

AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS PARA A
CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS

LUIZ HUMBERTO GOMES

BIÓLOGO

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Agronomia, Área de
concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Agosto - 1995

**AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS PARA A
CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS**

LUIZ HUMBERTO GOMES

Aprovado em 26/10/1995

Comissão Julgadora:

Prof.Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

ESALQ-USP

Prof.Dr. Luiz Eduardo Gutierrez

ESALQ-USP

Prof .Dr. Fernando Carlos Pagnoca

UNESP - Rio Claro



Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

Orientador

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares da ESALQ-USP pela orientação e apoio em todos esses anos.

- Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna da UCS pela amizade e todos os ensinamentos.

- Keila Maria Roncato Duarte pelo companheirismo.

- Prof. Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho da ESALQ-USP pela amizade e apoio.

- Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho da ESALQ-USP e a pesquisadora Luciana C. A. Regitano da EMBRAPA- CPPSE pelo apoio e confiança.

- Profa. Dra. Marisa Vieira de Queiroz pela colaboração.

- Ana Maria Brancalion Giacomelli , Juan Lucas Argueso, Thais Priscila de Souza e Silva e Regina Celia Poli pela colaboração neste trabalho e amizade.

- A CAPES pelo apoio e concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 - Leveduras utilizadas.....	20
3.2 - Preparo das amostras para eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE)	21
3.3 - Eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) - vertical	23
3.3.1 - Soluções estoque para gel de SDS-Page.....	23
3.3.2 - Montagem e vedação do suporte.....	24
3.3.3 - Preparo dos géis.....	25
3.4 - Coloração de prata para gel de eletroforese	

SDS-Page vertical.....	27
3.4.1- Soluções para coloração de prata.....	27
3.4.2 - Método de coloração com prata.....	29
3.5 - Leitura dos géis de eletroforese de proteínas totais.....	30
3.6 - Meios diferenciais para leveduras.....	30
3.6.1 - Corantes utilizados.....	31
3.7 - Separação de cromossomos de leveduras CHEF	32
3.7.1 - Soluções estoque para separação de cromossomos.....	32
3.7.2 - Método para separação de cromossomos.....	33
3.7.3 - Gel para separação de cromossomos de leveduras.....	34
3.8 - RAPD em leveduras.....	34
3.8.1 - Isolamento de DNA de leveduras.....	36
3.8.1.1- Rompimento das células.....	36
3.8.1.2- Desproteínização.....	37
3.8.1.3- Precipitação dos ácidos nucleicos.....	37

3.8.1.4- Tratamento com RNase.....	38
3.9 - Método de análise de dados.....	39
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 - Meios diferenciais.....	40
4.2 - Eletroforese de proteínas totais SDS-PAGE.....	46
4.3 - Separação de cromossomos em levedura (CHEF)...	55
4.4 - RAPD em levedura.....	62
5 -CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
APÊNDICE.....	87

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 - Teste de assimilação de corantes pelas 10 linhagens. A disposição das linhagens em cada placa é de cima para baixo, da direita para a esquerda: IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC, AN, KA, BR e SK.....	42
2 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de absorção de corantes entre as linhagens da indústria alcooleira, onde L1-IZ1904, L2-M300A-10, L3 - FF, L4 - ITAIQUARA e L5 - M304-2C.....	44
3 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de absorção de corante entre as linhagens da indústria cervejeira, onde L1-SC, L2-AN, L3-KA, L4-BR e L5-SK.....	45
4 - Perfil de bandas apresentado pelas linhagens da indústria alcooleira, onde P - PADRÃO, A -IZ1904, B - M300A-10, C - FF, D - ITAIQUARA e E - M304-2.....	48

- 5 - Perfil de bandas apresentado pelas linhagens da indústria cervejeira, onde P-PADRÃO, A-SC, B -AN, C-KA, D-BR e E-SK.....48
- 6 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de eletroforese de proteínas entre as linhagens da indústria alcooleira, onde L1 - IZ1904, L2 - M300A-10, L3 - FF, L4 - ITAIQUARA e L5 - M304-2C.....53
- 7- Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de eletroforese de proteínas entre as linhagens da indústria cervejeira, onde L1-SC, L2-AN, L3-KA, L4-BR e L5 -SK.....53
- 8 - Separação de cromossomos pelo método CHEF, onde temos da esquerda para direita, IZ1904, M300A-10,FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC,AN, KA, BR e SK.....56
- 9 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método CHEF de separação de cromossomos, entre as linhagens da indústria alcooleira, onde L1-IZ1904, L2 - M300A-10, L3 - FF, L4 - ITAIQUARA e L5 - M304-2C.....59
- 10 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método

- do CHEF de separação de cromossomos, entre as linhagens da indústria cervejeira, onde L1 - SCHINCA-RIOL, L2- AN,L3- KA, L4 -BR e L5 -SK.....60
- 11 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA. (A) OPB-2, (B) OPB-12, (C) OPB-13, (D) OPB-20 onde tem-se da esquerda para direita, PADRÃO, IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC, AN,KA, BR e SK.....63
- 12 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA. (E) OPB-10, (F) OPB-17, (G) OPB-11, onde tem-se da esquerda para direita, PADRÃO, IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA,M304-2C,SC, KA, BR e SK.....64
- 13 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de RAPD em leveduras, entre as linhagens da indústria alcooleira, onde L1- IZ1904, L2- M300A-10, L3 - FF, L4 - ITAIQUARA e L5 - M304-2C.....68
- 14 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de RAPD em leveduras,entre as linhagens da indústria cervejeira, onde L1-SC, L2-AN, L3-KA, L4-BR e

L5 -SK.....	69
15 - Dendrograma de similaridade apresentado pela união dos quatro métodos, entre as linhagens da indústria alcooleira, onde L1- IZ1904, L2- M300A-10, L3 - FF, L4 - ITAIQUARA e L5 - M304-2C.....	71
16 - Dendrograma de similaridade apresentado pela união dos quatro métodos, entre as linhagens da indústria cervejeira, onde L1- SC, L2- AN, L3 - KA, L4 - BR e L5 -SK.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA	PÁGINA
1 - Teste de assimilação de corantes pelas 10 linhagens. (X) absorção de corantes durante o crescimento e (0) não absorção.....	43
2 - Diagrama das linhagens da indústria alcooleira analisadas por SDS-PAGE.....	49
3 - Diagrama das linhagens da indústria cervejeira analisadas por SDS-PAGE.....	50
4 - Organização das bandas de cromossomos das linhagens da indústria alcooleira de acordo com sua migração no gel.....	57
5 - Organização das bandas de cromossomos das linhagens da indústria cervejeira de acordo com sua migração no gel.....	58

AVALIAÇÃO DE QUATRO MÉTODOS
PARA A CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS

Autor: Luiz Humberto Gomes

Orientador: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

RESUMO

Este trabalho teve por objetivos comparar a eficiência de quatro métodos na caracterização de linhagens de leveduras industriais, a fim de estabelecer um padrão a ser seguido na caracterização da levedura utilizada no processo fermentativo, e por consequência a verificação de possíveis contaminações que possam ocorrer. As linhagens utilizadas para este trabalho foram IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C pertencentes à indústria alcooleira e SC, AN, KA, BR e SK pertencentes à indústria cervejeira. Os métodos utilizados foram meios diferenciais, eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE), separação de cromossomos (CHEF) e RAPD. Todos os métodos mostraram-se eficientes na

diferenciação das linhagens da indústria cervejeira, pois se tratam de linhagens pertencentes a espécies diferentes. Já no caso das linhagens da indústria alcooleira, que apresentam uma alta similaridade, sendo todas as cinco pertencentes à mesma espécie (*Saccharomyces cerevisiae*), houve diferença na sensibilidade dos métodos, mostrando vantagens de uns em relação aos outros.

EVALUATION OF FOUR METHODS FOR YEAST CHARACTERIZATION

Author: Luiz Humberto Gomes

Adviser: Prof. Dr. Flavio Cesar Almeida Tavares

SUMMARY

This work had the objective to compare the efficiency of four methods used to identify industrial yeast strains, to establish a pattern for yeast characterization to be used during the process, so permitting detection of contamination that may occur. The yeast strains utilized were IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C used by the alcohol industry and SC, AN, KA, BR and SK used in the brewing industry. The methods used were differential culture media, total protein electrophoresis (SDS-PAGE), CHEF chromosome separation, and RAPD. For identification of brewing

yeast , all the methods were efficient, since the strains come from different species. For the alcohol strains, that showed high level of similarity, being all the five strains from the same specie, there were differences in the method sensibilities, some showing advantages over others.

1 - INTRODUÇÃO

A identificação de leveduras consiste em caracterizá-las de forma inequívoca e as distinguir, mesmo quando suas células estão misturadas. As metodologias aplicadas à identificação, tem a finalidade principal de classificar taxonomicamente as espécies. Contudo, elas tem destacada aplicação na indústria de fermentações, onde aliás tiveram a sua origem (HANSEN, 1987).

As leveduras e outros microrganismos após isolamentos do ambiente, seja natural ou em cultivo artificial, são comumente identificados e classificados empregando-se meios de cultivo especiais. Assim, determinam-se amplo espectro de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Seguindo-se a comparação com organismos padrão e ocasionalmente a avaliação de propriedades tecnológicas, conclui-se a classificação e eventualmente a identificação do microrganismo. Métodos para condução de tais testes são padronizados e descritos por BARNETT *et al* (1986) e KREGER-VAN RIJ (1987).

O trabalho de laboratório necessário para realização destes testes é bastante complexo e geralmente não se obtém um resultado antes de uma ou duas semanas, sendo ainda necessário uma análise e interpretação dos resultados por pessoal especializado. Frequentemente, mesmo com uma rígida observância das condições em que se avaliam as propriedades das leveduras, pode-se ainda obter resultados insatisfatórios.

Por este motivo deve-se considerar que qualquer variação dos resultados, obtidos pela técnica usada ou pela variação de linhagens, podem resultar em identificação totalmente errada (EGUCHI *et al*, 1991). Assim existem espécies antes distintas e que atualmente, com base em critérios genéticos são consideradas a mesma espécie, como descrevem VAN VUUREN & VANDER MEER (1987), as espécies *Saccharomyces uvarum*, *S. bayanus* e *S. calshbergensis*, hoje todas *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma das metodologias mais eficientes na identificação de leveduras foi descrita por BARNETT (1960) e baseia-se em uma grande quantidade de testes de assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em condições de aerobiose e anaerobiose, os quais demandam muito tempo para a identificação e diferenciação das linhagens, o que justifica a busca de metodologia mais eficiente e rápida na identificação de

leveduras, tendo em vista a importância econômica destes organismos em processos industriais.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar quatro metodologias para a classificação de leveduras, buscando estabelecer um padrão de análise, o qual possa ser aplicado nas indústrias para um monitoramento e controle da levedura utilizada.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Diversas metodologias tem sido desenvolvidas para a obtenção de sistemas mais simples e rápidos para identificação de leveduras, como a sorologia para complementação ao método descrito por BARNETT(1960) feita por TSUCHIYA *et al* (1965), análise da parede celular de leveduras por ressonância magnética (GORIN & SPENCER, 1970), análise do sistema de coenzima Q (YAMADA *et al*, 1976), conteúdo de bases nitrogenadas (KURTZMAN & PHAFF, 1987), bioluminescência (MILLER & GALSTON, 1989), propriedades genéticas modificáveis (THORNTON & BUNKER, 1989), conteúdo de trealose (GUTIERREZ, 1990) propriedades dos ácidos graxos (BENDO VÁ *et al*, 1991), movimento de prótons e transporte de açúcares (KILIAN *et al*, 1991), efeito inibitório de diferentes compostos (SIMPSON *et al*, 1992).

Alguns autores utilizaram a presença de corantes no meio para diferenciação das linhagens de leveduras. HALL (1971) utilizou três meios diferenciais WLN-Wallerstein Laboratories' Nutrient Agar, com variação da

fonte de nitrogênio (WLN-DIFCO-casitona, WLN-OXOID-peptona-triptona e WLN com caseína hidrolisada) para detecção de contaminantes em cervejarias e concluiu que o método se mostra eficiente somente para algumas linhagens, já que existem grupos de linhagens que apresentam a mesma coloração.

LIN (1975) utilizou cinco meios diferenciais para a detecção de leveduras selvagens na indústria de cerveja. Os meios utilizados foram: meio actidiona, meio de lisina, meio de cristal violeta, SDM (Schwarz Differential Medium) e meio de Lin ,desenvolvido por ele mesmo, onde demonstrou que a utilização de apenas um meio ou método não foi suficiente para a detecção de leveduras selvagens na fermentação. Com estes meios foi possível a diferenciação de cinco espécies do gênero *Saccharomyces* e outras quinze espécies de leveduras.

LONGLEY et al (1978) utilizaram todos os meios seletivos citados por LIN (1975) com a adição de ergosterol e tween 80 e condições de aerobiose e anaerobiose para diferenciação de linhagens de *Saccharomyces* e outras leveduras. Com este método conseguiram diferenciar 12 linhagens pertencentes a sete espécies de *Saccharomyces* e outros seis gêneros diferentes.

OLIVEIRA & PAGNOCCA (1988) utilizaram meios de cultura diferenciais para identificação de contaminantes na indústria alcooleira, onde afirmaram que o meio WLN não se mostrou adequado para o monitoramento microbiológico de contaminantes, a não ser quando se trabalha somente com *Saccharomyces cerevisiae*.

DEGRÉ et al (1989) utilizaram seis métodos para identificação de leveduras de vinho (fermentação e assimilação de açúcares, eletroforese de proteínas, toxina Killer, análise de ácidos graxos voláteis, separação de cromossomos-FIGE e DNA Fingerprinting), mostrando as vantagens e desvantagens de cada método, sugerindo ainda que somente um método não é capaz de diferenciar claramente as linhagens de *Saccharomyces spp.* .

TAVARES et al (1992) também fizeram uma comparação de três métodos (isoenzimas, eletroforese de proteínas totais e DNA fingerprinting) para a identificação de leveduras da indústria alcooleira pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae* e concluíram que os três métodos são eficazes para a identificação de linhagens da mesma espécie e com isso permitem distinguir variações do próprio fermento ou aquela devido a contaminações.

Alguns progressos foram alcançados a fim de simplificar os métodos para identificação de leveduras. Diversos testes como "kits" de diagnóstico "easy-to-use" são disponíveis comercialmente (LIN & FUNG , 1987; DEAK & BEUCHAT, 1987) embora estes "kits" cubram uma margem limitada de testes de assimilação de carbono e nitrogênio, utilizadas para algumas espécies de leveduras de importância médica, não sendo indicadas para identificação de leveduras de um modo geral.

O sistema API-20, baseado em testes de assimilação de 49 fontes de carbono e testes de fermentação, tem sido atualmente muito utilizado embora tenha sido idealizado para identificação de bactérias (SUBDEN *et al*, 1980; FUCHS & DOLAN, 1982), sendo portanto necessárias diversas modificações do método, como testes de assimilação de nitrogênio essenciais para identificação de leveduras.

HEARD & FLEET (1990) descreveram um método em microplacas para identificação de 18 espécies de leveduras, baseados em testes de fermentação com 12 carboidratos diferentes, 33 testes de assimilação de carbono e seis testes de assimilação de nitrogênio, utilizando ainda, crescimento em meio livre de vitaminas, crescimento na presença de ciclohexamida, testes de esporulação e morfologia. As vantagens deste

método quando comparado com os descritos anteriormente são a quantidade de meio utilizado para a realização dos testes, que é bem menor, além dos resultados serem obtidos em 2 a 3 dias.

Já ROHM & LECHNER (1990) e ROHM et al (1991) utilizando uma quantidade maior de fontes de carbono, conseguiram identificar uma diversidade maior de espécies de leveduras (38 espécies), mas ainda este tipo de metodologia carrega consigo o mesmo problema dos anteriores, ou seja os resultados dependem de pessoal altamente especializado e condições perfeitamente padronizadas.

AUTIO & MATTILA-SANDHOLM (1992) desenvolveram um método de detecção de células de leveduras em fatias congeladas de massas destinadas a indústria de panificação, que se baseia na absorção do corante DAPI (4',6 - diamidino-2-fenilindol) cujas células de leveduras se apresentam amarelas em contraste com a massa que se apresenta vermelha.

ERICKSON (1992) desenvolveu um método baseado em filtração de membrana hidrofóbica para seleção e diferenciação de leveduras especialmente *Zygosaccharomyces bailii* em alimentos acidificados do tipo picles e suco de frutas concentrados e pasteurizados . Com este método

também foi possível a detecção de outras leveduras como *Pichia spp.* e *Hansenula spp.*

Atualmente métodos de separação de cromossomos tem sido bastante utilizados para identificação de linhagens de leveduras. CARLE & OLSON (1984 e 1985) utilizaram o método de "orthogonal-field-alternation gel electrophoresis " (OFAGE) afim de estabelecerem um padrão de bandas para *Saccharomyces cerevisiae*.

Com o método foram detectadas 12 bandas sendo que 9 bandas correspondendo a um cromossomo cada e 3 bandas contendo 2 cromossomos em cada uma, totalizando os 15 cromossomos da espécie.

Em outro trabalho, CARLE et al (1986) utilizaram gel bidimensional de separação de cromossomos visando demonstrar a existência de mais de um cromossomo em algumas bandas .

Na primeira dimensão foi utilizado o método OFAGE e o mesmo gel submetido a uma segunda corrida pelo método FIGE "field inversion gel electrophoresis". Com isso confirmaram que realmente as 3 bandas contém 2 cromossomos cada.

JONGE et al (1986) utilizando o mesmo método (OFAGE) estabeleceram padrões de bandas de 22 ascomicetos e 4 basidiomicetos. Tal

estudo permitiu estabelecer que o padrão apresentado pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* é o único que apresenta no mínimo 4 bandas abaixo de 500 kb, em contra partida com as outras 25 linhagens que apresentam a maioria de suas bandas acima de 1000 kb.

O método de separação de cromossomos por eletroforese de campo pulsado ("pulsed field gel electrophoresis" - PFGE) tem sido bastante utilizado por diversos autores como McCLUSKEY et al (1990) que estabeleceram cariótipos bastante precisos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Ustilago hordei*, *Tilletia caries* e *T. controversa*, utilizando células intactas para execução do método. Tal procedimento foi também utilizado por IBEAS & JIMENEZ (1993), que demonstraram a eficiência do método de "contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis" (CHEF), mesmo sem a esferoplastização das células antes da inclusão nos "plugs"(blocos de agarose).

SHEEHAN & WEISS (1991) utilizaram o método de CHEF para identificar a presença de leveduras poliplóides na indústria cervejeira, pois, a presença das mesmas causam alteração no sabor e aroma da cerveja. Com a utilização do método, foi possível encontrar padrões de 16 bandas para *Saccharomyces cerevisiae*, detectando ploidia da linhagem quando

comparada com a original do estoque. Relataram ainda problemas com o método, o qual não apresentou uma repetibilidade satisfatória.

MEADEN (1989) fez uma comparação entre 6 métodos utilizados para a avaliação da diversidade de leveduras em cervejarias, sendo eles: ("DNA fingerprinting" , "contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis" (CHEF), "field inversion gel electrophoresis" (FIGE), "orthogonal field alternation gel electrophoresis" (OFAGE), "pulsed field gel electrophoresis" (PFGE) e "transverse alternating field electrophoresis" (TAFE), na qual demonstrou a ineficiência dos cinco métodos baseados na separação de cromossomos em relação a eficiência do método de "DNA fingerprinting", salientando ainda que o TAFE não garante a suficiente diversidade existente entre linhagens de cervejaria ,como também descrito por CASEY et al. (1988).

HAWTHORNE & PHILIPPSEN (1994) utilizaram o método OFAGE para explicar a infertilidade de híbridos obtidos de cruzamentos entre linhagens esporuladas de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* e *S. douglasii*, onde detectaram a ausência de alguns cromossomos homólogos.

LINK & OLSON (1991) construíram um mapa físico do genoma de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o método CHEF para a

separação de cromossomos e hibridização DNA-DNA para a construção do mapa.

PEDERSEN (1986a) utilizou o método de OFAGE para separação de cromossomos, em seguida, hibridizou os cromossomos separados com duas sondas distintas. Com isso criou um padrão de diferenciação entre as 14 linhagens mais utilizadas nas cervejarias (*Saccharomyces bayanus*, *S. capensis*, *S. carlsbergensis*, *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. diastaticus*, *S. ellipsoideus*, *S. inusitatus*, *S. italicus*, *S. monacensis*, *S. norbensis*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* e *Zygosaccharomyces fermentati*), o que não havia conseguido anteriormente somente com a separação de cromossomos.

PEDERSEN (1986b) utilizando o método de OFAGE e hibridização de DNA-DNA encontrou alta homologia entre o cromossomo III de *Saccharomyces bayanus*, *S. uvarum* e *S. carlsbergensis*.

NAUMOV et al (1992) utilizaram o método de PFGE para confirmação da homologia entre *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. bayanus* através de cariótipos eletroforéticos.

Eletroforese constitui-se numa técnica que permite a separação de macromoléculas eletricamente carregadas em uma solução, quando a esta

é aplicada uma diferença de potencial. Diversos sistemas tem sido desenvolvidos para facilitar estudos de caracterização de espécies, estando entre elas a técnica de SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970 e MATSUOKA et al, 1988).

Cultura de leveduras da indústria de bebidas alcoólicas são usualmente caracterizadas pela morfologia de célula e colônia, testes fisiológicos e habilidade de flocular ou formar um filme (KUNKE & AMERINE, 1970), contudo estes critérios não são mais confiáveis para a identificação correta de linhagens. Padrões eletroforéticos tem sido usados para o estudo da variação genética em plantas, animais e microrganismos (KERSTERS & DE LEY, 1980).

VAN VURREN & VAN DER MEER (1987) analisaram através de SDS-PAGE 27 linhagens de *Saccharomyces* utilizadas comercialmente para a produção de vinho e duas linhagens usadas na fermentação de cerveja. O padrão de bandas proteicas foi usado como um "fingerprinting" das linhagens. Diferentes grupos genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* foram distinguidos. O padrão de proteína das linhagens dentro de cada grupo apresentou uma alta correlação confirmando

que *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces uvarum* e *Saccharomyces carlsbergensis* são sinônimos de *Saccharomyces cerevisiae* .

A caracterização de linhagens de leveduras utilizadas na indústria cervejeira foi feita através do método de eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) e análise numérica de proteínas totais solúveis, como realizado por VAN VURREN & VAN DER MEER (1988) onde 33 linhagens de cervejaria foram diferenciadas e classificadas num dendrograma de similaridade . Três grupos foram obtidos: no grupo I, 21 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram agrupadas representando as maiores cervejarias, mostrando assim que existe uma padronização no tipo de linhagem utilizada. No grupo II foram agrupadas duas leveduras de cerveja com sabor fenólico e no grupo III foram agrupadas duas leveduras de cerveja do tipo "trappisten" e duas do tipo "top ale", e outras seis linhagens não se ligaram a nenhum grupo.

HOLMES et al (1990) utilizaram o método de eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) para a identificação de 32 bactérias pertencentes ao grupo das *Achromobacter* de interesse clínico e o método demonstrou satisfatória diferenciação entre as linhagens quando comparadas ao organismo padrão.

TAVARES et al (1992) estabeleceram que o método de eletroforese de proteínas apresenta satisfatória diferenciação entre linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um método rápido e fácil na detecção de contaminantes da fermentação.

A detecção e exploração de sequências de polimorfismos de DNA ocorridos naturalmente representa um dos mais significantes desenvolvimentos na biologia molecular. A forma de polimorfismo chamada amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD) tem sido bastante utilizada principalmente pela vantagem de ser simples e rápido.

A modificação da base da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite RAPDs é extremamente simples. Ao invés de usar uma cadeia bastante longa e cuidadosamente escolhida para amplificar uma sequência de DNA, um "primer" bastante curto de oligonucleotídeos (10 mer), o qual se liga a muitos diferentes loci, é usado para amplificar sequências ao acaso de DNAs bastante complexos, como o genoma de plantas. Com isso a técnica de RAPD constitui-se em um sistema útil de monitoramento de níveis de diversidade detectáveis entre e dentro de populações (WAUGH & POWELL ,1992).

WILLIAMS et al (1990) foram o primeiro grupo a utilizarem o método de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) com a finalidade de simplificar a construção de mapas genéticos moleculares até então feitos pelo método de RFLP. Neste trabalho mostraram diferenças de amplificação de duas variedades de soja para 11 "primers" e compararam os resultados com os obtidos com o método de RFLP, mostrando que o método de RAPD é muito eficiente.

WELSH & McCLELLAND (1990) utilizaram a metodologia de PCR, usando "primers" ao acaso nas amplificações a fim de distinguir linhagens através de polimorfismo em "fingerprints" genômicos. Com isso, foi possível diferenciarem 24 linhagens de cinco espécies de *Staphilococcus*, 11 linhagens de *Streptococcus pyogenes* e três variedades de arroz (*Oryza sativa*). Este tipo de RAPD realizado foi chamado por eles de AP-PCR. (PCR com "primer" arbitrário).

LEHMANN et al (1992) utilizaram RAPD para melhor caracterizar diferenças genotípicas entre espécies de *Candida* de importância médica. Foram utilizados "primers" pequenos (com até 10 mers), com sequências arbitrárias e resultaram em reações capazes de distinguir isolados de *Candida albicans*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis* e

Torulopsis glabrata. A análise do RAPD permitiu construir um painel de homologia fisiológica de *Candida parapsilosis*, classificando as linhagens em 3 grupos distintos e mostrou diversidade genética dentro de isolados de *C. haemulonii*.

WAUGH & POWELL (1992) fizeram uma revisão sobre o método de RAPD e o comparou com o método de RFLP demonstrando as seguintes características:

	RFLPs	RAPDs
Partes do genoma analisado	baixas copias de regiões codificantes	todo o genoma
Dificuldade técnica	intermediária	baixa
Qualidade do DNA	puro	bruto
Quantidade de DNA	2-10 µg	10-50 ng
Uso de radioisótopos	sim	não
Tipo de sonda	Específico	ao acaso

HEUN & HELETJARIS (1992) utilizaram o método de RAPD para diferenciação de 16 híbridos F1 de milho e seus respectivos parentais utilizando 21 "primers", os resultados os deixaram em dúvida pois não conseguiram repetibilidade nas amostras e sugeriram que o método é

eficiente mas deve sempre ser acompanhado de outro método. KEIM et al 1989 trabalhando com soja e tomate obtiveram os mesmos problemas.

PENNER et al 1993 testaram a reprodutibilidade do método de RAPD trabalhando em conjunto com mais seis laboratórios , onde, em todos os laboratórios foram utilizados os mesmos cinco "primers" contra o DNA de dois cultivares de aveia , chegando a conclusão de que apesar da complexidade da reação o método pode ser feito em laboratórios diferentes com os mesmos resultados, inclusive com a utilização de termocicladores de marcas diferentes.

HALEY et al (1993) trabalharam com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) atacado por ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.)), a fim de determinarem os genes envolvidos com a resistência da planta a doença e estabelecimento da doença, utilizando a técnica de RAPD para marcar e mapear estes genes. Através deste trabalho, foi possível identificar linhagens e populações de feijão suscetíveis a este patógeno, realizando, assim, um trabalho de "limpeza" de populações que carregavam estes genes. Este trabalho mostra uma utilização bastante prática e bastante útil da técnica de RAPD na identificação de genes de interesse em linhagens e segregantes.

De acordo com GOMES et al (1995) o método de RAPD permite distinguir a linhagem de levedura padrão dentre outras que possam, por exemplo contaminar a fermentação na indústria alcooleira.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Leveduras utilizadas

IZ-1904 (*Saccharomyces cerevisiae*) - Linhagem cedida pelo Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - ESALQ-USP.

FF (*Saccharomyces cerevisiae*) - Fermento biológico Fleischmann

ITAIQUARA (*Saccharomyces cerevisiae*) - Fermento biológico ITAIQUARA

M300A-10(*Saccharomyces cerevisiae*) - Linhagem industrial obtida no Departamento de Genética - Laboratório de leveduras - ESALQ-USP.

M304-2C (*Saccharomyces cerevisiae*) - Linhagem obtida no Departamento de Genética - Laboratório de leveduras - ESALQ-USP.

Colônias isoladas das leveduras pertencentes às cervejarias foram obtidas filtrando-se 100 ml de chope comercial em filtro Millipore de 0,22 μm estéril, o qual foi transferido para placa de petri contendo meio

YEPD sólido (contendo 100 ppm de tetraciclina e 100 ppm de penicilina) com a seguinte composição:

MEIO YEPD (Sólido)

1% de Extrato de Levedura

1% de Peptona

2% de Dextrose

2% de Agar

Adicionada água deionizada, o meio foi autoclavado a 1 atm por 15 minutos. As placas de cultivo foram mantidas em incubadora à 30° C por 24 horas. Cada linhagem isolada foi denominada pelas siglas: SC, AN, KA, BR e SK.

3.2 - Preparo das amostras para eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE)

O preparo das amostras foi feito de acordo com TAVARES et al (1992). As leveduras foram crescidas em 50 ml de meio YEPD líquido por 15 horas a 30° C sob agitação constante. Após o crescimento, 15 ml foram transferidos para tubos plásticos de 15 ml com tampa e centrifugado a 4000

g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular úmida transferida para um almofariz de 150 ml, onde foi adicionado aproximadamente 30 ml de N₂ líquido e a massa celular foi macerada com ajuda de um pistilo.

Após o maceramento foi adicionado ao almofariz 500 µl de água deionizada e o seu conteúdo totalmente transferido para um tubo de Eppendorf de 1,7 ml e o mesmo centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de Eppendorf de 1,7 ml onde foi adicionado 500 µl de Tampão da Amostra e esta mistura fervida em Banho Maria a 100° C por 5 minutos. O tampão de amostra, de composição abaixo, preparado em água deionizada deve ser guardado em geladeira. As amostras podem ser guardadas a -20° C.

TAMPÃO DA AMOSTRA

25% de Tris-HCl 0,5 M pH 6.8

2% de SDS (lauryl sulfato de sódio)

10 % de Glicerol

5% de 2-mercaptoetanol

1% de Solução de Azul de Bromofenol (0.1%)

3.3 - Eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) - vertical

3.3.1 - Soluções estoque para gel de SDS-PAGE

ACRILAMIDA

30% de Acrilamida

0,8% de Bis-Acrilamida

Preparado em água deionizada, guardado em frasco escuro na geladeira (5° C) . Esta solução tem vida útil de no máximo duas semanas.

TAMPÃO "Lower"

Tris-HCl 1,5 M pH 8.8 mais 0,2 % de SDS

O pH foi ajustado com HCl concentrado.

TAMPÃO "Upper"

Tris-HCl 0,5 M pH 6.8 mais 0.2% de SDS

O pH foi ajustado com HCl concentrado.

TAMPÃO DE CORRIDA 4X CONCENTRADO

1,2% de Tris-base

5,76% de Glicina

Este tampão foi diluído 1:3 em água deionizada e acrescentado 1% de SDS para o uso.

SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIO

10 % de persulfato de Amônio em água deionizada.

3.3.2- Montagem e vedação do suporte

O suporte de eletroforese vertical é constituído de duas partes: as placas de vidro(16.5 x 14.5 cm) e os espaçadores de 1 mm de espessura, os quais devem ser rigorosamente limpos antes do uso, lavando-se com detergente e retirando-se o resíduo dos mesmos com muita água corrente. Após a secagem dos vidros e espaçadores deve-se limpá-los com álcool etílico 96° GL.

Na montagem do suporte procedeu-se da seguinte forma:

- Os espaçadores foram colocados nas laterais entre as placas de vidro e presos com garras de metal, em seguida foram vedadas as laterais com ágar 1%. em água destilada.

3.3.3 - Preparo dos géis

Na eletroforese vertical SDS-PAGE foram utilizados dois tipos de géis adaptados do método de LAEMMLI (1970). O primeiro é o gel separador que foi preparado da seguinte forma:

GEL SEPARADOR A 10% de POLIACRILAMIDA

19,8 ml de acrilamida

30 ml de tampão "Lower"

8 ml de água deionizada

40 µl de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametil-etilenodiamina)

1 ml de persulfato de amônio a 10%

Em seguida o gel foi despejado no suporte até aproximadamente quatro centímetros da borda, e sobre o gel foi adicionado uma fina camada de água deionizada para evitar o contato com o ar.

Após a polimerização do gel separador a água foi retirada e foi adicionado o gel empilhador que foi preparado da seguinte forma:

GEL EMPILHADOR A 3% DE POLIACRILAMIDA

2 ml de acrilamida

10 ml de tampão "Upper"

7 ml de água deionizada

40 μ l de TEMED

600 μ l de persulfato de amônio a 10%

O Gel empilhador foi vedado com o pente de 10 dentes de 1 mm de espessura . Em seguida à polimerização retirou-se o pente e o espaçador inferior, as canaletas formadas pelo pente foram lavadas com água deionizada e o suporte fixado na cuba com garras de metal e vedado com solução de agar na parte superior entre suporte e a cuba.

As amostras foram adicionadas nas canaletas e cobertas com tampão de corrida, o qual também foi adicionado nas partes superior e inferior da cuba.

Uma canaleta ficou sempre reservada para a adição de 5 μ l do padrão de peso molecular (Pharmacia-LMW - COD. 17-0446-01) e a corrida foi conduzida a 80 volts e 40 mA no gel empilhador e 120 volts e 60 mA no gel separador. Proporções previamente definidas para dois géis de 1 mm.

3.4 - Coloração com prata para gel de eletroforese SDS-PAGE vertical.

3.4.1 - Soluções para coloração com prata

SOLUÇÃO FIXADORA

40% de Etanol P.A.

10% de Ácido Acético

Preparada em água deionizada.

SOLUÇÃO INCUBADORA

17 g de Acetato de Sódio 3 H₂O

75 ml de etanol 96° GL P.A.

1 g de Tiosulfato de Sódio

1,3 ml de Glutaraldeido a 25% (Deve ser adicionado somente na hora do uso)

O volume foi completado para 250 ml com água deionizada.

SOLUÇÃO DE PRATA

0,25 g de Nitrato de Prata

50 μ l de Formaldeido (Deve ser adicionado somente na hora do uso)

O volume foi completado para 250 ml com água deionizada.

SOLUÇÃO REVELADORA

6,25 g de Carbonato de Sódio

25 μ l de Formaldeido (Deve ser adicionado somente na hora do uso)

O volume foi completado para 250 ml com água deionizada.

SOLUÇÃO "STOP"

3,65 g de Sódio EDTA 2 H₂O

O volume foi completado para 250 ml com água deionizada. Obs: É importante manter o volume de 250 ml para gel de 1 mm, pois a redução deste volume interfere na nitidez da coloração.

3.4.2 - Método de coloração com prata

Escolheu-se a coloração com prata por apresentar sensibilidade suficiente para diferenciar linhagens bastante semelhantes, com uma boa definição das bandas. O método utilizado foi uma modificação dos métodos propostos por DION & PONENTI (1983), GOTTLIEB & CHAVKO (1986), baseados em PROUDMAN¹.

Após a corrida, o gel foi transferido para uma bandeja plástica com tampa contendo 250 ml de solução fixadora e deixado a temperatura ambiente durante a noite (aproximadamente 15 horas). A solução fixadora foi substituída por 250 ml da solução incubadora.

Após 15 minutos a solução incubadora foi retirada lavando-se o gel três vezes em água deionizada. Cada lavagem deve ser feita por 10 minutos e sob agitação constante. Adiciona-se ao gel a solução de prata por 20 minutos, após o que, esta é substituída por 250 ml de solução reveladora até o aparecimento das bandas. A solução reveladora foi descartada e adicionado a solução "stop" por 10 minutos, seguindo-se a lavagem do gel em água corrente por 2 horas. A água utilizada para esta lavagem não necessita ser deionizada nem destilada.

O gel foi conservado em solução de glicerol 10% em água.

¹ PROUDMAN, J.A. (USDA, Agricultural Research Service Germoplasm & Gamete Physiology Laboratory) Comunicação pessoal, 1994

3.5 - Leitura dos géis de eletroforese de proteínas totais

Os géis de poliacrilamida foram lidos em densitômetro HOEFER GS-300 (Hoeffer Scientific Instruments - San Francisco) a 0.5 mv , 0.22 cm/segundo , com 567 nm e os dados foram analisados com o programa GS-365-PC (compatível com IBM).

3.6 - Meios diferenciais para leveduras

A utilização de meios diferenciais foi uma adaptação do método de LIN (1975), onde adicionado-se ao meio YEPD sólido a quantidade pré-determinada do corante para não causar inibição do crescimento, mas acusar ou não a sua absorção. Assim, leveduras foram estriadas sobre o meio com ajuda de um palito tipo português e incubadas a 30° C em incubadora por 48 horas.

Todos os corantes utilizados foram preparados dissolvendo-se 100 mg do corante em 10 ml de etanol 96°GL P.A.

3.6.1 - Corantes utilizados

CORANTE	ESTOQUE	UTILIZADO EM 10 ML DE YEPD
Fucsina básica	100 mg/10ml	100 μ l
Azul do Nilo	100 mg/10ml	100 μ l
Violeta de Metila	100 mg/10ml	20 μ l
Purpura de Bromocresol	100 mg/10ml	100 μ l
Anilina Blue-Black	100 mg/10ml	100 μ l
Violeta Cristal	100 mg/10ml	20 μ l
Verde Brilhante	100 mg/10ml	50 μ l
Rose Bengal	100 mg/10ml	100 μ l
Fucsina ácida	100 mg/10ml	100 μ l

3.7 - Separação de cromossomos de leveduras CHEF

3.7.1 - Soluções estoque para separação de cromossomos

TAMPÃO DE CORRIDA TEB 10 X CONCENTRADO

Trisma base	500 mM
Ácido bórico	500 mM
EDTA sódico	25 mM

SOLUÇÃO DE EDTA 1M pH 8.0

O pH foi acertado com NaOH 5 N

TAMPÃO TRIS-HCl 1M pH 8,0

TAMPÃO NDS

Tris-HCl 0,5 M pH 8,0	2 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	90 ml
SDS	1 g

O volume foi completado com água deionizada para 100 ml, a proteinase K foi adicionada no momento do uso de acordo com a quantidade de NDS requerido.

3.7.2 Método de separação de cromossomos

As leveduras foram crescidas em 50 ml de meio YEPD(líquido) por 15 horas a 30°C sob agitação constante (150 rpm). Após este período centrifugadas em tubo cônico de 15 ml por 5 minutos a 4000g e lavadas três vezes com 10 ml de tampão EDTA 0,05 M pH 8,0. Após a terceira lavagem, as leveduras foram ressuspendidas em 10 ml de EDTA 0,05 M pH 8,0. Em seguida 600 µl da suspensão celular foram transferidos para tubo Eppendorf e misturadas com 600 µl de agarose LMP (baixo ponto de fusão) 1.4 % e transferidos para o molde do plug. Após solidificação do gel, os "plugs" foram transferidos para placas de culturas de células de 24 orifícios e tratados com tampão NDS (contendo 1mg/ml de proteinase K) à 52°C por 15 horas.(IBEAS & JIMENEZ, 1993)

Posteriormente ao tratamento, os "plugs" foram lavados três vezes (sendo cada lavagem de 15 minutos) com EDTA 0,05M pH 8,0 e uma

vez com tampão de corrida TEB 0,5 vezes concentrado (por 20 minutos). Após a lavagem, os "plugs" foram adicionados ao gel , e foram corridos por um tempo de 23 horas, sendo dividido em 15 horas com pulsos de 60 segundos e 8 horas com pulsos de 90 segundos à 200 volts e 14 °C utilizando o equipamento CHEF-DR II - Bio-Rad.

O gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/ml em água deionizada) por 20 minutos, descorado em água corrente por 40 minutos e fotografado.

3.7.3 - Gel para separação de cromossomos de leveduras

O gel foi preparado dissolvendo-se 1g de agarose para "pulse field" em cada 100 ml de TEB 10X (diluído 1:20 em água deionizada) e adicionado ao molde. Logo após sua geleificação foi transferido para cuba e coberto com TEB (diluído 1:20 em água deionizada) .

3.8 - RAPD em leveduras

As amplificações foram feitas em volume de 25 µl contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de KCl, 3,75 mM de MgCl₂ , 100 µM de cada um dos 4 desoxinucleotídeos, 30 ng de "primer" (10 bp), 40 ng de

DNA genômico e 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Gibco-BRL) segundo GOMES et al (1995).

A pré denaturação foi feita a 92^o C por 2 minutos seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 92^o C, 1 minuto a 37^o C e 2 minutos a 72^o C com uma extensão final de 3 minutos a 72^o C em termo ciclador PTC-100 da M J RESEARCH INC.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose (1,3% de agarose em tampão TBE) com 80 mA.

O gel foi corado com brometo de etídio (10 µg/ml em água deionizada) por 20 minutos, descorado em água corrente por 40 minutos e fotografado com filme polaroide 667 com filtro laranja, em transiluminador Macro Vue de 302 nm Pharmacia LKB Biotechnology (ref. 80-1316-50).

Os "primers" utilizados pertencem ao Kit B da OPERON TECHNOLOGIES, INC., sendo eles OPB-02(TGATCCCTGG), OPB-10 (CTGCTGGGAC), OPB-11(GTAGACCCGT), OPB-12 (CCTTGACGCA), OPB-13(TTCCCCCGCT), OPB-17(AGGGAACGAG) e OPB-20 (GGACCCTTAC).

3.8.1 - Isolamento de DNA de leveduras

A metodologia utilizada para isolamento de DNA foi adaptada do método descrito por JOHNSTON, 1988.

3.8.1.1 - Rompimento das células

As leveduras foram crescidas em 50 ml de YEPD (líquido) por 15 horas a 30° C sob agitação constante. Após o crescimento, o volume total foi transferido para tubos de 100 ml e centrifugado a 4000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa celular úmida transferida para um almofariz de 150 ml, onde foi adicionado aproximadamente 30 ml de N₂ líquido e a massa celular foi macerada com ajuda de um pistilo.

Em seguida, foi adicionado ao almofariz 3 ml de Tris-HCl 0,1M pH 8.0 . 1200 µl foram transferidos para dois tubos Eppendorf de 1,7 ml (600 µl em cada) e adicionados de 75 µl de solução de SDS 10% mais 60 µl de 2- Mercaptoetanol, sendo os tubos agitados lentamente até que a solução se torne viscosa.

3.8.1.2 - Desproteínização

Adicionou-se então o mesmo volume de clorofane (fenol-clorofórmio-álcool iso-amílico na proporção 25:24:1 v/v) aos tubos, os quais foram agitados lentamente por inversão durante 10 minutos e centrifugados a 12000 g por 10 minutos.

Em seguida a centrifugação a parte superior da solução foi transferida para outro tubo com a ajuda de uma micropipeta de 100 µl e a parte inferior descartada. Este passo foi repetido por 3 vezes sendo que na última vez, o clorofane foi substituído por clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v).

3.8.1.3 - Precipitação dos ácidos nucleicos

Aos tubos contendo o material desproteínizado foram adicionados 5% do seu volume com solução de Acetato de Sódio 3M e o dobro de seu volume com etanol 96° GL gelado a -20°C.

Com os ácidos nucleicos precipitados, o sobrenadante foi retirado com muito cuidado por inversão e os tubos deixados invertidos em B.O.D. à 30°C por 30 minutos para a evaporação total do etanol.

Após a evaporação do etanol o precipitado foi ressuspendido em 1ml de tampão TE .

TAMPÃO TE 10 X CONCENTRADO

Tris-HCl pH 8.0 100 mM

Na₂EDTA 10mM

3.8.1.4 - Tratamento com RNase

Foi adicionado 20 µl de solução de RNase (10 mg/ml) ao material ressuspendido em 1 ml de TE e deixado em banho maria à 37° C por 1 hora.

Após 1 hora o material foi desproteinizado uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) , a parte superior foi coletada com ajuda de uma micropipeta de 100 µl e transferida para outro Eppendorf de 1,7 ml.

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho GENE-QUANT Pharmacia.

3.9 - Método de análise dos dados

Todos os dados foram analisados pelo programa NTSYS-pc versão 1.70 (Applied Biostatistics, 1992). Para a formação das matrizes foi utilizado o método de similaridade qualitativa com o coeficiente SM e para a formação dos dendrogramas as matrizes foram analisadas pelo método "SAHN-Clustering" (desempenho sequencial de aglomeração hierárquica de grupos) com o coeficiente UPGMA (método de agrupamento pareado sem peso com significado aritmético).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Meios diferenciais

Os meios diferenciais tem sido extensivamente utilizados tanto na classificação como na identificação de leveduras HALL (1971). A sua aplicação está fundamentada principalmente no levantamento de populações industriais, por apresentar fundamentalmente um baixo custo e simplicidade de execução do método LIN (1975) , LONGLEY et al (1978) e OLIVEIRA & PAGNOCCA (1988) .

De acordo com o método descrito acima, cinco leveduras de utilização da indústria alcooleira apresentaram um comportamento similar em todos os corantes. Houve absorção dos corantes em meios contendo fucsina básica, violeta de metila, púrpura de bromocresol, violeta cristal, rose bengal e fucsina ácida e não absorção em meio com azul do nilo, anilina blue-black e verde brilhante. Já as cinco leveduras de utilização da indústria cervejeira apresentaram um comportamento completamente

desuniforme, existindo semelhança de absorção entre as leveduras SC e KA em meio contendo verde brilhante e rosa de bengala e não absorção para os demais corantes. A linhagem AN apresenta absorção para os corantes fucsina básica, rosa de bengala e fucsina ácida e não absorção para os demais. A linhagem BR absorveu os corantes fucsina básica, rosa de bengala, fucsina ácida, violeta de metila e violeta cristal. A linhagem SK absorveu todos os corantes menos violeta cristal, como apresentado na Tabela 1 e Figura 1.

Os dados obtidos dos corantes foram utilizados para compor o dendrograma da Figura 2. Todas as leveduras da indústria alcooleira foram agrupadas em um só grupo com 100% de similaridade, pois não houve diferença entre elas na absorção dos nove corantes utilizados durante o crescimento.

Placa C - Controle

Placa 1 - Fucsina básica

Placa 2 - Azul do Nilo

Placa 3 - Violeta de Metila

Placa 4 - Púrpura de Bromocresol

Placa 5 - Anilina Blue/Black

Placa 6 - Violeta Cristal

Placa 7 - Verde Brilhante

Placa 8 - Rosa de Bengala

Placa 9 - Fucsina Ácida

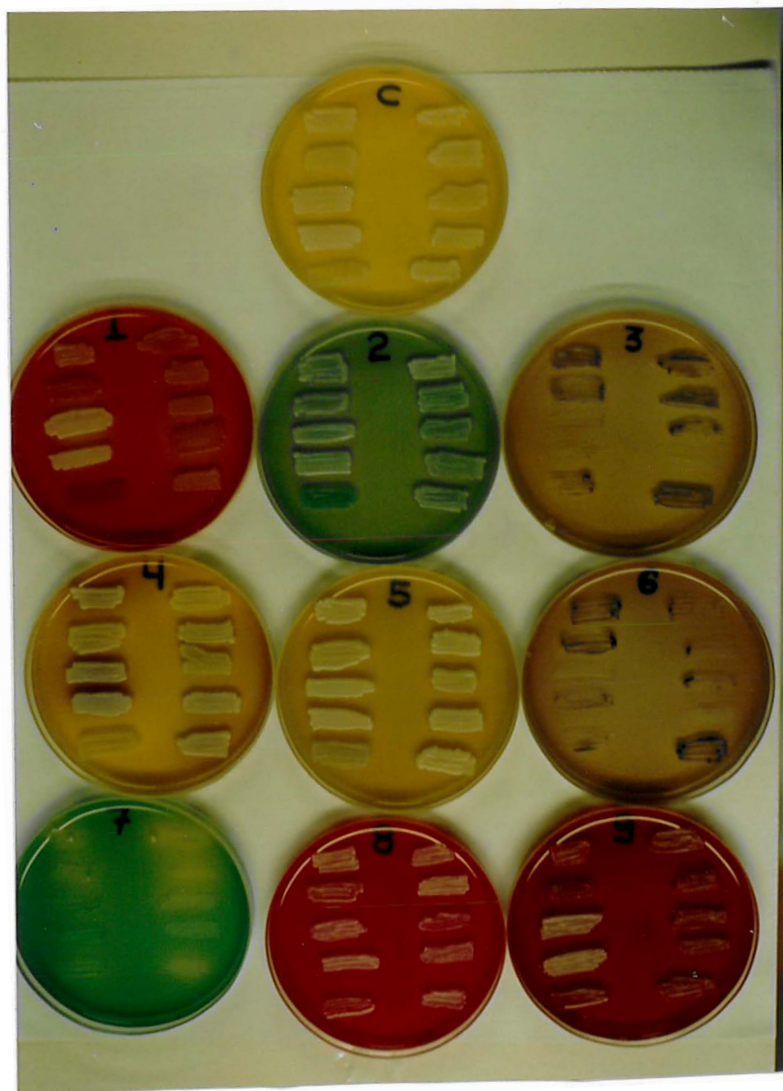


Figura 1 - Teste de assimilação de corantes pelas 10 leveduras. A disposição das leveduras em cada placa é de cima para baixo, da direita para esquerda: IZ1904, M300-A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC, AN, KA, BR E SK.

Tabela 1 - Teste de assimilação de corantes pelas 10 Linhagens

LINHAGENS CORANTES	IZ 1904	M300A-10	FF	ITAQUARA	M6042C	SC	AN	KA	BR	SK
FUCHSINA BÁSICA	X	X	X	X	X	O	X	O	X	X
AZUL DO NILO	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X
VIOLETA DE METILA	X	X	X	X	X	O	O	O	X	X
PURPURA BROMOCRESOL	X	X	X	X	X	O	O	O	O	X
ANILINA BLUE/BLACK	O	O	O	O	O	O	O	O	O	X
VIOLETA CRISTAL	X	X	X	X	X	O	O	O	X	O
VERDE BRILHANTE	O	O	O	O	O	X	O	X	O	X
ROSE BENGAL	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FUCHSINA ÁCIDA	X	X	X	X	X	O	X	O	X	X

(X) absorção

(O) não absorção

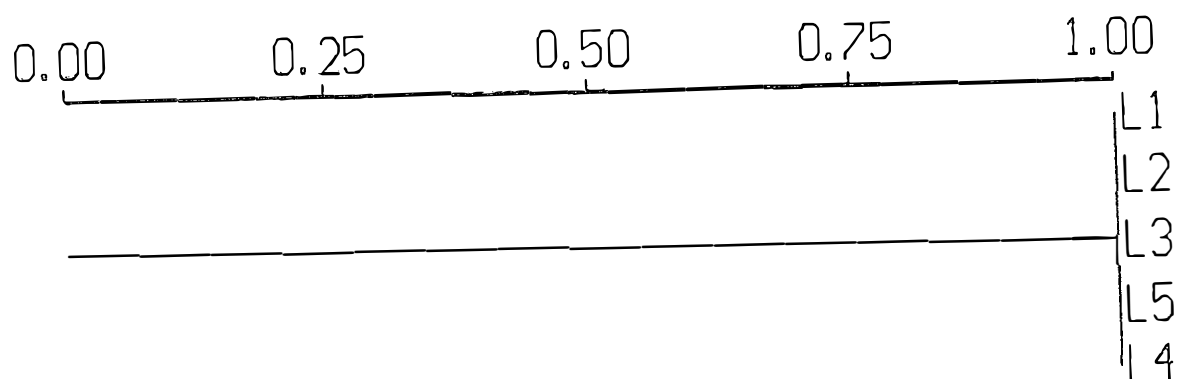


Figura 2 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de absorção de corantes entre as leveduras da indústria alcooleira, onde L1(IZ1904), L2(M300A-10), L3(FF), L4(ITAIQUARA) e L5(M304-2C)

Já no caso das leveduras da indústria cervejeira, o dendrograma da Figura 3, apresenta a formação de 3 grupos distintos, onde as leveduras SC e KA estão no mesmo grupo, pois não apresentam diferenças no padrão de absorção de corantes, sendo classificadas como uma única linhagem com 100% de similaridade.

As leveduras AN e BR estão em um segundo grupo apresentando um padrão de 77,8% de similaridade entre elas e 55% de similaridade com o primeiro grupo. A linhagem SK forma sozinha o terceiro grupo, apresentando 40% de similaridade com os outros dois grupos.

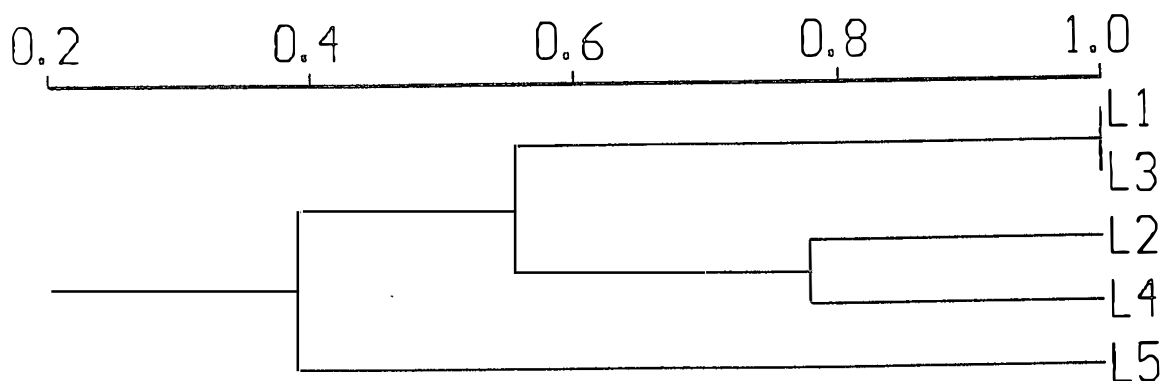


Figura 3 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de absorção de corantes entre as leveduras da indústria cervejeira, onde L1(SC), L2(AN), L3(KA), L4(BR) e L5(SK).

Com base nas observações feitas, pode-se concluir que o método se mostra eficiente para diferenciação entre leveduras que provavelmente pertençam a espécies diferentes, como no caso das leveduras de cervejaria. LIN (1975) conseguiu diferenciar 5 espécies do gênero *Saccharomyces* e outras 15 espécies de leveduras pertencentes a indústria cervejeira, com a utilização de 5 meios diferenciais. O mesmo não ocorreu

para as leveduras da indústria alcooleira onde o método se mostra pouco preciso.

Estes mesmos resultados foram observados por HALL (1971) que concluiu que o método se mostra eficiente somente para algumas leveduras, já que existem grupos de leveduras muito semelhantes que apresentam a mesma coloração. OLIVEIRA & PAGNOCCA (1988) trabalhando com meios diferenciais não conseguiram diferenciar leveduras na indústria alcooleira por se tratarem de leveduras pertencentes a uma mesma espécie (*Saccharomyces cerevisiae*), repetindo assim os resultados obtidos neste trabalho.

4.2 - Eletroforese de proteínas totais SDS-PAGE

Dentre as técnicas mais utilizadas, a SDS-PAGE, na qual as proteínas perdem o efeito de carga específica, separando-se devido as suas diferenças de peso molecular, está entre as que permitem melhor resolução de bandas, sendo possível a avaliação a nível qualitativo, ou seja, ausência e presenças de bandas, e quantitativo, diferenças de concentração de polipeptídeos existentes em uma amostra (CARRARO, 1990).

Os perfis de bandas apresentado nos géis pelas leveduras da indústria alcooleira e de cervejaria, podem ser observados nas Figuras 4 e 5.

Os géis foram lidos em densitômetro para caracterização dos polimorfismos proteicos (em anexo) e utilizados para a construção de uma tabela de mobilidade relativo (RF - posição das bandas no gel em relação à borda superior e inferior) , Tabela 2 e 3, a qual foi utilizada para a formação do dendrograma de similaridade.

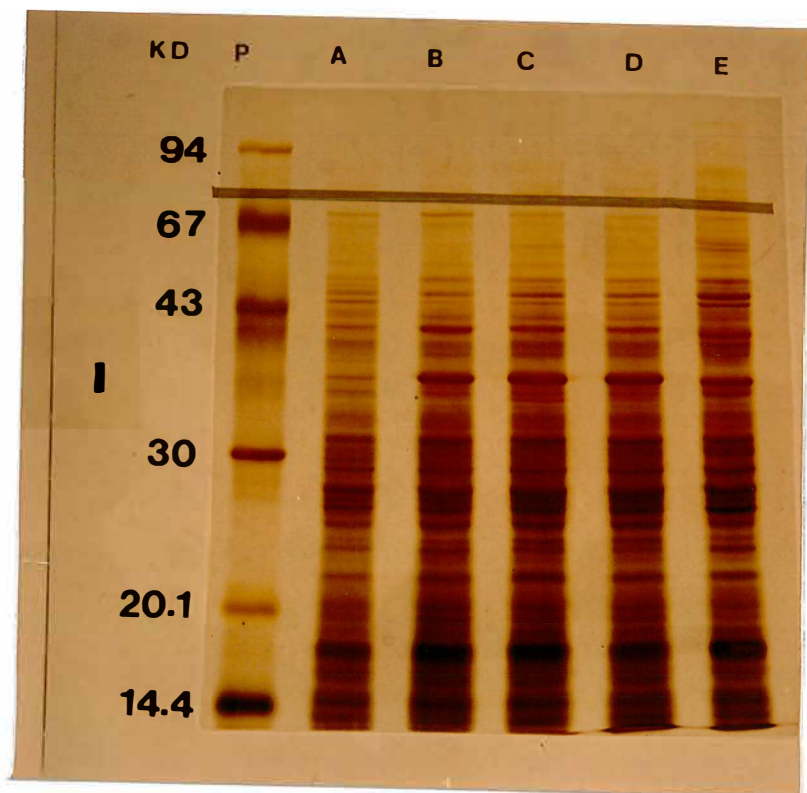


Figura 4 - Perfil de bandas apresentado pelas leveduras da indústria alcooleira, onde P(PADRÃO), A(IZ1904), B(M300A-10), C(FF), D(ITAIQUARA) e E(M304-2C).

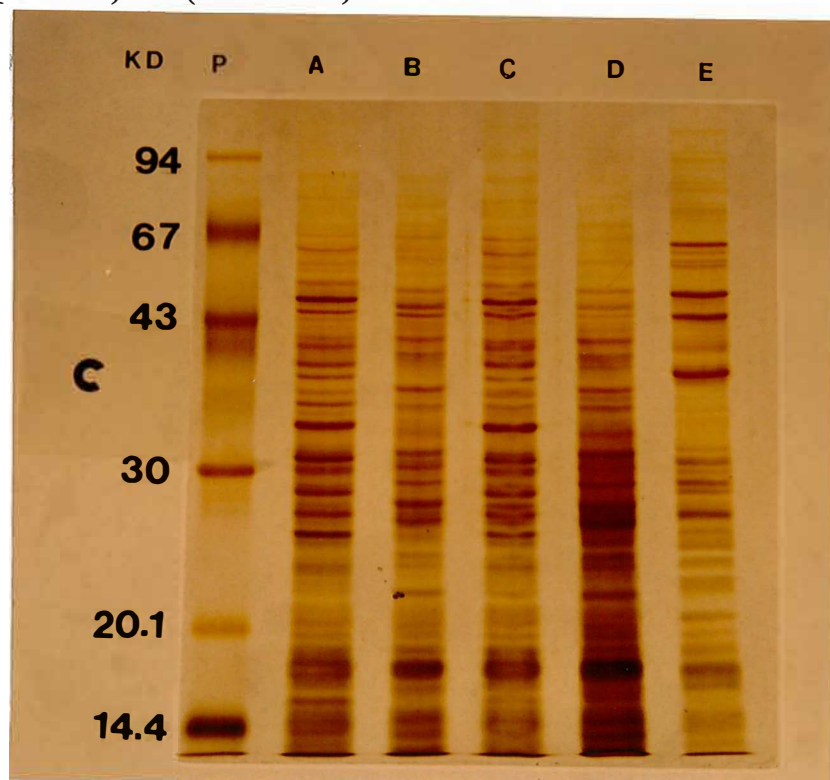


Figura 5 - Perfil de bandas apresentado pelas leveduras da indústria cervejeira, onde P(PADRÃO), A(SC), B(AN), C(KA), D(BR) e E(SK).

Tabela 3 - Diagrama das leveduras da indústria cervejeira analisadas por SDS-PAGE.

Linhas	SC	AN	KA	BR	SK	RF
Bandas 1					xxxxxx	0.236
2	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.277
3	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.295
4		xxxxxx		xxxxxx		0.307
5	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.313
6	xxxxxx		xxxxxx			0.325
7	xxxxxx		xxxxxx			0.342
8		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx	0.351
9	xxxxxx		xxxxxx			0.366
10		xxxxxx		xxxxxx		0.372
11	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.385
12		xxxxxx		xxxxxx		0.405
13	xxxxxx	xxxxxx		xxxxxx		0.419
14	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.427
15		xxxxxx		xxxxxx		0.443
16	xxxxxx		xxxxxx			0.455
17					xxxxxx	0.465
18	xxxxxx		xxxxxx			0.473
19		xxxxxx		xxxxxx		0.490
20	xxxxxx		xxxxxx			0.494
21	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.514
22	xxxxxx					0.525
23					xxxxxx	0.530
24	xxxxxx		xxxxxx			0.543
25		xxxxxx		xxxxxx		0.551
26					xxxxxx	0.570
27		xxxxxx		xxxxxx		0.581
28	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.588
29	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.602
30		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx	0.620
31	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.633
32		xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		0.652
33	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.663

34		xxxxxx		xxxxxx		0.674
35	xxxxxx		xxxxxx		xxxxxx	0.691
36					xxxxxx	0.703
37		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx	0.723
38	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		0.735
39					xxxxxx	0.754
40		xxxxxx		xxxxxx		0.773
41					xxxxxx	0.803
42	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		0.816
43	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.830
44		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx	0.849
45	xxxxxx		xxxxxx			0.867
46		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx	0.875
47	xxxxxx		xxxxxx			0.883
48					xxxxxx	0.897
49		xxxxxx		xxxxxx		0.911
50	xxxxxx		xxxxxx			0.919
51	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	0.947
52	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		0.964
53					xxxxxx	0.978

No dendrograma da Figura 6 observamos a formação de 3 grupos distintos formados pelas leveduras da indústria alcooleira. Ao contrário do que ocorre no método anterior, é possível distinguir as leveduras apesar de apresentarem uma alta similaridade.

As leveduras IZ1904 e M300-A-10 formam um grupo com 93,9% de similaridade e apresentam 2 bandas diferentes em seus padrões proteicos.

A linhagem FF aparece sozinha formando um grupo que se liga ao grupo anterior com 85% de similaridade e 4 bandas diferentes.

Outro grupo é formado pelas leveduras ITAIQUARA e M304-2C com 87,9% de similaridade e 4 bandas diferentes entre elas. A linhagem FF apresenta 7 bandas diferentes em relação a este grupo. Todos os grupos estão ligados entre si com 82% de similaridade.

As leveduras industriais de cervejaria foram agrupadas no dendrograma da Figura 7, no qual observamos a formação dos mesmos grupos apresentados pelo dendrograma da Figura 3, com um grau de similaridade de 94,3% entre as leveduras SC e KA com 3 bandas diferentes entre elas, 100% de similaridade entre as leveduras AN e BR com nenhuma banda de diferença e a linhagem SK apresentando 45% de similaridade com o primeiro grupo e 40% de similaridade com o segundo grupo, com 25 bandas diferentes em relação ao primeiro grupo e 30 bandas diferentes em relação ao segundo grupo.

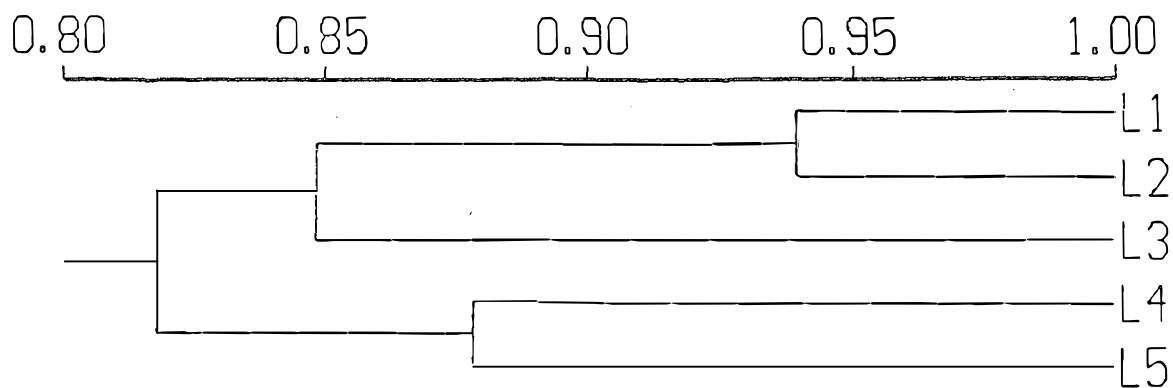


Figura 6 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de eletroforese de proteínas totais entre as leveduras da indústria alcooleira , Onde L1(IZ1904), L2(M300A-10), L3(FF), L4(ITAIQUARA) e L5(M304-2C).

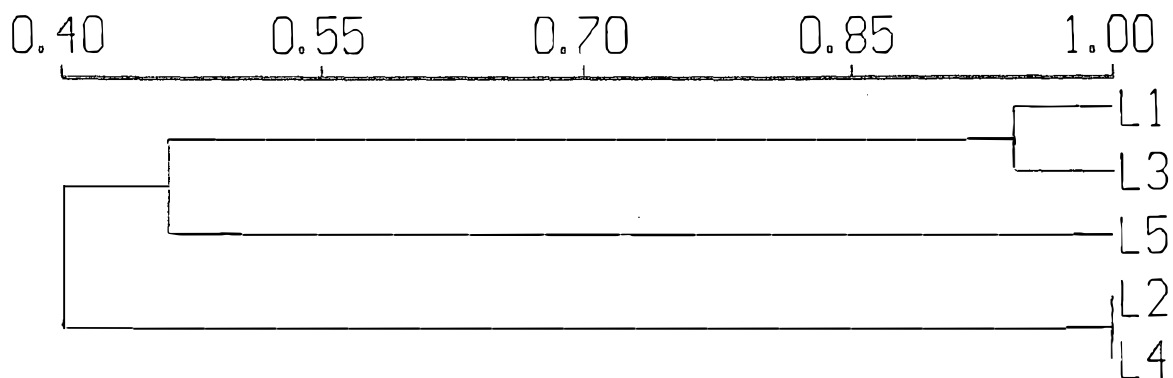


Figura 7 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de eletroforese de proteínas totais entre as leveduras da indústria cervejeira, onde L1(SC), L2(AN), L3(KA), L4(BR) e L5(SK).

Nas Figuras 4 e 5 pode ser facilmente observado que as leveduras da indústria de cervejaria apresentam maior variabilidade que as da indústria alcooleira. Este fato pode ser discutido com base nas condições estressantes as quais as leveduras da indústria alcooleira estão submetidas, criando uma forte pressão de seleção em favor de determinados genes associados a composição de paredes, membranas e etc..

Já na industria cervejeira as condições de fermentação são muito mais amenas causando um menor estresse nas leveduras, podendo-se optar por leveduras de várias espécies (VAN VURREN & VAN DER MEER, 1988).

Com estes dados foi possível avaliar que o método de eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) é capaz de mostrar diferenças mesmo entre leveduras muito semelhantes, como no caso das leveduras da indústria alcooleira principalmente demonstrado pelas leveduras IZ1904 e M300A-10 que apresentam apenas duas bandas de diferença entre elas. Já no caso das leveduras da indústria cervejeira onde existe uma gama maior de diversificação de leveduras utilizadas, o método se mostra ainda mais eficiente na diferenciação das culturas, que de acordo com os dados obtidos podemos dizer que as leveduras BR e AN provavelmente pertençam a

mesma espécie apresentando 100% de similaridade, o mesmo ocorrendo para as leveduras KA e SC pois apresentam 94.3% de similaridade, já a linhagem SK apresenta um padrão completamente diferente em relação as outras leveduras.

4.3 - Separação de cromossomos em levedura (CHEF)

A separação de cromossomos foi feita pelo método de CHEF e o preparo das amostras segundo Mc CLUSKEY et al (1990) e IBEAS & JIMENEZ (1993) , com os resultados demonstrados na Figura 8. Nas Tabelas 4 e 5 temos a organização das bandas de cada linhagem, segundo sua posição no gel quando comparadas entre si. Com a intenção de estabelecer um padrão, assumimos que cada banda seja apenas um cromossomo, apesar de sabido que bandas de cromossomos muito intensas podem significar a presença de dois ou mais cromossomos na mesma região de migração (CARLE & OLSON, 1985 e SHEEHAN & WEISS, 1990)

Os padrões de bandas apresentados entre as leveduras da indústria alcooleira mostram grande semelhança entre si, como podemos observar na Tabela 4, onde IZ1904 apresenta um padrão com 12 bandas, M300A-10 13 bandas, FF 12 bandas, ITAIQUARA 12 bandas e M304-2C

13 bandas. As diferenças apresentadas pelas leveduras da indústria alcooleira é representado principalmente pela migração diferencial de seus cromossomos no gel e não pela quantidade de bandas de cromossomos.

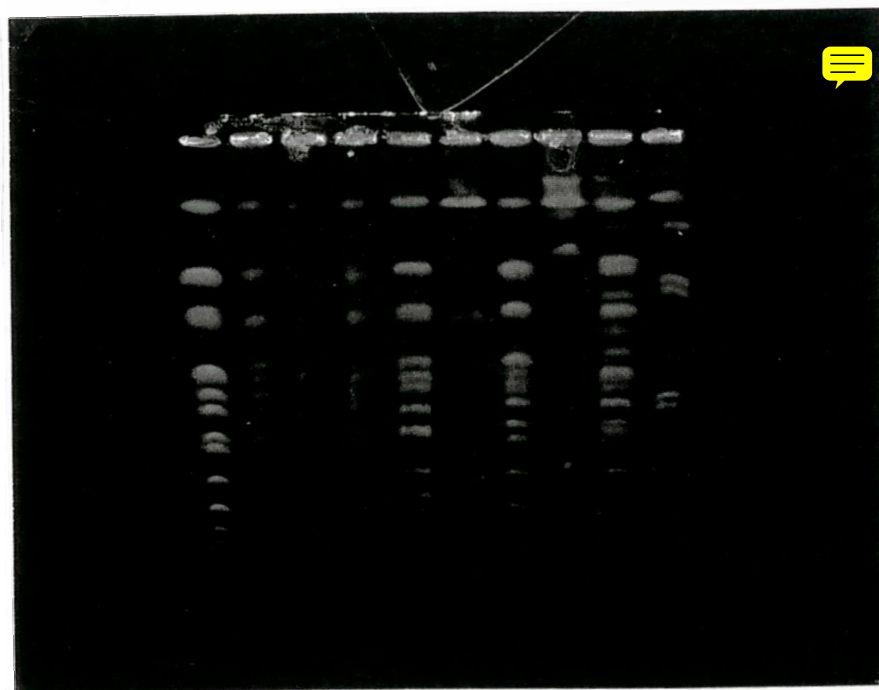


Figura 8 - Separação de cromossomos pelo método CHEF, onde temos da esquerda para direita, IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC, AN, KA, BR, SK.

Tabela 4 - Organização das bandas de cromossomos das leveduras da indústria alcooleira de acordo com sua migração no gel.

LINHAGENS	IZ1904	M300A-10	FF	ITAIQUARA	M304-2C
BANDAS	1 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	2				xxxxxx
	3 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	4 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	5	xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx
	6 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	7				xxxxxx
	8 xxxxxx	xxxxxx		xxxxxx	
	9 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	10		xxxxxx		
	11 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	12 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	
	13 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	14 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx		xxxxxx
	15 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	16 xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx

Com os dados das Tabelas 4 e 5 construímos os dendrogramas de similaridade das Figuras 9 e 10 respectivamente. No dendrograma da Figura 9 observamos a formação de apenas um grupo com duas leveduras representado por IZ1904 e M300A-10 com 93,8% de similaridade o que pode ser explicado pela presença da banda 5 na linhagem M300A-10 sendo esta a única diferença existente entre estas duas leveduras. Observamos também que as outras três leveduras se ligam a este grupo na seguinte ordem: ITAIQUARA com 91,0 % de similaridade, FF com 81,5% e M304-2C com 70,0%.

Tabela 5 - Organização das bandas de cromossomos das leveduras da indústria cervejeira de acordo com sua migração no gel.

LINHAGENS		SC	AN	KA	BR	SK
BANDAS	1	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx
	2	xxxxxx		xxxxxx		
	3				xxxxxx	xxxxxx
	4			xxxxxx		
	5		xxxxxx		xxxxxx	
	6				xxxxxx	xxxxxx
	7				xxxxxx	xxxxxx
	8		xxxxxx			
	9				xxxxxx	
	10	xxxxxx	xxxxxx		xxxxxx	
	11		xxxxxx		xxxxxx	
	12		xxxxxx		xxxxxx	
	13		xxxxxx		xxxxxx	
	14				xxxxxx	
	15					xxxxxx
	16		xxxxxx		xxxxxx	xxxxxx
	17		xxxxxx		xxxxxx	
	18		xxxxxx		xxxxxx	
	19	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	xxxxxx	
	20		xxxxxx		xxxxxx	
	21		xxxxxx		xxxxxx	
	22		xxxxxx		xxxxxx	

A separação de cromossomos das leveduras da indústria cervejeira apresentou grandes diferenças, principalmente quanto ao número de bandas de cromossomos, onde SC apresentou 4 bandas, AN 14 bandas, KA 4 bandas, BR 18 bandas e SK 6 bandas.

As leveduras da indústria cervejeira estão representadas no dendrograma da Figura 10 no qual há a formação de três grupos distintos, onde as leveduras SC E KA formam um grupo com 90,9% de similaridade, explicado por uma única diferença entre elas que está na migração da banda 10 em SC em relação a migração da banda 4 da linhagem KA.

AN E BR formam um segundo grupo com 72,7% de similaridade e a linhagem SK forma sozinha um terceiro grupo, ligando-se ao primeiro grupo com 62,9% de similaridade e 33,0% de similaridade com o segundo grupo.

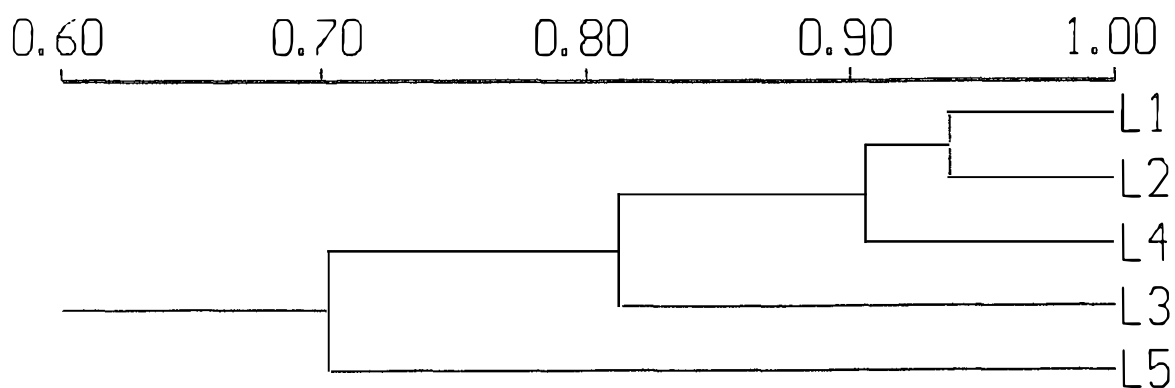


Figura 9 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método CHEF de separação de cromossomos, entre as leveduras da indústria alcooleira, onde L1(IZ1904), L2(M300A-10), L3(FF), L4(ITAIQUARA) e L5(M304-2C).

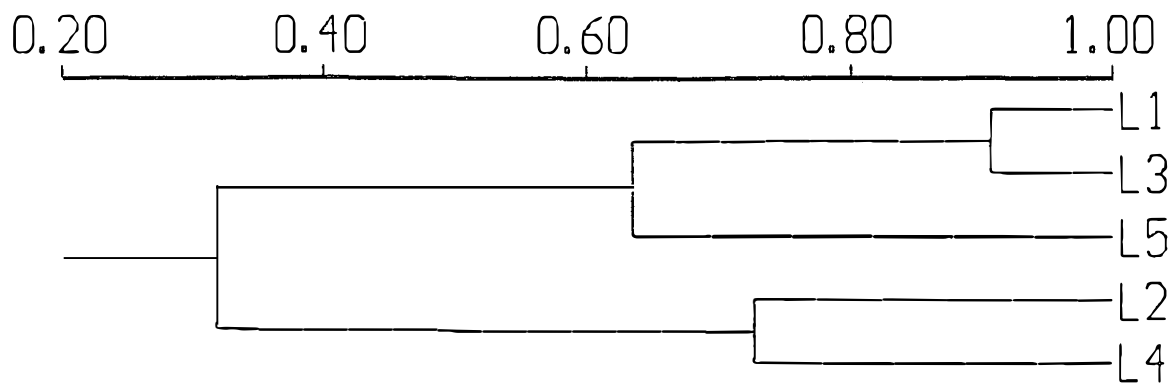


Figura 10 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método CHEF de separação de cromossomos , entre as leveduras da indústria cervejeira, onde L1(SC), L2(AN), L3(KA), L4(BR) e L5(SK).

O método não se mostrou muito eficiente, com poucas informações para uma conclusão mais precisa, além de deixar muitas dúvidas em relação a quantidade de cromossomos existentes nas bandas mais fortes , e não apresentar uma repetibilidade confiável na diferenciação de leveduras muito próximas, pois é altamente dependente de vários fatores como : concentração de células no bloco de agarose, variação da voltagem e da temperatura durante a corrida, concentração do tampão de corrida, concentração do gel, atividade da enzima proteinase K, qualidade do SDS utilizado, etc.

Todos esses fatores devem ser rigorosamente observados pois a mínima diferença em um destes fatores entre uma corrida e outra, o resultado já se apresenta alterado.

SHEEHAN & WEISS (1991) mostraram que o método apresentou muitos problemas principalmente regiões do gel onde não é possível distinguir com certeza a quantidade de bandas existentes.

O método pode ser utilizado em primeira análise para se fazer um triagem entre leveduras as quais se deseja diferenciar mas deve ser sempre acompanhado de outro método.

Para as leveduras da indústria alcooleira tivemos uma grande dificuldade na avaliação das bandas no gel, o mesmo aconteceu para as leveduras AN e BR da indústria cervejeira. Em relação as leveduras SC, KA e SK não tivemos problemas em avaliar as suas bandas pois apresentavam-se em pequena quantidade e bem definidas.

4.4 - RAPD em levedura

Os marcadores do tipo RAPD foram recentemente descritos como uma nova classe de marcadores genéticos (WILLIAMS et al, 1990). Estes marcadores partilham da maioria das vantagens do método de RFLP, contudo sem suas desvantagens especificamente a não necessidade de sondas derivadas de clones de cDNA , o ensaio não é radioativo e pode ser automatizado para aplicação em larga escala (BOTSTEIN et al, 1980).

Com a utilização de 7 "primers", foi obtido um padrão de amplificação de fragmentos de DNA para cada uma das 10 leveduras como demonstrado nas Figuras 11 e 12 . Com base nestes padrões foram construídos os dendrogramas de similaridade das leveduras industriais alcooleiras e de cervejarias.

No dendrograma da Figura 13 observamos que as leveduras IZ1904 e M300A-10 foram agrupadas com 87,9% de similaridade, enquanto as leveduras FF e ITAIQUARA apresentam 83,7% de similaridade formando um segundo grupo. A linhagem M304-2C forma sozinha um terceiro grupo ligando-se ao primeiro grupo com 73,7% de similaridade e por sua vez liga-se ao segundo grupo com 62,8% de similaridade.

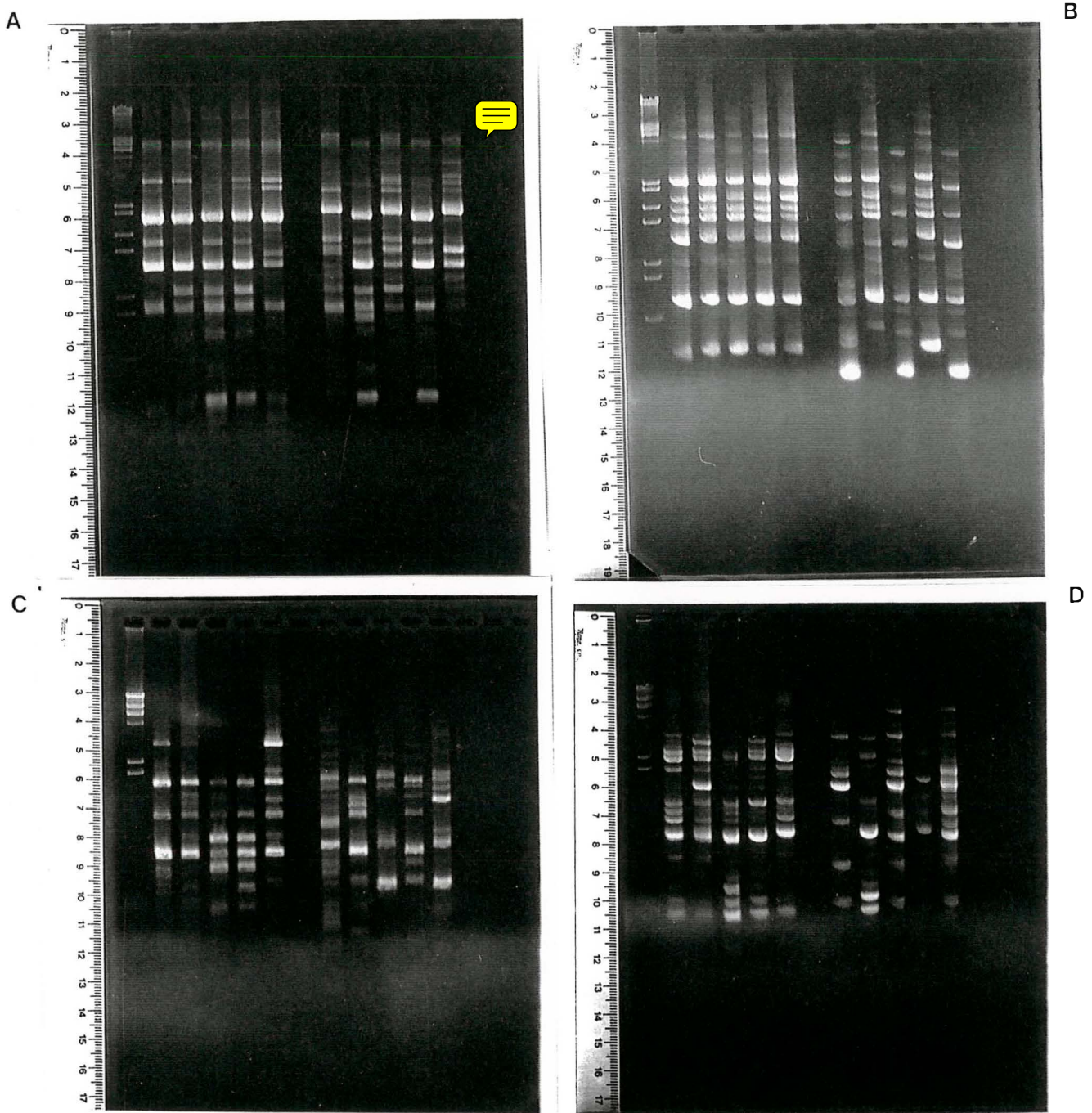


Figura 11 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA. (A) OPB-2, (B) OPB-12, (C) OPB-13, (D) OPB-20 onde tem-se da esquerda para direita Padrão, IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, SC, AN, KA, BR, SK.

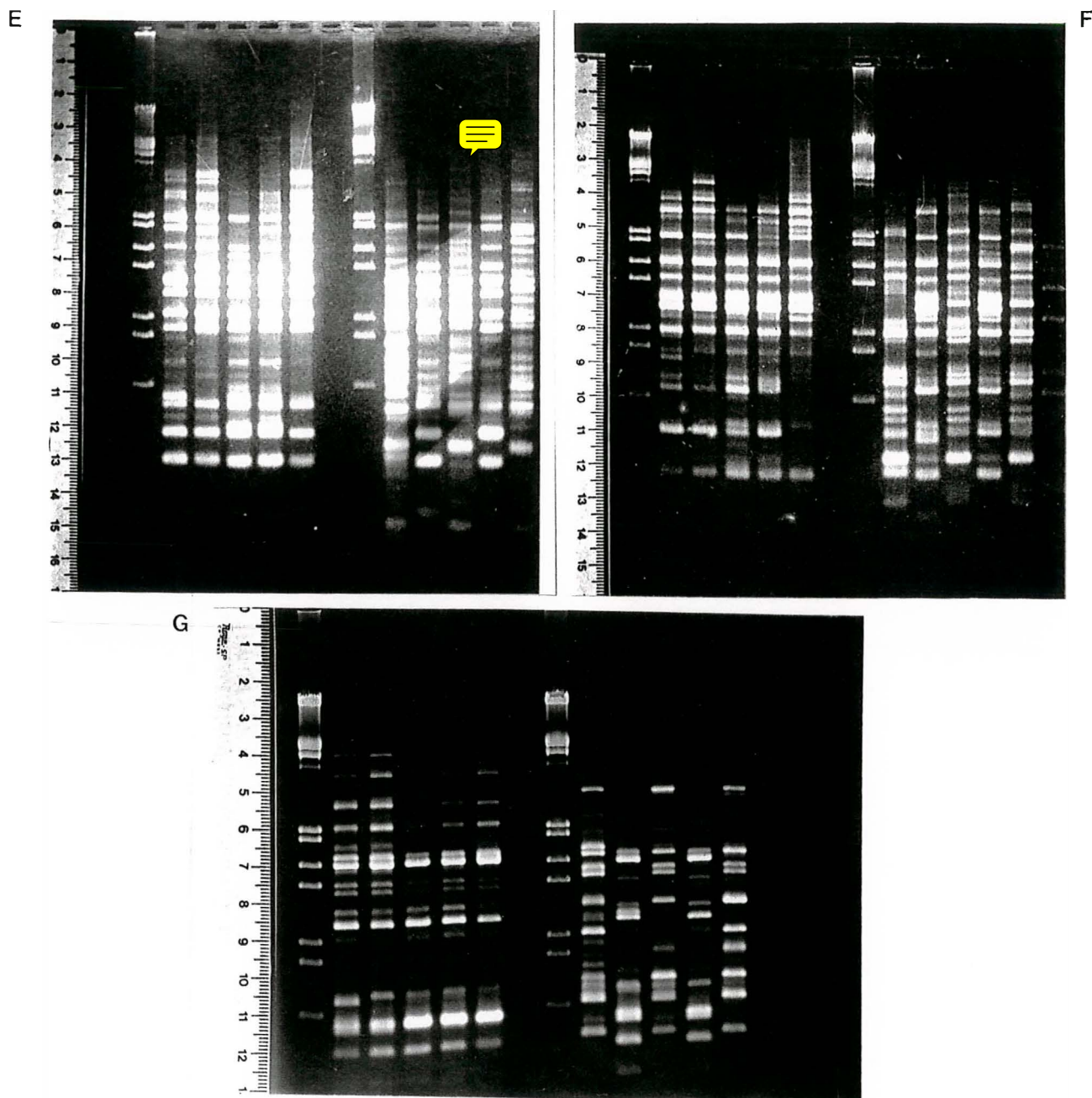


Figura 12 - Padrão de amplificação de fragmentos de DNA. (E) OPB-10, (F) OPB-17, (G) OPB-11, onde tem-se da esquerda para direita PADRÃO, IZ1904, M300A-10, FF, ITAIQUARA, M304-2C, PADRÃO, SC, AN, KA, BR, SK.

Na formação do dendrograma da Figura 14 podemos observar que as leveduras KA e SK formam um grupo com 89,2% de similaridade e as leveduras AN e BR formam um segundo grupo com 93,4% de similaridade. A linhagem SC forma um terceiro grupo com o primeiro grupo com 81,0% de similaridade, o segundo grupo liga-se ao terceiro grupo com 24,5% de similaridade.

De acordo com as figuras 11 e 12 observamos que as leveduras da indústria alcooleira apresentaram 47,12% de monomorfismo e 52,88% de polimorfismo, uma vez que apresentam alto grau de similaridade provando mais uma vez a falta de diversificação de leveduras utilizadas no processo, o que não ocorre com as leveduras da indústria cervejeira, as quais apresentam apenas 5,76% de monomorfismo e 94,24% de polimorfismo indicando uma diversificação maior de leveduras utilizadas no processo.

O método de RAPD se mostrou o mais eficiente dos quatro métodos utilizados, pois mesmo entre as leveduras da indústria alcooleira pertencentes a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as quais apresentam uma alta similaridade, conseguiu, devido ao seu maior número de informações apresentar uma distância maior entre os grupos formados, identificando

diferenças que não foram possíveis de serem avaliadas devido as limitações apresentadas pelos outros métodos.

No exemplo entre as leveduras IZ1904 e M300A-10 que apresentam similaridade de 100% no método de Absorção de corantes, 93,9% no método de SDS-PAGE, 93.8% no método de separação de cromossomos e 87.9% no método de RAPD.

A formação deste grupo já era prevista, pois as leveduras IZ1904 e M300A-10 que provem do cruzamento entre IZ671 e IZ672 , quando analisadas pelo método de eletroforese de proteínas totais, apresentaram a formação de dois grupos com 100% de similaridade, sendo eles formados por IZ672 com IZ1904 e M300A-10 com IZ671(GOMES, dados não publicados).

O grupo apresentado pelas leveduras ITAIQUARA e FF também já era esperado a sua proximidade, uma vez que são leveduras utilizadas na indústria alcooleira, mas destinadas principalmente a industria de panificação. Sendo assim ,devem apresentar as mesmas características genéticas pois o processo de seleção e melhoramento genético visam as mesmas qualidades.

A linhagem M304-2C está sozinha pois provém de uma série de cruzamentos para o melhoramento genético entre leveduras não comerciais de *Saccharomyces cerevisiae*, visando tanto a produção de álcool como também a redução do volume celular.

O método de RAPD quando aplicado as leveduras da indústria cervejeira apresentou uma padrão diferente dos outros 3 métodos em relação as leveduras SC, KA e SK, onde formou uma grupo com KA e SK com 89.2% de similaridade e isolou a linhagem SC, que se liga a este grupo com 81% de similaridade. Já o padrão entre as leveduras AN e BR foi mantido.

As diferenças apresentadas entre as leveduras SC, KA e SK neste método, podem ser explicadas pela alta variabilidade entre elas, pois como podemos observar nas figuras 11 e 12, em nenhum dos 7 "primers" utilizados obtivemos um padrão idêntico de amplificação de fragmentos de DNA para estas leveduras e verificou-se uma taxa de polimorfismo acima de 90%.

Isto nos leva a pensar que estas leveduras sejam realmente diferentes e a sensibilidade dos outros métodos não conseguiu detectá-las ou a utilização de mais primers nos levaria a uma melhor caracterização destas 3 leveduras. LEHMANN et al (1992) utilizando quatro "primers" para a

caracterização de leveduras de *Candida* chegou a conclusão que uma maior número de "primers" o levaria a um melhor resultado na diferenciação

O método se mostrou muito eficiente quando as leveduras apresentam uma grande similaridade, como no caso das leveduras da indústria alcooleira e as leveduras AN e BR da indústria cervejeira.

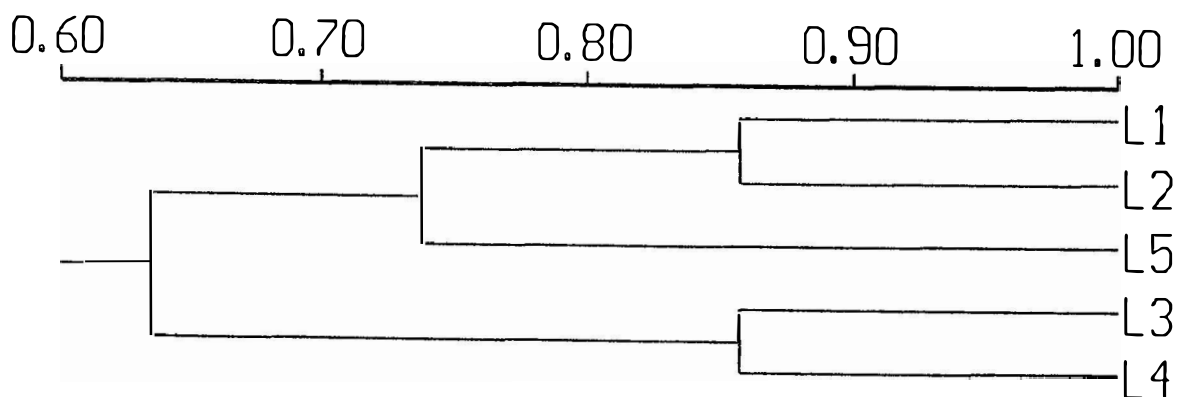


Figura 13 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de RAPD em leveduras, entre as leveduras da indústria alcooleira, onde L1(IZ1904), L2(M300A-10), L3(FF), L4(ITAIQUARA) e L5(M304-2C).

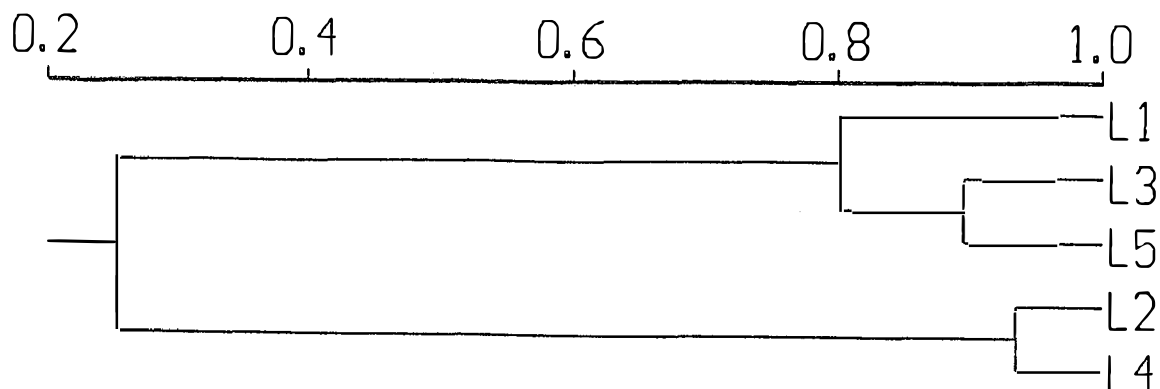


Figura 14 - Dendrograma de similaridade apresentado pelo método de RAPD em leveduras, entre as leveduras da indústria cervejeira, onde L1(SC), L2(AN), L3(KA), L4(BR) e L5(SK).

Neste trabalho todos os dados foram analisados como resultados não paramétricos ou seja, presença ou ausência de uma característica, sendo assim foi feita uma compilação final de todos os dados apresentados em cada um dos métodos para a formação de um único dendrograma de similaridade, com 162 características para as leveduras da indústria alcooleira e 222 características para as leveduras da indústria cervejeira.

Na Figura 15 temos a formação de um dendrograma de similaridade para as leveduras da indústria alcooleira com um grupo

representado pelas leveduras IZ 1904 e M300A-10 com 88,9% de similaridade, outro grupo formado pelas leveduras ITAIQUARA e FF com 84.6% de similaridade, havendo uma similaridade de 75% entre esses 2 grupos, que por sua vez se ligam a linhagem M304-2C com 72% de similaridade.

Neste dendrograma observamos basicamente os mesmos grupos apresentados pelo método de RAPD, com graus de similaridade diferentes confirmando novamente a eficiência do método de RAPD com poucos "primers" para leveduras muito semelhantes.

No dendrograma das leveduras da indústria cervejeira (Figura 16) observamos a formação de um primeiro grupo entre as leveduras SC e KA com 84.7% de similaridade, a linhagem SK se liga a este grupo com 70% de similaridade e um grupo formado pelas leveduras AN e BR com 87.8% de similaridade se liga aos outros dois grupos com 30% de similaridade.

A dúvida que tínhamos em relação as leveduras SC, KA e SK no método de RAPD, não aparece quando usamos a união dos dados dos quatro métodos para a formação do dendrograma, que se repete como nos métodos de absorção de corantes, SDS-PAGE e separação de

cromossomos o que reforça a idéia de que um número maior de "primers" levaria a uma distinção mais eficiente destas leveduras no método de RAPD devido a sua alta sensibilidade.

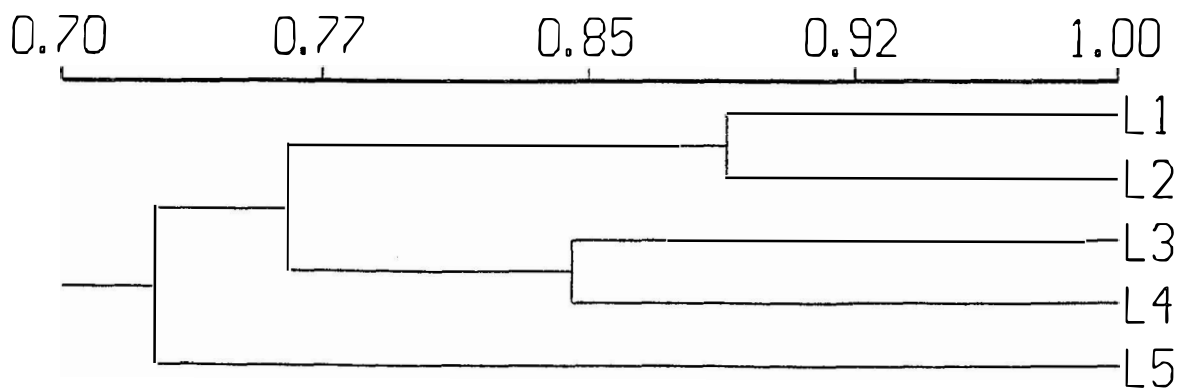


Figura 15 - Dendrograma de similaridade apresentado pela união dos quatro métodos entre as leveduras da indústria alcooleira, onde L1(IZ1904), L2(M300A-10), L3(FF), L4(ITAIQUARA) e L5(M304-2C).

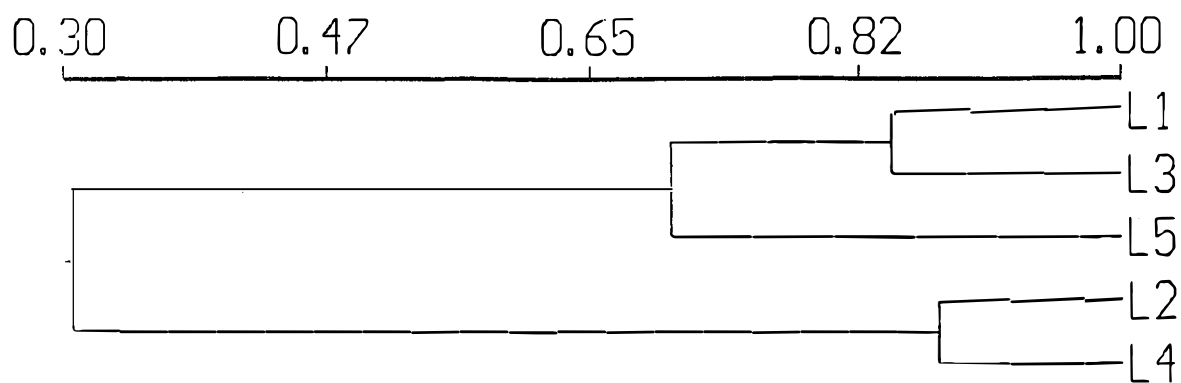


Figura 16 - Dendrograma similaridade apresentado pela união dos quatro métodos entre as leveduras da indústria cervejeira, onde L1(SC), L2(AN), L3(KA), L4(BR) e L5(SK).

5 - CONCLUSÕES

- O método de RAPD mostrou-se o melhor para diferenciação de leveduras da indústria alcooleira, mesmo com a utilização de poucos "primers".

- Todos os métodos se mostraram eficientes na diferenciação de leveduras com alta diversidade, como no caso das leveduras da indústria cervejeira.

- Sempre devemos utilizar mais de um método na diferenciação de leveduras, pois as limitações de um método podem ser complementadas por outro.

- Os métodos mais indicados para a diferenciação de leveduras industriais são RAPD e eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTIO, K. & MATTILA-SANDHOLM, T. Detection of active yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) in frozen dough sections. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **58(7):2153-7**, 1992.

BARNETT, J.A. Comparative studies of yeasts. **Nature**, London, **186:449-51**, 1960.

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. Cambridge, C.U.Press, 1986. p. 1-20.

BENDO VÁ, O.; RICHTER, V.; JANDEROVÁ, B.; HAÜSLER, J. Identification of industrial yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* by fatty acid profiles. **Applied Microbiology Biotechnology**, New York, **35:810-2**, 1991.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.H.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic map in man using restriction fragment

polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, New York, **32**: 314-31, 1980.

CARLE, G.F.; FRANK, M.; OLSON, M.V. Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. **Science**, Oxford, **232**:65-8, 1986.

CARLE, G.F. & OLSON, M.V. Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field - alternation gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, Oxford, **12** (14): 5647-64, 1984.

CARLE, G.F. & OLSON, M.V. An electrophoretic karyotype for yeast. **Proceedings of the National Academy of Science United States of American**, Washington, **82**: 3756-60, 1985.

CARRARO, D.M. Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1990. 121p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ USP).

CASEY, G.P.; XIAO, W.; RANK, G.H. Application of pulsed field chromosome electrophoresis in the study of chromosome XIII and the electrophoretic karyotype of industrial strains of *Saccharomyces*

- yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **94**: 239-43, 1988.
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis I. Method and application to human serum proteins. **Annals of New York Academic Science**, New York, **121**:404-27, 1964.
- DEAK, T. & BEUCHAT, L.R. Identification of food-borne yeasts. **Journal of Food Protection**, Ames, **50**:243-64, 1987.
- DION, A.S. & PONENTI, A.A. Ammoniacal silver staining of proteins: mechanism of glutaraldehyde enhancement. **Analytical Biochemistry**, San Diego, **129**: 490-6, 1983.
- DEGRÉ, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, K.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, **40** (4):309-15, 1989.
- EGUCHI, S.Y.; CASTRO, M.M.S.; MECATE, G.M. **Manual de identificação de leveduras**. Campinas, SP. Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1991. 32 p.
- ERICKSON, J.P. Hydrophobic membrane filtration method for the selective recovery and differentiation of *Zygosaccharomyces bailii* in

- acidified ingredients. **Journal of Food Protection**, Ames, **56(3)**: 234-8, 1993.
- FUCHS, D.C. & DOLAN, T. Performance of yeast identification systems. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, **8**:664-7, 1982.
- GOMES, L.H.; ARGUESO, J.L.; DUARTE, K.M.R., TAVARES, F.C.A. RAPD para a identificação de leveduras industriais. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 20., Piracicaba 1995. **Anais**. p.154.
- GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F.T. Proton magnetic resonance spectroscopy, an aid in identification and chemotaxonomy of yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, **13**:25-89, 1970.
- GOTTLIEB, M. & CHAVKO, M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, **165**: 33-7, 1987.
- GUTIERREZ, L.E. Acúmulo de trealose em leveduras de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Anais da ESALQ**, Piracicaba, **47**:597-608, 1990.

- HALEY, S. D.; MIKLAS, P.N.; STAVELY, J.R.; BRYUM, J.; KELLY, J.D. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. **Theoretical Applied Genetics**, New York, **86**: 505-12, 1993.
- HALL, J.F. Detection of wild yeasts in the brewery. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **77**: 513-6, 1971.
- HANSEN, E.C. Undersolgelser over alkoholgaersvam penes fisiologi og morfologi VII Om Alkoholgaersvampenes Forhold til Sukkeratarm Meddeleserr fra Calsberg Laboratoriet 2:220-56 In: Rose A.H & Harrison J.S., ed. **The yeasts** , London Academic Press, 1987. v. 1, p. 5-61.
- HAWTHORNE, D. & PHILIPPSEN, P. Genetic and molecular analysis of hybrids in the genus *Saccharomyces* involving *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and a new species, *S. douglasii*. **Yeast**, London, **10**: 1285-96, 1994.
- HEARD, G.M. & FLEET, G.H. A convenient microtitre tray procedure for yeast identification. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **68**:447-51, 1990.
- HEUN, M. & HELENTJARIS, T. Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. **Theoretical Applied Genetics**, London, **85**: 961-8, 1993.

- HOLMES, B.; COSTAS, M.; WOOD, A.C.; KERSTERS, K. Numerical analysis of eletrophoretic protein patterns of *Achromobacter* group B, E and F strains from human blood. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **68**: 495-504, 1990.
- HORVATH, A. & RIEZMAN, H. Rapid protein extration from *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, London, **10**: 1305-10, 1994.
- IBEAS, J.I. & JIMENEZ, J. Electrophoretics karyotype of budding yeasts with intact cell wall. **Nucleic Acids Research**, Oxford, **21**(16):3902, 1993.
- JONGE, P. de; JONGH, F.C. de; MEIJERS, R.; STEENSMA, H.; SCHEFFERS, W.A. Orthogonal -field -alternation gel electrophoresis banding patterns of DNA from yeasts. **Yeast**, London, **2**:193-204, 1986.
- JOHNSTON, J.R. **Yeast: a pratical approach**. Oxford, IRL Press, 1988. cap. 5, p.107-22.
- KEIM, P.; SHOEMAKER, R.C.; PALMER, R.G. Restriction fragment length polymorphism diversity in soybean. **Theoretical Applied Genetics**, New York, **77**:786-92, 1989.

KERSTERS, K & DE LEY, J. Classification and identification of bacteria by eletrophoresis of their proteins. In: GOODFELLOW, M. & BOARD, R.G, ed. **Microbial classification and identification**, London, Academic Press, 1980. p. 273-94.

KILIAN, S.G.; DEEMTER, A.; KOCK, J.L.F.; PREEZ, J.C. Ocurrence and taxonomic aspecto of proton movements coupled to sugar transport in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Antonie van Leeuwenhock**, Amsterdam, **59**:199-206, 1991.

KREGER-VANRIJ, N.J.W. , Classification of yeasts. In: Rose, A.H & Harrison, J.S., ed. **The yeasts**. London, Academic Press, 1987. v. 1, p. 5-61.

KUNKEE, R.E. & AMERINE, M.A. Yeasts in wine making. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. **The yeasts**. London, Academic Press, 1970. v.3, p.5-71.

KURSTMAN, C.P. & PHAFF, H.J. Molecular taxonomy. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. **The yeasts**. London, Academic Press, 1987. v.1, p.63-94.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, **227**: 680-5, 1970.

- LEHMANN, P.F.; LIN, D.; LASKER, B.A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, **30**(12): 3249-54, 1992.
- LIN, C.C.S. & FUNG, O.Y.C. Conventional and rapid methods for yeast identification. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, **14**: 273-89, 1987.
- LIN, Y. Detection of wild yeast in the brewery efficiency of differential media. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **81**: 410-7, 1975.
- LINK, A.J. & OLSON, M.V. Physical map of the *Saccharomyces cerevisiae* genome at 110-kilobase resolution. **Genetics**, Chapel Hill, **127** (4): 681-98, 1991.
- LONGLEY, R.P.; DENNIS, R.R.; HEYER, M.S.; WREN, J.J. Selective *Saccharomyces* media containing ergosterol and tween 80. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **84**: 341-5, 1978.
- MATSUOKA, M.; ASOU, S.; OHASHI, Y. Regulation mechanisms of the synthesis of pathogenesis - regulated proteins in tobacco leaves. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, **29**:1185-92, 1988.

- McCLUSKEY, K.; RUSSEL, B.W.; MILLS, D. Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. **Current Genetics**, New York, **18**: 385-6, 1990.
- MEADEN, P. DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **96**: 195-200, 1990.
- MILLER, R. & GALSTON, G. Rapid methods for the detection of yeast and *Lactobacillus* by ATP bioluminescence. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **95**: 317-9, 1989.
- 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**, London, **8**: 599-612, 1992.
- OLIVEIRA, M.C.F. & PAGNOCCA, F.C. Aplicabilidade de meios seletivos empregados na indústria cervejeira a detecção de leveduras selvagens em unidades sucroalcooleiras. In: Simpósio Nacional de Fermentações, **Anais**, SBM, **8**: 78-81, São Lourenço, SP, 1988.
- PEDERSEN, M.B. DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces* III. Restriction endonuclease fragment patterns of chromosomal regions in brewing and other yeast strains.

Carlsberg Research Communication, New York, **51**:163-83, 1986.a

PEDERSEN, M.B. DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces* IV. Homeologous chromosomes III of *Saccharomyces bayanus*, *S. carlbergensis*, and *S. uvarum*. **Carlsberg Research Communication**, New York, **51**:185-202, 1986.b

PENNER, G.A.; BUSH, A.; WISE, R.; KIM, W.; DOMIER, L.; KASHA, K.; LAROCHE, A.; SCOLES, G.; MOLNAR, S.J.; FEDAK, G. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. In: **PCR methods and applications**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1993. p.341-5.

ROHM, H. & LECHNER, F. Evaluation and reliability of a simplified method for identification of food-borne yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, **56** (5):1290-5, 1990.

ROHM, H.; LECHNER, F.; BRÄUER, M. Diversity of yeasts in selected dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, **72**:370-6, 1992.

SHEEHAN, C.A. & WEISS, A. Brewing yeast identification and chromosome analysis using high resolution CHEF gel

electrophoresis. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **97**:163-7, 1991.

SIMPSON, W.J.; FERNANDEZ, J.L.; HAMMOND, J.R.M. Differentiation of brewery yeasts using a disc-difusion test. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **98**:33-6, 1992.

SUBDEN, R.E.; CORNELL, R.; NOBLE, A.C. Evaluation of API20c clinical yeast identification system for must and wine yeast identification. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, **31**:364-6, 1980.

TAVARES, F.C.A.; ECHEVERRIGARAY, S.; GOMES, L.H.; SOUBIHE, M. Identificação molecular de leveduras da fermentação alcoólica. **STAB**, Piracicaba, **10** (4): 34-9, 1992.

THORNTON, R.J.; BUNKER, A. Characterization of wine yeasts for genetically modifiable properties. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **95**:181-4, 1989.

TSUCHIYA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAWARITA, S. Significance of serological studies on yeasts. **Mycologia Applicata**, New York, **26**:1-5, 1965.

VAN VUUREN, H.J.J. & VAN DER MEER, L. Fingerprinting of yeast by proteins eletroforesis. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, **38**:49-53, 1987.

VAN VUUREN, H.J.J. & VAN DER MEER, L. Characterization of brewing yeast strains by numerical analysis of total soluble cell proteins patterns. **Journal of the Institute of Brewing**, London, **94**: 245-8, 1988.

WAUGH, R. & POWELL, W. Using markers for crop improvement. **Trends in Biotechnology**, Oxford, **10**: 186-91, 1992.

WELSH, J. & McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, **18**(24): 7213-8, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, **18**: 6531-5, 1990.

YAMADA, Y.; NOJIRI, M.; MATSUYAMA, M.; KONDO, K. Co-enzyme Q system in the classification of the ascoporogenous yeast Genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and

Endomycopsis. **Journal General Applied Microbiology**, Tokyo,
23:325-39, 1976.

APÊNDICE

ANEXO - Caracterização de polimorfismos proteicos das leveduras industriais pelo método de SDS-PAGE.

