UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA DISCRIMINAÇÃO INTRAESPECÍFICA DE LEVEDURAS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL (CMIA) DA EMBRAPA

GABRIELE JARDIM GROSS TEIXEIRA

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Patricia Valente da Silva
Co-orientador: Dr.Gildo Almeida da Silva

Porto Alegre
Março/2019

CIP - Catalogação na Publicação

Teixeira, Gabriele Jardim Gross
SELEÇÃO DE PRIMERS PARA DISCRIMINAÇÃO INTRAESPECÍFICA DE LEVEDURAS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL (CMIA) DA EMBRAPA / Gabriele Jardim Gross Teixeira. -- 2019.
85 f.
Orientador: Patricia Valente da Silva.

Coorientador: Gildo Almeida da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Caracterização de linhagens quanto ao potencial enológico. 2. Variabilidade genética das linhagens de Saccharomyces Cerevisae. 3. . I. da Silva, Patricia Valente, orient. II. da Silva, Gildo Almeida, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA DISCRIMINAÇÃO INTRAESPECÍFICA DE LEVEDURAS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL (CMIA) DA EMBRAPA

Gabriele Jardim Gross Teixeira
Tecnóloga em Alimentos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente

Orientadora: Prof.ª. Dr.ª. Patrícia Valente da Silva
Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Março/2019

“Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças”

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À minha família por todo apoio, dedicação e amor, em especial à minha mãe, Rosane Gross, que em todos os momentos foi meu porto seguro e à minha avó, Alaide Gross, que não mede esforços para que eu siga em frente em meus estudos.

Ao meu co-orientador Dr. Gildo Almeida da Silva, por todos os ensinamentos, tanto os acadêmicos quanto os pessoais, pelas intensas provas de bioquímica que, sem dúvidas, agregaram muito ao meu conhecimento, pela confiança e compreensão.

À minha orientadora Dra. Patricia Valente da Silva pelo receptividade, conselhos e tranquilidade transmitida. A todo o laboratório 325, de micologia, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A Dra. Maria Lúcia Scroferneker, pela amizade e momentos de descontração, sempre acompanhados de um maravilhoso café.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Uva e Vinho, de Bento Gonçalves/RS, por todo suporte estrutural e acolhimento nesse período. Em especial à amiga e analista do laboratório de microbiologia aplicada, Dra. Bruna Carla Agustini, por todos as sugestões, os ensinamentos e a dedicação ao projeto. À Maria Antonieta Luvison (Chica), por todo companheirismo, auxílios recebidos e pelo mate todas as manhãs. À colega de casa que se tornou uma grande amiga, doutoranda Natalia Pisoni Canedo, por todas as risadas, conselhos e parceria.

Às amigas do coração, Carina Timotheo, Roberta Hoffmann e Jhenifer Guterres que mesmo distantes fisicamente sempre se fizeram presentes em minha vida, me confortando em momentos difíceis e celebrando as vitórias.

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto.

SELEÇÃO DE *PRIMERS* PARA DISCRIMINAÇÃO INTRAESPECÍFICA DE LEVEDURAS DA COLEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE INTERESSE AGROINDUSTRIAL (CMIA) DA EMBRAPA

Autor: Gabriele Jardim Gross Teixeira
Orientadora: Prof.ª. Dr.ª. Patricia Valente da Silva
Co-orientador: Dr. Gildo Almeida da Silva

RESUMO

A fermentação é diretamente influenciada por microrganismos presentes no mosto. As ferramentas de biologia molecular têm apresentado grande potencial para a identificação taxonômica de microrganismos e têm se popularizado nos meios científicos e nas empresas de tecnologia que utilizam microrganismos. *Saccharomyces cerevisiae* é a principal espécie utilizada para o processo de fermentação do mosto para elaboração vinhos. Em vista disso, o objetivo principal deste trabalho é definir o método mais eficiente para discriminar linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Foram utilizadas linhagens da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA), da Embrapa Uva e Vinho. Avaliaram-se características como habilidade de fermentação, produção de H_2S, produção de fator *killer* efetivo, sensibilidade e neutralidade ao fator *killer*. Os *primers* avaliados para discriminar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram os seguintes: M13, $(GACA)_4$, $(GTG)_5$, $(GAC)_5$, OPA-11, *primer* 28 e os pares δ 2-12 e δ 12-21*,* associados a técnicas de biologia molecular, dentre elas: RAPD, SSR e retrotransposons Ty. Os resultados serão apresentados por meio de um dendrograma empregando distâncias euclidianas e mostrando o coeficiente de correlação cofenética. Embora as linhagens tenham apresentado valores de evolução de CO_2 variados, todas mostraram potencial fermentativo adequado, sem a produção de H_2S. Dentre elas, quatro produziram a proteína *killer* efetiva, duas foram sensíveis e as demais consideradas neutras. A discriminação das linhagens, por outro lado, só foi efetiva no uso dos pares de *primer* δ 12-21 relacionados com os elementos Ty. O coeficiente de correlação cofenética foi 0,96.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (85 p.) Março, 2019.

SELECTION OF PRIMERS FOR INTRASPECIFIC DISCRIMINATION OF YEAST FROM COLLECTION OF MICRORGANISMS OF AGROINDUSTRIAL INTEREST (CMIA) OF EMBRAPA[1]

Author: Gabriele Jardim Gross Teixeira
Advisor: Prof. Dr. Patricia Valente da Silva
Co-Advisor: Dr. Gildo Almeida da Silva

ABSTRACT

Microorganisms present in the grape must influence directly the fermentation process. Molecular biology tools have showed great potential for the taxonomic identification of microorganisms and have become popular in the scientific circles and among the biotechnology companies. Saccharomyces cerevisiae is the main species used for the fermentation process of must for wine making. Therefore, the main objective of this work is to define the most efficient method to discriminate strains of the species Saccharomyces cerevisiae. Strains from the Collection of Microorganisms of Agroindustrial Interest (CMIA), from Embrapa Grape and Wine were utilized. Characteristics such as fermentation ability, H_2S formation, and production of effective killer factor, sensitivity and neutrality to the killer factor were evaluated. The primers used to differentiate Saccharomyces cerevisiae strains were the following: M13, $(GACA)_4$, $(GTG)_5$, $(GAC)_5$, OPA-11, primer 28 and pairs δ2- δ12 and δ12- δ21, associated to the molecular biology techniques, among them: RAPD, SSR and Ty retrotransposons. The results are presented through a dendrogram employing Euclidean distances and showing the coefficient of cophenetic correlation. Although the strains presented variation in the CO_2 evolution values, they all showed adequate fermentation potential, without the production of H_2S. Among the strains, four produced the effective killer protein, two were sensitive and the others were considered neutral. The discrimination of the strains, on the other hand, was only effective using the pairs of primer δ12-δ21 related to the elements Ty. Cophenetic correlation coefficient was 0.96.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (85 p.) March, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
2.1 Objetivo Geral 3
2.2 Objetivos Específicos 3
3. REVISÃO DA LITERATURA 4
3.1 Microrganismo e Habitat 4
3.2 Regiões vitivinícolas no Brasil 4
3.3 Influência das leveduras como agente transformante 7
3.3.1 Fermentação 8
3.4 Importância da utilização de leveduras selecionadas 9
3.5 Seleção de leveduras autóctones 10
3.5.1 Capacidade fermentativa 10
3.5.2 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S) 10
3.5.3 Fator *killer* 11
3.6 Utilização de marcadores moleculares 12
3.6.1 Diferenciação de linhagens por RAPD 13
3.6.2 Diferenciação de linhagens por SSR 14
3.6.3 Diferenciação de linhagens por Ty 14
4. MATERIAL E MÉTODOS 18
4.1 Origem dos microrganismos 18
4.2 Linhagens utilizadas 18
4.3 Caracterização das linhagens 19
4.3.1 Velocidade de fermentação 19
4.3.2 Evolução de sulfeto de hidrogênio 19
4.3.3 Atividade *killer* 19
4.3.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator *killer* 20
4.4 Variabilidade genética das linhagens 21
4.4.1 Padronização de células e extração do DNA 21
4.4.1.1 PCR-ITS 21
4.4.1.2 Sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA 22
4.4.1.3 PCR-RAPD 23

4.4.1.4 PCR-SSR....26
4.4.1.5 PCR-Ty 29
4.4.2 Eletroforese....30
4.5 Análise estatística....30
5. RESULTADOS 31
5.1 Caracterização das linhagens....31
5.1.1 Habilidade fermentativa 31
5.1.2 Produção de H_2S 32
5.1.3 Fator *killer* 32
5.1.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator *killer*....33
5.2 PCR-ITS....34
5.3 PCR-RAPD 37
5.4 PCR-SSR....48
5.5 PCR-Ty 52
6. DISCUSSÃO....57
6.1 Caracterização de linhagens quanto ao potencial enológico 57
6.2 Discriminação de Espécies e Linhagens 57
6.2.1 **RAPD**....58
6.2.2 **SSR**....59
6.2.3 **Ty**....59
7. CONCLUSÃO....61
8. REFERÊNCIAS 62
9. APÊNDICES 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Princípios fundamentais entre os conceitos de Denominação de Origem (D.O) e Indicação de Procedência (I.P) 6

Tabela 2 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por PCR-ITS 22

Tabela 3 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com primer M13 e primer $(GACA)_4$ 23

Tabela 4 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com primer $(GAC)_5$ e primer $(GTG)_5$ 24

Tabela 5 - Otimização do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD, com primer OPA-11 25

Tabela 6 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com primer OPA-11 25

Tabela 7 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com primer 28 26

Tabela 8 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com primer M13 27

Tabela 9 – Otimização do meio reacional para amplificação do material genético por SSR, com primers $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$ 27

Tabela 10 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com primer OPA-11 28

Tabela 11 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com primer 28 28

Tabela 12 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por Ty com o par de primers δ2 -δ12 e par de primers δ12- δ21 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regiões produtoras de vinhos no Brasil. 5
Figura 2 – Indicações geográficas de vinhos no Brasil 7
Figura 3 - Curva de crescimento das leveduras..... 9
Figura 4 - As duas classes principais de elementos móveis 15
Figura 5 - Transposons em eucariontes 16
Figura 6 - Velocidade de fermentação das linhagens de Saccharomyces cerevisiae..... 31
Figura 7 - Fermentação das linhagens de Saccharomyces cerevisiae após 96h de incubação 32
Figura 8 - Avaliação do teste killer 33
Figura 9 - Avaliação das linhagens sensíveis 02MB12 e 37GTEpUf17 ... 34
Figura 10 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae da região rDNA ITS1-5.8S-ITS2 amplificada com os primers ITS1 e ITS4..... 35
Figura 11 - Perfil eletroforético das linhagens de não- Saccharomyces da região rDNA ITS1-5.8S-ITS2 amplificada com os primers ITS1 e ITS4..... 36
Figura 12 - Perfil eletroforético da linhagem 89VVT99, amplificada com os primers 28candiv3 e 28candiv4 36
Figura 13 – Avaliação da extração inicial de linhagens de Saccharomyces cerevisiae, utilizando RAPD com primer M13..... 37
Figura 14 – Avaliação de diferentes diluições da extração inicial (10^9 células.mL^{-1}) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando RAPD com *primer* M13..... 38
Figura 15 - Avaliação de diferentes diluições seriadas da extração inicial (10^9 células.mL^{-1}) da linhagem 91B84, utilizando RAPD com primer M13 39
Figura 16 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando RAPD com primer M13..... 39
Figura 17 - Perfil eletroforético de espécies não- Saccharomyces com primer M13..... 40
Figura 18 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com primer $(GAC)_5$ 41

Figura 19 - Perfil eletroforético das espécies não- Saccharomyces utilizando RAPD com primer $(GAC)_5$ 42
Figura 20 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando RAPD com primer $(GTG)_5$ 43
Figura 21 - Perfil eletroforético de espécies não-Saccharomyces utilizando RAPD com primer $(GTG)_5$ 44
Figura 22 - Otimização do perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando RAPD com primer OPA-11 45
Figura 23 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando RAPD com primer OPA-11 45
Figura 24 - Perfil eletroforético das espécies não- Saccharomyces utilizando RAPD com primer OPA-11 46
Figura 25 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando RAPD com primer 28 47
Figura 26 - Perfil eletroforético das espécies não- Saccharomyces utilizando RAPD com primer 28 47
Figura 27 - Avaliação da repetibilidade do primer 28 com espécies não-Saccharomyces 48
Figura 28 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando SSR com primer M13 49
Figura 29 - Avaliação de diferentes concentrações de $MgCl_2$ e primer $(GTG)_5$ 50
Figura 30 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando SSR com primer $(GTG)_5$ 50
Figura 31 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando SSR com primer $(GAC)_5$ 51
Figura 32 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando SSR com primer OPA-11 52
Figura 33 - Perfil eletroforético do par de primers δ2 e δ12 com 1µL de 10^7 células.mL^{-1} 53
Figura 34 - Evolução do perfil eletroforético do par de primers δ2 e δ12 com aumento de DNA 54

Figura 35 - Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando o par de primers δ2 e δ12 54
Figura 36 – Perfil eletroforético das linhagens de Saccharomyces cerevisiae utilizando, o par de primers δ12 e δ21 55
Figura 37 - Dendrograma, mostrando as relações moleculares com base em PCR com os primers δ12 e δ21 de linhagens Saccharomyces cerevisiae pertencentes à CMIA, com coeficiente de correlação cofenética de 0,96 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina Trifosfato
CMIA	Coleção de microrganismos com interesse agroindustrial
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures-Utrecht
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DO	Denominação de origem
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
LKB	Laboratory of the Kondama Brewing Company
IG	Indicação geográfica
IP	Indicação de procedência
ITS	Espaçadores internos transcritos (do inglês, *internal transcribed spacer*)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês) *Polymerase Chain Reaction*
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico (do inglês *Random Amplification of Polymorphic DNA)*
NRRL	The Northern Recional Research Laboratory
OIV	Organização Internacional do Vinho
SSR	Repetições Sequenciais Simples (do inglês *Simple Sequence Repeats*

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos unicelulares, que possuem reprodução vegetativa por brotamento ou fissão. Crescem rapidamente em meio simples, gerando alta densidade celular (ROMANO et al., 2003). Desempenham uma função primordial na elaboração de vinhos, atuando na transformação do açúcar do mosto em etanol e componentes orgânicos outros igualmente importantes. Esses microrganismos realizam essas tarefas, mas o fator de conversão e a velocidade do processo dependem, dentre outros fatores, da linhagem empregada. Diferenças entre vinhos de um mesmo mosto e em condições análogas podem ser elucidadas pelos produtos secundários formados durante a fermentação. Dentre esses compostos produzidos estão, notoriamente, glicerol, álcoois superiores e ésteres. Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* podem produzir teores elevados desses produtos, contudo, as concentrações são variáveis de acordo com a linhagem, desta forma, atribuem particularidade ao vinho (SILVA & SILVA, 1987).

A restrição da ação de microrganismos não desejáveis em processos fermentativos não estéreis, como na elaboração de vinho, é possível por meio da inoculação de linhagens de leveduras selecionadas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas são responsáveis pela produção de diversos metabólitos que exercem influência sobre o aroma e o sabor do vinho. Por conta disso, tornou-se comum o isolamento e manutenção de linhagens desta espécie para a utilização na vinificação na busca do controle do processo (FLEET, 2008). Adicionalmente, é usual no início do processo fermentativo, serem encontradas linhagens como *Pichia*, *Candida* e *Hanseniaspora* (COCOLIN et al., 2004). Estas espécies produzem compostos de aroma que têm grande contribuição para a qualidade sensorial do vinho, apesar de participarem apenas do início da fermentação. Assim, o estudo das propriedades metabólicas e fisiológicas das leveduras não-*Saccharomyces* pode contribuir para a elaboração de vinhos (MAMEDE & PASTORE, 2007). A superfície de bagas de uvas colhidas em vinhedo no Brasil também mostrou uma diversidade importante de gêneros, como *Candida*, *Hanseniaspora*, *Isstachenkia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kodamaea*, *Kwoniella*, *Starmerella*, *Zygoascus*, *Saccharomycopsis*, *Zigosaccharomyces, Sporidiobolus, Papiliotrema* e, numa amostra Sauvignon Blanc, foi posteriormente identificada o gênero *Yarrowia* (SILVA et al., 2016).

Técnicas de biologia molecular são amplamente aplicadas na determinação de grupos taxonômicos. A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consiste em uma reação de polimerização em cadeia para a amplificação de sequência de DNA por meio de uma reação enzimática. Os tipos distintos de marcadores moleculares hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade em nível de DNA, e assim variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, ao custo, à facilidade de uso, à consistência, à repetibilidade (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Sendo assim, por meio da PCR, pode-se obter, *in vitro* um aumento da quantidade de uma determinada sequência de DNA, representando um grande recurso para o estudo destas sequências e permitindo uma série de aplicações nas mais diferentes áreas da ciência. Com os avanços da técnica, surgiram algumas variações de iniciadores *(primers)* e de temperaturas aplicadas no processo de amplificação.

Desta forma, o conhecimento das linhagens de leveduras utilizadas no processo é essencial para que se obtenha uma fermentação adequada e, consequentemente, a elaboração de produtos com a qualidade requerida.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o melhor *primer* para a discriminar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial da Embrapa por meio dos métodos: RAPD (*Random Amplification of Polymorphic* DNA); SSR (*Simple Sequence Repeats*); e transposons Ty.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a atividade metabólica de 9 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e identificar o melhor *primer* para discriminar variações intraespecíficas entre linhagens.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Aferir a velocidade de fermentação de nove linhagens *Saccharomyces cerevisiae;*

2.2.2 Estimar a produção de sulfeto de hidrogênio de nove linhagens *Saccharomyces cerevisiae*;

2.2.3 Investigar a característica *killer*, sensibilidade e neutralidade ao fator *killer* de nove linhagens *Saccharomyces cerevisiae*;

2.2.4 Avaliar a capacidade dos métodos em discriminar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Microrganismo e Habitat

As leveduras são fungos unicelulares que podem apresentar células esféricas, ovais, alongadas e forma de limão, podendo também formar psedomicélio e micélio verdadeiro. Estão amplamente distribuídas na natureza e com frequência são encontradas sobre folhas e frutos. A forma de reprodução das leveduras é variada podendo se reproduzir por processo sexuado ou assexuado. Este último pode se dar por brotamento, sendo este multilateral, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces Pachysolen*, unipolar, como *Trigonopsis*, biploar, como *Hanseniaspora, Wickerhamia*. A repodução assexuada pode ainda ser por fissão binária, como *Schizosaccharomyces pombae* (KREGER VAN RIJ, 1984, BARNETT et al. 1990, Walker, 1998).

Na superfície de bagas de uvas podem existir diversas espécies de leveduras, dependendo do estádio de maturação. Além da *Saccharomyces cerevisiae*, pode-se encontrar *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia, Cryptococcus (FLEET, 2003) Rhodotorula, Sporobolomyces, Candida, Hanseniaspora, Pichia, Zygoascus, Zygosaccharomyces e Torulaspora* (BARATA et al., 2012), *Candida*, *Isstachenkia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Kodamaea*, *Kwoniella*, *Starmerella*, *Saccharomycopsis, Sporidiobolus, Papiliotrema* e *Yarrowia.* O local e a cultivar parecem influenciar a biodiversidade (SILVA et al., 2016).

3.2 Regiões vitivinícolas no Brasil

O cultivo vitivinícola no Brasil está dividido em 6 regiões, distribuídas pelo Sul e Nordeste do País: Rio Grande do Sul: Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste e Campos de Cima da Serra; Santa Catarina: Planalto Catarinense; Bahia: Vale do São Francisco (Figura 1).

Fonte: IBRAVIN (2012).

Figura 1 - Regiões produtoras de vinhos no Brasil.

A Indicação Geográfica (IG) retrata a tipicidade do produto, valorizando suas características principais e preservando o vínculo com a origem geográfica (INPI, 2018) (Tabela 1). E são divididas em Indicações de Procedência e Denominação de origem.

As Indicações de Procedência (IP) referem-se ao nome geográfico de um país, cidade, região ou localidade de um território e que se tornou conhecida como

centro de obtenção, produção de um determinado produto ou de prestação de um serviço.

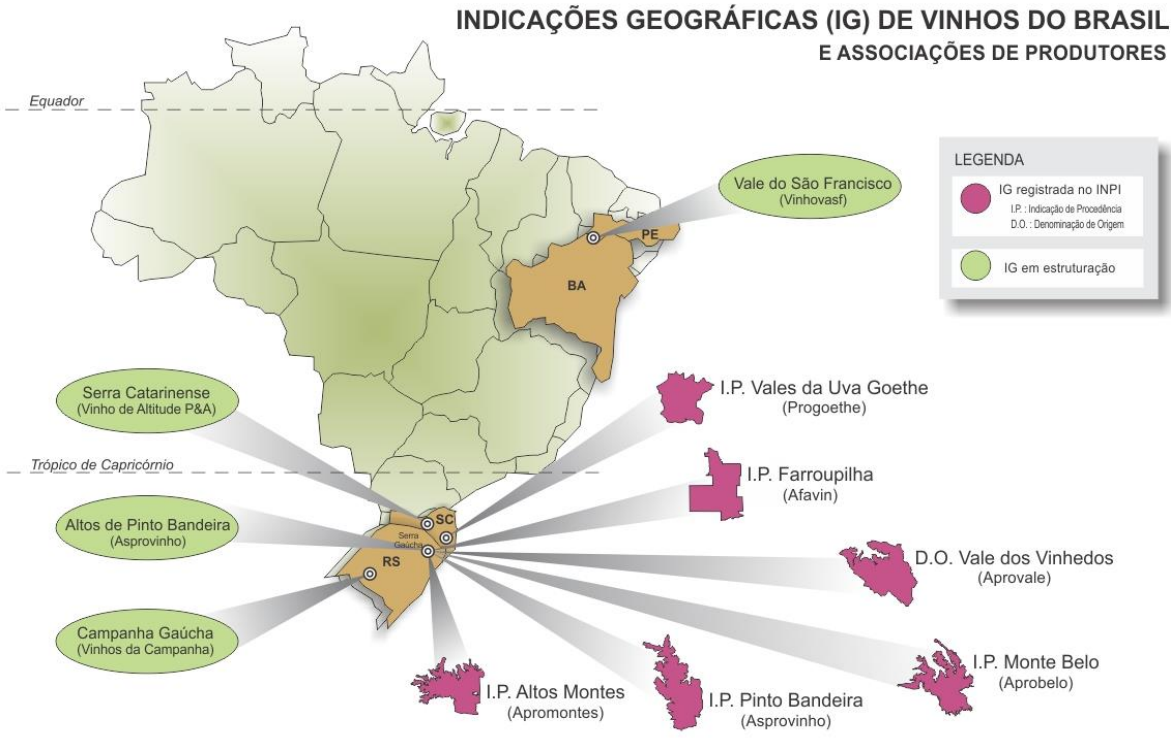
Por outro lado, as Denominações de Origem (DO) indicam o nome geográfico do país, cidade, região ou localidade de seu território e que designa o produto ou serviço cujas qualidades ou características devam-se exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluindo fatores naturais e humanos (Figura 2).

Tanto a IP quanto a DO devem estar registradas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (ANJOS, et al., 2010).

Tabela 1 - Princípios fundamentais entre os conceitos de Denominação de Origem (D.O) e Indicação de Procedência (I.P)

Itens	D.O	I.P
Meio Natural	O meio geográfico marca e personaliza o produto; a delimitação da zona de produção é indispensável	O meio geográfico não tem necessariamente uma importância especial, sendo que o nome geográfico pode referir-se à origem do vinho, a localização da cantina ou ao local de engarrafamento
Renome/ Prestígio	Indispensável	Não necessariamente indispensável
Uniformidade de produção	Mesmo existindo mais de um tipo de produto, eles estão ligados por certa homogeneidade de características	Pode ser aplicado a um conjunto de produtos de características diferentes que tenham em comum apenas o local de produção, o centro de distribuição ou o local de engarrafamento
Regime de produção	Há regras específicas de produção e características qualitativas mínimas dos produtos	Não existe uma disciplina de produção à qual devam ser submetidos os produtos; existe apenas uma disciplina de marca
Constância das características	Os produtos devem conservar um mínimo de qualidade e uma certa constância nas suas características	Não implica um nível de qualidade determinado nem de constância de características
Volume de produção	Há um limite de produção por hectare, que tem relação com a qualidade do produto	Não existe limite de produção

Fonte: Yravedra 1980, adaptado por Jorge Tonietto (Embrapa, 1993).



Fonte: Jorge Tonietto, Luciana Prado. (Embrapa Uva e Vinho) e Ivanira Falcade (UCS) (2017).

Figura 2 – Indicações geográficas de vinhos no Brasil

3.3 Influência das leveduras como agente transformante

As leveduras são os principais agentes de transformação do açúcar em etanol e outros componentes. A *Saccharomyces cerevisae* é a principal representante e responsável pela transformação do mosto em vinho. Um vinho de qualidade jamais poderá ser elaborado sem a participação de algum agente transformante de qualidade e, da mesma forma, sem uva de qualidade (SILVA, 2003).

Sabe-se que há diversas espécies de leveduras presentes na baga da uva. Todas elas participam, de uma forma ou de outra, do processo de vinificação, em especial, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. As outras espécies de leveduras atuam na fermentação contribuindo no desenvolvimento de aromas, entre outros importantes atributos. As leveduras, tanto as *Saccharomyces* quanto as não-*Saccharomyces*, são os principais agentes influenciadores no sabor dos vinhos, sejam estes vinhos elaborados por meio de fermentações espontâneas, sejam por

fermentações onde leveduras selecionadas são inoculadas. Tanto num processo como no outro, há interação com leveduras do vinhedo e do ambiente da própria cantina (LAMBRECHTS & PRETORIUS 2000; ROMANO et al., 2003).

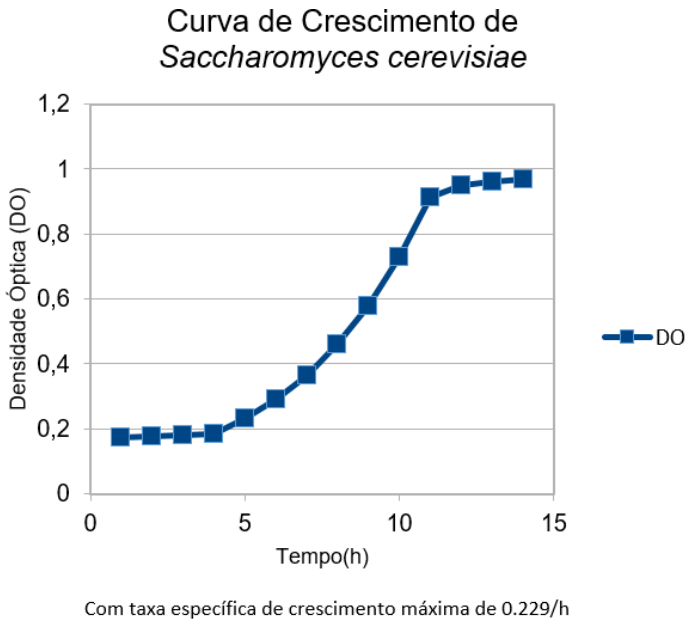
3.3.1 Fermentação

Por volta de 1850, Louis Pasteur concluiu que a fermentação de açúcar em álcool ocorria por agentes biológicos (teoria vitalística). Ele postulou que o processo fermentativo era inseparável da estrutura das células de levedura vivas. Esse ponto de vista, chamado de teoria vitalística, prevalece até hoje. Em 1897, Eduard Buchner mostrou que extratos de levedura podiam transformar açúcar em álcool, provando que a fermentação era feita por moléculas que continuavam ativas em extratos livres de células (NELSON & COX, 2014). Essa descoberta, no entanto, em nada se contrapõe ao que afirmou Dr. Louis. A grande diferença entre o que Pasteur encontrou e o que Büchner demonstrou está na cinética de transformação. Afinal, todo o ser vivo conta com a atividade de enzimas que catalisa reações químicas inerentes ao processo vital. A fermentação alcoólica é uma dessas reações vitais que permite, entre outros objetivos fisiológicos, a obtenção de energia metabólica que se armazena na forma de ATP.

A fermentação alcoólica ocorre em anaerobiose, na glicólise. O metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* nessas condições, ao invés de ser conduzido para o sistema oxidativo (via do ciclo tricaboxílico e fosforilação oxidativa), é desviado para a formação de etanol e CO_2 ou glicerol. Inicialmente, uma molécula de glicose é clivada, e passa por uma sequência de no mínimo 12 reações ordenadas, catalisadas por enzimas específicas, que Büchner ajudou a descobrir. Durante essa sequência de reações, são produzidas quatro moléculas de alta energia ATP (Adenosina Trifosfato), com um saldo líquido de duas moléculas por cada molécula de glicose metabolizada, em seu trajeto em direção ao ácido alfa-cetopirúvico ou simplesmente pirúvico. Na fermentação alcoólica, cada ácido pirúvico sofre uma descarboxilação e é convertido a acetaldeído, liberando uma molécula de dióxido de carbono (CO_2). Em seguida, o acetaldeído formado sofre uma redução com o $NADH+H^+$, NAD esse reduzido logo após a fase preparativa da glicólise, convertendo-se em etanol (CONN & STUMPF, 1975). Assim, o principal objetivo da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia que será

empregada na realização de diversas funções fisiológicas e formar esqueleto de carbono para a síntese de outras moléculas importantes como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos.

O crescimento das leveduras pode ser considerado um aumento no número de células, exponencialmente. A curva de crescimento das leveduras (Figura 3), assim como a das bactérias, tem quatro fases (1) fase lag: alto metabolismo, sem divisão celular, a duração dependerá do meio de cultura; (2) fase log (exponencial): rápida divisão celular, as leveduras crescem em progressão geométrica. É uma reta cuja inclinação depende da velocidade de divisão de células; (3) fase estacionária: o número de células permanece quase em constante por um período de tempo, há baixo consumo de energia e manutenção da viabilidade celular até o esgotamento dos nutrientes; (4) fase de morte: as leveduras passam a morrer mais rapidamente que a população de novas células (VIEIRA & FERNANDES, 2012).



Fonte: Silva (2012).

Figura 3 - Curva de crescimento das leveduras

3.4 Importância da utilização de leveduras selecionadas

Há vantagens no emprego de leveduras selecionadas para a elaboração de vinhos. Entre elas, podemos citar fermentação completa e regular, maior produção de álcool, produção controlada de acidez volátil, maior estabilidade biológica, além de

garantir uma clarificação mais rápida do vinho e não formação de produtos indesejáveis (SILVA & SILVA, 1987). As linhagens naturalmente presentes na uva de uma determinada região e devidamente selecionadas para elaboração do vinho daquela mesma região conferem características sensoriais únicas aos vinhos. A inoculação do mosto com uma levedura selecionada minimiza a influência negativa da linhagem sem aptidão enológica, mas sem impedir que linhagens não-*Saccharomyces* desempenhem o seu papel quanto a outros aspectos do vinho, como os aromas (FLEET, 2008). As leveduras autóctones podem contribuir com a qualidade do vinho, além de dar contribuições únicas e, reservando para uma determinada área geográfica, nuances regionais típicas (HEARD, 1999).

3.5 Seleção de leveduras autóctones

3.5.1 Capacidade fermentativa

A fermentação do vinho é um processo ecologicamente complexo, a população de leveduras poderá mudar à medida que a fermentação prossegue. A capacidade de transformação da levedura aliada à alta concentração de açúcares resulta numa atividade metabólica tal que pode ser visualizada pela intensa movimentação da massa líquida devido à liberação do CO_2. Essa conversão pode ser monitorada por análises químicas, avaliando a concentração de açúcares redutores totais e a quantidade de etanol formada, ou por processos físicos, medindo a densidade do mosto em processo fermentativo ou por gravimetria (FLEET, 2008).

Algumas espécies podem estar presentes no estádio inicial da fermentação alcoólica, e apresentam baixo poder fermentativo, *como Candida, Hanseniaspora, Pichia, Hansenula, Metschnikowia, Kluyveromyces, Zygosaccharomyces, Saccharomycodes, Torulaspora, Schizosaccharomyces e Rhodotorula* (FLEET, 2008). Também são encontradas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae,* algumas destas linhagens apresentam aptidão enológica e outras não.

3.5.2 Produção de Sulfeto de Hidrogênio (H_2S)

A produção de H_2S é uma atividade metabólica de algumas linhagens de leveduras. Este composto é indesejável porque confere odores estranhos ao vinho

(SILVA & SILVA, 1987). É considerado produto secundário da fermentação alcoólica. Diversos fatores podem contribuir com a produção de H_2S durante a fermentação vínica. Entre estes fatores podemos destacar a concentração em compostos nitrogenados, teor em compostos sulfurados, o estado de maturação da uva, as práticas enológicas, a taxa e a temperatura de fermentação e a linhagem da levedura (RANKINE, 1964; ZAMBONELLI *et al.,* 1984).

3.5.3 Fator *killer*

O fenômeno *killer* caracteriza-se por produzir exotoxinas com atividade antimicrobiana, que são mediadas por receptores de parede específicos da célula em microrganismos suscetíveis. Estas leveduras estão aptas a destruir células e atuam em organismos da mesma espécie ou espécies distintas (POLONELLI et al., 1993).

A atividade *killer*, de acordo com Somers e Bevan (1969), corresponde à produção de proteínas de baixo peso molecular que são letais às leveduras sensíveis. Suas toxinas *killer* possuem massa molecular que varia de 18 a 300 kDa dependendo da espécie de levedura (SOARES & SATO, 2000). Esta característica foi descrita pela primeira vez em linhagens de laboratório de *Saccharomyces cerevisiae* por Bevan e Makower, (1963). Os autores observaram que certas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* podiam ser classificadas em três fenótipos: *killer*, sensível e neutra. Quando células *killer* e sensíveis cresciam em um mesmo meio de cultura, uma grande proporção das células sensíveis era destruída. Segundo Brites (2003) as células neutras não matavam células sensíveis, nem eram mortas por células *killer*. Silva (1996) também elucidou que o fator *killer* é determinado por proteínas de baixo peso molecular excretadas por algumas linhagens de leveduras, que por sua vez secretam toxinas glicoproteicas que matam linhagens sensíveis. Afirma também que linhagens sensíveis podem conviver num mesmo ambiente se linhagens neutras estiverem presentes. Isto é o que ocorre constantemente na natureza. Se assim não fosse, não seria possível se obter, ao mesmo tempo e no mesmo ambiente, linhagens killer e sensível, como as linhagens encontradas por Silva (1996).

3.6 Utilização de marcadores moleculares

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é fundamentada na biologia molecular, pois amplifica uma ou mais cópias de um segmento de DNA em várias ordens de grandeza, gerando milhares de cópias de uma determinada sequência de DNA. A técnica foi desenvolvida em 1983, por Kary Mullins (BARTLETT & STIRLING, 2003). As aplicações de PCR usualmente empregam uma enzima termoestável, como a Taq polimerase, originalmente isolada de bactéria extremófila *Thermus aquaticus* (PORTA & ENNERS, 2012).

A reação de PCR envolve três etapas: (1) desnaturação: o DNA, contendo a sequência a ser amplificada, é desnaturado por aquecimento a cerca de 95°C por cerca de 30 segundos. A dupla fita é aberta (desnaturada), tornando-se uma fita única; (2) pareamento: após a separação das fitas, um par de iniciadores ou *primers* complementam a fita oposta da sequência de DNA a ser amplificada. Ou seja, um deles é complementar à sequência em uma fita da dupla-hélice de DNA e o outro é complementar à sequência na outra fita. O molde é determinado pela posição dos iniciadores que se ligam à fita. A etapa geralmente ocorre a uma temperatura em torno de 60°C e em média 40 ciclos; (3) extensão: com o molde já identificado e o *primer* acoplado ao DNA, a enzima DNA-polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de DNA. Esse processo acontece a uma temperatura de 72°C e tempo variável (ALBERTS et al., 1994 ; PORTA & ENNERS, 2012). Baseando-se nesse procedimento molecular, o presente trabalho foi planejado para utilizar as técnicas de biologia molecular RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA); Inter Simple Sequence Repeats (SSR); e o elemento de transposição, Ty para discriminar linhagens.

Nesse sentido, a compreensão do genoma completo de algumas espécies de leveduras e as funções específicas dos genes possibilitarão novos avanços científicos, especialmente em sua fisiologia e funcionalidade durante a fermentação. Os estudos de caracterização de linhagens podem proporcionar o desenvolvimento da enologia moderna, com a aplicação de novas linhagens de levedura selecionadas. Além disso, estudos concentram-se principalmente na discriminação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, no entanto, há um crescente interesse em isolar, caracterizar e utilizar leveduras pertencentes ao grupo de leveduras não-*Saccharomyces,* que formam grande parte da microbiota natural de levedura das uvas

e são ativas no início do processo da fermentação alcoólica. Embora muitas vezes influenciem a capacidade fermentativa e o sabor do vinho de forma negativa, algumas destas leveduras também adicionam compostos aromáticos endereçados positivamente que enriquecem a complexidade do vinho (CASTELLUCCI, 2012).

3.6.1 Diferenciação de linhagens por RAPD

A necessidade de conhecimentos prévios sobre a sequência de nucleotídeos da espécie a ser estudada, e os custos elevados para a obtenção destes conhecimentos limitaram, durante alguns anos, a aplicação das novas técnicas desenvolvidas baseadas em PCR (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Em meados dos anos 90, essa necessidade foi suprida, com o desenvolvimento do RAPD *(Random Amplification of Polymorphic DNA)*, um marcador molecular dominante que amplifica o DNA genômico, utilizando pequenos *primers de* sequência arbitrária. Esta técnica tem sido aplicada no estudo da genética de populações e é considerada como eficiente na detecção de polimorfismos devido a rápida identificação de fragmentos específicos de DNA (WILLIAMS et al., 1990).

Esse sistema é caracterizado pelo uso de *primers* curtos, em torno de 10 mers. O diferencial também se encontra nas baixas temperaturas de pareamento (geralmente de 35 a 39°C). O *primer* é ligado a regiões do DNA não específicas, distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma, permitindo assim, amplificações polimórficas. O uso de RAPD permite obter "*fingerprints*", que são combinações de diferentes números de *amplicons*, com diferentes tamanhos, gerando um padrão de bandas que viabiliza a discriminação (ERGON & GULAY, 2005).

Dentre as vantagens da técnica RAPD, destacam-se: o uso de *primers* universais, que facilitam a análise de uma grande variabilidade de espécies; a aplicabilidade em trabalhar com genomas desconhecidos: poder ser aplicado em casos onde se tem apenas uma pequena quantidade de DNA; (MATIENZO, 2002) (HADRYS et al., 1992), é importante ressaltar que, em algumas espécies, dependendo do *primer* utilizado, poderá não haver discriminação por meio dessa técnica (ERGON & GULAY, 2005).

3.6.2 Diferenciação de linhagens por SSR

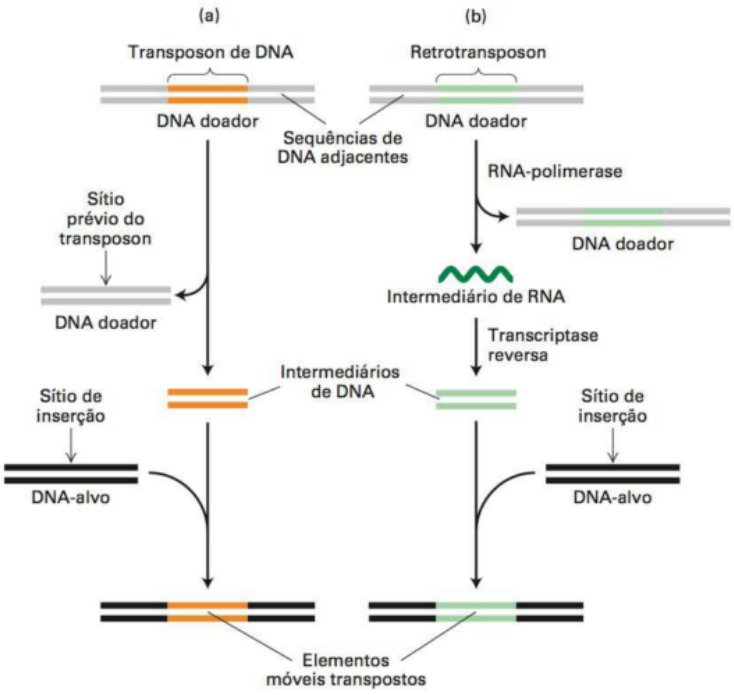
Estudos realizados na década de 1980 mostraram que os genomas de eucarióticos são amplamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas em *tandem*, que foram chamadas de *Simple sequence repeats* (SSRs) (LEVINSON & GUTMAN, 1987), geralmente possuem um valor inferior a 10 pares de base (STRAND et al., 1993). São formados presumivelmente por recombinação ou por um mecanismo de deslizamento ou do molde ou das fitas recém-sintetizadas durante a replicação do DNA (LODISH et al., 2014). Essas repetições são encontradas intercaladas em várias combinações de dois ou mais SSRs, podem ser di-, tri-, tetra-, e penta nucleotídeos (GUPTA et al., 1994). São utilizados como marcadores genéticos altamente informativos, é utilizado em conjunto com a técnica de PCR (SCHLÖTTERER, 2000). Este meio de detecção do polimorfismo visa regiões altamente variáveis do genoma. É vantajoso por ser robusto, alta reprodutibilidade, codominante e multialélico, portanto, apresentam um alto grau de confiabilidade (LAMINE & MLIKI, 2015). Os microssatélites são mais comumente encontrados nas regiões não codificantes do genoma, onde a falta de restrições seletivas impede a correção de mutações nesses alelos (HANCOCK, 1995).

Gallego et al. (1997) utilizaram os microssatélites para discriminar linhagens da mesma espécie de *Saccharomyces cerevisiae*. A utilização deste método pode superou algumas das limitações associadas com métodos clássicos de identificação taxonômica. Atualmente, estudos moleculares baseados em microssatélites têm sido desenvolvidos embasados em algumas espécies de fungos, com aplicação na discriminação das linhagens enológicas, com o objetivo de diagnóstico rápido. É um método adequado, de alto rendimento e baixo custo para monitorar rapidamente a dominância de linhagens de leveduras inoculadas em fermentações industriais de vinhos tintos e brancos usando um pré-tratamento de limpeza de carbono ativado e um método de extração rápida de DNA mais análise multiplex PCR-SSR (CORDERO-BUESO et al., 2017).

3.6.3 Diferenciação de linhagens por Ty

Na década de 1940, foram descobertos os primeiros elementos móveis, durante a realização de experimentos clássicos com milho. Identificaram-se as

entidades genéticas que podiam entrar e sair dos genes, alterando o fenótipo dos grãos do milho. Posteriormente, foram identificados elementos móveis semelhantes nas bactérias, nas quais foram identificados como sequências específicas de DNA (MCCLINTOCK, 1950). Por meio de estudos desses elementos móveis, descobriu-se que podiam ser classificados em duas categorias: aqueles diretamente transpostos como DNA, sem intermediários – chamados de transposons. E aqueles transpostos por meio de um RNA intermediário transcrito a partir de um elemento móvel por uma RNA polimerase e, então, convertido novamente em cDNA de fita dupla por uma transcriptase reversa – chamados de retrotransposons. Dessa forma, como pode-se observar na Figura 4, os (a) transposons de DNA movem-se por um mecanismo de corte e colagem enquanto os (b) retrotransposons movem-se por um mecanismo de cópia e colagem(LODISH et al., 2014).

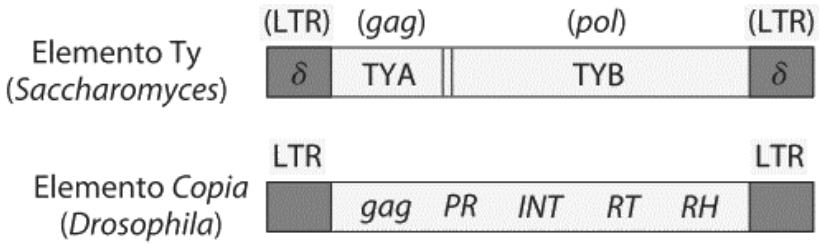


Fonte: Lodish et al., 2014.

Figura 4 - As duas classes principais de elementos móveis

Os genomas de todos os eucariotos estudados, desde leveduras até humanos, contêm retrotransposons, que representam aproximadamente 1-2 % do genoma da levedura (PARKET & KUPIEC, 1992). Esses elementos móveis são

divididos em duas categorias principais: aqueles que contêm e os que não contêm repetições terminais longas – conhecidos como *Long Terminal Repeat* (LTR). Os retrotransposons LTR são comuns nas leveduras, por exemplo, o elemento Ty, e na *Drosophila* os elementos cópia (Figura 5). Estruturalmente são muitos semelhantes aos retrovírus, desta forma, as sequências do elemento Ty são funcionalmente equivalentes às LTR retrovirais (LODISH et al., 2014; NELSON, D.L. & COX, 2014). A classificação nessas subclasses é baseada na filogenia da transcriptase reversa (XIONG & EICKBUSH, 1990). O elemento Ty1 de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido o mais estudado porque foi o primeiro LTR-retrotransposon a ser descoberto envolvendo uma molécula intermediária de RNA. O Ty1 funcional codifica dois quadros abertos de leitura (ORF), GAG, com funções de capsídeo e chaperona, e POL que codifica três proteínas com atividade catalítica, protease, integrase e transcripatse reversa/RNase H (CURCIO et al., 2015).



Fonte: Nelson & Cox, 2014.

Figura 5 - Transposons em eucariontes

As leveduras possuem uma característica interessante, a grande variabilidade genética. Duas sequências repetidas que possuem relação com elementos Ty1 foram isolados do genoma de *Saccharomyces cerevisiae.* São elas, Ty1-17 e Ty1-191, ambas estão situadas no cromossomo III, são estruturalmente semelhantes e diferem entre si pela inserção presença de 1200 pb próximo do terminal da sequência do elemento. Ty1 e Ty1-17 apresentam aproximadamente o mesmo tamanho mas diferem entre si pela presença de duas grandes substituições (KINGSMAN et al., 1981). Muitos elementos podem ser distinguidos com base no padrão de restrição. Desta forma, grande parte dos Ty sequenciados mostram a

mesma organização genética, com pequenas variações de sequência (BOEKE et al., 1985).

O genoma de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* contém 331 inserções compostas por 217 Ty1, 34 Ty2, 41 Ty3, 32 Ty4 e 7 Ty5. Destes, 87% eram constituídos por LTRs ou fragmentos de LTR (KIM et al., 1998). A quantidade de inserções apresentadas por Sandmeyer (1998) é superior àquela mostrada por Kim et al. (1998). Segundo estudos de Jordan and McDonald (1999), das cinco famílias de retrotransposons, Ty1 e Ty2 são as famílias mais populosas do genoma enquanto as famílias Ty3, Ty4 e Ty5 são menos expressivas e mostraram ainda que estas famílias apresentam pouca variação tanto de tamanho quanto em sequência. Análises filogenéticas baseadas em sequências de aminoácidos de TyB mostram que as cinco famílias do elemento Ty pertencem a dois grupos: (a) Ty1, Ty2, Ty4 e Ty5 são retroelementos cópia e (b) Ty3 é a única família pertencente ao grupo móvel.

A utilização da técnica de PCR com objetivo de amplificar a região interdelta foi proposta inicialmente por Ness et al (1993). Legras & Karst (2003) melhoraram a amplificação da região interdelta, utilizando a base de dados da sequência completa do genoma de leveduras. A análise do banco de dados permitiu a otimização do desenho dos *primers* interdelta, bem como o desenvolvimento de um novo método compatível com a projeção numérica. No estudo citado, a sequência do genoma da *Saccharomyces cerevisiae* foi usada para projetar dois novos *primers* interdelta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem dos microrganismos

As leveduras autóctones utilizadas pertencem à Coleção de Microrganismos de Interesse Agroindustrial (CMIA) do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Embrapa Uva e Vinho. As linhagens foram mantidas a -81°C Sanyo MDF U33F (USA). Desta forma, para o início dos testes, as leveduras foram propagadas em meio Mosto Ágar (SILVA,1996) em um tubo de ensaio e mantidas em uma incubadora a 24°C para crescimento celular.

A abreviação dos microrganismos, quando aqui empregada, seguirá aquela preconizada por Kreger van Rij (1984) e usada nas Coleções Internacionais: ATCC- American Type Culture Collection, CBS- Centraalbureau Schimmelcultures-Utrecht, LKB- Laboratoy of the Kondama Brewing Company, NRRL- The Northern Recional Research Laboratory.

4.2 Linhagens utilizadas

As linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* estudadas no presente trabalho foram selecionadas da coleção de microrganismos de interesse agroindustrial da Embrapa. A linhagem 1VVT97, isolada a partir do mosto de uvas tintas da região do Vale dos Vinhedos Bento Gonçalves- RS, é utilizada como linhagem padrão para avaliar a velocidade de fermentação e não produção H_2S (SILVA et al., 2005) e a levedura K1 é uma linhagem comercial (Lallemand) que também é empregada como padrão de velocidade de fermentação mas apresenta formação variada de H_2S. A linhagem 91B84, isolada por da Silva (1996), também é utilizada como linhagem padrão na avaliação de sensibilidade ao fator *kille*r. Além das linhagens 1VVT97, 91B84 e K1, também foram estudadas as linhagens isoladas em diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Vale do São Francisco, entre 2010 e 2017: 02MB12**,** 38APB12**,** 50MBTF14**,** 29MSCL15**,** 45VSFCS10**,** 3MCBSf17 e 37GTEpUf17 e *Saccharomyces cerevisiae boulardii* (Merck) (Apêndice I). Para avaliação de espécies diferentes foram utilizadas as linhagens descriminadas no Apêndice II.

4.3 Caracterização das linhagens

4.3.1 Velocidade de fermentação

Preparou-se uma suspensão de células, transferindo uma alçada da linhagem de interesse para tubos de ensaio com água destilada estéril de modo a se obter uma concentração aproximada de 10^7 células.mL^{-1}, padronizada por meio do cartão de Wickerham, descrito por Kreger-van Rij (1984). A análise da velocidade de fermentação ocorre no tubo de ensaio com rosca, em triplicata, contendo 9mL de mosto sulfito (SILVA & SILVA, 1984) e 1mL de suspensão de células de cada levedura de interesse.

As avaliações da velocidade de fermentação e da produção de H_2S foram simultaneamente realizadas por gravimetria (GIUDICI & KUNKEE, 1994; CIANI & FERRARO, 1996) e com acetato de chumbo, respectivamente. Os tubos são pesados num período total de 96 horas, com intervalos de 6 e 18 horas. Os tubos foram incubados em estufa Lab-Line® Imperial II Incubator (USA) a 24ºC. Durante o período, observa-se o desprendimento de CO_2, a partir dos valores obtidos nas pesagens calcula-se a média aritmética da triplicada e o delta peso de forma adicional.

4.3.2 Evolução de sulfeto de hidrogênio

A presença ou ausência de H_2S é detectada qualitativamente por meio de uma fita de papel filtro fixada na tampa do tubo, previamente impregnada com solução saturada de acetato de chumbo 3% (Silva & Silva, 1984). As notações: negativo (-), fracamente positivo (+), positivo (++) e fortemente positivo (+++) dependem do escurecimento da fita durante a fermentação, indicando a não produção (-) e os teores diferenciados de H_2S produzido.

4.3.3 Atividade *killer*

Neste teste foi possível observar a capacidade das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em produzir a proteína *killer*. A análise foi realizada em placas de Petri contendo meio ágar 80:20 (SILVA *et al*., 2011). Inicialmente as placas foram semeadas com 100µL de suspensão de células cuja concentração foi de 10^7

células.mL^{-1}, das seguintes linhagens sensíveis, que foram utilizadas como tapete na placa:

- *Saccharomyces cerevisiae* 26B84;
- *Zygosaccharomyces bisporus* 46TASL15;
- *Hanseniaspora uvarum* 50MCF14;
- *Candida californica* 40MCF14;
- *Issatchenkia terrícola 21MCF14;*
- *Pichia fermentans* 1GTRU15.

Em seguida, como massa pontual, foram utilizadas as leveduras em estudo, com o objetivo de observar quais linhagens apresentam a capacidade de matar as linhagens sensíveis acima citadas. Adicionalmente, foram utilizadas as linhagens *Saccharomyces cerevisiae* 1B e *Saccharomyces cerevisiae* K1 como linhagens padrão, ou seja, espera-se que haja morte na placa onde a linhagem sensível *Saccharomyces cerevisiae* 26B84 esteja sendo utilizada como tapete. A característica *killer* positiva é indicada pela formação do halo de inibição ao redor das leveduras sensíveis (SILVA, 1996). Todos os processos de manipulação das linhagens para efetuar os testes foram feitos em capela de fluxo laminar TROX (vertical) BR equipada com filtros esterilizantes com 0.22 µm de diâmetro de poro.

4.3.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator *killer*

Investigou-se a sensibilidade das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* ao fator *killer*, utilizando-as como tapete da placa de Petri contendo meio mosto 80/20 (SILVA et al., 2011), e como massa pontual as leveduras padrão *killer*: *Saccharomyces cerevisiae* 1B, *Saccharomyces cerevisiae* 91B84 e *Saccharomyces cerevisiae* K1 e 22 linhagens *killer* não-*Saccharomyces*:

- *Hanseniaspora uvarum* 28MCF14;
- *Hanseniaspora opuntiae* 33MCF14, 13GTRU15, 7GTGU15, 37GPEpU15 e 34GPEpU16;
- *Candida diversa*: 29MCF14, 51MCF14, 52MCF14, 30MPB12, 12MPB12, 10MBR2f14, 27MBR2f14, 44TASL15 2GCEpU16, 8

GCEpU16, 36 GCEpUf16, 40GCEpU16, 41GCEpU16, 19PVPBf16, 28PVPBf16 e 32PVPBf16;

4.4 Variabilidade genética das linhagens

4.4.1 Padronização de células e extração do DNA

A padronização foi feita em tubos ensaio contendo 600 µL água estéril, e uma alçada do microrganismo, de modo a se obter uma concentração de 10^9 células.mL^{-1}. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada em vórtex. A contagem de células foi feita por meio da câmara de Neubauer melhorada. Esta padronização foi utilizada para todas as técnicas descritas no presente trabalho. O material genético das linhagens foi extraído segundo a técnica preconizada por Silva *et al*. (2012). Nos procedimentos de biologia molecular descritas neste trabalho, foram feitos três ciclos de: congelamento, descongelamento e agitação em vórtex por 1 minuto. Após a extração, também foram feitos alguns testes com o sobrenadante da extração, os tubos de *eppendorf* foram levados a centrífuga (Eppendorf® Microcentrifuge 5416 – Sigma) por 3 minutos a 5000rpm, o sobrenadante foi retirado e armazenado. Para otimização da concentração de células, foram analisadas a amostra inicial (10^9 células.mL^{-1}) e três diluições seriadas (10^8, 10^7e 10^6 células.mL^{-1}). Deste modo, a melhor concentração foi utilizada.

Posteriormente, foram feitas novas extrações, a fim de evitar o desgaste das amostras, as mesmas foram divididas em alíquotas, e em seguida mantidas no ultrafreezer. A cada reação de PCR feita retirava-se apenas 1 alíquota para descongelamento. As reações de PCR e suas aplicações nos géis foram efetuadas em duplicata para, deste modo, testar a repetibilidade.

4.4.1.1 PCR-ITS

O material genético foi amplificado por PCR, utilizando a região ITS do rDNA, ITS1-5.8S e ITS2. Foram utilizados os *primers* ITS 1(5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’) e ITS 4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’). Para cada reação, utilizou-se os seguintes reagentes: Taq polimerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase – Promega), $MgCl_2$ (Promega), dNTP (Invitrogen), *primer forward* (ITS1)

(Sigma)*, primer reverse* (ITS4) (Sigma) e *buffer* (5x colorless GoTaq® Flexi DNA - Promega). Na Tabela 2, estão apresentados os componentes e concentrações necessárias para o meio reacional.

Tabela 2 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por PCR-ITS

Componentes	Concentração na reação	Volume final (µL)
Água	q.s.p.	10,7
Primer ITS1	0,8 µM	1,0
Primer ITS4	0,8 µM	1,0
Taq polimerase	1,5U	0,3
Buffer	1x	5,0
$MgCl_2$	1,5 mM	1,5
dNTP	180 µM	4,5
DNA	10^9 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

A amplificação foi realizada no termociclador PROFLEX™ PCR System (USA), nas condições: desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30 segundos, 60ºC por um minuto para o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72ºC por um minuto para extensão da cadeia. E por fim, um ciclo de 72ºC por 10 minutos para a extensão final.

Para a espécie *Candida diversa* foi necessário utilizar *primers* específicos, por não apresentar amplificação com os ITS1 e ITS4. Portanto, utilizou-se o *primer* descrito por Agustini (2014), que foi desenvolvido utilizando com o auxílio da ferramenta Primer3Plus, com base na linhagem *Candida diversa* 1VVT99. Os *primers* foram denominados 28candiv3 *(forward)* e 28candiv4 *(reverse*).

4.4.1.2 Sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA.

A identificação foi realizada também pelo sequenciamento do produto de PCR da região D1/D2 do 26S rDNA. Para tanto, foi utilizado o par de *primers* NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') e NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG3'), em conjunto com os componentes descritos na Tabela 3, para a amplificação de um

fragmento entre 400 – 600 pb (Kurtzman & Robnett, 1998). A Composição do meio reacional para amplificação do material genético para o sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA é idêntica a descrita na tabela 2.

A amplificação foi realizada no termociclador PROFLEX™ PCR System (USA), nas condições: desnaturação inicial a 95ºC por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95ºC por 30 segundos, 60ºC por um minuto para o pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, 72ºC por um minuto para extensão da cadeia. E por fim, um ciclo de 72ºC por 10 minutos para a extensão final.

4.4.1.3 PCR-RAPD

Primer M13

Para o *primer* M13 (5’ GAGGGTGGCGGTTCT 3’) utilizou-se condições baseadas em Andrighetto et al. (2000), com algumas modificações na concentração do *primer.* Assim, as concentrações finais de reagentes estão encontradas na Tabela 3. As condições no termociclador foram de: um ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de: 95 °C por 30 segundos; 35 °C por 1 minuto; 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Tabela 3 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com *primer* M13 e *primer* $(GACA)_4$

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,1
Primer (20µM)	2 µM	2,5
Taq polimerase (5U/µL)	2U	0,4
Buffer (5x)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	2 mM	2,0
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

Primer $(GACA)_4$

O meio reacional foi idêntico ao do *primer* M13, já apresentados na Tabela 3. As condições de amplificação no termociclador utilizadas foram: um ciclo de desnaturação de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de: 94 °C por 1 minuto; 36 °C por 1 minuto; 55 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

Primers $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$

Foi utilizada a metodologia de Couto et al. (1996), com algumas modificações. O meio reacional está apresentado na Tabela 4. As condições de amplificação utilizadas no termociclador foram: um ciclo de desnaturação de 94 °C por cinco minutos; 40 ciclos de: 94 °C por quinze segundos; 35 °C por quarenta e cinco segundos; 72 °C por 1 minuto e 3 segundos e um ciclo final de 72 °C por 4 minutos.

Tabela 4 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com *primer* $(GAC)_5$ e *primer* $(GTG)_5$

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	10,95
Primer (20µM)	1 µM	1,25
Taq polimerase (5U/µL)	1,5U	0,3
Buffer (5X)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	1,5mM	1,5
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

Primers 28 e OPA-11

Foi utilizada a metodologia baseada em Couto et al. (1996) com *primer* 28 (5′-AGG AGG AGG A) e *primer* OPA-11 (5′-CAA TCG CCG T). O meio reacional descrito pelos autores foi testado e otimizado (Tabela 5), aumentando a concentração de dNTPs, Taq polimerase e *primer,* o resultado final está apresentado na Tabela 6.

Tabela 5 - Otimização do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD, com *primer* OPA-11

Reagentes	*C*1 (µL)	*C*2 (µL)	*C*3 (µL)
Água	10,95	9,8	9,1
Primer (20µM)	1,25	1,0	2,5
MgCl2 (25mM)	1,5	3,0	2
Taq (5U/µL)	0,3	0,2	0,4
dNTP (1mM)	5,0	5,0	5,0
Buffer (5x)	5,0	5,0	5,0
DNA	1,0	1,0	1,0
Volume total	25µL	25µL	25µL

Tabela 6 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com *primer* OPA-11

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,1
Primer (20µM)	2 µM	2,5
Taq polimerase (5U/µL)	2U	0,4
Buffer (5X)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	2 mM	2
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

O *primer* 28 também foi otimizado, com o aumento da concentração de *primer,* a composição final utilizada está na Tabela 7.

Tabela 7 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por RAPD com *primer* 28

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,8
Primer (20µM)	0,8µM	1,0
Taq polimerase (5U/µL)	1U	0,2
Buffer (5X)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	3 mM	3,0
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

As condições de amplificação para *primers* 28 e OPA-11 foram: 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 36°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, a extensão final foi de 72°C por 5 minutos.

4.4.1.4 PCR-SSR

Primer M13

As concentrações do meio reacional estão descritas na Tabela 8. As condições de amplificação para SSR foram de: um ciclo de desnaturação de 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de: 95 °C por 30 segundos; 55 °C por 1 minuto; 72 °C por 1 minuto e um ciclo final de 72 °C por 10 minutos.

Tabela 8 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com *primer* M13

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,1
Primer (20µM)	2 µM	2,5
Taq polimerase (5U/µL)	2U	0,4
Buffer (5x)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	2 mM	2,0
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

Primers $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$

Os ajustes do meio reacional para os *primers* $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$ foram realizados testando as concentrações apresentadas na Tabela 9. No *C*1 foi utilizado 2mM de $MgCl_2$, mantendo o *primer* a 1µM. O *C*2 diminuiu-se o $MgCl_2$ para 1,5 mM, e elevou-se o *primer* para 2µM. O *C*3 foi idêntico ao usado com os *primers* M13 e $(GACA)_4$, ou seja, com concentração de $MgCl_2$ e *primer* elevados. Por fim, no *C*4 utilizou-se as concentrações menores nos dois reagentes, de 1,5 mM e 1µM para $MgCl_2$ e *primer,* respectivamente.

Tabela 9 – Otimização do meio reacional para amplificação do material genético por SSR, com *primers* $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$

Reagentes	*C* 1 (µL)	*C* 2 (µL)	*C* 3 (µL)	*C* 4 (µL)
Água	10,45	9,7	9,1	10,95
Primer (20µM)	1,25	2,5	2,5	1,25
MgCl2 (25mM)	2,0	1,5	2	1,5
Taq (5U/µL)	0,3	0,3	0,4	0,3
dNTP (1mM)	5,0	5,0	5,0	5,0
Buffer (5x)	5,0	5,0	5,0	5,0
DNA	1,0	1,0	1,0	1,0
Volume total	25µL	25µL	25µL	25µL

Primers 28 e OPA-11

Foi utilizada a metodologia de Couto et al. (1996) com *primer* 28 (5′-AGG AGG AGG A) e *primer* OPA-11 (5′-CAA TCG CCG T). As composições dos meios estão na Tabela 10 e 11.

Tabela 10 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com *primer* OPA-11

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,1
Primer (20µM)	2 µM	2,5
Taq polimerase (5U/µL)	2U	0,4
Buffer (5X)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	2 mM	2
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

Tabela 11 – Composição final do meio reacional para amplificação do material genético por SSR com *primer* 28

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	9,8
Primer (20µM)	0,8µM	1,0
Taq polimerase (5U/µL)	1U	0,2
Buffer (5X)	1x	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	3 mM	3,0
dNTP (1mM)	200 µM	5,0
DNA	10^7 células.mL^{-1}	1,0
Volume total	-	25µL

As condições de amplificação foram: 94°C por 4 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, a extensão final foi de 72°C por 5 minutos.

4.4.1.5 PCR-Ty

As condições de PCR foram baseadas em Legras & Karst (2003) e Xufre et al. (2011), utilizando os *primers* delta 2 (δ2) (5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') delta 12 (δ12) (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') e delta21 (δ21) (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3'). Foram testadas duas combinações, δ2 - δ12 e δ12- δ21).

Na Tabela 12, está representada o meio reacional para reação de PCR de cada amostra.

Tabela 12 - Composição do meio reacional para amplificação do material genético por Ty com o par de *primers δ2 -δ12 e* par de *primers δ12- δ21*

Componente	Concentração na reação	Volume (µL)
Água	q.s.p.	5,1
Primer 1 (20µM)	2 µM	2,5
Primer 2 (20µM)	2 µM	2,5
Taq polimerase (5U/µL)	2U	0,4
Buffer 5x	1X	5,0
$MgCl_2$ (25mM)	1,5 mM	2,5
dNTP (1mM)	0,2 mM	5,0
DNA	10^9 células.mL^{-1}	2
Volume total	-	25µL

A reações de amplificação foram realizadas no termociclador PROFLEX™ PCR System (USA), nas condições: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos; seguido do pareamento de 42 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C e 90 segundos a 72°C; e a extensão final da cadeia a 72°C por 10 minutos.

4.4.2 Eletroforese

Os produtos amplificados, em todas as técnicas analisadas, foram separados por eletroforese em gel de agarose de 1,5% a 3%, 35mm a 50mm de espessura, e tamanho de 10cm x 15cm a 90V durante aproximadamente 2h (Kasvi, K33 -300V, USA) com corante bromofenol azul (BlueJuice™ Gel Loading Buffer 10X, Invitrogen) e tampão TBE 1x (Tris 90 mM, Ácido Bórico 90 mM, EDTA 2 mM). Como referência de tamanho molecular foram utilizados marcadores de 100 pb (DNA Ladder Invitrogen e DNA express Biotecnologia). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio na concentração de 0,5µg/mL por 20-30 minutos, a visualização e fotografia foram feitas em luz UV 320 nm no fotodumentador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (BIO RAD).

4.5 Análise estatística

Quando oportuno, os dados serão submetidos à análise de variância e a comparação das médias será efetuada pelo teste de Duncan ($p<0.05$). As bandas padrão obtidas após a amostra ter sido submetida à eletroforese foram usadas para a construção de uma matriz de ausência e presença, considerando o número total de bandas observadas. Com base nessa matriz binária de similaridade foi possível gerar o dendrograma. Para isso, foi empregado usado o programa “dendrograma_program R.txt" feito em R por Silva, G. A. da, 2013 e revisado em 2019 (R Development Core Team: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90005107-0, 2008) (Team, 2008). O programa calcula a distância euclidiana, o número de nós e de folhas, apresenta vários atributos dos nós e exibe o Coeficiente de Correlação Cofenética que afere o grau de ajuste do dendrograma observado.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das linhagens

As linhagens *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram, como esperado, substancial potencial fermentativo (Figura 6). Ao final das 96h (Figura 7), verificou-se, pela análise de variância que pelo menos uma das linhagens apresenta diferença significativa ($p<0,05$). O teste de Duncan revelou que esta diferença significativa ($p<0,05$) na evolução de CO_2 realmente existe entre a linhagem 91B84 e as linhagens 1VVT97, 3MCBSf17, 37GTEpUf17 e 29MSCL15 e que a linhagem 02MB12 só difere significativamente ($p<0.05$) da linhagem 1VVT97. O coeficiente de variação (CV) deste experimento foi considerado alto, uma vez que o valor obtido foi de 23%. Isso pode ser explicado pelo processo de avaliação gravimétrico aplicado. Ao serem pesados, uma das repetições pode liberar, aleatoriamente, maior o menor volume de gás de acordo com o manuseio dos tubos no momento da avaliação. Esse fato pode elevar o CV do experimento.

5.1.1 Habilidade fermentativa

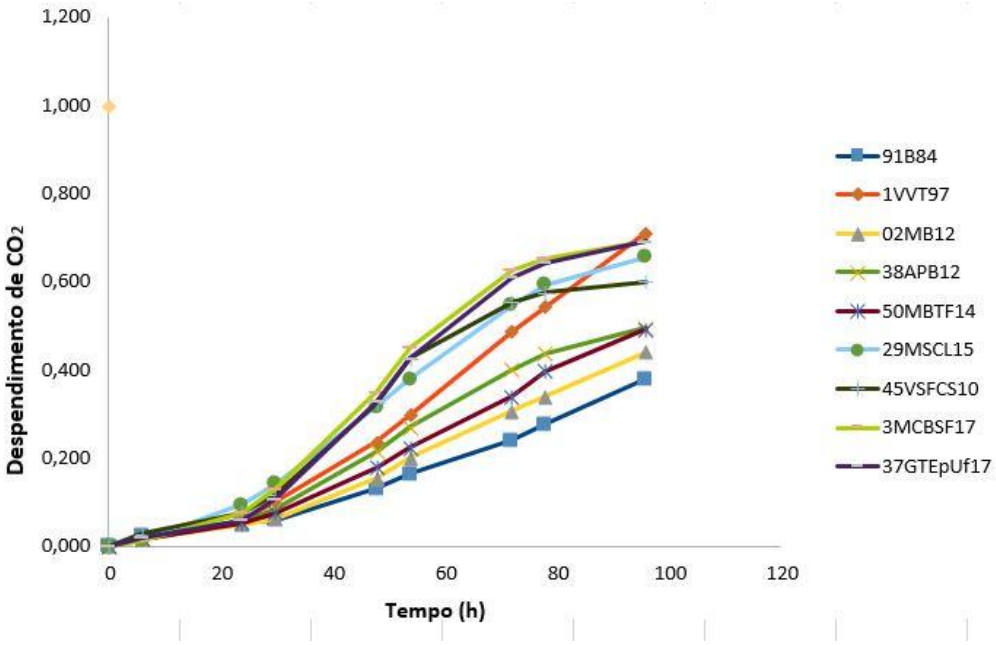


Figura 6 - Velocidade de fermentação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Figura 7 - Fermentação das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* após 96h de incubação

5.1.2 Produção de H_2S

As fitas impregnadas com acetato de chumbo mantiveram-se na cor original (branca). Isso mostra que as linhagens, mesmo numa condição de cultivo que estimula a redução biológica do enxofre, não foram capazes de formar sulfeto de hidrogênio.

5.1.3 Fator *killer*

As linhagens 91B84, 45VSFCS10, 3MCBSf17, 1B84 e K1 produziram a proteína *killer* em relação a 26B84, bem como, K1 em relação à 40MCF14. As demais não apresentaram potencial *killer* (Figura 8).

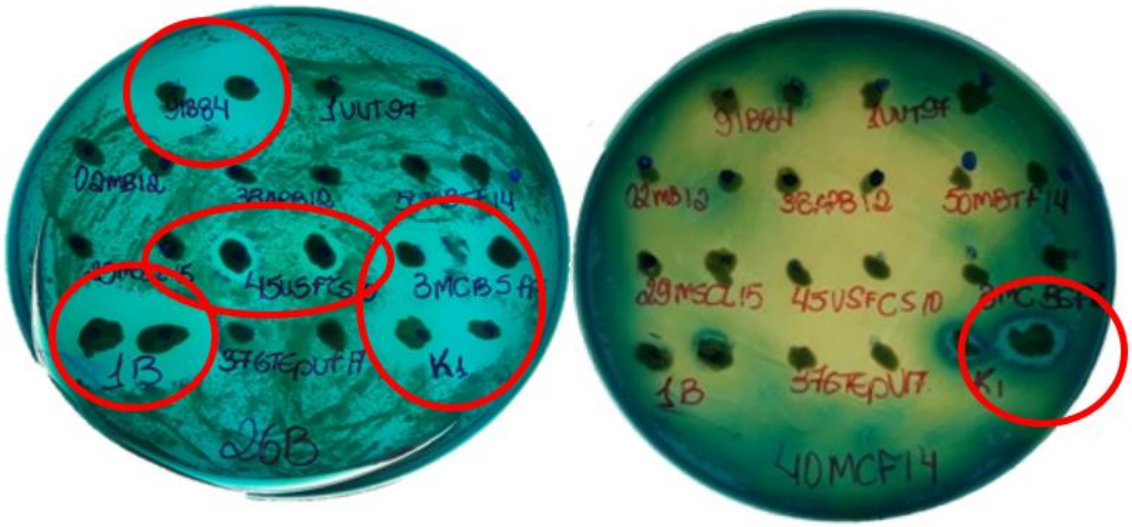


Figura 8 - Avaliação do teste *killer*

5.1.4 Sensibilidade e neutralidade ao fator *killer*

Com relação à sensibilidade, nove linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* foram usadas como tapete e sobre elas foram aplicadas 25 linhagens *killer* como massa pontual. Observou-se que as linhagens 02MB12 e 37GTEpUf17 foram as únicas a se comportarem como sensíveis (Figura 9). Estas duas linhagens se mostraram sensíveis às mesmas duas linhagens de *Candida diversa*. As demais linhagens foram consideradas neutras ao fator *killer*, ou seja, não apresentaram o halo de morte com nenhuma das linhagens *killer* empregadas.

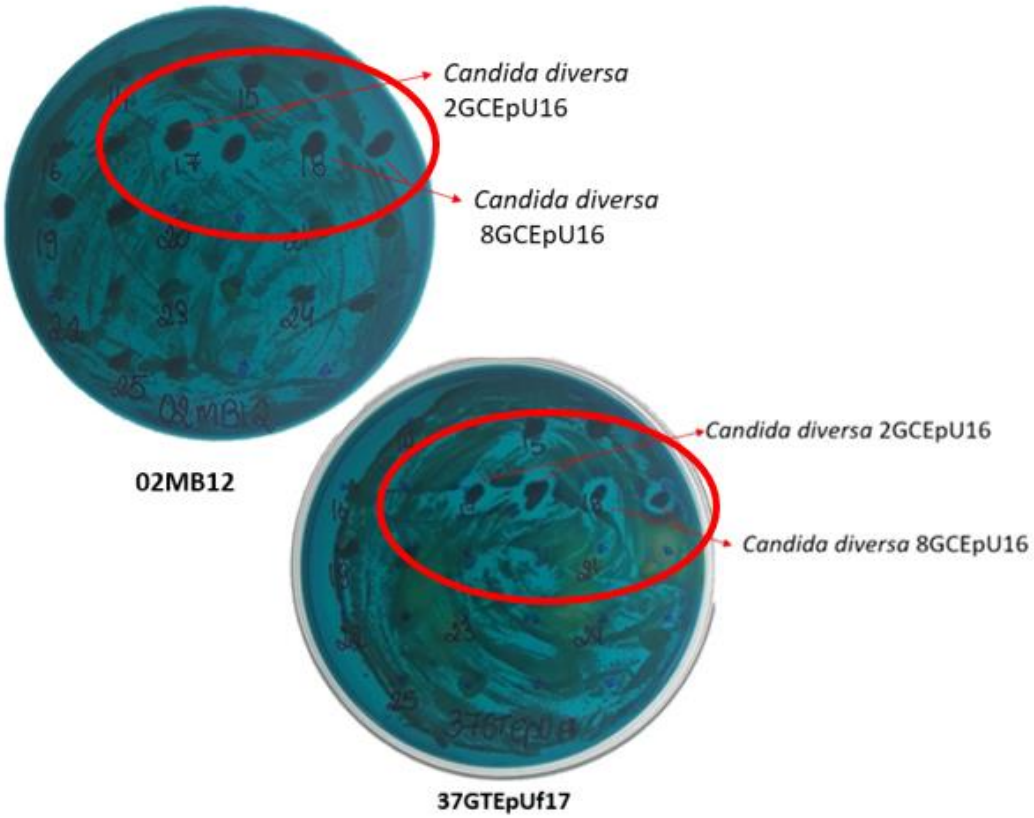
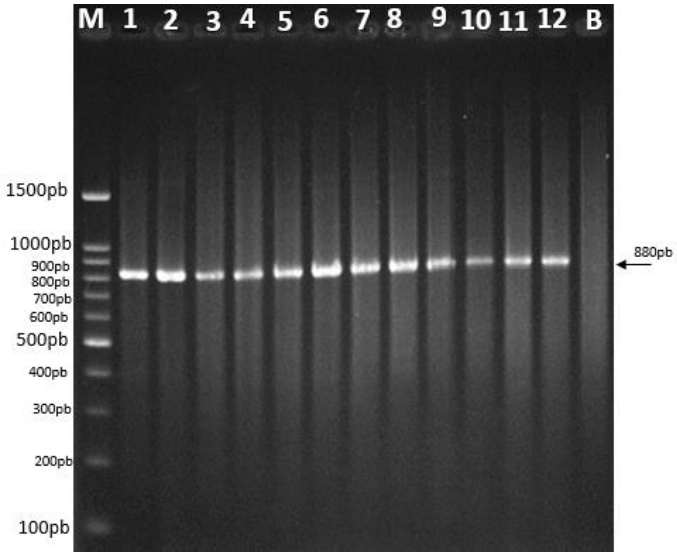


Figura 9 - Avaliação das linhagens sensíveis 02MB12 e 37GTEpUf17

5.2 PCR-ITS

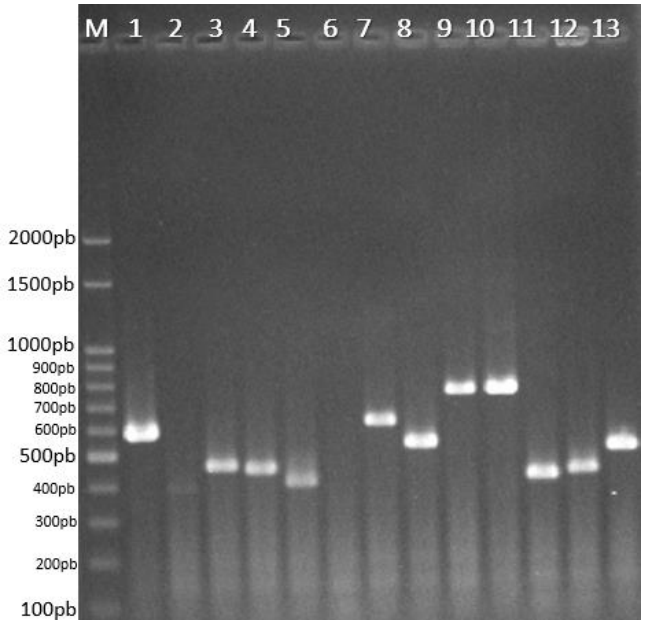
A Figura 10 mostra os resultados obtidos com o PCR do ITS1-5.8S-ITS2. O *amplicon* gerado foi de 880pb, sendo este o esperado a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A identidade da espécie foi confirmada por PCR-RFLP e por sequenciamento.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10 8- 3MCBSf17 9- 37GTEpUf17, 10 – *Sacch. boulardii*, 11- K1 e 12 – 20B84 e B – Branco. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 1,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

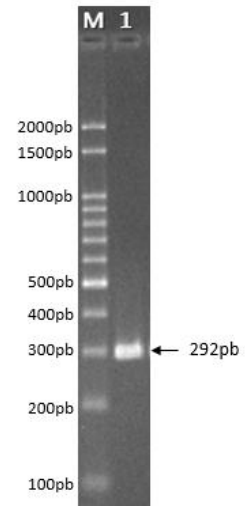
Figura 10 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* da região rDNA ITS1-5.8S-ITS2 amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4

A região rDNA ITS1-5.8S-ITS2 das espécies não-*Saccharomyces*, listadas no Apêndice II, também foi submetida à amplificação com os *primers* ITS1 e ITS4 para verificar eficiência da extração e a pureza das linhagens. Foram obtidos os o *amplicons* esperados em cada linhagem, com exceção da linhagem de *C. diversa*, confirmando os resultados obtidos por Agustini et al. (2014). A linhagem 89VVT99 *Candida diversa* não gerou produto de amplificação com os *primers* ITS1 e ITS4 (Figura11). Deste modo, foram utilizados os *primers* 28candiv3 e 28candiv4 especificamente desenhados para *C. diversa* (AGUSTINI et al., 2014), gerando um *amplicon* com 292 pb como esperado para *Candida diversa*, em 292pb (Figura 12). A linhagem *Candida akabanensis* 98VVT99 teve amplificação fraca, foram adicionadas pérolas de vidro e o processo de extração repetido, produzindo uma banda mais forte posteriormente (dados não exibidos). O processo de extração foi eficiente e as linhagens empregadas estavam puras.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23 7- 89VVT99 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 59VVT99, 13- 1VVB97. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 11 - Perfil eletroforético das linhagens de não- *Saccharomyces* da região rDNA ITS1-5.8S-ITS2 amplificada com os *primers* ITS1 e ITS4



Identificação dos poços: M - Marcador 100 pb (Invitrogen), linhagem: 1 - Candida diversa 89VVT99. Todos os poços continham 5 µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 1,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 12 - Perfil eletroforético da linhagem 89VVT99, amplificada com os *primers* 28candiv3 e 28candiv4

5.3 PCR-RAPD

Primer M13

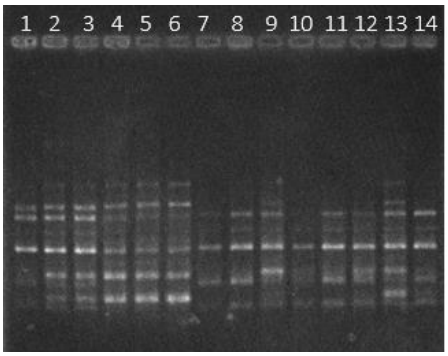
Inicialmente, as linhagens da CMIA de *Saccharomyces cerevisiae* foram analisadas com o *primer* M13. Algumas linhagens não apresentaram amplificação (Figura 13). Foram realizadas algumas alterações, incluindo procedimentos de outros autores, como Andrighetto et al. (2000), ajustando as concentrações de cloreto de magnésio, de *primer* e as condições da reação de PCR, inclusive, removendo e adicionando as fases de desnaturação inicial e de extensão final. Nenhuma das tentativas foi satisfatória na apresentação de bandas. Nessas reações iniciais o material genético havia sido extraído de células na concentração maior que 10^9 células.mL^{-1}.

Identificação dos poços: Marcador 100 pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97,3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17, 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 8µL de produto de PCR e 1,5µL de corante. Foi utilizado 2,0% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 13 – Avaliação da extração inicial de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando RAPD com *primer* M13

A fim de otimizar as reações, foram feitas três diluições da amostra inicial (D), (amostra inicial: H_2O osmose reversa, D1 = 1:1, D2 = 1:2 e D3 = 1:5) das amostras

91B84, 1VVT97, 38APB12, 29 MSCL15, 45VSFCS10, os resultados estão apresentados na Figura 14.

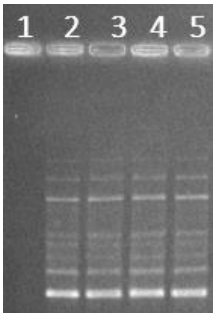


Identificação dos poços: 1 - 91B84(D1), 2 - 91B84(D2), 3 - 91B84(D3), 4 - 1VVT97(D1), 5 - 1VVT97(D2), 6 - 1VVT97(D3), 7 - 38APB12(D1), 8 - 38APB12(D2), 9 - 38APB12(D3), 10 - 29MSCL15(D1), 11 - 29MSCL15(D2), 12 - 29MSCL15(D3), 13- 45VSFCS10(D1), 14 - 45VSFCS10(D2). Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 14 – Avaliação de diferentes diluições da extração inicial (10^9 células.mL^{-1}) das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando RAPD com *primer* M13

As altas concentrações de DNA contidas nas amostras iniciais (Figura 13) provocaram interferências nas reações de PCR, não permitindo que houvesse amplificação do respectivo DNA de algumas linhagens. Na Figura 14, todas as diluições das amostras iniciais apresentaram resultados positivos. Com a diluição de 1:6 (D3) obteve-se uma boa qualidade nas bandas em quase todas as linhagens. A melhor definição de bandas para a linhagem 45VSFCS10, no entanto, foi na concentração de 1:1 (D1). Desta forma, os resultados indicam que a quantificação e padronização do número de células é fundamental para o sucesso das reações.

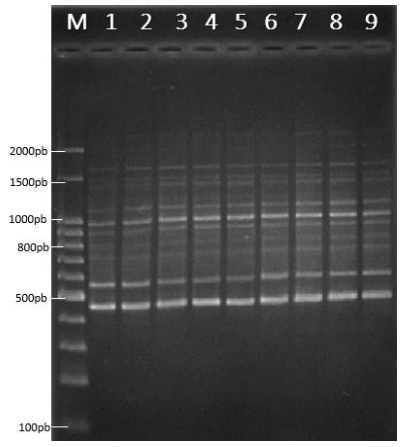
Para tanto, prosseguiu-se com as diluições em série: 10^9 células.mL^{-1}; 10^8 células.mL^{-1}, 10^7 células.mL^{-1}, 10^6 células.mL^{-1}, 10^5 células.mL^{-1}, da linhagem 91B84. Na Figura 15, estão apresentados os resultados das diluições. Pode-se observar que na concentração mais alta não houve amplificação, por outro lado, ao diminuir a quantidade de células foi possível observar as bandas de forma padronizada em todas as diluições seguintes.



Identificação dos poços: 1 - 91B84 (10^9 células.mL^{-1}), 2 - 91B84 (10^8 células.mL^{-1}), 3 - 91B84 (10^7 células.mL^{-1}), 4 - 91B84 (10^6 células.mL^{-1}), 5 - 91B84 (10^5 células.mL^{-1}). Todos os poços continham 8µL de produto de PCR e 1,5µL de corante. Foi utilizado 1,8% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 15 - Avaliação de diferentes diluições seriadas da extração inicial (10^9 células.mL^{-1}) da linhagem 91B84, utilizando RAPD com *primer* M13

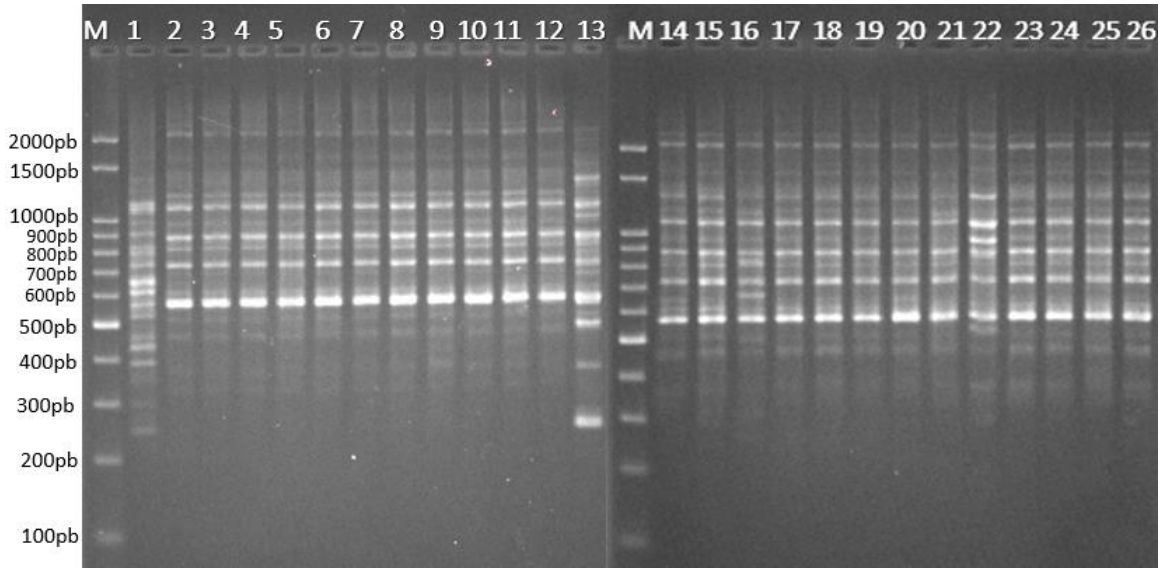
A repetibilidade dos resultados obtidos no termociclador foi avaliada com as linhagens: 91B84, 1VVT97 e 50MBTf14. Utilizou-se a mesma composição (*primer* M13) de componentes para as reações, e a PCR foi feita em três momentos diferentes ao termociclador. O padrão de bandas obtido foi igual em todos os testes, ou seja, houve reprodutibilidade. O padrão final para as *Sacch. cerevisiae* com M13 está na Figura 16.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17, 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 9µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 16 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com *primer* M13

O *primer* M13 não apresentou discriminação satisfatória entre as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*. Procurou-se verificar a capacidade do *primer* em diferenciar espécies não- *Saccharomyces* (Apêndice 2). O perfil eletroforético desta avaliação está apresentado na Figura 17.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23 7- 89VVT99 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15, 13- 12GTGU15, M – Marcador 100pb (Invitrogen) 14- 59VVT99, 15- 1VVB97, 16- 91MCMCF14, 17- 9GPEpU16, 18- 8MBS12, 19- 48VSFCB10, 20- 21SBCBSB16, 21- 43CNPUV02, 22- 20MPB12, 23- 36TPB12 24- 6VVT02, 25- 7MSCSL16, 26- *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 17 - Perfil eletroforético de espécies não- *Saccharomyces* com *primer* M13

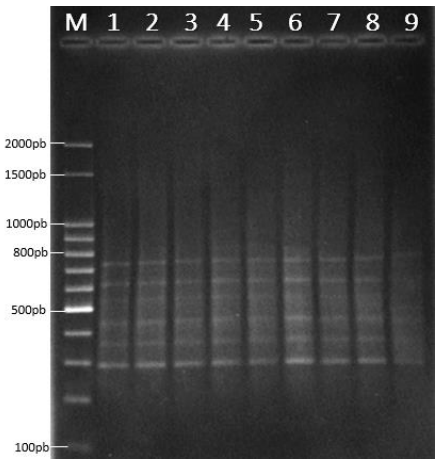
As diferentes espécies não apresentaram variação, exceto as linhagens *Aureobasidium pullulans* 41MCBSf17 e Issatchenkia *terrícola* 12GTGU15 que mostram perfil distinto das demais.

***Primer* (GACA)$_4$**

Com o *primer* $(GACA)_4$ foram feitos testes variando a quantidade de DNA de 10^7 células.mL^{-1} a 10^9 células.mL^{-1} e utilizando, inclusive, somente o DNA sobrenadante. Avaliaram-se também concentrações diferentes de *primer.* Nenhum desses procedimentos resultou amplificação.

***Primer* (GAC)$_5$**

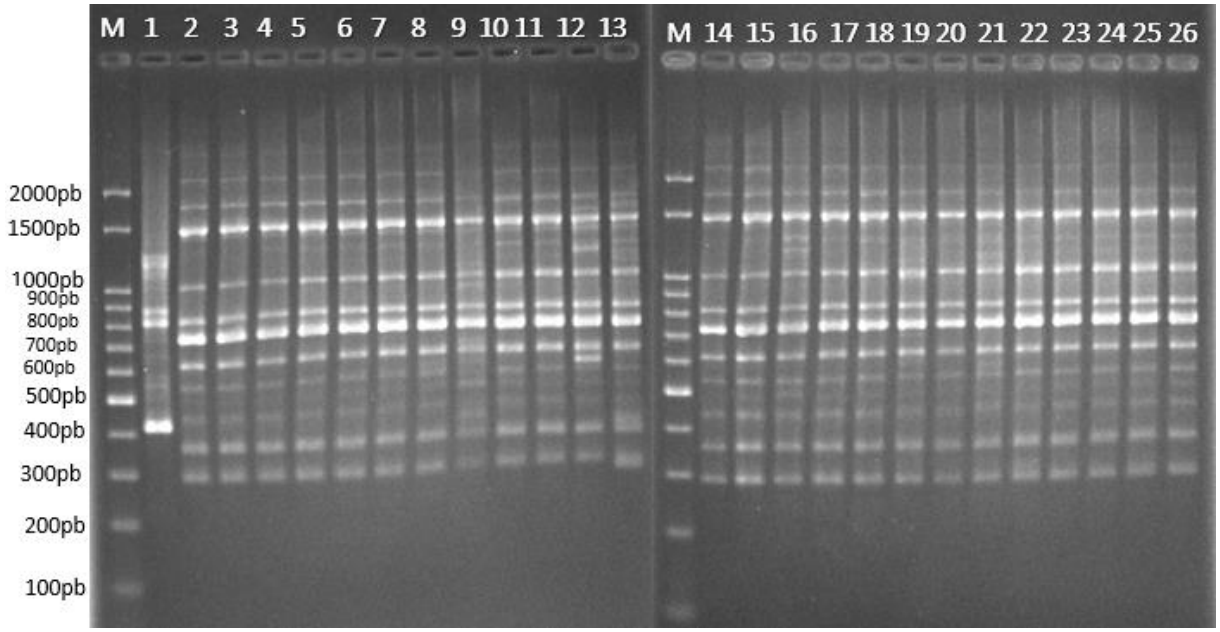
O *primer* (GAC)$_5$ também não apresentou poder discriminativo para as linhagens *Saccharomyces* (Figura 18).



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17, 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 9µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 18 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com primer (GAC)$_5$

Considerando apenas as espécies não- *Saccharomyces* apenas a linhagem *Aureobasidium pullulans* 41MCSBFf apresentou diferença nítida no perfil (Figura 19) em relação à demais linhagens. Observa-se que houve amplificação de fragmentos com mais de 2000 pb. Pode ser visto também, na Figura 19, que as linhagens 27CSSCSL15 (poço 12) e 12GTGU15 (poço 13) parecem também diferir das outras linhagens por apresentar bandas exclusivas, embora suaves, pouco acima de 1500 pb. Há indícios, pela suavidade das bandas, de diferenças entre estas duas linhagens quando se analisam as bandas existentes entre 1000 e 1500 pb.

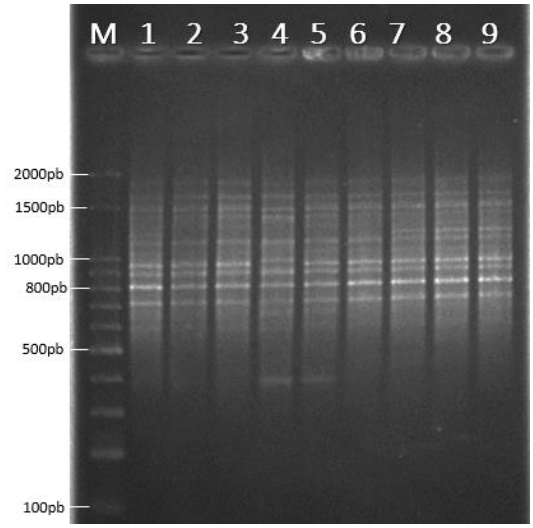


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23 7- 89VVT99, 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15, 13- 12GTGU15, M – Marcador 100pb (Invitrogen) 14- 59VVT99, 15- 1VVB97, 16- 91MCMCF14, 17- 9GPEpU16, 18- 8MBS12, 19- 48VSFCB10, 20- 21SBCBSB16, 21- 43CNPUV02, 22- 20MPB12, 23- 36TPB12 24- 6VVT02, 25- 7MSCSL16, 26- *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 19 - Perfil eletroforético das espécies não- *Saccharomyces* utilizando RAPD com *primer* $(GAC)_5$

***Primer* (GTG)$_5$**

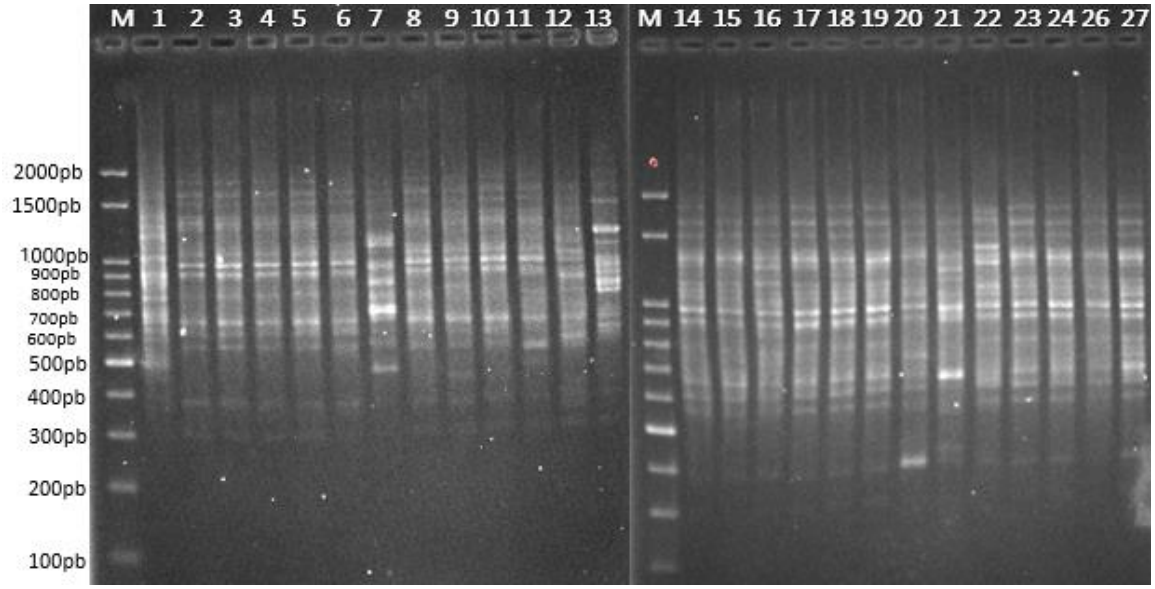
Foram observadas pequenas diferenças nas linhagens 38APB12 e 50MBTf14 da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas apresentaram uma banda em torno de 380pb (Figura 20).



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2- 1VVT97, 3- 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 20 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com *primer* $(GTG)_5$

Em seguida, foram analisados outros gêneros com *(GTG)$_5$* (Figura 21). As linhagens *Aureobasidium pullulans* 41MCBS17, *Candida diversa* 89VVT99, *Issatchenkia terricola* 12GTGU15 apresentaram bandas distintas, as demais apresentaram perfil idêntico.

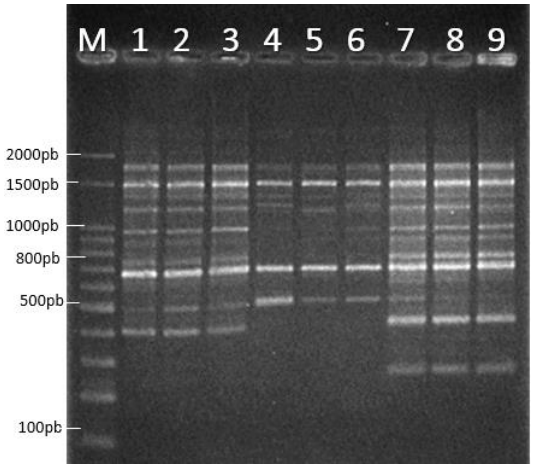


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23 7- 89VVT99 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15, 13- 12GTGU15, M – Marcador 100pb (Invitrogen) 14- 59VVT99, 15- 1VVB97, 16- 91MCMCF14, 17- 9GPEpU16, 18- 8MBS12, 19- 48VSFCB10, 20- 21SBCBSB16, 21- 43CNPUV02, 22- 20MPB12, 23- 36TPB12 24- 6VVT02, 25- 7MSCSL16, 26- *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 21 - Perfil eletroforético de espécies não-*Saccharomyces* utilizando RAPD com *primer* $(GTG)_5$

***Primer* OPA-11**

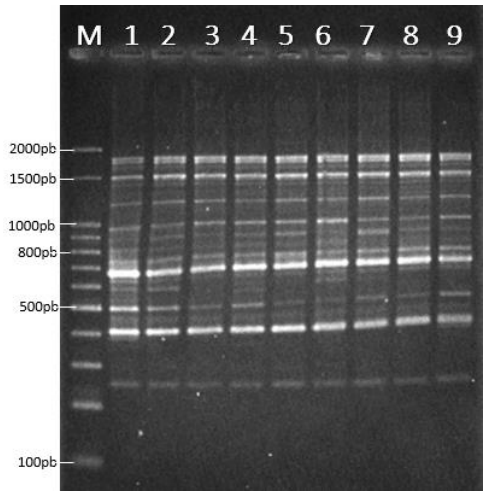
A otimização feita para o *primer* OPA-11 indicou que a composição 3 (C3) apresenta melhores condições de amplificação que as demais, como pode ser visto na Figura 22.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84 (C1), 2 - 1VVT97(C1), 3 - 50MBTF14 (C1), 4- 91B84(C2), 5- 1VVT97 (C2), 6- 5 MBTF14 (C2), 7- 91B84 (C3), 8- 1VVT97 (C3), 9- 50MBTF14 (C3). Todos os poços continham 8µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 22 - Otimização do perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com *primer* OPA-11

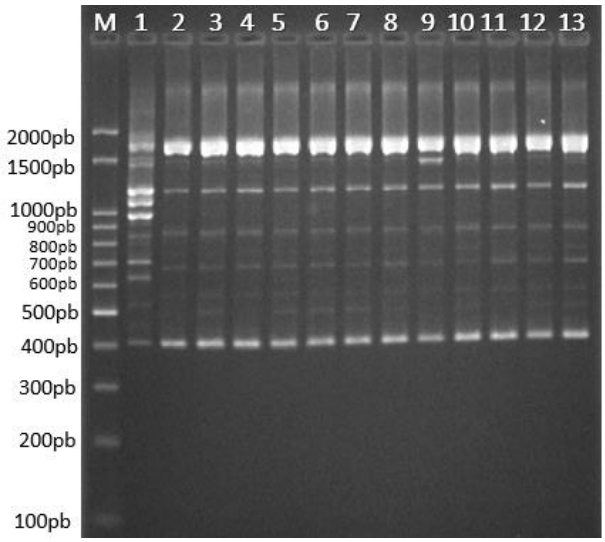
Deste modo, o resultado obtido a partir da composição 3 está apresentado na Figura 23.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 23 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com *primer* OPA-11

As não- *Saccharomyces* (Figura 24), apresentaram perfil semelhante, exceto a linhagem *Aureobasidium pullulans* 41MCBS17 que sempre está se diferenciando das demais espécies.

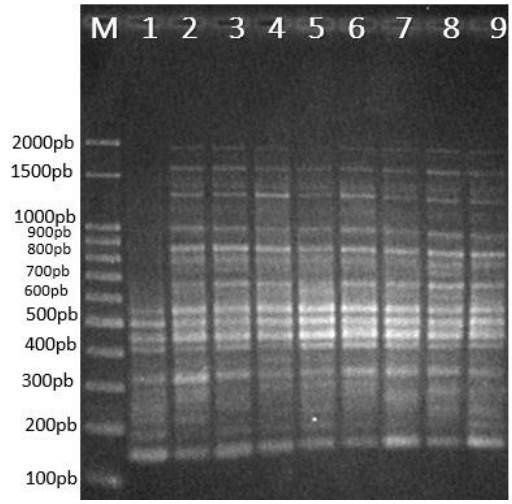


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23, 7- 89VVT99, 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15 e 13- 12GTGU15. Todos os poços continham 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 24 - Perfil eletroforético das espécies não- *Saccharomyces* utilizando RAPD com *primer* OPA-11

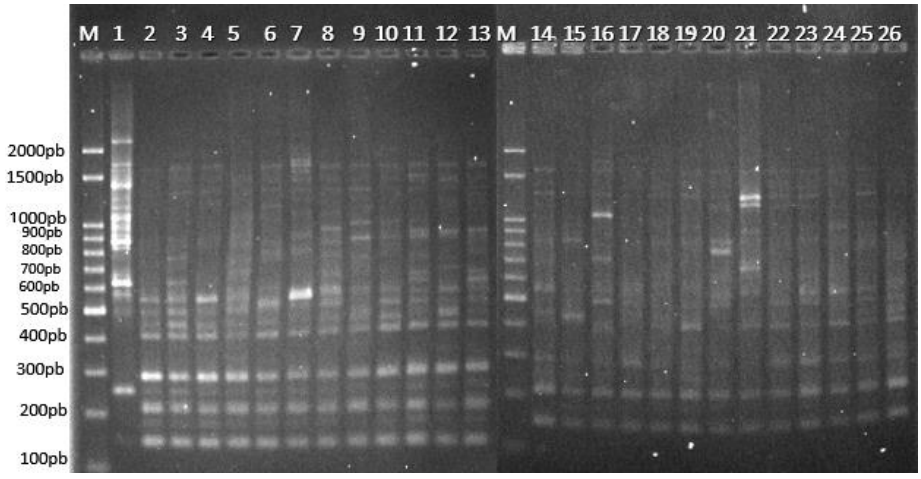
***Primer* 28**

O perfil das linhagens *Sacch. cerevisiae* está apresentado na Figura 25. Como observado com os outros *primers,* não foi possível a diferenciação das linhagens. Em seguida, na Figura 26, as espécies não-*Saccharomyces*, em que houve diferenciação das espécies, porém, a repetibilidade foi fraca quando as amostras foram submetidas a novas reações. O grau de repetibilidade pode ser observado na Figura 27.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen) 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6-29 MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

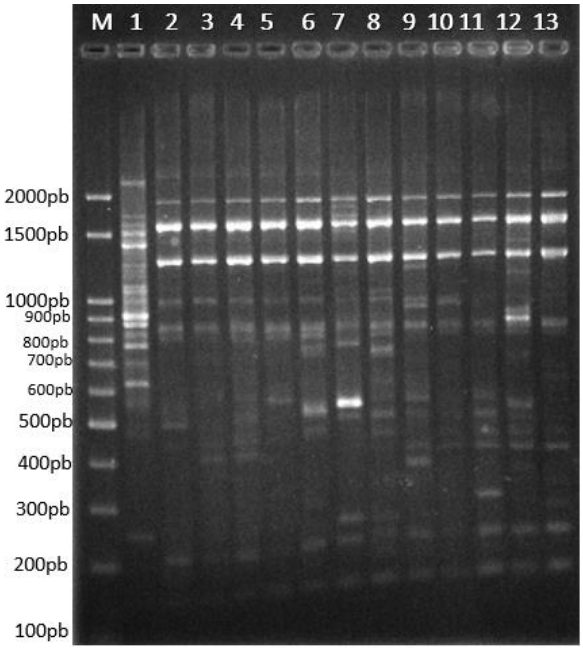
Figura 25 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando RAPD com *primer* 28



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23, 7- 89VVT99, 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15, 13- 12GTGU15, M – Marcador 100pb (Invitrogen) 14- 59VVT99, 15- 1VVB97, 16- 91MCMCF14, 17- 9GPEpU16, 18- 8MBS12, 19- 48VSFCB10, 20- 21SBCBSB16, 21- 43CNPUV02, 22- 20MPB12, 23- 36TPB12 24- 6VVT02, 25- 7MSCSL16, 26- *Saccharomyces cerevisiae* 1VVT97. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 26 - Perfil eletroforético das espécies não- *Saccharomyces* utilizando RAPD com *primer* 28

Embora as linhagens tenham tido diferenciação, a linhagem *Aureobasidium pullulans* 41MCBS17 segue contrastando em maior nível, se comparada as demais.



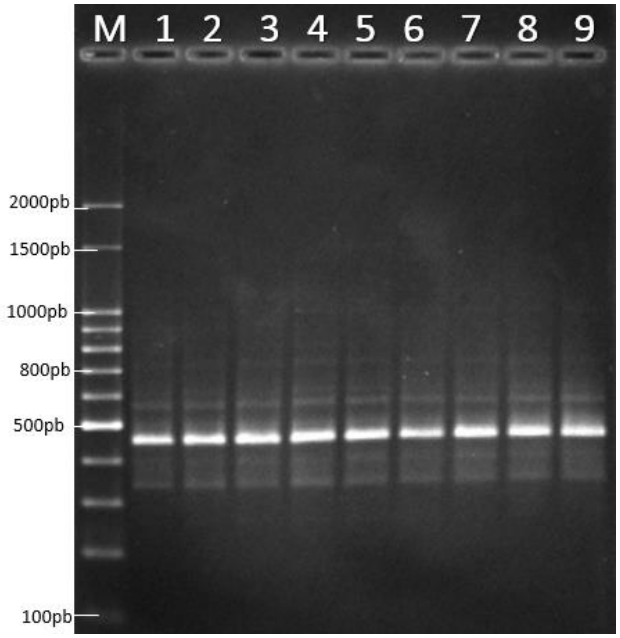
Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 41MCBS17, 2- 98VVT99, 3- 3TASL15, 4- 11MSCSL15, 5- 22MFMF14, 6- 6CL23, 7- 89VVT99, 8- 54MFMF14, 9- 42VSFSB10, 10- 8GTGU15, 11- 14GTRU15, 12- 27CSSCSL15 e 13- 12GTGU15. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 27 - Avaliação da repetibilidade do *primer* 28 com espécies não-*Saccharomyces*

5.4 PCR-SSR

Primer M13

O resultado obtido com *primer* M13 está apresentado na Figura 28. Pode-se observar que também não houve diferença entre as linhagens. Além disso, o número de material genético amplificado foi menor que no RAPD. Isso mostra que a temperatura empregada na fase do pareamento tem realmente um efeito importante.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

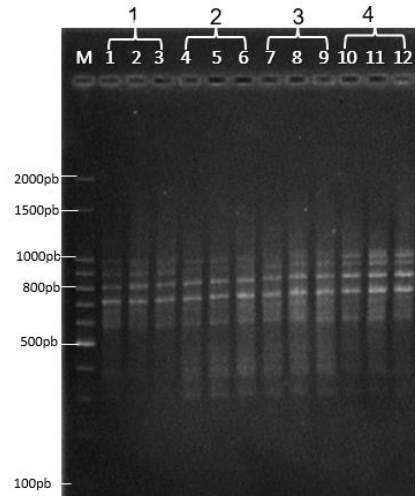
Figura 28 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando SSR com *primer* M13

***Primer* (GACA)$_4$**

Com o primer $(GACA)_5$ foram feitos testes variando a quantidade de DNA de 10^7 células.mL^{-1} a 10^9 células.mL^{-1}, utilizando inclusive somente o DNA sobrenadante. Avaliaram-se também concentrações diferentes de *primer,* porém não pode ser observado perfil de amplificação.

***Primer* (GTG)$_5$**

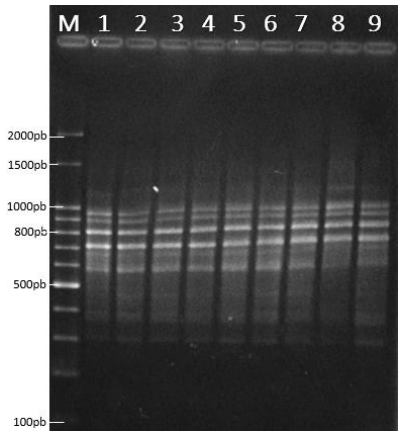
A otimização dos meios reacionais para o *primer* GTG em microssatélites está apresentada na Figura 29. Para tanto, utilizou-se as linhagens 91B84, 1VVT97 e 50MBTf14. Foram elaborados quatro meios reacionais diferentes, chamados de composição 1 (*C*1), composição 2 (*C*2), composição 3 (*C*3) e composição (*C*4).



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen) 1,4,7 e 10 - 91B84; 2,5,8 e 11 - 1VVT97; 3,6,9 e 12 - 50 MBTF14. Todos os poços continham 4 µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 29 - Avaliação de diferentes concentrações de $MgCl_2$ e *primer* $(GTG)_5$

A partir dos resultados obtidos no teste dos meios reacionais, foi definido que a *C*4 seria o padrão utilizado nos *primers* $(GTG)_5$ e $(GAC)_5$, por apresentar o melhor perfil de amplificação. O padrão de bandas obtido com o *primer* $(GTG)_5$ está na Figura 30.

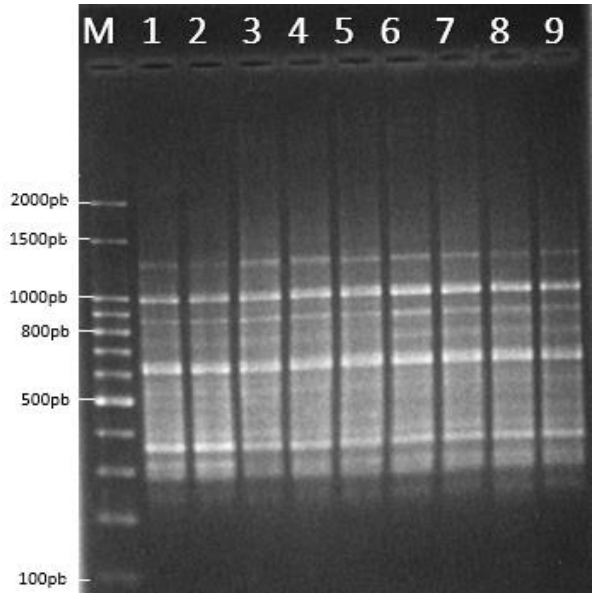


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen) 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10 8- 3MCBSf17 9- 37GTEpUf17. Todos os poços contêm 4µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 30 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando SSR com *primer* $(GTG)_5$

Primer (GAC)$_5$

Na Figura 31 está o resultado da amplificação mediada pelo *primer* (GAC)$_5$. Houve amplificação, mas não houve diferenciação das linhagens.

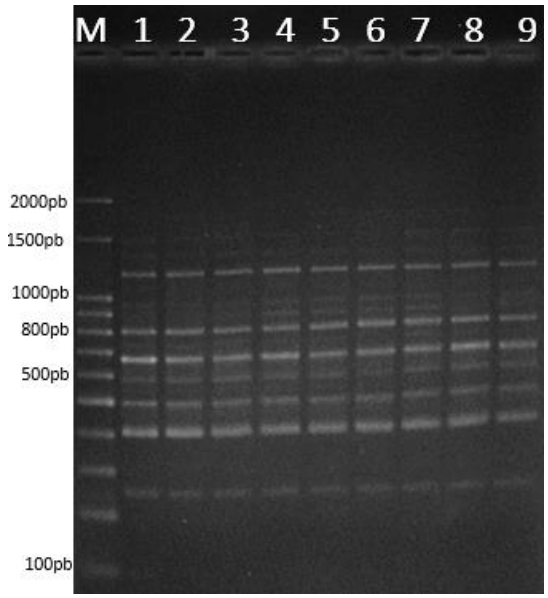


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17. Todos os poços contêm 8µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 31 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando SSR com *primer* (GAC)$_5$

Primer OPA-11

A Figura 32 mostra o resultado obtido com as linhagens *Sacch. cerevisiae* e o *primer* OPA-11. Houve amplificação, mas não foi possível diferenciar as linhagens.



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (Invitrogen), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10 8- 3MCBSf17 9- 37GTEpUf17. Todos os poços continham 8µL de produto de PCR e 1 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 32 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando SSR com *primer* OPA-11

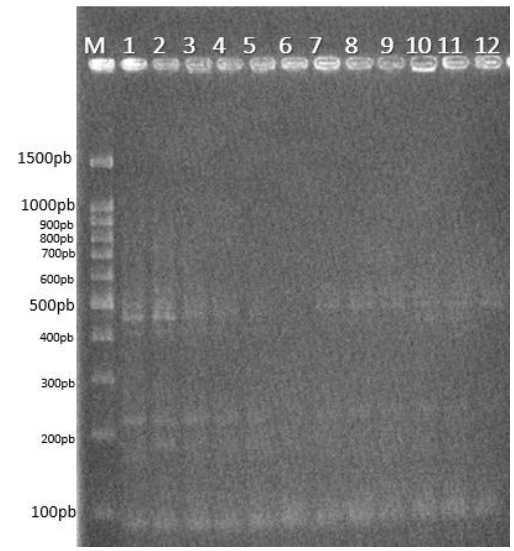
5.5 PCR-Ty

Uma das características que se observou para amplificar retrotransposons foi necessidade de utilizar maior quantidade da amostra extraída. Foram realizadas otimizações variando as concentrações de dNTP, $MgCl_2$ e dos *primers,* Como já dito, uma amplificação efetiva só foi possível com o DNA de células na concentração de 10^9 células.mL^{-1}. Adicionalmente, elevou-se de 1µL de DNA para 2µL de DNA em cada amostra.

δ2 e δ12

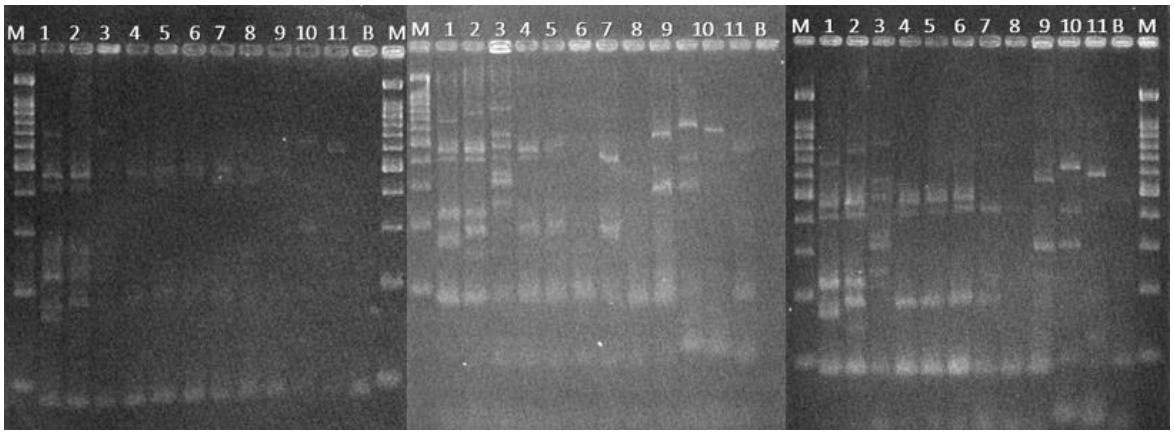
Foram testadas concentrações diferentes oriundas de volumes variados de células. Com a concentração de células de 10^7 (Figura 33), não houve amplificação satisfatória. Na Figura 34, podemos observar a evolução do perfil eletroforético com o aumento de DNA nas reações. Com volume de 1 µL, o processo de amplificação só

teve seu início nas concentrações de células a partir de 10^8. Mantendo-se a concentração de 10^9 células.mL^{-1} , foram empregados volumes para amplificação de 1, 1,5 e 2 µL. Assim, evidencia-se a evolução da amplificação à medida em que o volume aumenta de 1 a 1,5. A Figura 35 mostra a amplificação correspondente ao volume de 2 µL. Observa-se claramente que houve a melhor definição nos perfis quando 2 µL de uma suspensão de células, contendo 10^9 células.mL^{-1} foram utilizados. Assim, foram este volume e esta concentração de células definidos para as futuras amplificações. Deve-se salientar que todas essas amplificações foram realizadas com os *primers* δ2 e δ12.



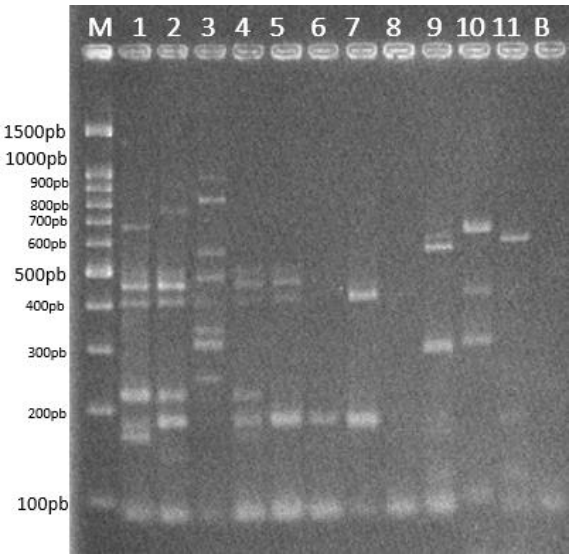
Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (DNA express), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10, 8- 3MCBSf17 e 9- 37GTEpUf17, 10 – *Sacch. cerevisiae boulardii*, 11- K1, B – Branco. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 33 - Perfil eletroforético do par de *primers δ2 e δ12* com 1µL de 10^7 células.mL^{-1}



Legenda: Esquerda: 1µL de 10^8 células.mL^{-1} ; Centro: 1µL de 10^9 células.mL^{-1}; Direita: 1,5µL de 10^9 células.mL^{-1}.

Figura 34 - Evolução do perfil eletroforético do par de *primers δ2 e δ12* com aumento de DNA

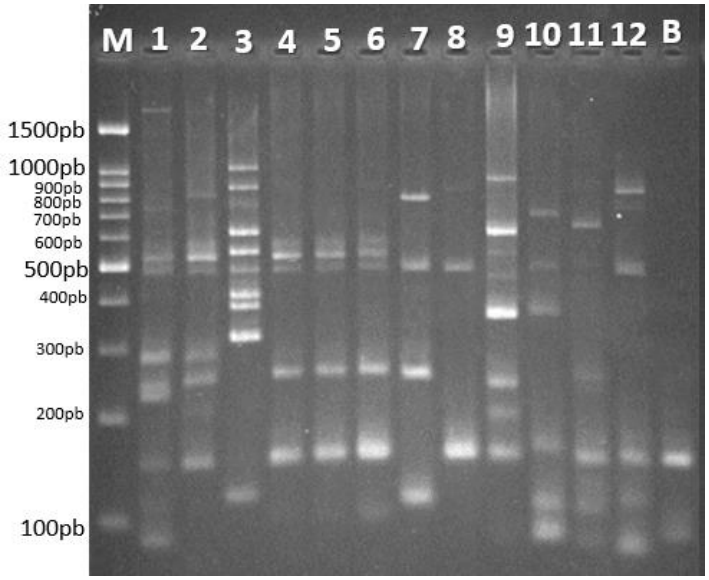


Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (DNA express), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10 8- 3MCBSf17 9- 37GTEpUf17, 10 – *Sacch. cerevisiae boulardii*, 11- K1, B – Branco. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 2,5% (p.v^{-1}) de gel de agarose.

Figura 35 - Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando o par de *primers δ2 e δ12*

δ 12 e δ 21

A Figura 36 apresenta o perfil eletroforético de 12 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae.*



Identificação dos poços: M – Marcador 100pb (DNA express), linhagens: 1- 91B84, 2 - 1VVT97, 3 - 02MB12, 4- 38APB12, 5- 50MBTF14, 6- 29MSCL15, 7- 45VSFCS10 8- 3MCBSf17 9- 37GTEpUf17, 10 – *Sacch. cerevisiae boulardii,* 11- K1, 12- 20B84 e B- Branco. Todos os poços continham 5µL de produto de PCR e 1,4 µL de corante. Foi utilizado 1,8% ($p.v^{-1}$) de gel de agarose.

Figura 36 – Perfil eletroforético das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando, o par de *primers δ12 e δ21*

A Figura 37 apresenta o dendrograma construído a partir do perfil eletroforético gerado com o par de *primers* δ12 e δ21 (Figura 36). O coeficiente da correlação cofenética foi de 0,96.

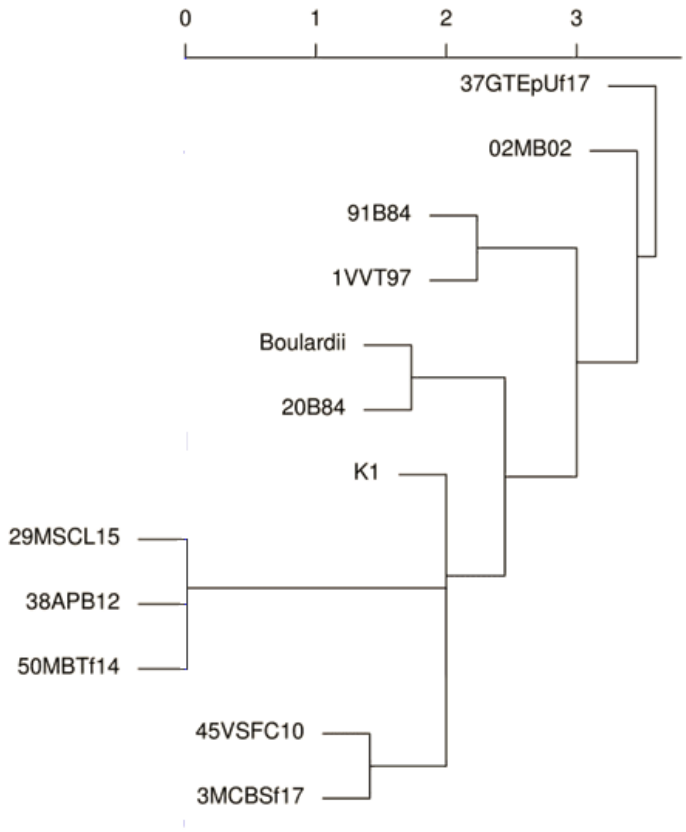


Figura 37 - Dendrograma, mostrando as relações moleculares com base em PCR com os *primers* δ12 e δ21 de linhagens *Saccharomyces cerevisiae* pertencentes à CMIA, com coeficiente de correlação cofenética de 0,96

As linhagens 91B84 (*killer*) e 1VVT97 (neutra), ambas isoladas em bagas de uva provenientes do Vale dos Vinhedos – RS estão no mesmo grupo, segundo o dendrograma. *Sacch. cerevisiae boulardii*, linhagem comercial, teve perfil eletroforético semelhante à 20B84, isolada do Vale dos Vinhedos. As linhagens 29MSCL15, 38APB12 e 50MBTf14 obtiveram um perfil eletroforético semelhante, todas são consideradas neutras, foram isoladas de Santana do Livramento – RS, Pinto Bandeira – RS e Farroupilha – RS, respectivamente. As linhagens 45VSFC10 (*killer*) e 3MCBSf10 (*killer*) apresentaram perfil semelhante, isoladas de regiões com uma distância territorial considerável, Vale do São Francisco – BA e Campo Belo do Sul – SC. As linhagens 02MB12 e 37GTEpUf17, ambas são sensíveis, isoladas de Monte Belo do Sul – RS e Urussanga- SC. E por fim, a linhagem comercial K1(*killer*), que tem perfil diferente das demais.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização de linhagens quanto ao potencial enológico

A elaboração de vinhos é um sistema complexo, onde vários gêneros, espécies e linhagens participam do processo. Inicialmente, há crescimento de espécies não-*Saccharomyces* como *Hanseniaspora, Candida, Pichia*, entre outras, em seguida há um predomínio de *Saccharomyces cerevisiae* que é, notoriamente, a espécie dominante. No final da fermentação, muitas não-*Saccharomyces* também podem ser encontradas. Algumas dessas espécies não-*Saccharomyces* que participam da fermentação estão envolvidas com o desenvolvimento de aromas. A contribuição que as leveduras dão ao processo de vinificação pode ser resumida na capacidade de transformar o açúcar em substâncias orgânicas importantes, como etanol, glicerol, ergosterol, ésteres aromáticos e aromas provenientes de precursores inodoros da própria uva. Na vinificação, sendo um processo de fermentação não estéril, as linhagens de *Sacch. cerevisiae* selecionadas que se candidatam a assumir a fermentação principal devem apresentar uma taxa de formação de etanol elevada e apresentar deficiência em formar H_2S . Por isso, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* em questão foram submetidas a testes de fermentação e de formação de H_2S. Os resultados comprovaram a aptidão destas linhagens na elaboração de vinho, com relação à atividade metabólica e formação de H_2S.

6.2 Discriminação de Espécies e Linhagens

A CMIA possui, além das linhagens *Saccharomyces cerevisiae* usadas neste trabalho, mais de 200 outras. É necessário proceder uma discriminação específica, pois a OIV (Organização Internacional do Vinho) preconiza a discriminação das espécies empregadas na vinificação por meio de técnicas de biologia molecular (CASTELLUCCI, 2012). As técnicas de biologia molecular destinadas à discriminação são variadas e cada qual com suas vantagens e desvantagens. Muitas dessas técnicas necessitam de ajustes para que a amplificação seja efetiva.

Nos testes iniciais de ajuste, foi observado que altas concentrações de DNA não geravam produtos amplificados. Este fato também foi observado por Ramirez-Castrillón (2012) onde verificou que DNA em excesso não resultava em amplificações.

6.2.1 **RAPD**

Com o *primer* M13 Andrighetto et al. (2000) conseguiram diferenciar, em nível de espécie, linhagens provenientes de amostras de queijo. No presente trabalho, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 15) não demonstraram discriminação, entretanto, nas não-*Saccharomyces* (Figura 16) a linhagem *Aureobasidium pullulans* 41MCBSf17 e a *Issatchenkia terrícola* 12GTGU15 mostram perfil distinto das demais, ou seja, em nível de espécie, o *primer* M13 pode estar apto a apresentar perfis diferentes.

A expressiva diferenciação da linhagem de *Aureobasidium pullulans* pode ser explicada devido ao fato de que é um fungo preto, muito semelhante a leveduras, pode ser isolado de uma ampla variedade de espécies de plantas (ANDREWS et al., 2002). Tem grande importância biotecnológica, também é utilizado no controle biológico de algumas espécies de plantas, especialmente em doenças de armazenamento (CHI et al., 2009). *Aureobasidium pullulans* apresentou perfil eletroforético distinto das demais com todos os *primers* testados neste trabalho.

Andrade et al. (2006) utilizaram os *primers* M13, $(GACA)_4$, $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$. O *primer* M13 mostrou-se capaz de produzir padrões diferentes em 5 das 7 espécies testadas. Enquanto os *primers* $(GAC)_5$ e $(GTG)_5$ foram capazes de discriminar todas as espécies do estudo. Em contrapartida, $(GACA)_4$ foi o *primer* que demonstrou menor nível de eficiência. Os autores não encontraram diferenças específicas em nível de linhagem. No presente estudo, os *primers* $(GTG)_5$ e $(GAC)_5$ não tiveram poder discriminatório entre as linhagens, e $(GACA)_4$ não apresentou amplificação.

El-Fiky et al. (2012) utilizaram a técnica de RAPD combinada à *primers* OPA (OPA03, OPA12, OPA13, OPA15, OPA16, OPA17, OPA18, OPA19 e OPA20) com objetivo de diferenciar doze linhagens de *Sacch. cerevisiae* comerciais. Com o *primer* OPA-18 os autores obtiveram o maior número de *amplicons.* No presente estudo, foi utilizado o *primer* OPA-11 com linhagens *Saccharomyces* (Figura 23) e não-*Saccharomyces* (Figura 24), dentre todas as linhagens somente a *Aureobasidium pullulans* apresentou perfil eletroforético diferente. Em estudos de Tosta (2004), o resultado foi semelhante, todas as linhagens *Sacch. cerevisiae* apresentaram perfil eletroforético idêntico com *primer* OPA-11, enquanto, as não-*Saccharomyces* demonstraram certo nível de diferenciação.

Couto et al. (1996) avaliaram linhagens de *Sacch. cerevisiae,* com *primer* 28 e OPA-11 encontraram bandas padrões que puderam ser observadas em todas as linhagens, apesar de apresentarem perfil muito semelhante, algumas dessas linhagens tiveram algumas bandas com tamanhos de fragmentos diferentes.

6.2.2 **SSR**

Neste estudo somente linhagens *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas a técnica de SSR, contudo, não foi um método efetivo para a discriminação das linhagens. Cordero-Bueso et al. (2017), utilizaram a técnica, porém com *primers* diferentes para avaliar a predominância das linhagens durante o período de fermentação, somente obtiveram sucesso na diferenciação utilizando um pré-tratamento com carbono ativado e adaptando a extração de DNA.

Gallego et al. (2005), utilizaram 6 *primers (*ScAAT1, ScAAT2, ScAAT3 ScAAT4,ScAAT5, e ScAAT6) para diferenciar linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e obtiveram um poder discriminatório maior em comparação a RAPD, com SSR foi possivel diferenciar 23 de 27 linhagens testadas. Neste trabalho, não foram utilizados estes primers, deste modo não foi possível verificar se haveria distinção nessas regiões.

6.2.3 **Ty**

Ness et al. (1993) lideraram estudos sobre os elementos interdelta, na década 90. Com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* combinado aos *primers* δ1-δ2, obtiveram sucesso na diferenciação. De acordo com os autores, essa discriminação foi possível porque neste método certas sequências de DNA entre elementos interdelta podem ser amplificadas, consequentemente, produtos de amplificação serão diferentes de acordo com a linhagem. Também verificaram que é possível diferenciar sub-espécies de *Saccharomyces,* o que não ocorreu com outras espécies, como *Candida vini, Pichia canadensis* e *Hanseniaspora uvarum.* Na Figura 35 estão apresentados os perfis eletroforéticos de onze *Saccharomyces cerevisiae* e uma *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, deste modo, dos resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro aos de Ness et al.

Legras & Karst (2003), apresentaram o novo par de *primers* δ12-δ21 e dessa forma otimizaram o processo de análise interdelta. Estes *primers* foram desenhados com base na sequência do genoma da levedura. No estudo, testaram os três pares de *primers*: δ1-δ2, δ2-δ12 e δ12-δ21. Os resultados desses últimos dois pares foram semelhantes, enquanto δ1-δ2 foram divergentes. Por fim, definiram o par δ12-δ21 como o melhor. Na Figura 35 e 36, ao compararmos os pares δ2-δ12 e δ12-δ21, respectivamente, pode-se notar a semelhança. O par δ12-δ21 foi, no presente estudo, o escolhido porque gerou o melhor perfil de amplificação.

Em 2011, estudos de monitoramento populacional durante a fermentação de vinho, Xufre et al. (2011) definiram como melhor combinação o par δ2-δ12, para as linhagens testadas. Mostraram que é o método é mais eficiente de discriminação de linhagens quando comparado a outras técnicas de biologia molecular como AFLP, MSP-PCR, RAPD e PFGE.

Suranská et al. (2015) também avaliariam linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial enológico isoladas de bagas de uvas na República Checa. A produção de sulfeto de hidrogênio e habilidade fermentativa dessas linhagens também foram avaliadas. O resultado com *primer* M13 foi um perfil eletroforético muito semelhante para todas as linhagens. Em contrapartida, os pares δ1- δ2 e δ12- δ2 foram capazes de discriminar as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*.

7. CONCLUSÃO

Técnicas de RAPD e SSR podem não discriminar adequadamente leveduras em nível de espécie, por consequência, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* podem não apresentar diferenciação por meio desses sistemas. A melhor metodologia para detectar discriminação de variações específicas de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* está relacionada com o emprego dos *primers* δ, especialmente, δ12 e δ21.

8. REFERÊNCIAS

Agustini B.C.; Silva, L.P.; Bloch, C. JR.; Bonfim, T.M.; DA Silva, G.A., 2014 Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of environmental yeasts and development of supplementary database Appl. Microbiol Biotechnol.Jun v. 98 n.12. p.5645-54.

Agustini, B. C., 2014. **"Identificação Molecular De Leveduras Vínicas E Implantação De Um Banco De Dados Suplementar Fundamentado Em Espectrometria De Massa Maldi-Tof."** (Tese doutorado) UFPR, Paraná.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. 2006 **Biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. 1294 p.

Andrade, M. J. Rodrigues, M.; Sánchez. B.; 2006. "DNA Typing Methods for Differentiation of Yeasts Related to Dry-Cured Meat Products." International Journal of Food Microbiology 107(1): 48–58.

Andrighetto, C. et al. 2000. "Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) PCR for the Identification of Yeasts Isolated from Dairy Products." Letters in Applied Microbiology 30(1): 5–9.

Andrews, J. H.; Spear, R. N.; Nordheim, E. V. (2002). "Population biology of Aureobasidium pullulans on apple leaf surfaces". Canadian Journal of Microbiology. 48 (6): 500–13. doi:10.1139/w02-044. PMID 12166677.

Anjos, F.S.; Criado, E.A.; Bezerra, A.J.A. 2010. "ST No 19 – Metamofoses Do Rural Contemporâneo INDICAÇÕES GEOGRÁFICAS NA EUROPA E BRASIL "

Barnett, S.W., Flynn, K., Webster, M.K., Beckendorf, S.K., 1990. Noncoordinate expression of Drosophila glue genes: Sgs-4 is expressed at many stages and in two different tissues. Dev. Biol. 140(2): 362-373.

Barata A, et al. 2012. Changes in sour rotten grape berry microbiota during ripening and wine fermentation. Int J Food Microbiol 154(3):152-61.

Bartlett, J. M. S.; Stirling, D.; 2003. "A Short History of the Polymerase Chain Reaction." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 226: 3–6.

Bevan, E. A. and Makower, M. 1963. The physiological basis of the killer character in yeast. — Proc. Int. Congr. Genet. The Hague. ed. Goerts, S. J. 11: 127

Boeke, J. D.; Garfinkel, D. J.; Styles, C. A.; Fink, G. R.; 1985. "Ty Elements Transpose through an RNA Intermediate." Cell 40(3): 491–500.

Brites, A. S. T. **Seleção de Linhagens de Saccharomyces cerevisiae potencializadas pelo Fator *Killer*, H_2S- e o Caráter Floculante.** Piracicaba, 2003. 72p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Castellucci, Frederico. 2012. “Molecular tools for identification of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and other yeast species related to winemaking.” Oiv (June): 1–30.

Chi, Z; Wang, F; Chi, Z; Yue, L; Liu, G; Zhang, T (2009). "Bioproducts from Aureobasidium pullulans, a biotechnologically important yeast". Applied Microbiology and Biotechnology. 82 (5): 793–804. doi:10.1007/s00253-009-1882-2. PMID 19198830

Ciani M, Ferraro L. 1996. Enhanced Glycerol Content in Wines Made with Immobilized Candida stellata Cells. Appl Environ Microbiol. Jan; v.62 n.1:128-32.

Cocolin, L.; Pepe, V.; Comitini, F.; Comi, G.; Ciani M.; 2004. Enological and genetic traits of Saccharomyces cerevisiae isolated from former and modern wineries. FEMS Yeast Res 5(3):237-45

Conn, E. E.; Stumpf P. K., 1975. **Introdução à Bioquímica,** editora: Edgard Blücher, ª edição.

Couto, M M et al. 1996. “Evaluation of Molecular Typing Techniques to Assign Genetic Diversity among Saccharomyces Cerevisiae Strains.” Applied and environmental microbiology 62(1): 41–46.

Cordero-Bueso, Gustavo, María Esther Rodríguez, Carlos Garrido, and Jesús Manuel Cantoral. 2017. “Rapid and Not Culture-Dependent Assay Based on Multiplex PCR-SSR Analysis for Monitoring Inoculated Yeast Strains in Industrial Wine Fermentations.” Archives of Microbiology 199(1): 135–43

da Silva, G. A. DA; Wlodarczyk, S. R.; DE Souza, R. C. 2012. Avaliação de leveduras isoladas na região de Pinto Bandeira, Bento Gonçalves (RS) com relação à produção de H_2S e velocidade de fermentação. II SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA SIMBBTEC.

da Silva, G. A., Gurak, P. D., DS Castro, H. M., Farias, D. , 2005. Influência da concentração de levedura sobre o vinho tinto Cabernet Sauvignon. In Guerra, C. C., de Souza Sebben, S., editors, Anais do X Congresso Latino-Americano de Viticultura e Enologia/XICongresso Brasileiro de Viticultura e Enologia/II Seminário Franco-Brasileiro de Viticultura e Enologia/, page 345, Bento Gonçalves-RS. Embrapa Uva e Vinho, Embrapa Uva e Vinho.

da Silva, G.A. da, 2003. Elaboração de vinho: Aspectos Microbiológicos. Frutas do Brasil. UVA para processamento Pós-colheita. Embrapa Informação Tecnológica Brasília - DF.

da Silva, G.A. 1996.The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brasilian Riesling Italico grape must and effect of neutral strains on killing behaviour. Apllied Microbiology and Biotechnology. V46, n2, p112-121.

El-Fiky, Zaki A., Gamal M. Hassan, and Ahmed M. Emam. 2012. “Quality Parameters and RAPD-PCR Differentiation of Commercial Baker’s Yeast and Hybrid Strains.” Journal of Food Science 77(6): 312–17.

Ergon, M C, and Z Gulay. 2005. “Molecular Epidemiology of Candida Species Isolated from Urine at an Intensive Care Unit.” Mycoses 48(2): 126–31.

Ferreira, Marcio Elias, and Dario Grattapaglia. 1998. “Introdução Ao Uso de Marcadoresmoleculares Em Análise Genética.” Embrapa-Cenargen: 220.

Fleet, G.H.; 2003. Yeast interactions and wine flavor. International Journal of Food Microbiology 86 11–22.

Fleet, Graham H. 2008. “Wine Yeasts for the Future.” FEMS Yeast Research 8(7): 979–95.

Gallego, F.J.; Perez, M.A.; Martinez, I.; Hidalgo, P. 1997. “Saccharomyces Cerevisiae:” Biotechnology 57(2): 383–401.

Gallego, F.J.; Perez, M.A.; Martinez, I.; Hidalgo, P.; Nuñez, Y. 2005. Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of Saccharomyces cerevisiae. Food Microbiology 22(6):561-568.

Gupta, M., Y. S. Chyi, J. Romero-Severson, and J. L. Owen. 1994. “Amplification of DNA Markers from Evolutionarily Diverse Genomes Using Single Primers of Simple-Sequence Repeats.” Theoretical and Applied Genetics 89(7–8): 998–1006.

Giudici, P.; Kunkee, R.E., 1994. The effect of nitrogen deficiency and súlfur-containing amino acids on the reduction of sulfate to hydrogen sulfide by wine yeasts. Am. J. Enol. Vitic. V.45. n.1. p. 107-112.

Hadrys, H.; Balick, M. & Schuerwater, B. 1992. “Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology.” Molecular Ecology :55–63.

Heard, G. 1999. Novel yeasts in winemaking - looking to the future. Food Australia, 51(8):347–352.

INPI - **Instituto Nacional da Propriedade Industrial.** (2018) Disponível em: http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/regulamento-de-uso-das-indicacoes-geograficas Acesso em: 04/07/2018.

Jordan, I K, and J F McDonald. 1999. “Comparative Genomics and Evolutionary Dynamics of Saccharomyces Cerevisiae Ty Elements.” Genetica 107(1–3): 3–13. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952193.

Kim, J. M.; Vanguri, S.; Boeke, J. D.; Gabriel, A.; Voytas, D.F.; 1998. “Transposable Elements and Genome Organization : A Comprehensive Survey of Retrotransposons Revealed by the Complete Saccharomyces Cerevisiae Genome ? Sequence Transposable Elements and Genome Organization : A Comprehensive Survey of Retrotransposons Revea.” (515): 464–78.

Kingsman, A. J.; Gimlich, R. L.; Clarke, L.; Chinault, A. C.; Carbon, J.; 1981. “Sequence Variation in Dispersed Repetitive Sequences in Saccharomyces-Cerevisiae.” Journal of Molecular Biology 145(4): 619–32.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1984.**The Yeasts**: a Taxonomic Study (3rd ed.). Amsterdam: Elsevier 1082p.

Kurtzman, Cletus P., and Christie J. Robnett. 1998. “Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26S) Ribosomal DNA Partial Sequences.” Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology 73(4): 331–71.

Lambrechts, M G, and I S Pretorius. 2000. “Yeast and Its Importance to Wine Aroma - A Review.” South African Journal of Enology and Viticulture 21(Special Issue): 97–129.

Lamine, Myriam, and Ahmed Mliki. 2015. “Elucidating Genetic Diversity among Sour Orange Rootstocks: A Comparative Study of the Efficiency of RAPD and SSR Markers.” Applied Biochemistry and Biotechnology 175(6): 2996–3013.

Legras, J.L.; Karst, F. 2003. “Optimisation of Interdelta Analysis for Saccharomyces Cerevisiae Strain Characterisation.” 221: 249–55.

Levinson, Gene, and George A. Gutman. 1987. “High Frequencies of Short Frameshifts in Poly-CA/TG Tandem Repeats Borne by Bacteriophage M13 in Escherichia Coli K-12.” Nucleic Acids Research 15(13): 5323–38.

Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C.A.; Kireger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; amon, A.; Scott, M, P.; 2014. **Molecular Cell Biology**.

Mamede, M. E. O.; Pastore, G.M; 2007. Avaliação de mosto de uva fermentado Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(2): 281-284.

Matienzo, Patricia Anchorena-. 2002. “**Re-Identificação E Caracterização Genética Da Levedura Iz-987 Utilizando Marcadores Moleculares.**” : 64. Dissertação (Mestrado).

McClintock, B. 1950. **“The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize.”** Proceedings of the National Academy of Sciences 36(6): 344–55.

Nelson, D.L.; Cox, M.M.; 2014**. Lehninger Principles Of Biochemistry.**

Ness, F.; Lavallee, F.; Dubourdieu, D.; Aigle, M.; Dulau, L.; 1993. “Identification of Yeast Strains Using the Polymerase Chain Reaction.” Journal of the Science of Food & Agriculture 62(1): 89–94.

Parket, A, and M Kupiec. 1992. “Ectopic Recombination between Ty Elements in Saccharomyces Cerevisiae Is Not Induced by DNA Damage.” Molecular and cellular biology 12(10): 4441–48.

Polonelli, L; Conti, S; Gerloni, M; Magliani, W; Castagnola, M; Lucas, A. P. 1993. Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. Manchete Rural, Rio de Janeiro, v.5, n.69, p.10-13.

Porta, A. R.; Enners, E.; 2012. “Determining Annealing Temperatures for Polymerase Chain Reaction.” The American Biology Teacher 74(4): 256–60.

Ramirez-Castrillón, M. 2012. “**Tipagem Molecular de Leveduras Associadas a Vinhos Do Sul Do Brasil: Padronização de MSP-PCR Fingerprinting.”** : 94p. Dissertação (mestrado)

Rankine, B. C. 1964. “Hydrogen Sulphide Production by Yeasts.” Journal of the Science of Food and Agriculture 15(12): 872–77.

Romano, P. et al. 2003. “Function of Yeast Species and Strains in Wine Flavour.” International Journal of Food Microbiology 86(1–2): 169–80.

Sandmeyer, S.; 1998. “Targeting Transposition: At Home in the Genome.” Genome Research 8(5): 416–18.

Schlötterer, Christian. 2000. “Evolutionary Dynamics of Microsatellite DNA.” Chromosoma 109(6): 365–71.

Silva, G. A. da; POLI, J. S., Poletto, C. M.; Schaker, P. D. C.; Valente, P., 2011. Production of functional killer protein in batch cultures upon a shift from aerobic to anaerobic conditions. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 54. n.3. p.601–612.

da Silva, G.A.; SILVA, M.A.A.A. 1984. Determinação qualitativa da produção de sulfeto de hidrogênio por leveduras. In: Tecnologias geradas pelo sistema Embrapa. Technical report, Embrap- DDT, Brasília

Silva, M.A.A.A. da; Silva, G.A. da, 1987. Leveduras nacionais selecionadas para a elaboração de vinho - Bento Gonçalves: EMBRAPA CNPUV, 19 p. - (EMBRAPA-CNPUV. Circular técnica; 14).

Silva, G. A. da, 2013 e revisado em 2019 (R Development Core Team: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90005107-0, 2008.

Soares, A; Sato, 2000. H. H. Braz J Microbiol, v.31, p. 291-297.

Somers, J. M.; Bevan, 1969. E. A. The inheritance of *killer* character in yeast. Genetic Researches, v.13, p. 71-73.

Strand, Micheline, Tomas A. Prolla, R. Michael Liskay, and Thomas D. Petes. 1993. “Destabilization of Tracts of Simple Repetitive DNA in Yeast by Mutations Affecting DNA Mismatch Repair.” Nature 365(6443): 274–76.

Suranská, Hana, and Dana Vránová. 2015. “Isolation, Identification and Characterization of Regional Indigenous Saccharomyces Cerevisiae.” 7: 181–90.

Tonietto, J. 1993.**O conceito de denominação de origem: uma opção para o desenvolvimento do setor vitivinícola brasileiro**, 20p. Bento Gonçalves: EMBRAPA CNPUV.

Tosta, C. D. 2004. **“Biotipagem de Leveduras Industriais Através Do Sistema Killer.”** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.

Vieira, Darlene Ana de Paula, e Nayara Cláudia de Assunção Queiroz Fernandes. 2012. **"Microbiologia Geral."** © Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás Este: 1–100.

Williams, John GK et al. 1990. "DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers Are Usefil as Genetic Markers." 18 (22): 6531–35.

Xiong, Y, and T H Eickbush. 1990. "Origin and Evolution of Retroelements Based upon Their Reverse Transcriptase Sequences." The EMBO journal 9(10): 3353–62.

Xufre, Angela, Helena Albergaria, Francisco Gírio, and Isabel Spencer-Martins. 2011. "Use of Interdelta Polymorphisms of Saccharomyces Cerevisiae Strains to Monitor Population Evolution during Wine Fermentation." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 38(1): 127–32.

Zambonelli, C.; Solli, M. G., Guerra, D. A .1984. study of H_2S non-producing strains of wine yeasts. Ann.Microbiol., v.34, p.7-15.

Walker, G.M.; 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**

9. APÊNDICES

Apêndice I

Espécies *Saccharomyces*

Espécie	BRM	Região	Espécie da uva
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 91B84	025697	Vale dos Vinhedos - RS	Riesiling Italico
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 1VVT97	004687	Vale dos Vinhedos- RS	Cabernet Franc
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 02MB12	043899	Monte Belo do Sul -RS	Cabernet Sauvignon
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 38APB12	033533	Pinto Bandeira - RS	Ancelota
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 50MBTF14	043351	Farroupilha -RS	Moscato Bianco
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 29MSCL15	042110	Santana do Livramento -RS	Merlot
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 45VSFCS10	043894	Vale do São Francisco - BA	Cabernet Sauvignon
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 3MCBSf17	044615	Campo Belo do Sul -SC e São Joaquim - SC	Malbec
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 37GTEpUf17	047522	Urussanga -SC	Goethe Tradicional
Saccharomyces cerevisiae Embrapa 1B84	025625	Vale dos Vinhedos - RS	Riesiling Italico
Saccharomyces cerevisiae K1 (comercial)		Lallemand	-
Saccharomyces boulardii (comercial)		Merck	-

Apêndice II

Espécies não-*Saccharomyces*

Espécie	Linhagem	BRM	**Região**	**Cultivar**
Aureobasidium pullulans	41MCBS17	045931	Campo Belo do Sul - RS	Malbec[1]
Candida akabanensis	98VVT99	042380	Vale dos Vinhedos -RS	Cabernet Franc[1]
Candida apicola	3TASL15	033353	Santana do Livramento - RS	Tannat[1]
Candida azyma	11MSCSL15	042102	Santana do Livramento - RS	Merlot[1]
Candida bentonensis	22MFMF14	032141	Farroupilha - RS	Florida[2]
Candida californica	6CL23	031975	Farroupilha - RS	Florida[2]
Candida diversa	89VVT99	042371	Vale dos Vinhedos -RS	Cabernet Franc[1]
Candida quercitrusa	54MFMF14	032147	Farroupilha - RS	Florida[2]
Papiliotrema laurentii	42VSFSB10	045933	Vale do São Francisco - PE	Sauvignon Blanc[1]
Hanseniaspora opuntiae	8GTGU15	039627	Urussanga - SC	Goethe[1]
Hanseniaspora uvarum	14GTRU15	039566	Urussanga - SC	Goethe[1]
Hanseniaspora vineae	27CSSCSL15	033519	Santana do Livramento - RS	Cabernet Sauvignon[1]
Issatchenkia terricola	12GTGU15	039628	Urussanga - SC	Goethe[1]
Issatchenkia hanoiensis	59VVT99	042356	Vale dos Vinhedos -RS	Cabernet Franc[1]
Issatchenkia orientalis	1VVB97	041706	Vale dos Vinhedos -RS	Riesiling Italico[1]
Kazachstania lodderae	91MCMCF14	045914	Farroupilha - RS	Climax[2]
Kodamaea ohmeri	9GPEpU16	039728	Urussanga - SC	Goethe[1]
Lodderomyces elongisporus	8MBS12	044588	Monte Belo do Sul -RS	Cabernet Sauvignon[1]
Meyerozyma guilliermondii	48VSFCB10	043840	Vale do São Francisco - PE	Chenin Blanc[1]
Pichia fermentans	21SBCBSB16	044583	Campo Belo do Sul - RS	Sauvignon Blanc[1]
Pichia galeiformis	43CNPUV02	043535	Vale dos Vinhedos -RS	Cabernet Sauvignon[1]
Pichia kluyveri	20MPB12	040093	Pinto Bandeira - RS	Merlot[1]
Pichia membranifaciens	36TPB12	033463	Pinto Bandeira - RS	Tannat[1]
Pichia myanmarensis	6VVT02	042438	Vale dos Vinhedos -RS	Cabernet Sauvignon[1]
Pichia occidentalis	7MSCSL16	045915	Santana do Livramento - RS	Merlot[1]

[1] Cultivar de Uva [2] Cultivar de Mirtilo