

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TIPAGEM MOLECULAR DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL
DO BRASIL: PADRONIZAÇÃO DE MSP-PCR *FINGERPRINTING*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MAURICIO RAMÍREZ CASTRILLÓN

Orientador: Dra. Patrícia Valente da Silva

Porto Alegre

Agosto de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

TIPAGEM MOLECULAR DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL
DO BRASIL: PADRONIZAÇÃO DE MSP-PCR *FINGERPRINTING*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

MAURICIO RAMÍREZ CASTRILLÓN

Biólogo (Universidad del Valle/2009)

Orientador: Dra. Patrícia Valente da Silva

Porto Alegre

Agosto de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia (ICBS) e no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica (Centro de Biotecnologia), ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A bolsa de mestrado foi financiada pelo CNPq (PEC-PG).

AGRADECIMENTOS

Por ser uma página especial, vou escrever em espanhol os seguintes parágrafos:

“Agradezco a mi profesora Patrícia Valente por haberme dado la oportunidad de trabajar junto con ella y el grupo de investigación en Brasil, por haber creído en mis actitudes académicas y por ser mi segunda mamá en este, mi segundo hogar. A Sandra y Andrea, quienes participaron directamente en la ejecución de este proyecto y pasar por los buenos y malos momentos que ofrece la biología molecular. A mis compañeros de laboratorio por compartir conmigo durante estos meses y haber compartido conmigo de esta bonita ciudad que es Porto Alegre. A mis amigos colombianos, compañeros de aventuras, y el amor de mi vida Isella, quienes me han acompañado en mis viajes y locuras, en especial a Rodolfo por los interminables “Rodizzios de locura” y enseñarme a conocer Porto Alegre... A mis compañeros de maestría y laboratorio del 220, quienes me acompañaron durante buen tiempo de trabajo en el Centro de Biotecnología, son personas muy chéveres. A la profesora Maria Lucia por sus sabios consejos e invitaciones a café colombiano. A Silvia y Luciano, quienes siempre estuvieron dispuestos a colaborar en la parte administrativa durante mi maestría. A mi familia por su incondicional apoyo por esta larga travesía por Brasil, sé que ha sido muy difícil para ellos y por eso este trabajo va dedicado especialmente a ellos, espero conozcan Brasil muy pronto. Finalmente, a CNPq quien ofreció la ayuda económica e hizo realidad el sueño de poder realizar mi postgrado en el exterior. A todos, muchas gracias”

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	18
Taxonomia, identificação e classificação.	18
Técnicas moleculares para identificar leveduras	19
Métodos moleculares para agrupar isolados de leveduras	21
MSP-PCR <i>Fingerprinting</i>	23
Bebidas fermentadas	24
Vinho.....	26
OBJETIVO.....	28
Objetivo geral	28
Objetivos específicos	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
Amostragem.....	29
Extração de DNA	29
MSP-PCR <i>Fingerprinting</i>	30
Análise de agrupamento	31
Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC)	32
Identificação molecular de leveduras.....	33
RESULTADOS	34
Padronização da técnica MSP-PCR- <i>Fingerprinting</i>	34
Comparação dos <i>primers</i> M13 e (GTG) ₅	42

Avaliação da técnica	45
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	59
PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
APÊNDICE	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES

Cbiot-UFRGS-RS: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

MSP-PCR: *Microsatellite Primed* – Reação em cadeia da Polimerase

dNTP: deoxi-Nucleotídeo TriFosfato.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

UFC: Unidade Formadora de Colônia.

MLST: *Multi Locus Sequencing Typing*.

PFGE: *Pulsed Field Gel Electrophoresis*.

RAPD: *Randomly Amplified Polymorphism DNA*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*.

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism*.

mL: mililitro.

GPY: Glicose, Peptona, Extrato de Levedura.

M: Molar

mM: mili-molar.

µL: microlitro.

Rpm: Rotações por minuto.

Min: minuto.

v/v: volume/volume.

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de ions hidrogênio numa solução.

mg/mL: miligramas / mililitro.

p/v: peso / volume.

ng/ μ L: nanogramas / microlitro.

pmol/ μ L: picomol / microlitro.

s: segundo.

U: unidade de atividade enzimática.

UPGMA: *Unweighted Pair Group with Arithmetical Average*

PIC: *Polymorphic Index Content.*

V: Volts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito da concentração do *primer* (GTG)₅ (pmol/μL) na amostra 20E (*S. cerevisiae*) com a utilização da Taq DNA polimerase Ludwig Biotech Brasil.. 36
- Figura 2.** Efeito da concentração do dNTP Mix (μM) na amostra 20E (*S. cerevisiae*) com a utilização da Taq DNA polimerase Ludwig Biotech Brasil. 37
- Figura 3.** Avaliação da concentração de MgCl₂ com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen Recombinante. 38
- Figura 4.** Avaliação da concentração do *primer* (GTG)₅ (pmol/μL) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen Recombinante. 38
- Figura 5.** Avaliação da concentração de dNTPs (μM) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen Recombinante..... 39
- Figura 6.** Avaliação da concentração do DNA (ng/μL) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen Recombinante..... 40
- Figura 7.** Comparação dos perfis genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* usando o *primer* (GTG)₅ 41
- Figura 8.** Comparação de dendrogramas usando o método UPGMA e correlação de Pearson, baseado em uma matriz binária de presença/ausência de bandas usando os *primers* A. M13 e B. (GTG)₅. 43
- Figura 9.** Comparação de dendrogramas usando o método UPGMA e distância euclidiana, baseado em uma matriz binária de presença/ausência de bandas usando os *primers* A. M13 e B. (GTG)₅. 44
- Figura 10.** Dendrogramas obtidos usando o método UPGMA (A) e Ward (B) baseado em distâncias euclidianas a partir de 113 amostras de leveduras..... 46
- Figura 11.** Cluster de perfis genéticos de vinhos do sul do Brasil usando o algoritmo QAPgrid 48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de cepas de levedura usadas e tipo de extração de DNA..... 34
- Tabela 2.** Identificação de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil e a sua associação com os perfis genéticos encontrados. 49

RESUMO

A identificação das leveduras participantes no processo fermentativo de vinhos comerciais e artesanais permite inferir as propriedades organolépticas, concentração de álcool e qualidade do produto final. Assim, a construção de uma base de dados que permita discriminar e identificar leveduras associadas a vinhos é necessário para monitorar o processo fermentativo e controlar os seus contaminantes. A principal proposta deste trabalho foi avaliar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting* usando o oligonucleotídeo iniciador (GTG)₅ para discriminar espécies de leveduras associadas a vinho no sul do Brasil. O protocolo foi otimizado usando três cepas variando as concentrações de dNTPs, MgCl₂, oligonucleotídeo iniciador e DNA. Foram analisadas 113 cepas de leveduras associadas a vinhos dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Brasil). A análise de *clustering* do tamanho e distribuição das bandas, baseada no algoritmo QAPgrid, usando distâncias euclidianas, gerou 20 agrupamentos com 22 perfis genéticos. A comparação das sequências da região D1/D2 do gene 26S rDNA e/ou região ITS com a base de dados Genbank usando o algoritmo Mega Blast permitiu identificar 10 espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, entre outros, associadas a vinhos. Assim, o algoritmo QAPgrid foi capaz de analisar a variabilidade inter e intraespecífica dos 113 isolados de forma não aleatória e dependente da similaridade genética. Se propõe o agrupamento molecular usando o *primer* (GTG)₅ associado ao sequenciamento de 10% dos isolados dentro de cada grupo como ferramenta para identificar e monitorar as populações de leveduras de vinhos.

ABSTRACT

The identification of yeasts involved in commercial and artisanal alcoholic fermentation allows inferences concerning the organoleptic properties and quality of the final product. Thus, the construction of a database that allows discriminating and identifying the wine yeasts is necessary to monitor the fermentation process and control their contaminants. The main purpose of this study was to evaluate the MSP-PCR fingerprinting technique using the primer (GTG)₅ for discrimination of wine yeast species in Southern Brazil. The protocol was optimized using three strains varying concentrations of dNTPs mix, MgCl₂, primer and DNA. We analyzed 113 strains of yeasts associated with wine from the states of Santa Catarina and Rio Grande do Sul (Brazil). The analysis of cluster size and distribution of bands, based on the QAPgrid algorithm using Euclidean distances generated 20 clusters with 22 genetic profiles. The comparison of sequences of the D1/D2 domain of the gene 26S rDNA and/or ITS region with the GenBank database using the Blast algorithm identified 10 species of the genera *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, and others associated with the wine. The algorithm QAPgrid was able to analyze inter and intra-specific variability of 113 isolates in a non-random manner dependent on genetic similarity. We propose the molecular clustering using the primer (GTG)₅ followed by sequencing of 10% of the isolates within each group can function as a tool for identifying and monitoring the wine yeast populations.

INTRODUÇÃO

A transformação do mosto em vinho inclui um processo microbiológico envolvendo interações entre levedura, bactéria e fungo (FLEET, 2007; FUGELSANG & EDWARDS, 2007). As leveduras têm um papel fundamental no processo até o produto final, sendo dominantes na fermentação, produzindo o álcool e sendo responsáveis pela qualidade organoléptica da bebida (FLEET & HEARD, 1993; NYKÄNEN, 1986; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000). Na microbiota natural do vinho, o gênero *Saccharomyces* é o principal responsável pela dominância e finalização da fermentação alcoólica (PRETORIUS, 2000). Porém, o uso de levedura seca ativa disponível comercialmente foi convertido numa prática padrão, limitando a diversidade de características organolépticas que a bebida pode ter.

Embora *Saccharomyces cerevisiae* seja o principal agente na fermentação alcoólica, outras espécies de levedura podem alcançar populações perto de 10^7 UFC/mL durante a fermentação do mosto (FLEET, 1999; FLEET, 2008). Assim, a variabilidade na composição de espécies e contagens de levedura deveria causar diferenças na concentração de etanol, sabor e aroma, criando um campo potencial de uso na indústria biotecnológica (CIANI & PICCIOTTI, 1995; ROMANO *et al.*, 1997; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1998).

O vinho é um produto fermentado que é produzido por fermentação espontânea pela microbiota natural presente nas uvas ou equipamentos, ou por fermentação induzida com inóculos de cepas de levedura pura seca ativa. Fermentações inoculadas incrementam a probabilidade de controle de qualidade do produto, são rápidas e diminuem problemas de contaminação. Cultivos puros podem contribuir na complexidade, aroma e qualidade do vinho (PRETORIUS, 2000; VAUDANO & GARCIA-MORUNO, 2008). O monitoramento das fermentações espontâneas ou induzidas provê o entendimento da dinâmica e composição da microbiota total durante a fermentação e do ambiente da vinícola, consequentemente elucidando como esses organismos afetam a composição do vinho e finalmente a sua qualidade (QUEROL *et al.*, 1992; SCHUTZ & GAFNER, 1994; PRAMATEFTAKI *et al.*, 2000).

Levantamentos ecológicos de cepas de leveduras de vinhos de várias áreas foram publicados (REDŽEPOVIĆ *et al.*, 2002; FLEET, 2003). A dinâmica de populações nos vinhedos revelou que espécies de leveduras são dependentes de fatores como localização geográfica, clima, variedade da uva e dano físico nas uvas (KHAN, 1999; PRETORIUS *et al.*, 1999; VAN DER WESTHUIZEN, 1999). Isso levou à introdução de cepas de leveduras caracterizadas como ideais para uso comercial (*Saccharomyces*), que se adaptaram melhor a fermentações com altas concentrações de sacarose e, geralmente, têm tolerância a altas concentrações de etanol e sulfito (VEZINHET *et al.*, 1990; QUEROL *et al.*, 1992b; LAVALLEE *et al.*, 1994; PRETORIUS, 2000).

Atualmente, mais de 200 cepas de levedura comercial estão disponíveis globalmente e consistem principalmente de isolados naturais (diploides, aneuploides ou poliploides) como também híbridos (HENSCHKE, 2004; BRADBURY *et al.*, 2005). A necessidade da identificação não ambígua de espécies e cepas de levedura foi sempre uma preocupação na indústria de vinhos devido a suas implicações econômicas. A taxonomia e sistemática de leveduras foram revolucionadas nos últimos 15 anos com a chegada das técnicas de biologia molecular, passando da identificação microbiológica clássica (fenotípica), molecular até uma abordagem polifásica: descrição fenotípica, genotípica, genômica – preferencialmente usando sequências de vários genes (MLST)- e ecológica, sendo este o consenso entre os pesquisadores atualmente na área (VALENTE, 2012).

A identificação de leveduras no passado baseou-se em propriedades bioquímicas e fisiológicas para caracterização e identificação, mas essas propriedades podem ser afetadas por condições de cultivo (BARNETT *et al.*, 2000; RIBEREAU-GAYON *et al.*, 2006). Abordagens moleculares para caracterizar e identificar as leveduras substituíram em parte os métodos tradicionais e baseiam-se na composição de bases de DNA, reassociação genômica, sequenciamento gênico, cariotipagem cromossômica e métodos baseados em PCR (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1995; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999; PRETORIUS *et al.*, 1999; PRETORIUS, 2000; SCHULLER *et al.*, 2004; NISIOTOU & GIBSON, 2005; PULVIRENTI *et al.*, 2005; FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006).

O monitoramento da contribuição de cada espécie ou população de leveduras, tanto nas fermentações industriais como artesanais, envolve o isolamento de um grande número de cepas, o que faz a identificação de todos os isolados por sequenciamento inviável em pesquisas de rotina, mesmo com os métodos de sequenciamento *high throughput* disponíveis atualmente. Neste sentido, muitas técnicas moleculares foram desenvolvidas para discriminar entre espécies de leveduras diferentes. Entre estas, a técnica “*Microsatellite Primed (MSP)-PCR Fingerprinting*” foi amplamente usada na literatura para discriminar cepas do gênero *Saccharomyces* (LIECKFELDT *et al.*, 1993; TORRIANI *et al.*, 1999; NAUMOVA *et al.*, 2003; DELLAGLIO *et al.*, 2003; SILVA-FILHO *et al.*, 2005) e Não-*Saccharomyces* (CARUSO *et al.*, 2002; CAPECE *et al.*, 2003; DE SOUZA *et al.*, 2007; BASILIO *et al.*, 2008) usando *primers* como (GAC)₅, (GACA)₄, (GTG)₅ e M13.

SCHULLER *et al.* (2004) mostraram que a resolução do MSP-PCR *Fingerprinting* é comparável com outras técnicas de tipagem molecular, como os elementos δ e análise de restrição do DNA mitocondrial. Porém, alguns estudos reportaram dificuldade em separar espécies usando diferentes iniciadores (GADANHO & SAMPAIO 2002; RODRIGUES & FONSECA 2003; ANDRADE *et al.*, 2006; LIBKIND 2007; GUAMÁN & CARVAJAL 2009). Um exemplo claro deste problema foi mostrado por ANDRADE *et al.* (2006), que não conseguiram discriminar entre *Debaromyces polymorphus* e *Pichia carsonii* devido a essas espécies apresentarem o mesmo perfil genético. Além disto, cada trabalho reporta

diferentes protocolos de amplificação do DNA, representando uma dificuldade quando se compara perfis genéticos, impossibilitando compartilhar bases de dados de genótipos entre laboratórios. SILVA-FILHO *et al.* (2005) mostraram que o *primer* (GTG)₅ foi útil na descrição da dinâmica de populações de leveduras ao longo do processo de fermentação de etanol combustível e para a identificação de cepas selvagens dominantes que poderiam ser usadas como *starter*, porém, este *primer* ainda não foi avaliado para monitorar a dinâmica de leveduras na produção de vinhos no Brasil.

Os processos fermentativos de bebidas comerciais e artesanais precisam da avaliação constante e rápida da comunidade participante. Além disso, correlacionar as propriedades organolépticas únicas de cada bebida com as espécies que agem no processo fermentativo e a sua avaliação da qualidade do produto final permitem melhorar a qualidade do produto. Assim, uma técnica molecular eficaz e rápida, capaz de auxiliar no acompanhamento e melhoria da produção das bebidas na indústria, é de grande valia.

A principal proposta deste trabalho foi padronizar a técnica de MSP-PCR *Fingerprinting* usando o *primer* (GTG)₅ para avaliar a diversidade de leveduras de regiões produtoras de vinhos do sul do Brasil. A diferenciação de espécies de leveduras usando esta técnica visa à construção de uma base de dados das leveduras mais representativas de bebidas fermentadas que possa ser utilizada para a identificação rápida dessas leveduras.

REVISÃO DE LITERATURA

Taxonomia, identificação e classificação.

A palavra inglesa “yeast” (derivado do alemão “Gischt” que significa espuma) ou seu equivalente em outros idiomas faz referência direta aos microrganismos presentes na fermentação do pão ou cerveja. Por isso, às vezes são conhecidas como fungos fermentativos similares a *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras são fungos ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares cujo crescimento resulta principalmente de brotamento ou fissão binária (KURTZMAN *et al.*, 2011). Elas podem ser caracterizadas por estados sexuais que não são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação (BARNETT, 1992). No trabalho mais recente sobre taxonomia de leveduras, mais de 149 gêneros e 1500 espécies de levedura estão descritos (KURTZMAN *et al.*, 2011).

A classificação se refere ao agrupamento de organismos em taxa baseado nas similaridades ou relações ancestrais comuns, enquanto que a identificação incorpora a ideia de comparar organismos desconhecidos a espécies classificadas baseado em características similares (KURTZMAN *et al.*, 2011). A taxonomia é vista como uma descrição coletiva de ambas: classificação e identificação (BARNETT *et al.*, 2000; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Primariamente, o taxonomista classifica espécies de leveduras (sejam ascomicéticas ou basidiomicéticas) sobre a sexualidade ou perda de fase sexual

(KURTZMAN, 2003; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006) e, secundariamente, por outras subdivisões, enquanto que a classificação e identificação são baseadas em critérios morfológicos, fisiológicos (nutricionais) e moleculares (PRETORIUS *et al.*, 1999; KURTZMAN *et al.*, 2011). Além disso, a taxonomia molecular de leveduras é baseada em similaridades de composição de nucleotídeos de DNA, enzimas, características de ultraestrutura e composição da parede celular, entre outras (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). O arranjo ou agrupamento de isolados de levedura em espécies, género, família, ordem, classes e divisões se ajusta aos regulamentos do Código Internacional de Nomenclatura Botânica (GREUTER *et al.*, 1994; KURTZMAN *et al.*, 2011). A ultima versão deste código foi adotada na Áustria em 2005 (MCNEILL *et al.*, 2007).

Técnicas moleculares para identificar leveduras

A identificação e caracterização de espécies e cepas de leveduras tradicionalmente são feitas usando testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (BARNETT *et al.*, 1990). Porém, este processo implica em aproximadamente 90 testes e os resultados variam dependendo do estado fisiológico do cultivo ou da variabilidade intraespecífica, além disso, os testes bioquímicos não são muito sensíveis, levando a identificação de leveduras duvidosa (GUILLAMÓN *et al.*, 1996; ARIAS *et al.*, 2002).

No momento que chegaram as técnicas de biologia molecular como alternativa aos métodos microbiológicos tradicionais, foram propostas outras

formas de identificar leveduras. Várias delas foram avaliadas nos diferentes laboratórios (QUEROL *et al.*, 1992a; QUEROL *et al.*, 1992b; QUEROL *et al.*, 1994; PIŠKUR *et al.*, 1995, DE BARROS *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2001), sendo que somente as propostas feitas por GUILLAMÓN *et al.* (1998), BELLOCH *et al.* (1998) e ESTEVE-ZARZOSO *et al.* (1999) foram aceitas pela comunidade industrial e acadêmica no início do século XXI. A construção de uma base de dados denominada “Yeastid.com” baseada nos perfis de restrição da região ITS1-5.8S-ITS2 foi disponibilizada na Internet para fazer as análises com mais de 400 espécies de leveduras, principalmente ascomicéticas (ver www.yeastid.com) (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.*, 2000; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, outros pesquisadores tentaram fazer novas propostas de técnicas moleculares para identificar leveduras (MARTORELL *et al.*, 2005a; SALINAS *et al.*, 2009; MASNEUF-POMAREDE *et al.*, 2007; PRAKITCHAIWATTANA *et al.*, 2004; BOYANTON *et al.*, 2008), mas a técnica proposta por KURTZMAN & ROBNETT (1998), e SCORZETTI *et al.* (2002) baseada no sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA e da região ITS foi aceita na comunidade científica por vários anos para identificar leveduras tanto ascomicéticas como basidiomicéticas, com uma ampla base de dados publicados no Genbank e Mycobank (ARIAS *et al.*, 2002).

Atualmente, a taxonomia de leveduras tem uma abordagem polifásica, com espécies e gêneros formados por clados monofiléticos e baseados em dados genômicos, genotípicos, fenotípicos e ecológicos. Isso faz com que a identificação

seja mais difícil na rotina dos laboratórios e mais ainda quando há um alto número de isolados, como no caso de estudos de microbiologia ambiental e alguns processos industriais.

Métodos moleculares para agrupar isolados de leveduras

As técnicas moleculares para agrupar leveduras apresentam a potencialidade de diferenciar entre espécies (variabilidade interespecífica) ou cepas da mesma espécie (variabilidade intraespecífica) e são aplicadas com o objetivo de melhorar a sensibilidade e diminuir o custo da identificação de leveduras (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2006). Mesmo que estes métodos não sejam considerados eficientes para delimitar espécies ou descrever novas espécies, eles são bem vistos do ponto de vista prático, especialmente quando uma cepa deve ser monitorada durante um processo industrial ou quando uma grande quantidade de isolados é obtida de uma amostra ambiental. Em qualquer caso, somente um ou poucos representantes de cada perfil genotípico precisam continuar o processo de identificação molecular, diminuindo o trabalho, custo e tempo da identificação de leveduras (VAUGHAN-MARTINI, 2003).

Foram desenvolvidos vários métodos capazes de demonstrar a variabilidade genética em ambientes naturais e industriais. Entre eles se encontram, por exemplo, PFGE – “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (BLONDIN & VEZINHET, 1988; VAN DER WHESTUIZEN & PRETORIUS, 1992), RAPDs – “Random Amplified Polymorphic DNA” (BALEIRAS COUTO *et al.*, 1994,

ANDRIGHETTO *et al.*, 2000; ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2000; QUESADA & CENIS, 1995), PCR-RFLPs da região ITS1-5.8S-ITS2 (CONSTANTÍN *et al.*, 1998; GUILLAMÓN *et al.*, 1998; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999), hibridização (DEGRÉ *et al.*, 1989; QUEROL *et al.*, 1992a; NADAL *et al.*, 1999), RFLPs do DNA mitocondrial (VEZINHET *et al.*, 1990, QUEROL *et al.*, 1992a, QUEROL *et al.*, 1992b, LÓPES *et al.*, 2007), AFLPs (DE BARROS LOPES *et al.*, 1999), MSP-PCR – “Microsatellite Primed PCR” (LIECKFELDT *et al.*, 1993; SILVA-FILHO *et al.*, 2005; SILHAVY *et al.*, 2006; VILA-NOVA *et al.*, 2009) e PCR dos elementos δ (NESS *et al.*, 1993; VERSAUD *et al.*, 1995; LE JEUNE *et al.*, 2006).

Atualmente, as técnicas usadas com mais frequência nos laboratórios são as baseadas somente em PCR, isto é, MSP-PCR e RAPDs, já que diminuem o tempo de análise comparado com técnicas como cariotipagem ou PCR-RFLP (SILVA-FILHO *et al.*, 2005). Porém, o uso de RAPDs é questionado em relação a sua reprodutibilidade e instabilidade dos perfis obtidos (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2011), portanto o uso de regiões microssatélites para analisar a variabilidade inter e intraespecífica é mais interessante para avaliar a dinâmica de comunidades e populações de leveduras na indústria e em microbiologia ambiental.

MSP-PCR *Fingerprinting*

O princípio desta técnica consiste em um conjunto de microssatélites, tais como (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n, etc., ou minissatélites, que funcionam como iniciadores de uma PCR de segmentos genômicos que são flanqueados por sequências repetidas, como no caso de microssatélites (LIECKFELDT *et al.*, 1993) ou por sequências de DNA minissatélite (MEYER & MITCHELL, 1995).

Os *loci* mais usados são (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ e M13 (5' GAGGGTGGCGGTTCT 3'), todos caracterizados por ter um alto índice de polimorfismos e reprodutibilidade entre os diferentes laboratórios e usados para um amplo grupo de organismos, desde procariontes até mamíferos (GEVERS *et al.*, 2001; CANTEROS *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-BLANCO *et al.*, 2010; PÖCHE *et al.*, 1991; MOHAPATRA *et al.*, 2008; BASILIO *et al.*, 2008; MAQUEDA *et al.*, 2010). Em leveduras, a sua aplicação principal tem a ver com a caracterização de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da dinâmica de populações em processos industriais (SILVA-FILHO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2007; BASILIO *et al.*, 2009; VILA-NOVA *et al.*, 2009).

Usando esta técnica, foram agrupados com sucesso perfis genéticos similares de isolados ambientais dos gêneros *Rhodotorula* (GADANHO & SAMPAIO 2002; ANDRADE *et al.*, 2006; LIBKIND 2007; GUAMÁN & CARVAJAL 2009), *Taphrina* (RODRIGUES & FONSECA, 2003) e *Candida* (LOPES *et al.*,

2007). Também foi testada a sua eficiência no monitoramento de processos industriais como a produção de vinhos em diversos países, onde foi desenvolvida e avaliada a técnica (LIECKFELDT *et al.*, 1993; BALEIRAS COUTO *et al.*, 1996; CARUSO *et al.*, 2002; CAPECE *et al.*, 2003).

Bebidas fermentadas

O conhecimento das técnicas de fermentação de bebidas foi transmitido entre as famílias ao longo do tempo, desde o início da sociedade humana até a atualidade, adaptando o produto final dependendo dos hábitos culturais do ser humano. Muitas bebidas tradicionais continuam na cultura de países específicos e outras foram industrializadas e distribuídas no mundo inteiro (BEJARANO, 1950). Exemplos claros são encontrados em América do Sul, onde se pode encontrar bebidas fermentadas artesanais, como a “chicha”, original de países como Colômbia, Peru, Chile e Equador (BEJARANO, 1950) e a cachaça, original do Brasil; ou bebidas às vezes industrializadas, como no caso dos vinhos e cervejas.

O processo de fermentação envolve interação entre leveduras, bactérias e fungos filamentosos (FLEET, 2007; FUGELSANG & EDWARDS, 2007), sendo as leveduras dominantes no produto final, produzindo o álcool e fornecendo as qualidades organolépticas à bebida (NYKÄNEN, 1986; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000). No entanto, a variabilidade na composição de espécies e populações de leveduras vai gerar diferenças na quantidade de etanol, sabor e

aroma, o que gera um potencial campo de uso biotecnológico na indústria (CIANI & PICCIOTTI, 1995; ROMANO *et al.*, 1997; ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1998).

Neste sentido, o mercado de bebidas fermentadas é variado e dependente do tipo de bebida e do caráter de produção (industrial ou artesanal). De qualquer forma, é desejável que as bebidas tenham características de aroma próprias das regiões onde são produzidas, conferindo um diferencial em relação a outras bebidas fermentadas disponíveis no comércio.

Este diferencial é dado pela matéria-prima utilizada para a fermentação, pelo próprio processo fermentativo, que pode ter características únicas em cada região, e pelo agente de fermentação utilizado (levedura). As leveduras podem contribuir positivamente no processo de diferenciação, na medida em que produzam metabólitos diferenciados a partir da constituição genética própria das linhagens adaptadas às condições geoclimáticas de cada região. Estes compostos contribuiriam para o aroma e sabor do produto, que poderiam constituir uma marca da região e mesmo de diferentes produtores da região. Além disso, diferentes espécies de leveduras podem contribuir negativamente para a qualidade do produto e devem ser identificadas e eliminadas. Portanto, a busca deste conjunto organoléptico a partir da prospecção da biodiversidade local das bebidas fermentadas parece uma iniciativa interessante.

A literatura que relata a diversidade e monitoramento de fermentações tradicionais na América Latina é escassa (CASTILHO *et al.*, 1990; WACHER *et*

al., 1993; LACHANCE, 1995; LOPES *et al.*, 2007; VIANNA *et al.*, 2008, VILANOVA *et al.*, 2009). Em geral, é comum encontrar leveduras dos gêneros *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspota* e *Zygosaccharomyces* no início da fermentação e *S. cerevisiae* e outras leveduras etanol-tolerantes no final do processo.

Vinho

A produção de uvas no Brasil se localiza nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, tendo importância socioeconômica nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Pernambuco, Bahia e Minas Gerais. Cerca de 50% da produção nacional de uva é destinada à elaboração de vinhos. O Rio Grande do Sul é o maior produtor de vinho do país, elaborando uma média de 300 milhões de litros de vinho e mosto por ano, representando 90% da produção nacional. A maior região produtora de vinho no RS é a Serra Gaúcha, possuindo cerca de 400 estabelecimentos vinícolas. Das 10 maiores vinícolas gaúchas, cinco são cooperativas e absorvem 71% da uva processada. O restante da produção de uva é consumido por pequenas e médias empresas, das quais 227 são vinícolas, 20 são cooperativas e 163 são cantinas rurais (DE MELO, 2010).

A qualidade do vinho está, em certa medida, relacionada e é consequência direta da microbiota que se desenvolve durante a fermentação (FLEET, 2008), principalmente em se tratando de um processo de fermentação espontânea. Em processos industriais que utilizam fermentos comerciais, este desenvolvimento

não é tão marcante, pois a população microbiana é mantida "quase" pura no processo. Entretanto, o uso de fermento comercial tem trazido um problema relacionado à qualidade final do produto que é a não participação desta microbiota autóctone nas características finais do produto. Esta participação marcante nos processos espontâneos se dá pela produção de álcoois superiores, aldeídos, ácidos, ésteres e outras substâncias aromatizantes ao longo da fermentação por uma ou mais leveduras ou linhagens de leveduras que se revezam no processo (DUMONT & DULAU, 1997; LAMBRECHTS & PRETORIUS, 2000; MURAT *et al.*, 2001). Este traço enológico típico da população autóctone de leveduras tem sido considerado representativo de uma região enológica particular, como acontece nas regiões produtoras da França, Espanha e Itália. Estas leveduras autóctones ocorrem na superfície das uvas e o sucesso no processo fermentativo depende de um conjunto de fatores físicos, químicos e bióticos da região. A distribuição geográfica de linhagens de *S. cerevisiae* nas diferentes regiões vitivinícolas específicas tem sido relatada (VERSAVAUD *et al.*, 1995; CARUSO *et al.*, 2002; REDZEPOVI *et al.*, 2002; CAPELO *et al.*, 2004) e mudanças na composição da microbiota em diferentes vinhedos têm sido observadas (CAPELLO *et al.*, 2004). Por vários anos consecutivos, linhagens predominantes de leveduras têm sido observadas em alguns vinhedos (VERSAVAUD *et al.*, 1995). Estudos revelam que apesar de serem encontradas centenas de espécies de leveduras nos vinhos, somente 15 são consideradas associadas à produção do vinho (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

OBJETIVO

Objetivo geral

Padronizar e avaliar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting* para discriminar espécies de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil.

Objetivos específicos

Isolar leveduras associadas a vinhos envasados de procedência artesanal ou semi-industrializada dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Brasil);

Padronizar e avaliar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting* para avaliação de leveduras associadas a vinhos com os primers (GTG)₅ e M13;

Agrupar isolados de acordo com o seu perfil genético usando a técnica de MSP-PCR *Fingerprinting* com o *primer* (GTG)₅ e o algoritmo QAPgrid.

Identificar isolados representativos de cada grupo mediante sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA e/ou da região ITS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

Amostras de vinho fino e colonial, branco e tinto (n=44) foram coletadas diretamente no ponto de produção e distribuição de vinho nos estados de Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Brasil), entre 2003 e 2011. De cada amostra de vinho, foram inoculados 100 mL de vinho puro e diluições (1:1, 1:3) em água destilada, filtradas em membranas com poro de 45µm, sobre meio de cultura GYP (2% glicose, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar) por 72 horas a 28°C. Cepas representativas dos diferentes morfotipos foram isoladas e purificadas em meio GYP e/ou cultivadas para análises moleculares.

Extração de DNA

Dois protocolos foram usados neste estudo. DNA genômico de amostras coletadas entre 2003 e 2010 foi extraído usando o protocolo clássico com fenol/clorofórmio (AUSEBEL *et al.* 1999). DNA de amostras coletadas em 2011 foi extraído com o protocolo baseado em acetato de potássio proposto por OSORIO-CADAVID *et al.* (2009), com algumas modificações. Cultivos puros de cada cepa foram cultivados em meio GYP (0.5% extrato de levedura, 2% glicose, 1% peptona) a 30°C por 18 horas. Depois de centrifugar e lavar com água destilada, a biomassa de cada cultivo foi ressuspensa em 400µL de tampão de lise (NaCl 0.5M, EDTA 10mM, SDS 2%, Tris-HCl 50mM; pH 8) e incubada por 60min a 65°C.

Imediatamente depois, foi adicionado 200µL de Acetato de Potássio (5M, pH 4.8) e as amostras foram mantidas por 30min em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 5 min.

O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e foi adicionado 1mL de isopropanol a -20°C, agitando suavemente os tubos durante 5min. Depois de centrifugar a 14.000 rpm por 10min, o sedimento foi lavado com etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente a 14.000 rpm por 5 min. Os *pellets* secos foram res-suspendidos em 50µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7.4). Depois de incubar as amostras a 37°C durante 30min com 3µL de RNase (10mg/mL), as amostras de DNA foram armazenadas a -20°C. A qualidade do DNA extraído foi analisada em géis de agarose 1% (p/v).

MSP-PCR *Fingerprinting*

MSP-PCR *Fingerprinting* usando os *primers* (GTG)₅ e M13 foram otimizados a partir de SILVA-FILHO *et al.* (2005). Concentrações diferentes de cada reagente usado na PCR foram testadas, variando MgCl₂ (1,5-4,5mM), concentração de *primer* (0,2-1,4pmol/µL), dNTPs (10-70µM) e DNA (110-0,1ng/µL). Foram testadas e otimizadas as condições para duas Taq DNA Polimerases (1U, Invitrogen recombinante; 1,2U, Ludwig Biotech Brasil) por reação. O programa iniciou a 94°C por 5min seguido de 35 ciclos de 94°C por 15s, 55°C por 45s e 72°C por 90s, com extensão final de 72°C por 6min.

Os produtos de PCR foram separados em géis de agarose a 1,5% (p/v) em 1X TAE a 7,5v/cm por 180min. Os géis foram corados com GelRed ® para visualização com luz UV e os marcadores de tamanho molecular 1Kb plus ou 1Kb (Invitrogen) foram usados para comparar os tamanhos das bandas usando o software UVI Mw Start Gel ® 11.

Análise de agrupamento

Inicialmente, foi desenvolvido o agrupamento mediante a construção de dendrogramas, construindo uma matriz binária de dados com os perfis genéticos baseados na presença /ausência de bandas e análise de *cluster* usando: (a) coeficiente de Pearson ou distância euclidiana, e (b) método UPGMA (*Unweighted Pair Group with Arithmetical Average*) ou método de Ward, usando o software STATISTICA 7.0 ®. Foi estabelecido o critério de 60% ou 80% de similaridade para definir grupos dependendo de cada dendrograma.

Posteriormente, a análise de agrupamento dos perfis genéticos foi otimizada usando um algoritmo de *cluster* de grafo não supervisionado e um método de traçado de otimização combinatório. Cada uma das amostras foi representada por um vetor de números inteiros que contém o tamanho das bandas encontradas na amostra, de forma quantitativa. Então, a matriz de distância é computada usando distâncias euclidianas entre cada dupla de amostras. Usando a matriz, uma representação gráfica dos dados é gerada e o

algoritmo de agrupamento (INOSTROZA-PONTA *et al.*, 2007) automaticamente computa a partição do grafo sem precisar de parâmetros definidos pelo usuário, como o número de *clusters*. Como resultado, o algoritmo encontra 20 grupos de amostras, com tamanhos variando entre duas e 19 amostras. Depois, a interface gráfica foi obtida usando o algoritmo QAPGrid (INOSTROZA-PONTA *et al.*, 2011). QAPGrid produz uma interface que, baseada somente no gráfico de partição e o perfil genético das amostras, organiza e agrupa espacialmente as amostras de acordo com a sua similaridade, enquanto que o algoritmo de agrupamento separa os grupos menores.

Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC)

O poder discriminatório dos *primers* (GTG)₅ e M13 foi comparado usando o Índice de Conteúdo Polimórfico (PIC), de acordo com SMITH *et al.* (1997). Supondo que cada iniciador funciona como um “locus” e a presença/ausência de bandas como os “alelos” de cada um, é possível estimar o nível de polimorfismo obtido no *fingerprinting*, onde valores perto de “0” indicam que o “locus” é monomórfico (sem poder discriminatório) e valores perto de “1” que o “locus” é altamente polimórfico e/ou discriminatório.

Identificação molecular de leveduras

O domínio divergente D1/D2 do 26S rDNA foi amplificado com os *primers* NL1 e NL4 (O'DONNELL, 1993) e a região ITS1-5.8S-ITS2 com os *primers* ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). As condições de amplificação foram as seguintes: Um ciclo inicial a 94°C por 5min; 35 ciclos a 94°C por 15s, 55°C por 45s, 72°C por 90s e um ciclo de extensão final de 72°C por 6min. Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese sobre um gel de agarose 1,5% a 100V por 45min, corados com GelRed ® para visualização em luz Ultravioleta, e purificados usando precipitação mediada por tRNA transportador (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

As sequências foram obtidas com o sequenciador automático Amersham MegaBACE 1000, usando os protocolos padronizados na Rede Genoma Brasileira, e o sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer, usando os protocolos estabelecidos pela empresa Ludwig Biotech Brasil. Ambos equipamentos se localizam no Centro de Biotecnologia, Cbiot-UFRGS-RS, Brasil.

RESULTADOS

Padronização da técnica MSP-PCR-*Fingerprinting*

Foi extraído o DNA genômico de 113 cepas de vinho, 47 isolados de vinhos do Rio Grande do Sul e 66 de Santa Catarina, entre 2003 e 2011 (Tabela 1). Foram selecionadas amostras de DNA de três isolados de leveduras para avaliar e padronizar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting*, testando duas variáveis: tipo de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotech Brasil ou Invitrogen recombinante) e iniciador (M13 ou (GTG)₅).

Tabela 1. Lista de cepas de levedura usadas e tipo de extração de DNA usado.

Tipo de vinho /uva	Região*	No. de isolados	Método de extração DNA
Bordaux Isabel	RS	2	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Branco	RS	1	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
	SC	9	
BrancoDemiSec	RS	5	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Chardonnay	SC	7	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Lorena	RS	2	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Mattana	SC	4	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Moscatto Giallo	RS	2	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Niagara Isabel	RS	2	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Niagara	RS	6	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)

Rosé	RS	2	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
	SC	2	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Tinto Bordaux	RS	10	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
	SC	25	
Tinto Isabel	RS	6	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
Tinto suave	RS	9	OSORIO-CADAVID <i>et al.</i> (2009)
	SC	5	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Branco Niágara	SC	1	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Branco seco	SC	4	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Branco mesa /	SC	4	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Courdec			
Tinto Cabernet	SC	4	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Tinto seco	SC	1	AUSUBEL <i>et al.</i> (1999)
Total de isolados		113	

*RS: Rio Grande do Sul, SC: Santa Catarina.

Inicialmente, foi usada a Taq polimerase da marca Ludwig Biotech Brasil para padronizar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting*, usando o *primer* (GTG)₅, em uma amostra posteriormente identificada como *Saccharomyces cerevisiae* (20E). A concentração escolhida para MgCl₂ foi 3mM, seguindo as recomendações do fabricante. Foram testadas duas concentrações de Taq DNA polimerase em três amostras por triplicata (1U e 1,2U), mas quando foi avaliada 1U (segundo a sugestão do fabricante), os géis mostraram arraste. Porém, o *fingerprinting* foi bem resolvido apenas quando foi usado 1,2U de Taq por cada reação. O *primer*

(GTG)₅ foi testado em oito concentrações diferentes, sendo que na concentração de 1,4 pmol/μL foi observado maior número de bandas com melhor resolução (Figura 1). De forma similar, na Figura 2 se apresenta o efeito da concentração do dNTP Mix na reação de PCR. A concentração escolhida na padronização foi de 50μM, por apresentar bandas mais separadas e definidas.

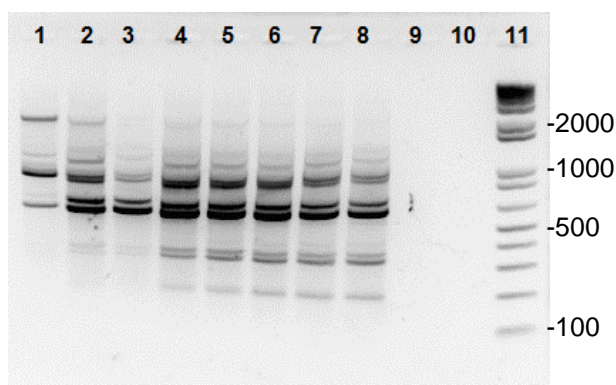


Figura 1. Efeito da concentração do *primer* (GTG)₅ (pmol/μL) na amostra 20E (*S. cerevisiae*) com a utilização da Taq DNA polimerase Ludwig Biotech Brasil. L1: 0,2; L2: 0,4; L3: 0,6; L4: 0,8; L5: 1; L6: 1,2; L7: 1,4; L8: 1,6; L9: C(-); L11: MPM 1Kb plus. Todos os poços tem o mesmo volume de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

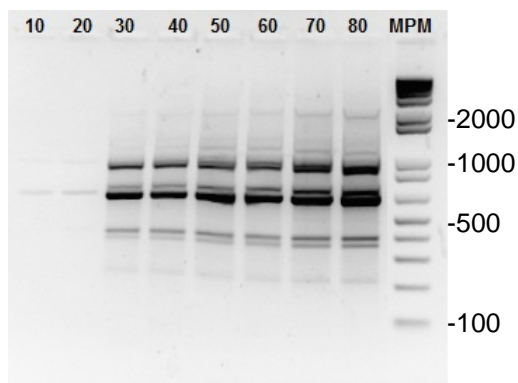


Figura 2. Efeito da concentração do dNTP Mix (μM) na amostra 20E (*S. cerevisiae*) com a utilização da Taq DNA polimerase Ludwig Biotech Brasil. MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR: 1Kb plus (Invitrogen). Todos os poços tem o mesmo volume de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

As reações padronizadas contêm, para um volume final de $25\mu\text{L}$: $5\mu\text{L}$ de DNA ($1\text{ng}/\mu\text{L}$), $1,4\text{pmol}/\mu\text{L}$ do iniciador, 3mM MgCl_2 , $0,05\text{mM}$ do dNTPs Mix e $1,2\text{U}$ de Taq polimerase Ludwig Biotech Brasil em 1X tampão de amplificação.

De forma semelhante, foi usada a Taq DNA polimerase da marca Invitrogen para padronizar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting*, usando o *primer* $(\text{GTG})_5$, em três amostras de DNA: 20E, 04C e MRC67. Foi usada 1U de Taq por amostra, de acordo com a sugestão do fabricante. A concentração ideal de MgCl_2 foi 3mM (Figura 3), iniciador $1\text{pmol}/\mu\text{L}$ (Figura 4) e dNTP Mix $60\mu\text{M}$ (Figura 5).

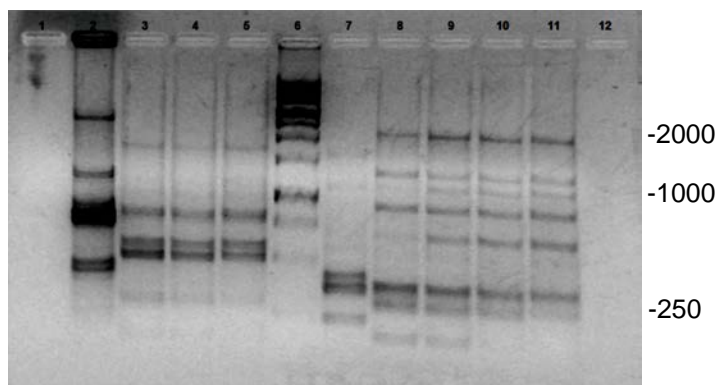


Figura 3. Avaliação da concentração de $MgCl_2$ com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen. 1-5, amostra 20E; 6, MPM 1Kb; 7-11, amostra 04C; 12, C(-). Foram testadas as seguintes concentrações: 1,5mM (1 e 7), 2,25mM (2 e 8), 3mM (3 e 9), 3,75mM (4 e 10), e 4,5mM (5 e 11). Foi adicionado $2\mu L$ de GelRed (diluído 1:500) por amostra, mas a linha 2 teve adição em excesso do corante, que alterou a migração de DNA quando comparadas com as outras. Todos os poços tem o mesmo volume de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

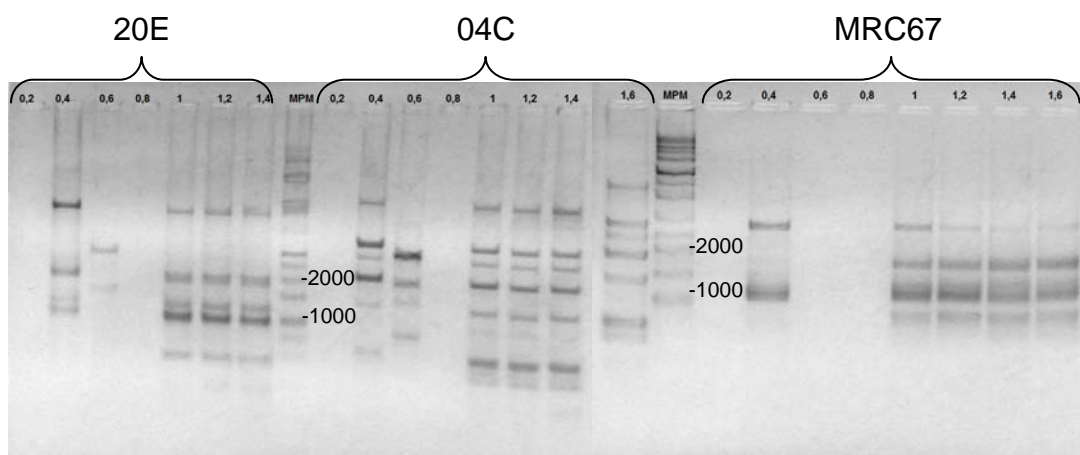


Figura 4. Avaliação da concentração do *primer* $(GTG)_5$ (pmol/ μL) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen. Marcador de Tamanho Molecular: 1Kb. Todos os poços tem a mesma quantidade de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

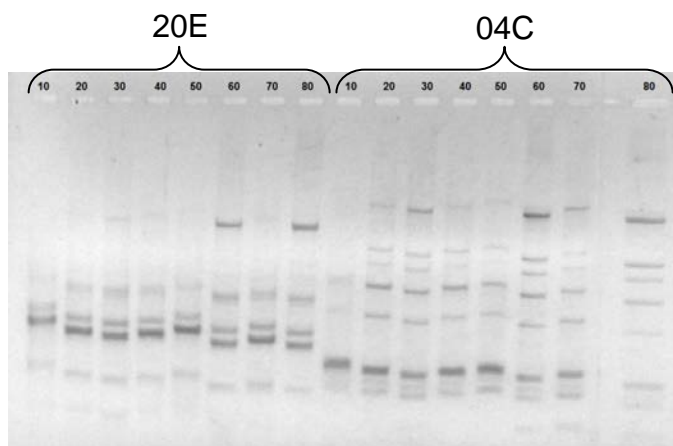


Figura 5. Avaliação da concentração de dNTPs (μM) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen. Concentrações avaliadas (μM): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80. Foi adicionado $2\mu\text{L}$ de GelRed diluído (1:500) em cada amostra, sendo a variação observada entre os poços devido a erro de pipetagem do corante GelRed. Todos os poços tem o mesmo volume de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

Também, foi avaliado o efeito da concentração de DNA no perfil do *fingerprinting* obtido (Figura 6). Concentrações menores que $10\text{ng}/\mu\text{L}$ não tiveram efeito sobre o perfil, porém, não houve amplificação quando foi testada numa concentração de DNA de $110\text{ng}/\mu\text{L}$, o que pode ser devido a uma interferência da alta concentração de DNA ou/e de impurezas.

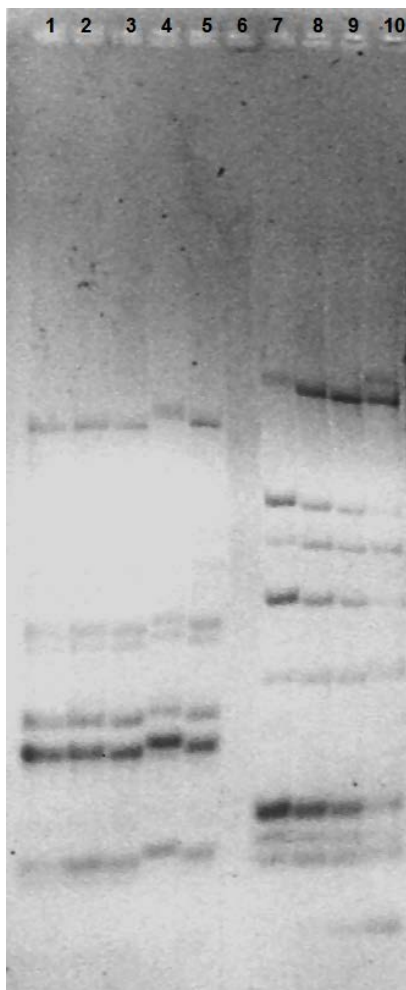


Figura 6. Avaliação da concentração do DNA (ng/ μ L) com a utilização da Taq DNA polimerase Invitrogen em diluições seriadas das amostras 20E (L1-L5) e 04C (L6-L10). L1: 5 ng/ μ L; L2: 1 ng/ μ L; L3: 0,5 ng/ μ L; L4: 0,25 ng/ μ L; L5: 0,1; L6: 110 ng/ μ L; L7: 11 ng/ μ L; L8: 2,2 ng/ μ L; L9: 1,1 ng/ μ L; L10: 0,55 ng/ μ L. Todos os poços tem o mesmo volume de produto de PCR. Gel de agarose 1,5% (p/v).

A cepa 20E foi identificada como *S. cerevisiae* por sequenciamento da região D1/D2 do 26S rDNA. O número de bandas reminiscentes no perfil de *S. cerevisiae* 20E foi similar a outros perfis de *fingerprinting* com o iniciador (GTG)₅ para esta espécie em outros estudos (SILVA-FILHO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*,

2007; MAQUEDA *et al.*, 2010), e a sua reprodutibilidade foi testada em reações de PCR independentes usando concentrações de DNA diferentes. A Figura 7 mostra o teste de repetitividade no *Fingerprinting* usando o isolado 20E em diferentes reações de PCR e a sua comparação com outros perfis genéticos obtidos em trabalhos semelhantes.

Pode-se notar que a intensidade das bandas varia e algumas bandas desaparecem e aparecem em cada migração no gel. Porém, algumas bandas apresentam um padrão de bandas específico que não muda, pelo qual o perfil genético pode ser detectado e agrupado como *S. cerevisiae*, apesar da resolução do tipo de gel feito.

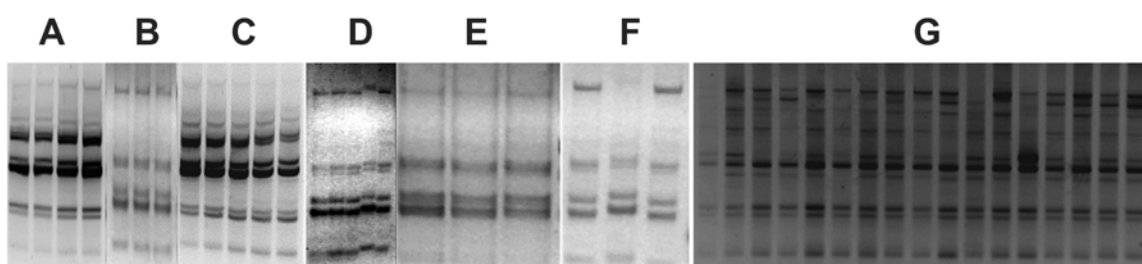


Figura 7. Avaliação da repetitividade da técnica MSP-PCR *Fingerprinting* comparando os perfis genéticos obtidos para a amostra 20E (*Saccharomyces cerevisiae*) usando o *primer* (GTG)₅. A-F. Amostra 20E (Analisado neste trabalho), onde cada letra representou reações de PCR independentes (A e C usando a Taq Ludwig Biotech Brasil e B, D, E, F a Taq Invitrogen Recombinante), e dentro de cada letra repetições da mesma amostra migrados no mesmo gel de agarose. G. Perfis genéticos obtidos por MAQUEDA *et al.* (2010)

Comparação dos *primers* M13 e (GTG)₅

A partir de uma matriz binária de similaridade baseada em presença/ausência de bandas, foram elaborados dendrogramas para cada um dos *primers* testados em 49 amostras (Figuras 8 e 9). O *primer* M13 agrupou 34 perfis diferentes (21 “alelos”) e o *primer* (GTG)₅ 29 perfis diferentes (18 “alelos”) usando o coeficiente de Pearson e o critério de agrupamento de 80% de similaridade. De forma similar, o *primer* M13 agrupou 30 perfis e o *primer* (GTG)₅ 32 perfis usando distâncias euclidianas, mas o critério de agrupamento foi de 60% de similaridade (80% de similaridade como é comum, não conseguiu agrupar para esta análise). Quando os *primers* foram comparados de acordo com o Índice de Conteúdo Polimórfico, os valores foram muito semelhantes (0,92 e 0,94, respectivamente), indicando que qualquer dos dois *primers* é suficientemente discriminatório para definir perfis genéticos diferentes. Consequentemente, a escolha do *primer* foi baseada na visualização dos géis de agarose, tendo como critério a melhor resolução e separação de bandas. Assim, as análises posteriores foram feitas usando somente o *primer* (GTG)₅.

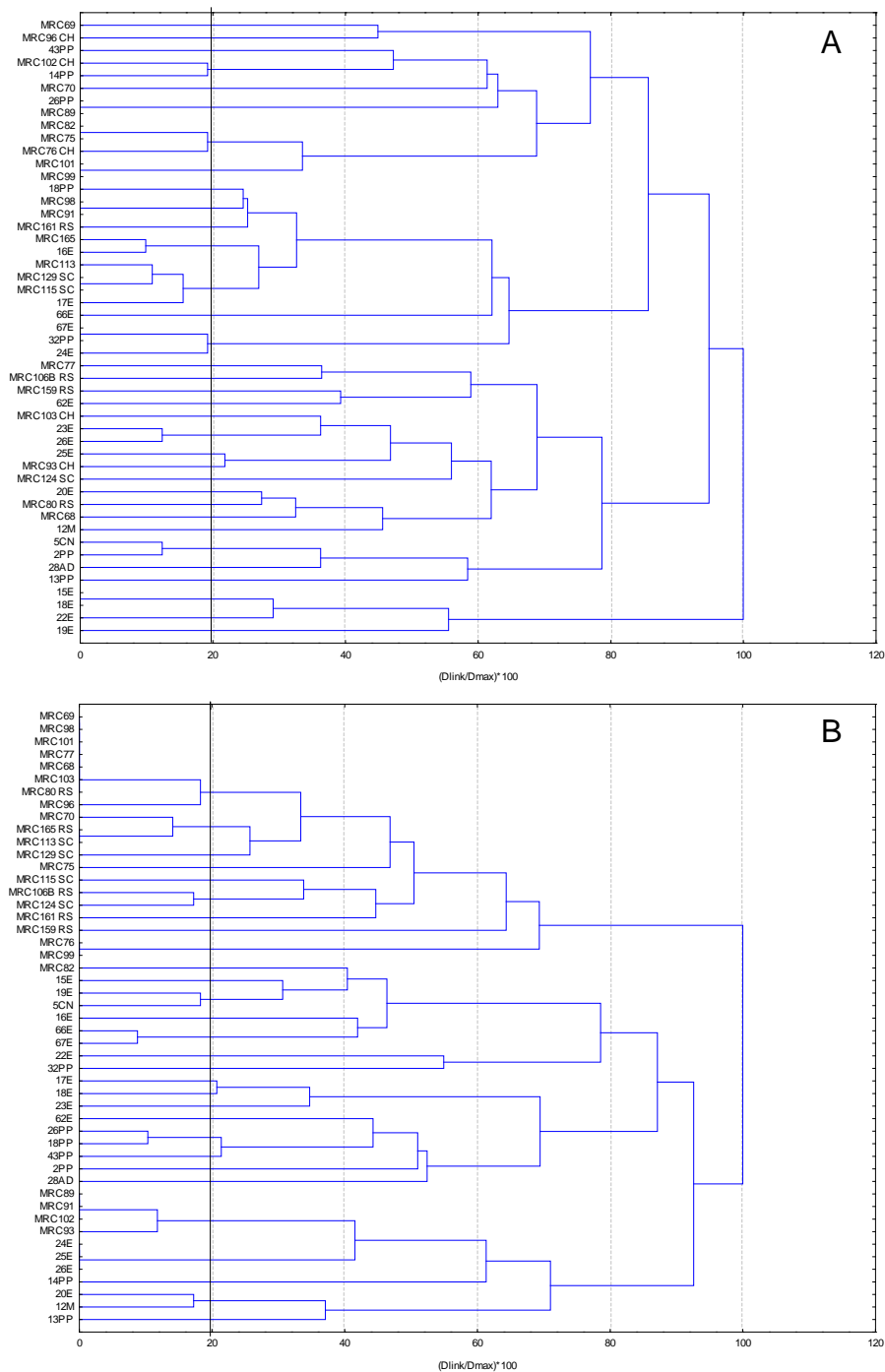


Figura 8. Comparação de dendrogramas usando o método UPGMA e correlação de Pearson, baseado em uma matriz binária de presença/ausência de bandas usando os *primers* M13 (A) e (GTG)₅ (B). O ponto de corte foi de 80% de similaridade para Pearson.

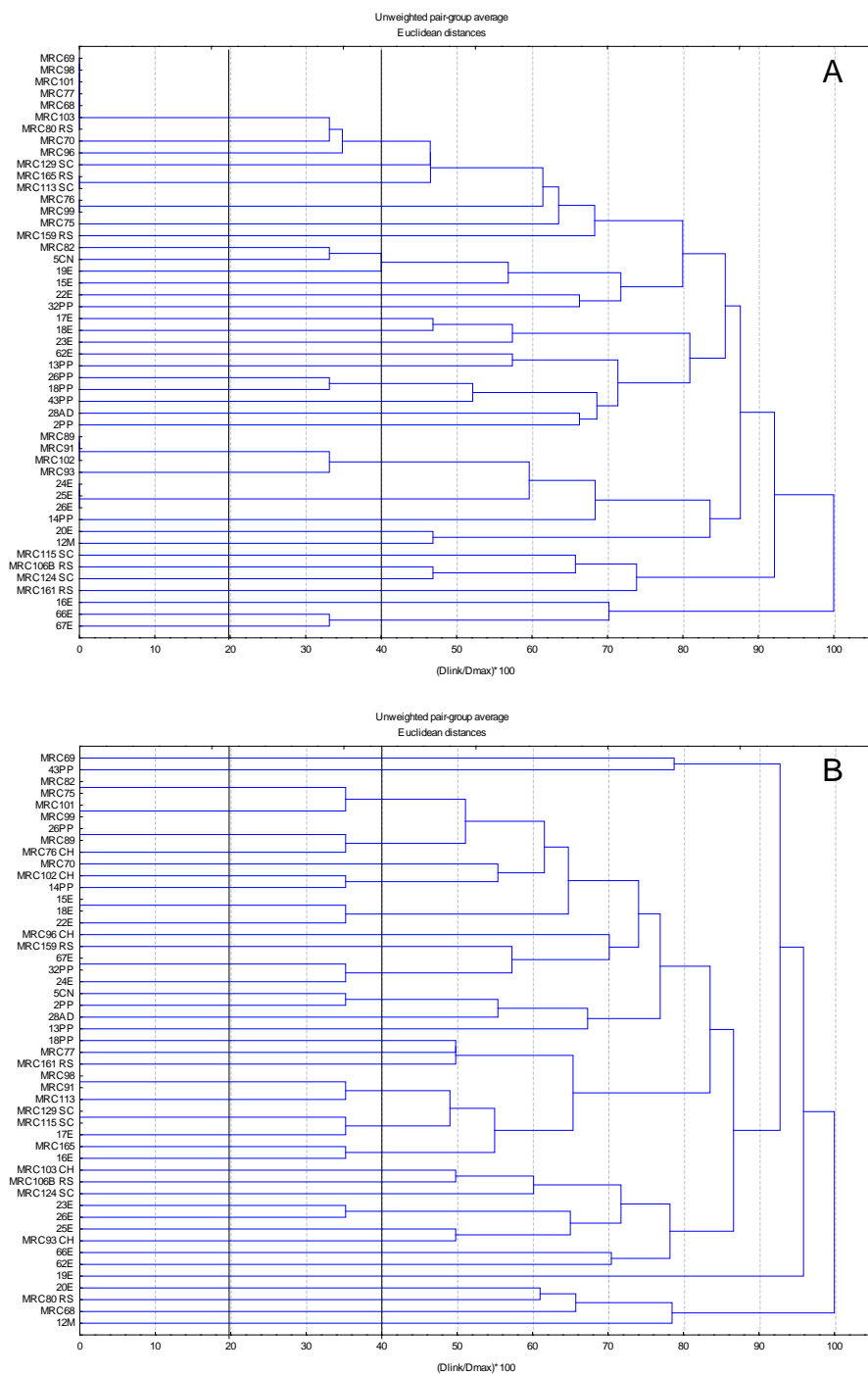


Figura 9. Comparação de dendrogramas usando o método UPGMA e distância euclidiana, baseado em uma matriz binária de presença/ausência de bandas usando os *primers* M13 (A) e $(GTG)_5$ (B). O ponto de corte foi de 60% de similaridade para Pearson.

Avaliação da técnica

Foram avaliadas várias estratégias para agrupar os perfis genéticos em *clusters* coerentes. Primeiro, foram construídos dendrogramas com as 113 leveduras isoladas de vinhos usando dois métodos de agrupamento baseados numa matriz binária de presença/ausência de bandas, UPGMA e método de Ward, mostrando diferenças entre os grupos de cepas (Figura 10). Porém, a alta variabilidade do método UPGMA usando o critério de agrupamento de 60% de similaridade permitiu separar 47 perfis a partir das 113 amostras. O método de Ward, usando o critério de 60% agrupou somente cinco perfis genéticos, portanto o critério foi mudado para 80%, onde se formaram 13 grupos de perfis. Assim, comparando os dois métodos, o primeiro não conseguiu agrupar os perfis genéticos, sendo muito sensível a qualquer variação na matriz, enquanto que o método de Ward incrementa a probabilidade de encontrar falsos positivos na hora da identificação por sequenciamento.

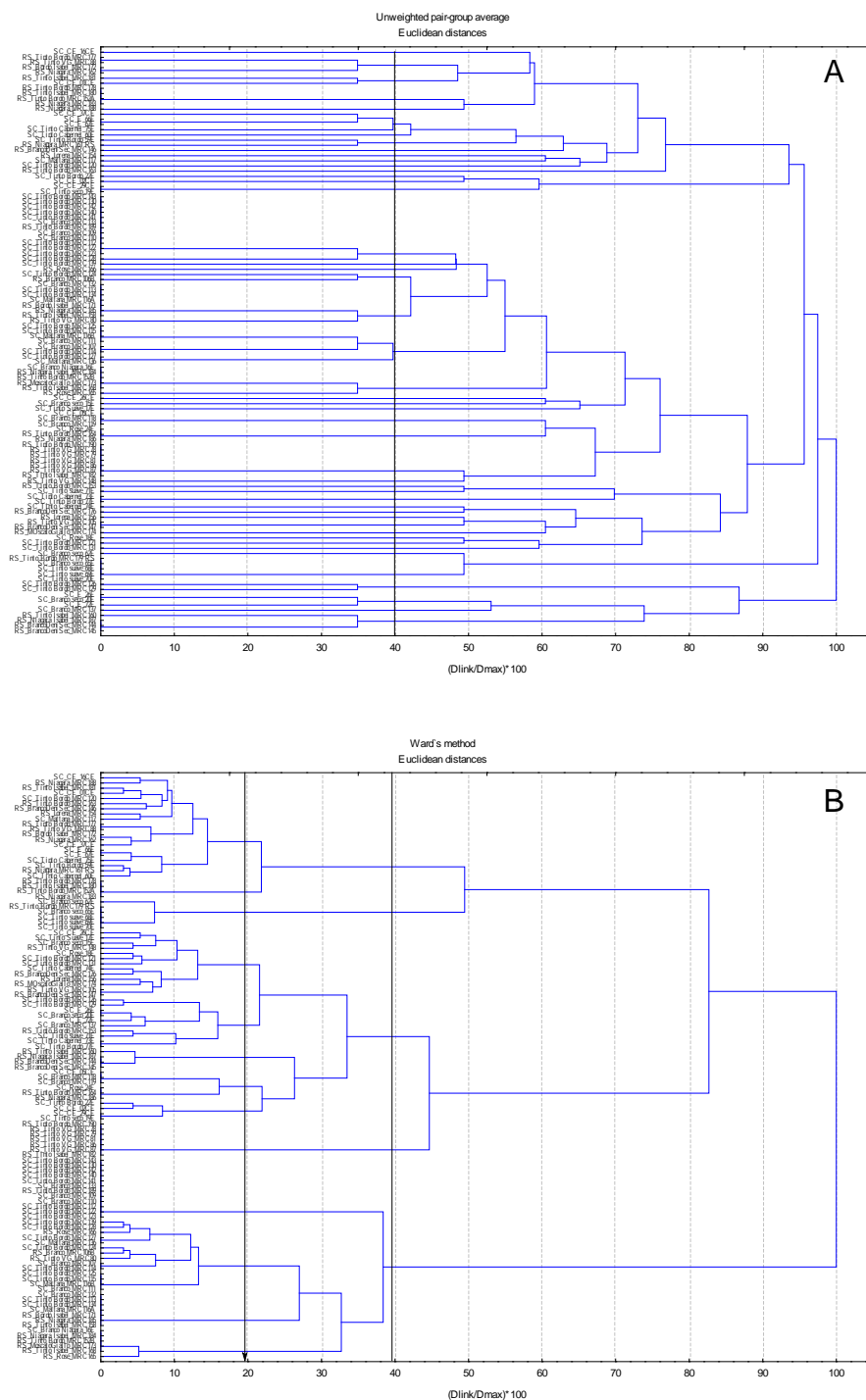


Figura 10. Dendrogramas obtidos usando o método UPGMA (A) e Ward (B) baseado em distâncias euclidianas a partir de 113 amostras de leveduras. O critério de agrupamento foi de 60% de similaridade para UPGMA e 80% para Ward.

Em consequência, foi avaliada outra estratégia para calcular as distâncias euclidianas, usando uma matriz quantitativa baseada no tamanho molecular das bandas. Esta abordagem, além de contar a presença ou ausência de bandas, proporciona a posição e distribuição do perfil, o que permite a melhor caracterização dos resultados. Além disso, a interface gráfica gerada permite separar espacialmente os grupos e fornece informação completa sobre divergência dos perfis e as variáveis testadas. Assim, o algoritmo QAPgrid separou 20 clusters correspondentes a 22 perfis genéticos detectados visualmente (Figura 11).

Várias cepas representativas de cada grupo foram sequenciadas no domínio D1/D2 do 26S rDNA e/ou na região ITS1-5.8S-ITS2 para a identificação. A identificação molecular das espécies e a sua associação com cada perfil de *fingerprinting* detectado são mostrados na Tabela 2.

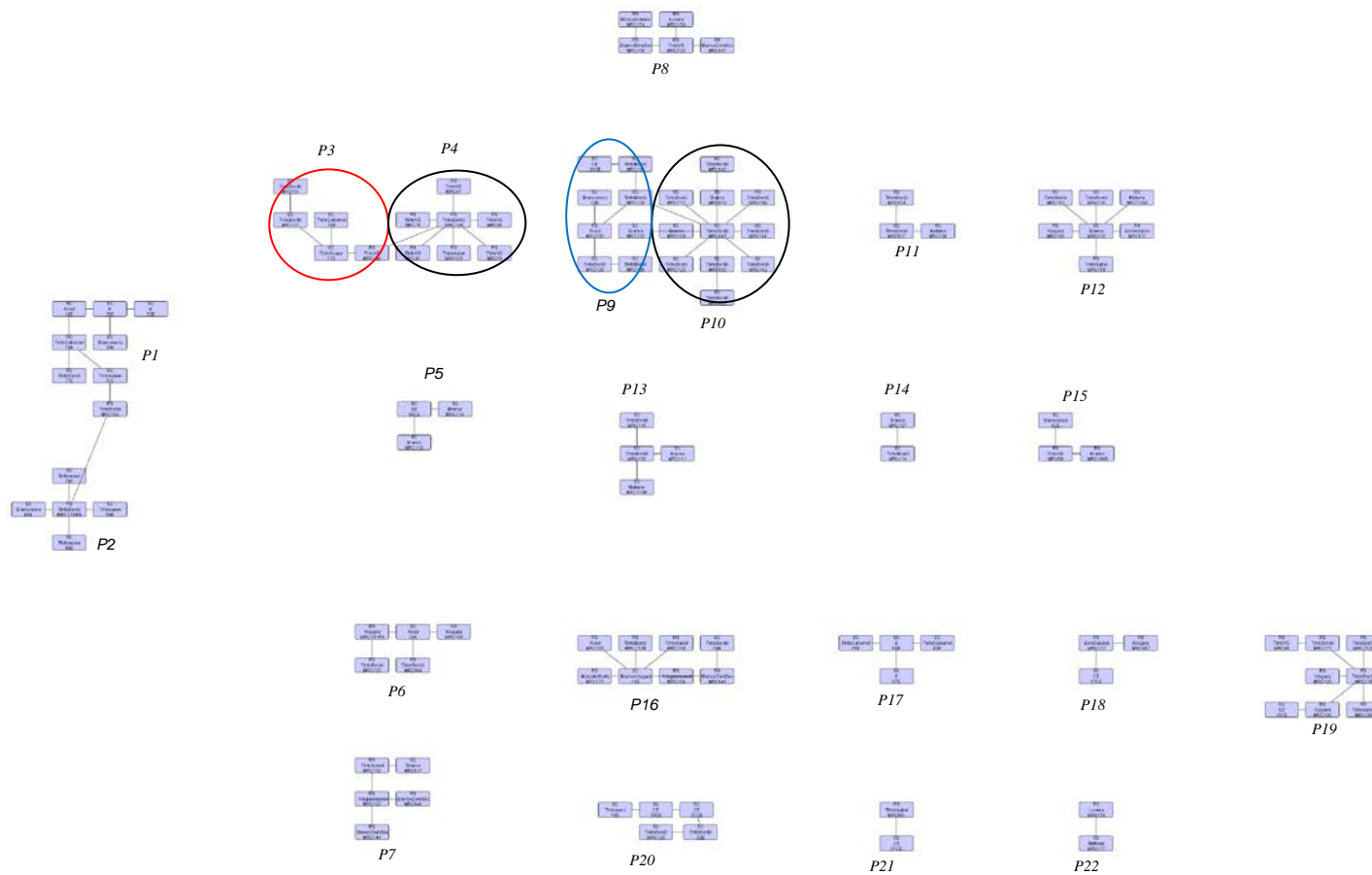


Figura 11. Cluster de perfis genéticos de vinhos do sul do Brasil usando o algoritmo QAPgrid. Os *clusters* foram obtidos a partir de uma matriz de dados quantitativo baseado no tamanho das bandas e usando distância euclidiana. Os clusters P3-P4 e P9-P10 foram separados de acordo com a detecção visual dos perfis genéticos.

Tabela 2. Identificação de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil e a sua associação com os perfis genéticos encontrados.

Código do perfil	Espécie	No. isolados sequenciados	Identidade máxima (%)
P1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	99
P2	<i>Candida magnoliae</i>	1	98
P3 (17E)	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	1	98
P3 (MRC148)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	99
P4, P17, P18, P19, P20, P21, P22	<i>Dekkera bruxellensis</i>	7	98-99
P5	<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	99
P9, P16	<i>Pichia membranifaciens</i>	6	99
P10, P11, P12, P13, P14, P15	<i>Pichia manshurica</i>	5	99
P18 (MRC162), P6 (MRC161)	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	2	99
P1 (18E)	<i>Candida zeylanoides</i>	1	99
P3, P6, P7, P8	Não identificados		
Total		26	

Em geral, as espécies mais abundantes se apresentaram em vários grupos. Assim, foram encontrados sete perfis genéticos para *Dekkera bruxellensis* e seis para *Pichia manshurica*, embora os géis de agarose somente permitissem a identificação visual de quatro genótipos em *D. bruxellensis*. A diferença entre a detecção visual e do algoritmo pode-se dever a diferenças sutis no tamanho molecular das bandas devido à baixa resolução do gel de agarose (6,43% de média de erro em tamanho das bandas).

Alguns *clusters* gerados pelo algoritmo agruparam isolados de perfis genéticos diferentes, posteriormente identificados como espécies diferentes por sequenciamento de DNA. Por exemplo, uma cepa (18E) agrupou no *cluster* de *S. cerevisiae* (P1), porém, foi identificada como *Candida zeylanoides*. Uma possível explicação foi o baixo número de bandas obtidas para esta cepa (o isolado 18E somente apresentou uma banda, o que reduz a resolução do algoritmo para separar os diferentes grupos genéticos). Este caso aconteceu também com as cepas 17E e MRC148 onde somente foram visualizadas uma e duas bandas, respectivamente. Neste sentido, os dois isolados foram agrupados no cluster P3, e foram identificados por sequenciamento, como *Torulaspota delbrueckii* e *Aureobasidium pullulans*, respectivamente. Também, um genótipo de *Pichia membranifaciens* (P9) agrupou junto com *P. manshurica* (P10), o que pode ser devido a sua proximidade filogenética (NAUMOV & NAMOVA, 2009). No entanto, o perfil de *Zygosaccharomyces bailii* (MRC162) foi muito semelhante com um dos perfis de *Dekkera bruxellensis* (P18), embora o número de bandas tenha sido aparentemente suficiente para inferir uma boa resolução do perfil genético de

ambas as espécies. Finalmente, quatro grupos ainda não foram identificados por sequenciamento.

DISCUSSÃO

A técnica MSP-PCR *Fingerprinting* baseada no *primer* (GTG)₅ foi avaliada para a caracterização de comunidades de leveduras de vinhos do Sul do Brasil. Este *primer* foi usado em outros trabalhos e mostrou confiabilidade para este propósito (LIECKFELDT *et al.*, 1993; BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996; TORRIANI *et al.*, 1999; SILVA-FILHO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2007). Porém, o uso de diferentes protocolos e a falta de uma base de dados padronizada não permitem o compartilhamento de dados entre os diferentes grupos de pesquisa. Atualmente somente existe disponível uma base de dados com perfis moleculares (www.yeast-id.com) com o objetivo de identificar leveduras associadas a alimentos e bebidas fermentadas, usando a técnica PCR-RFLPs com pelo menos três enzimas de restrição (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 1999). Porém, as dificuldades para identificação de algumas espécies de leveduras levaram à ideia de desenvolver novas metodologias e ferramentas para a sua identificação. Neste sentido, foi proposto o desenvolvimento de uma base de dados de perfis genéticos de leveduras associadas a vinhos, baseada num protocolo simples e otimizado, que possibilite analisar uma quantidade grande de amostras com baixo custo, em curto tempo, com reprodutibilidade e que possa ser facilmente alimentada com novos dados.

O *primer* (GTG)₅ foi escolhido entre várias alternativas de oligonucleotídeos para otimizar a técnica MSP-PCR *Fingerprinting*. SILVA-FILHO *et al.* (2005) recomendou este *primer* para monitorar populações de leveduras em

fermentações de bioetanol e selecionar cepas selvagens como *starter*. Grupos de espécies participantes na fermentação também foram avaliados usando vários *primers* e mostraram perfis similares usando M13 e (GACA)₄ e maior variabilidade usando os *primers* (GAC)₅ e (GTG)₅ para cepas Não-*Saccharomyces* (BALEIRAS-COUTO *et al.*, 1996; URZI *et al.*, 1999; CARUSO *et al.*, 2002, BASILIO *et al.*, 2008), além de conseguir diferenciar 16 cepas de *S. cerevisiae* (LOUREIRO, 2000), mas as condições de amplificação foram diferentes das deste trabalho.

A reprodutibilidade deste *primer* foi avaliada por BRITO *et al.* (2007) em espécies do grupo *Saccharomyces sensu stricto* e foi confirmada neste estudo usando três cepas, sendo uma delas identificada como *Saccharomyces cerevisiae*. A variabilidade na intensidade de algumas bandas entre réplicas do mesmo isolado foi observada nos resultados e por este motivo não foi usada essa variável como parte da análise de *clustering*. No entanto, SILVA-FILHO *et al.* (2005) sugeriram que a identificação de duas ou mais amostras com o mesmo padrão de amplificação (número e intensidade de bandas) poderia indicar origem clonal de cepas de origem geográficas diferentes.

PAN *et al.* (2010) sugeriram que a fonte de variabilidade em trabalhos de análise de diversidade microbiológica usando biologia molecular envolve principalmente o método de extração de DNA e os reagentes usados na PCR. Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade da metodologia proposta simulando diferentes condições de laboratório, dois métodos de extração de DNA genômico

e duas marcas de Taq polimerase, além de dois diferentes termocicladores, foram aplicados. Os resultados mostraram variação na intensidade das bandas e, como consequência, no seu número, mas não na distribuição do padrão de bandas amplificadas. Isso permitiu continuar a construir a base de dados usando o algoritmo aplicado neste trabalho. Consequentemente, cepas da mesma espécie mostraram perfis genéticos definidos caracterizados por bandas do mesmo tamanho, diferindo de outras espécies em pelo menos uma banda intensa.

A Figura 11 mostrou 20 *clusters* subdivididos em 22 perfis genéticos (por detecção visual dos géis) e foram identificados até nível de espécie, sem ambiguidades, representantes de 15 *clusters* de leveduras associadas à fermentação do vinho no sul do Brasil (ver Apêndice). Por outro lado, o algoritmo usado foi capaz de diferenciar vários *clusters* dentro da mesma espécie com uma distribuição não aleatória e dependente da similaridade genética, como sugeriram MARTINEZ *et al.* (2004) e VRANCKEN *et al.* (2010), mostrando alta sensibilidade à variação genética apesar da porcentagem de erro nos tamanhos de bandas devido à resolução do gel de agarose (média de erro de 6,43%). Cabe ressaltar que o algoritmo ainda não leva em conta este erro nas análises, separando somente os agrupamentos pelas diferenças entre tamanhos de bandas. De acordo com o anterior, se sugere fazer o agrupamento molecular das cepas usando o *primer* (GTG)₅, seguido do sequenciamento de 10% dos isolados em cada *cluster* seja usado como ferramenta para identificar e monitorar populações de leveduras participantes na produção de vinho.

A maioria da fermentação do vinho fino no sul do Brasil adiciona no mosto cepas comerciais de *S. cerevisiae*, e isso pode explicar a baixa variabilidade encontrada de genótipos dessa espécie. Alternativamente, a metodologia usada neste trabalho pode não ser suficientemente sensível para reconhecer a variabilidade genotípica dentro de isolados de *S. cerevisiae*, embora tenha sido capaz de diferenciar genótipos em outras espécies. Como *S. cerevisiae* está sub-representado nos isolados, provavelmente a variabilidade de genótipos dessa espécie não foi totalmente avaliada.

Dekkera bruxellensis apresentou sete genótipos claramente separados, e vale a pena ressaltar a grande diversidade genética que caracterizou esta espécie como contaminante de vinhos no sul do Brasil, principalmente em vinhos produzidos colonialmente (Apêndice). Seis dos sete genótipos agruparam proximamente, mas o genótipo P4 é geneticamente diferente dos outros, o que pode ser devido à falta de bandas superiores no padrão de amplificação quando comparados com outros genótipos da mesma espécie. Uma cepa identificada como *Zygosaccharomyces bailii* (MRC162) teve o mesmo perfil genético do cluster *D. bruxellensis* P18 (Figura 11), sendo falso positivo da técnica. A técnica MSP-PCR *Fingerprinting* resulta em padrão de bandas no gel que correlaciona o tamanho molecular das bandas. É possível que bandas com sequências diferentes tenham o mesmo padrão de mobilidade num gel de agarose, levando a uma identificação falsa positiva. Como estratégia alternativa, usou-se o *primer* M13 nas mesmas condições de amplificação e eletroforese e a separação das duas espécies foi conseguida neste *cluster*. Portanto, o uso do *primer* (GTG)₅ e

do M13 daria a clara separação das duas espécies neste grupo, como sugerido em outros trabalhos (BRITO *et al.*, 2007). Este resultado é pouco representativo da diversidade genética de *Z. bailii*, já que foram encontrados anteriormente quatro perfis genéticos nesta espécie (MARTORELL *et al.*, 2005b) usando a mesma técnica (protocolo diferente) e o mesmo *primer* (GTG)₅.

Os clusters que compreendem *P. membranifaciens* e *P. manshurica* foram também diversos genotípicamente. Depois de estudos moleculares extensivos, estas duas espécies são as únicas remanescentes do complexo de espécies *P. membranifaciens*, ambas presentes em fermentações naturais (NAUMOV & NAUMOVA, 2009; KURTZMAN *et al.*, 2011). É interessante notar que ambos os genótipos de *P. membranifaciens* e seis genótipos de *P. manshurica* encontrados no presente trabalho agruparam muito próximo, com dois deles (*P. membranifaciens* P9 e *P. manshurica* P16) misturados. Isso ressalta a dificuldade para resolver estas espécies, fato que pode ser responsável pela identificação de isolados de *P. manshurica* como *P. membranifaciens* (KURTZMAN *et al.*, 2011). Ambas as espécies são consideradas como potenciais microrganismos contaminantes de bebidas e alimentos.

Foram analisadas duas variáveis a correlacionar com as amostras: procedência geográfica e tipo de vinho empregado, porém os agrupamentos obtidos não tiveram nenhum tipo de associação com a procedência e o tipo de vinho analisado. Este resultado concorda com outros trabalhos analisando variabilidade interespecífica de leveduras em vinhos usando outras técnicas de

agrupamento, como Eletroforese em campo pulsado (MARTINEZ *et al.*, 2004) ou PCR-RFLPs (TORIJA *et al.*, 2001). No entanto, NAUMOVA *et al.* (2011) encontraram associação da origem geográfica com a variabilidade intraespecífica de isolados de *S. cerevisiae* em vinhos usando o *primer* (GTG)₅. Apesar de não ser encontrada correlação no presente trabalho, quatro dos seis genótipos de *P. manshurica* foram isolados exclusivamente em Santa Catarina.

A diversidade de leveduras encontrada nos vinhos do sul do Brasil mostra alta presença de leveduras denominadas Não-*Saccharomyces* (NS) e baixa abundância de leveduras do gênero *Saccharomyces*. As espécies encontradas não pertencentes à *Saccharomyces* concordam com outros trabalhos reportados na literatura e mostram a presença de leveduras selvagens comumente encontradas nos processos de fermentação de bebidas, como *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspota*, *Pichia* ou *Dekkera bruxellensis* (FLEET *et al.*, 2003; BALEIRAS-COUTO *et al.*, 2012; ERHU *et al.*, 2012; ESPIRITO SANTO *et al.*, 2012) e pouca dominância de *Saccharomyces cerevisiae*, que seria usada geralmente como *starter* na região. FLEET (2008) reportou um aumento de casos na literatura de espécies não-*Saccharomyces*, encontrando isolados de vinho de espécies como *Hanseniaspora*, *Candida* e *Kluyveromyces* com tolerância ao etanol similar a *S. cerevisiae* (MILLS *et al.*, 2002; PINA *et al.*, 2004; XUFRE *et al.*, 2006; NISIOTOU *et al.*, 2007). Além do etanol, outras variáveis como a temperatura de fermentação, conteúdo de oxigênio dissolvido, fatores *killer*, moléculas do tipo “quorum-sensing” e densidade espacial poderiam afetar a interação competitiva entre espécies de leveduras selvagens e cepas

fermentativas do vinho (YAP *et al.*, 2000; FLEET, 2003; NISSEN *et al.*, 2003; HOGAN, 2006; PEREZ-NEVADO *et al.*, 2006). Assim, pode-se inferir que leveduras selvagens próprias da região poderiam estar competindo na fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* introduzidas como *starter* e dominando a comunidade no produto final, até mesmo agindo como organismos contaminantes. Não obstante, foi demonstrado e é amplamente aceito que o crescimento leveduras denominadas Não-*Saccharomyces* influencia o perfil aromático do vinho (LEMA *et al.*, 1996), dado a suas características espécie-específicas, sendo produtoras de metabólitos secundários e podendo contribuir positiva ou negativamente para as propriedades organolépticas do produto final (ROMANO *et al.*, 1998). Mais pesquisas são necessárias para entender a diversidade e a dinâmica das comunidades de leveduras na fermentação dos vinhos no Sul do Brasil.

CONCLUSÕES

A técnica MSP-PCR *Fingerprinting*, usando os oligonucleotídeos iniciadores (GTG)₅ e M13, foi padronizada para analisar perfis moleculares de leveduras associadas a vinhos do sul do Brasil, sendo escolhido para as análises de *clustering* o *primer* (GTG)₅ por melhor resolução e separação visual dos perfis. A análise de agrupamento baseado em distâncias euclidianas e no algoritmo QAPgrid mostrou 20 *clusters* com 22 perfis genéticos detectados visualmente, identificando até nível de espécie representantes de 15 *clusters* sem ambiguidade. Além disso, os *clusters* pertencentes a genótipos da mesma espécie foram agrupados proximamente, mostrando uma associação não aleatória e dependente da similaridade genética. Não foi encontrada relação entre a procedência ou tipo de vinho analisado com os *clusters* gerados de acordo com os tamanhos das bandas, exceto para *P. manshurica*, onde quatro genótipos foram encontrados exclusivamente em Santa Catarina. Finalmente, a diversidade de leveduras encontrada em vinhos coloniais e finos do sul do Brasil está de acordo com outros estudos realizados em vinhos.

PERSPECTIVAS

- Identificação até nível de espécie das leveduras dos quatro *clusters* ainda não sequenciados poderá fornecer informação importante sobre genótipos não caracterizados ainda e/ou espécies não encontradas até agora.
- Melhora na resolução de alguns genótipos que apresentaram só uma ou duas bandas, como no caso de *T. delbrueckii* e *C. zeylanoides*.
- Alimentação da base de dados com maior número de amostras pode diminuir o erro encontrado na análise de agrupamento neste trabalho.
- Ampliação da análise de cepas de leveduras associadas a outras bebidas fermentadas artesanais permitirá analisar a viabilidade da técnica para aplicação da metodologia em outros substratos.

De acordo com os resultados apresentados, a associação encontrada entre espécies de leveduras e perfis genéticos específicos podem facilitar o desenvolvimento de uma ferramenta de reconhecimento rápido de espécies de leveduras associadas a vinhos. Isto pode ser usado para o monitoramento da dinâmica de leveduras selvagens e cepas *starter*, ajudando na avaliação da qualidade do vinho. Os perfis obtidos por MSP-PCR *Fingerprinting* podem ser usados como insumo para construir uma base de dados para identificação e genotipagem de leveduras, que pode ser compartilhada entre pesquisadores de leveduras de vinhos. Esta base de dados poderia ser potencialmente alimentada com novos dados, desde que as condições de amplificação e eletroforese sejam mantidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M.J., RODRÍGUEZ, M., SÁNCHEZ, M., ARANDA, E., CÓRDOBA, J.J.
DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology* 107, 48-58. 2006.
- ANDRIGHETTO C , PSOMAS E , TZANETAKIS N , SUZZI G , LOMBARDI A.
Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters of Applied Microbiology*, 30(1):5-9. 2000.
- ARIAS, C.R., J.K. BURNS, L.M. FRIEDRICH, R.M. GOODRICH & M.E. PARISH.
Yeast species associated with Orange Juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1955-1961. 2002.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., (eds). *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th edition. New York: Wiley. 1999.
- BALEIRAS COUTO, M. M., VAN DER VOSSSEN, J. M., HOFSTRA, H., & HUIS IN'T VELD, J. H. RAPD analysis: A rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 249-260. 1994.
- BALEIRAS COUTO, M.M., VOGELS, J.T.W.E., HOFSTRA, H., HUIS IN'T VELD, J.H.J. & VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: two identification techniques for food-bourne yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 525-535. 1995.

- BALEIRAS COUTO, M.M., EIJSMA, B., HOFSTRA, H., HUIS IN'T VELD, J.H.J., VAN DER VOSSSEN, J.M.B.M., Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 41 – 46. 1996.
- BALEIRAS-COUTO, M.M., GOMES, A.S., CASAL, M., DUARTE, F.L. Survey of yeast diversity during wine bottling processes using restriction analysis of 26S ribosomal DNA (rDNA). *Australian Journal of Grape and Wine Research* 18, 39–42. 2012.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. & YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 2nd edition. Cambridge University Press. Cambridge, England. 1990.
- BARNETT, J.A., The taxonomy of the genus *Saccharomyces* Meyen ex Reess: a short review for nontaxonomists. *Yeast* 8, 1-23. 1992.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. & YARROW, D., *Yeasts: Characteristics and Identification* (3rd edition.). Cambridge University Press, Cambridge. 2000.
- BASÍLIO, A.C.M., DE ARAÚJO, P.R.L., DE MORAIS, J.O.F., DA SILVA FILHO, E.A., DE MORAIS, M.A., SIMÕES, D.A. Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. *Food Microbiology* 27 (2), 205–209. 2008.
- BEJARANO, J. *La derrota de un vicio; origen e historia de la chicha*. Editorial Iqueima, Colombia, 144p. 1950.
- BELLOCH, C., BARRIO, E., GARCÍA, M.D. & QUEROL, A. Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of

the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal transcribed spacers. *Systematics of Applied Microbiology*, 21: 266-273. 1998.

BLONDIN, B., & VEZINHET, F. Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en électrophorèse en champ pulsé. *Revue française d'oenologie*, 115, 7-11. 1988.

BOYANTON, B.L., LUNA, R.A., FASCIANO, L.R., MENNE, K.G. & VERSALOVIC, J. DNA Pyrosequencing–Based Identification of Pathogenic *Candida* Species by Using the Internal Transcribed Spacer 2 Region. *Archives of Pathology Lab Medical*, 132: 667-674. 2008.

BRADBURY, J.E., RICHARDS, K.D., NIEDERER, H.A., SOON, A., LEE, P., DUNBAR, R. & GARDNER, R.C., A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 3, 1-12. 2005.

BRITO, S.K., BASILIO, A.C.M., RAMOS, B.T., SIMÕES, D.A., DA SILVA-FILHO, E.A., DE MORAIS JR, M.A. Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 1613–1620. 2007.

CANTEROS, C.E., IACHINI, R.H., RIVAS, M.C., VACCARO, O., MADARIAGA, J., GALARZA, R., SNAIDERMAN, L., MARTÍNEZ, M., PALADINO, M., CICUTTIN, G., VARELA, E., ALCOBA, E., ZUIANI, F., SAHAZA, J.H., TAYLOR, M.L., DAVEL, G. Primer aislamiento de *Histoplasma capsulatum* de murciélago urbano *Eumops bonariensis*. *Revista Argentina de Microbiología*, 37, 46-56. 2005.

- CAPECE, A., SALZANO, G., ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* 84, 33–39. 2003.
- CAPPELLO, M.S., BLEVE, G., GRIECO, F., DELLAGLIO, F. & ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1274-1280. 2004.
- CARUSO, M., CAPECE, A., SALZANO, G., ROMANO, P. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Letters in Applied Microbiology* 34, 323–328. 2002.
- CASTILHO, C.J.C., SATO, H.H., PASTORE, G.M. & PARK, Y.K. Detection of killer factor producing yeasts isolated from the alcoholic beverages "chicha" and "masato". *Revista de Microbiologia*, 21: 171-173. 1990.
- CIANI, M., PICCIOTTI, G. The growth kinetics and fermentation behaviour of some non-*Saccharomyces* yeast associated with wine-making. *Biotechnology Letters* 17, 1247 – 1250. 1995.
- CONSTANTÍN, M., REGUANT, C., POBLET, M., ZAMORA, F., MAS, A., & GUILLAMÓN, J. M. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 41, 169-175. 1998.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D., Valero, E. Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries, *International Journal of Food Microbiology*, 145, 132–139. 2011.

- DEGRÉ, R., THOMAS, D. Y., ASH, J., MAILHIOT, K., MORIN, A., & DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 309-315. 1989.
- DELLAGLIO, F., ZAPPAROLI, G., MALACRINO, P., SUZZI, G., TORRIANI, S. *Saccharomyces bayanus var uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. *Annals of Microbiology* 53, 411–425. 2003.
- DE BARROS, M., SODEN, A., MARTENS, A.L., HENSCHKE, P.A., & LANGRIDGE, P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48: 279–286. 1998.
- DE BARROS LOPES, M., RAINIERI, S., HENSCHKE, P. A., & LONGRIDGE, P. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 915-924. 1999.
- DE MELO, L.M.R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2010. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/prodvit2010.pdf>>. Acesso em 12 de julho de 2012. 2010.
- DE SOUZA, A.T., BASÍLIO, A.C.M., RESENDE, A.D.M., BRASILEIRO, B.T.V., DA SILVA-FILHO, E.A., DE MORAIS, J.O.F., SIMÕES, D.A., DE MORAIS JR, M.A. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 102 (2), 538–547. 2007.
- DUMONT, A., & DULAU, L. The role of yeasts in the formation of wine flavours. In ALLEN, M., LESKE, P. & BALDWIN, G. (Eds.), *Advances in juice clarification and yeast inoculation: proceedings in a seminar, 15 August 1996, Melbourne*,

- Victoria (pp. 14-16). Adelaide S.A.: Australian Society of Viticulture and Oenology. 1997.
- ECHEVERRIGARAY, S.; TORESAN-PAESE, S.; CARRAU, J. L RAPD marker polymorphism among commercial winery yeast strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 143-146, 2000.
- ERHU, L., LIU, C., LIU, Y., Evaluation of Yeast Diversity During Wine Fermentations with Direct Inoculation and pied de cuve Method at an Industrial Scale. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(7), 960–966. 2012.
- ESPÍRITO SANTO, E., GALEGO, L., GONÇALVES, T., QUINTAS, C. Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) fruits' fermentations. *Food Research International* 47, 45–50. 2012.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., MANZANARES, P., RAMÓN, D., QUEROL, A. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial wine-making. *International Microbiology* 1, 143 – 148. 1998.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., BELLOCH, C., URUBURU, F., QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematics Bacteriology* 49, 329-337. 1999.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., PERIS-TORÁN, M.J., GARCÍA-MAIQUEZ, E., URUBURU, F. & QUEROL, A. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 67(5): 2056-2061. 2001.

- ESTEVE-ZARZOSO, B., ZORMAN, T., BELLOCH, C. & QUEROL, A. Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosacccharomyces*. *Systematics of Applied Microbiology*, 26: 404-411. 2003.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, T., ESTEVE-ZARZOSO, B., QUEROL, A., & BARRIO, E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78: 87-97. 2000.
- FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., MATRORELL, P., DE LLANOS, R. & QUEROL, A. Molecular Methods to identify and Characterize Yeasts in Foods and Beverages. In: QUEROL A. & FLEET, G.H., 2006 (eds). *The Yeast Handbook- Yeasts in Food and Beverages*. Springer-Verlag, Germany. pp.55-82. 2006.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., LLOPIS, S., QUEROL, A., BARRIO, E. Molecular identification and characterization of wine yeasts. In: CARRASCOSA, A.V., MUÑOZ, R., GONZÁLEZ, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*, 1st ed. Elsevier, Academic Press, London,UK, pp. 111–141. 2011.
- FLEET, G.H., HEARD, G.M. Yeast growth during fermentation. In: Fleet G.H., Ed., *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 27-55. 1993.
- FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystem. *International Journal of Food Microbiology* 50, 101 – 117. 1999.
- FLEET, G.H. Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11 – 22. 2003.

- FLEET, G.H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 1-6. 2007.
- FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979–995. 2008.
- FUGELSANG, K.C., EDWARDS, C.G. *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd Ed. New York: Springer. 2007.
- GADANHO, M. SAMPAIO, J.P. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Research* 2, 47-58. 2002.
- GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31-36. 2001.
- GREUTER, W., BARRIE, F.R., BURDET, H.M., CHARLONER, W.G. DEMOULIN, V., HAWKSWORTH, D.L., JORGENSON P.M., NICHOLSON, D.H., SILVA, P.C., TREHANE, P. & MCNEIL, J. *International Code of Botanical Nomenclature*. Koeltz Scientific Books, Königstein. 1994.
- GUAMÁN-BURNEO, C., CARVAJAL-BARRIGA, J. Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas Scientiarum* 14(2-3), 187-197. 2009.
- GUILLAMÓN, J.M., E. BARRIO & A. QUEROL. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: correspondence between genetic distances and geographic or ecological origins. *Systematics of Applied Microbiology*, 19: 122-132. 1996.
- GUILLAMÓN, J. M., SABATE, J., BARRIO, E., CANO, J., & QUEROL, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal

- internal transcribed spacer ITS region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392. 1998.
- HENSCHKE, P.A., Yeast strains available for winemaking. 2004/2005. Australian Wine Research Institute, Technical Review, 153, 8-24. 2004.
- HOGAN, D.A. Quorum sensing: alcohols in a social situation. *Current Biology* 16, R457–R458. 2006.
- INOSTROZA-PONTA, M., MENDES, A., BERRETTA, R., MOSCATO, P. An integrated QAP-based approach to visualize patterns of gene expression similarity. In *Proceedings of the 3rd Australian conference on Progress in artificial life (ACAL'07)*, Marcus Randall, Hussein A. Abbass, and Janet Wiles (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 156-167. 2007.
- INOSTROZA-PONTA, M., BERRETTA, R., MOSCATO, P. QAPgrid: A Two Level QAP-Based Approach for Large-Scale Data Analysis and Visualization. *PLoS ONE* 6(1), e14468. 2011.
- KHAN, W., Geographical distribution, characterisation and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from South African vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape. Thesis. Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa. 1999.
- KURTZMAN, C.P., ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371. 1998.
- KURTZMAN, C.P. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of Saccharomycetaceae and the proposal

- of the new genera *Lachancea*, *Naumovia*, *Vanderwaltzzyma* and *Zygotorulaspora*. FEMS Yeast Res. 4, 233-245. 2003.
- KURTZMAN C.P., FELL J.W. & BOEKHOUT T. The Yeasts, a Taxonomic Study, 5a edição, Ed. Elsevier, New York, 2362 pp. 2011.
- LACHANCE, M.A. Yeast communities in a natural tequila fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek, 68(2): 151-160. 1995.
- LAMBRECHTS, M.G., PRETORIUS, I.S. Yeast and its importance to Wine Aroma – A review. South African Journal of Enology and Viticulture 21, 97-129. 2000.
- LAVALLEE, F., SALVAS, Y., LAMY, S., THOMAS, D.Y., DEGRE, R. & DULAU, L. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. American Journal of Enology and Viticulture, 46, 86-91. 1994.
- LE JEUNE, C., ERNY, C., DEMUYTER, C., & LOLLIER, M. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. Food Microbiology, 23, 709-716. 2006.
- LEMA, C., GARCIA-JARES, C., ORRIOLS, I., ANGULO, L. Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. American Journal of Enology and Viticulture. 47, 206– 216. 1996.
- LIBKIND, D. Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. Revista Argentina de Microbiología 39, 133-137. 2007.

- LIECKFELDT, E., MEYER, W., & BÖRN, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology* 33, 413-426. 1993.
- LOUREIRO, V. Spoilage yeasts in foods and beverages: Characterisation and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International* 33 (3-4), 247-256. 2000.
- LÓPEZ, C. A., RODRÍGUEZ, M. E., SANGORRÍN, M., QUEROL, A., & CABALLERO, A. C. Patagonia wines: Implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 139-149. 2007.
- J. MCNEILL, F. R. BARRIE, H. M. BURDET, V. DEMOULIN, D. L. HAWKSWORTH, K. MARHOLD, D. H. NICOLSON, J. PRADO, P. C. SILVA, J. E. SKOG, J. H. WIERSEMA & N. J. TURLAND, (Editors & Compilers): *International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code) adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005.* 568P. 2007.
- MAQUEDA, M., ZAMORA, E., RODRÍGUEZ-COUSIÑO, N., RAMÍREZ, M. Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology* 27, 205–209. 2010.
- MARTINEZ, C., GAC, S., LAVIN, A., GANGA, M. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *Journal of Applied Microbiology* 96, 1161–1168. 2004.

- MARTORELL, P., QUEROL, A. & FERNANDEZ-ESPINAR, M. T. Rapid Identification and Enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Wine by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 6823–6830. 2005a.
- MARTORELL, P., FERNANDEZ-ESPINAR, M.T., QUEROL, A. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology* 101, 293– 302. 2005b.
- MASNEUF-POMAREDE, I., LE JEUNEB, C., DURRENSC, P., LOLLIERB, M., AIGLED, M., & DUBOURDIEUE, D. Molecular typing of wine yeast strains *Saccharomyces bayanus var. uvarum* using microsatellite markers. *Systematic and Applied Microbiology*, 30: 75–82. 2007.
- MEYER, W., MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. *Electrophoresis*, 16(9), 1648-56. 1995.
- MILLS, D.A., JOHANNSEN, E.A., COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in Botrytis – affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4884–4892. 2002.
- MOHAPATRA, B.R., BROERSMA, K., MAZUMDER, A. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 245–252. 2008.

- MURAT, M.L., MASNEUF, I., DARRIET, P., LAVIGNE, V., TOMINAGA, T. & DUBOURDIEU, D. Effect of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon Blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 136 - 139. 2001.
- NADAL, D., CARRO, D., FERNANDEZ-LARREA, J., & PIÑA, B. Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 1944-1950. 1999.
- NAUMOV, G.I., NAUMOVA, E.S. Chromosomal Differentiation of the Sibling Species *Pichia membranifaciens* and *Pichia manshurica*. *Microbiology* 78, 214-217. 2009.
- NAUMOVA, E.S., KORSHUNOVA, I.V., JESPERSEN, L., NAUMOV, G.I. Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research* 1531, 1-8. 2003.
- NAUMOVA, E.S., NAUMOV, G.I., MICHAILOVA, Y.V., MARTYNENKO, N.N., MASNEUF-POMAREDE, I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus var. uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes. *Research in Microbiology* 162, 204-213. 2011.
- NESS, F., LAVALLE´E, F., DUBORDIEU, D., AIGLE, M., & DULAU, L. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of Sciences of Food and Agriculture*, 62, 89-94. 1993.
- NISIOTOU, A.A. & GIBSON, G.R., Isolation of culturable yeasts from market wines and evaluation of the 5.8-ITS rDNA sequence analysis for identification purposes. *Letters of Applied Microbiology*, 41, 454-463. 2005.

- NISIOTOU, A.A., SPIROPOULOS, A.E. NYCHAS, G.J.E. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6705–6713. 2007.
- NISSEN, P., NIELSEN, D. ARNEBORG, N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non- *Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast* 20, 331–341. 2003.
- NYKANEN, L. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(1), 84-96, 1986.
- O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, pp. 225–233. Edited by D. R. REYNOLDS & J. W. TAYLOR. Wallingford, UK: CAB International. 1993.
- OSORIO-CADAVID, E., RAMÍREZ, M., LÓPEZ, W.A., MAMBUSCAY, L.A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11(1), 125-131. 2009.
- PAN, Y., BODROSSY, L., FRENZEL, P., HESTNES, A.G., KRAUSE, S., LÜKE, C., MEIMA-FRANKE, M., SILJANEN, H., SVENNING, M.M., BODELIER, P.L. Impacts of inter- and intralaboratory variations on the reproducibility of microbial community analyses. *Applied Environmental Microbiology* 76(22), 7451-7458. 2010.
- PEREZ-NEVADO, F., ALBERGARIA, H., HOGG, T. GIRIO, F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentation with

- Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology 108, 336–345. 2006.
- PINA, C., SANTOS, C., COUTO, J.A., HOGG, T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*-influence of different culture conditions. Food Microbiology 21, 439–447. 2004.
- PISKUR, J., MOZINA, S.S., STENDERUP, J. & PEDERSEN, M.B. A Mitochondrial Molecular Marker, ori-rep-tra, for Differentiation of Yeast Species. Applied and Environmental Microbiology, 61(7): 2780–2782. 1995.
- PÖCHE, H., PETERS, C., WROBEL, G., SCHNEIDER, V., EPPLEN, J.T. Determining consanguinity by oligonucleotide fingerprinting with (GTG)₅/(CAC)₅. Electrophoresis, 12 (6), 397–402. 1991.
- PRAKITCHAIWATTANA C.J., FLEET, G.H. & HEARD, G.M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Research, 4: 865–877. 2004.
- PRAMATEFTAKI, P.V., LANARIDIS, P., TYPAS, M.A. Molecular identification of wine yeast at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. Journal of Applied Microbiology, 89, 236–248. 2000.
- PRETORIUS, I.S., VAN DER WESTHUIZEN, T.J. & AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. South African Journal of Enology and Viticulture, 20, 61-74. 1999.
- PRETORIUS, I.S., Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16, 675 – 729. 2000.

- PULVIRENTI, A., SOLIERI, L., DE VERO, L. & GIUDICI, P. Limitations on the use of polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism analysis of the rDNA NTS2 region for the taxonomy classification of the species *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51, 759-764. 2005.
- QUEROL, A., BARRIO, E., HUERTA, T., & RAMÓN, D. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2948-2953. 1992a.
- QUEROL, A., BARRIO, E., & RAMÓN, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439-446. 1992b.
- QUEROL, A., BARRIO, E. & RAMÓN, D. Population dynamics of wine yeast strains in natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 21: 315-323. 1994,
- QUEROL, A. & RAMÓN, D. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in Food Science and technology*, 7(3): 73-78. 1996.
- QUESADA, M., CENIS, J.L., Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterisation of wine yeasts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 204 – 208. 1995.
- REDZEPOVIC S., ORLIÆ S., SIKORA S., MAJDAK A., PRETORIUS I. S. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 305– 310. 2002.

- RIBÉREAU-GAYON, P., DUBOURDIEU, D., DONÉCHE, B., LONVAUD-FUNEL, A. Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications. Vol. 1 (2nd edition), John Wiley & Sons Ltd., England. 2006.
- RODRIGUES, M.G., FONSECA, A. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 607-616. 2003.
- ROMANO, P., SUZZI, G., DOMIZIO, P., FATICHENTI, F. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. Antonie van Leeuwenhoek 71, 239 – 242. 1997.
- ROMANO, P., BRANDOLINI, V., ANSALONI, C., MENZIANI, E., The production of 2,3-butanediol as a differentiating character in wine yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 649 – 653. 1998.
- RODRÍGUEZ-BLANCO, A., SICARDI, M., FRIONI, L. Competition for nodule occupancy between introduced and native strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. Biology and Fertility of Soils, 46(4), 419-425. 2010.
- SALINAS, F., GARRIDO, D., GANGA, A., VELIZ, G. & MARTINEZ, C. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. Food Microbiology, 26: 328–332. 2009.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rded Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3 v. 2001.
- SCHULLER, D., VALERO, E., DEQUIN, S., CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiology Letters 231, 19–26. 2004.

- SCHÜTZ, M., GAFNER, J. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Letters of Applied Microbiology*, 19, 253 – 257. 1994.
- SCORZETTI, G., FELL, J.W., FONSECA, A. & STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, 2: 495–517. 2002.
- SILHAVY, K., BERGER, S., MANDL, K., HACK, R., REGNER, F. Microsatellite analysis of commercial wine yeast strains. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 56, 140-146. 2006.
- SILVA-FILHO, E.A., SANTOS, S.K.B., RESENDE, A.M., MORAIS, J.O.F., MORAIS JR., M.A., SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88, 13 – 23. 2005.
- SMITH, J.S.C., CHIN, E.C.L., SHU, H., SMITH, O.S., WALL, S.J., SENIOR, M.L., MITCHELL, S.E., KRESOVICH, S., ZIEGLE, J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 163-173. 1997.
- TORIJA, M.J., ROZÉS, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J.M., MAS, A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 345 – 352. 2001.

- TORRIANI, S., ZAPPAROLI, G., SUZZI, G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 207-215. 1999.
- URZI, C., DE LEO, F., LO PASSO, C., CRISEO, G. Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods* 36, 95-105. 1999.
- VALENTE, Patricia . Yeast Systematics. In: McGraw-Hill. (Org.). McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology. 1a. ed. New York: McGraw-Hill, 464 pp. 2012.
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J. & PRETORIUS, I.S. The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antonie van Leewenhoek*, 61, 249-257. 1992.
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J. Characterisation and evaluation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from South African Vineyards. Thesis. Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa. 1999.
- VAUDANO, E., GARCIA-MORUNO, E. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology* 25(1): 56-64. 2008.
- VAUGHAN-MARTINI, A. & MARTINI, A. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: Kurtzman, C.P. & Fell, J.W. (eds). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam, pp. 358-371. 1998.

- VERSAVAUD, A., COURCOUX, P., ROULLAND, C., DULAU, L., & HALLET, J. N. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3521-3529. 1995.
- VEZINHET F., BLONDIN, B. & HALLET, J.N., Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphisms as tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32, 568-571. 1990.
- VIANNA, C. R., SILVA, C.L.C., NEVES, M.J. & ROSA, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* from traditional fermentations of Brazilian cachaça: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93:205-217. 2008.
- VILA-NOVA, M. X., PEREIRA, A. R., RAMOS, B. T. & MORAIS, M. A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. *Food Microbiology*. 26, 460-466. 2009.
- VRANCKEN, G., DE VUYST, L., VAN DER MEULEN, R., HUYS, G., VANDAMME, P., DANIEL, H.M. Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Research* 10, 471–481. 2010.
- WACHER, C., CAÑAS, A., COOK, P.E., BÁRZANA, E. & OWENS, J.D. Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9: 269-274. 1993.

- XUFRE, A., ALBERGARIA, H., INACIO, J., SPENCER-MARTINS, I. GIRIO, F. Application of fluorescence in situ hybridization (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 376–384. 2006.
- YAP, N.A., DE BARROS LOPES, M., LANGRIDGE, P. HENSCHKE, P.A. The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 89, 381–389. 2000.
- WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, E. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Editado por INNIS et al., Academic Press. 315-322. 1990.

APÊNDICE

Espécie	Código de perfil	Código de Cepa	Tipo de vinho	Procedência	Sequenciamento
<i>Candida zeylanoides</i>	P1	18E	Rosé	SC	D1/D2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P1	20E	Branco seco	SC	D1/D2
	P1	26E	Branco mesa / Courdec	SC	Não
	P1	71E	Tinto suave	SC	Não
	P1	72E	Branco mesa / Courdec	SC	Não
	P1	73E	Tinto cabernet	SC	Não
	P1	77E	Tinto Bordaux	SC	Não
	P1	MRC153	Tinto Bordaux, colonial	RS	Não
<i>Candida magnoliae</i>	P2	MRC179	Tinto Bordaux, fino	RS	ITS
	P2	65E	Branco seco	SC	Não
	P2	68E	Tinto suave	SC	Não
	P2	69E	Tinto suave	SC	Não
	P2	70E	Tinto suave	SC	Não
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	P3	17E	Tinto suave	SC	D1/D2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	P3	MRC148	Tinto suave, colonial	RS	D1/D2
Não identificado	P3	74E	Tinto cabernet	SC	Não
Não identificado	P3	MRC121	Tinto Bordaux, colonial	SC	Não
Não identificado	P3	MRC131	Tinto Bordaux, colonial	SC	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P4	MRC182	Tinto Isabel, colonial	RS	ITS
	P4	MRC190	Tinto Bordaux, fino	RS	Não
	P4	MRC78	Tinto suave, colonial	RS	Não

	P4	MRC79	Tinto suave, colonial	RS	Não
	P4	MRC81	Tinto suave, colonial	RS	Não
	P4	MRC86	Tinto suave, colonial	RS	Não
	P4	MRC87	Tinto suave, colonial	RS	Não
<i>Issatchenkia orientalis</i>	P5	05CE	Chardonnay	SC	ITS
	P5	MRC118	Branco, fino	SC	Não
	P5	MRC119	Branco, fino	SC	Não
Não identificado	P6	24E	Rosé	SC	Não
Não identificado	P6	MRC161	Niagara, colonial	RS	Não
Não identificado	P6	MRC163	Tinto Bordaux, fino	RS	Não
Não identificado	P6	MRC164	Tinto Bordaux, fino	RS	Não
Não identificado	P6	MRC186	Niagara, fino	RS	Não
Não identificado	P7	MRC137	Branco, fino	SC	Não
Não identificado	P7	MRC144	Branco DemiSec, fino	RS	Não
Não identificado	P7	MRC145	Branco DemiSec, fino	RS	Não
Não identificado	P7	MRC160	Tinto, Isabel, colonial	RS	Não
Não identificado	P7	MRC187	Niagara/Isabel, fino	RS	Não
Não identificado	P8	MRC105	Tinto suave, colonial	RS	Não
Não identificado	P8	MRC147	Branco DemiSec, fino	RS	Não
Não identificado	P8	MRC156	Lorena, colonial	RS	Não
Não identificado	P8	MRC174	Moscato Giallo, fino	RS	Não
Não identificado	P8	MRC176	Brando DemiSec, fino	RS	Não
<i>Pichia membranifaciens</i>	P9	MRC166	Rosé, colonial	RS	D1/D2
	P9	15E	Branco seco	SC	Não
	P9	26CE	Chardonnay	SC	Não
	P9	MRC126	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P9	MRC128	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P9	MRC129	Tinto Bordaux, fino	SC	Não

	P9	MRC133	Branco, fino	SC	Não
	P9	MRC139	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
Pichia manshurica	P10	MRC109	Branco, fino	SC	Não
	P10	MRC110	Branco, fino	SC	Não
	P10	MRC112	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC122	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC123	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC130	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC140	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC141	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC142	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC143	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P10	MRC189	Tinto Bordaux, fino	RS	Não
<i>Pichia manshurica</i>	P11	MRC127	Tinto Bordaux, fino	SC	D1/D2
	P11	MRC124	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P11	MRC136	Mattana, colonial	SC	Não
<i>Pichia manshurica</i>	P12	MRC171	Bordaux/Isabel, colonial	RS	D1/D2
	P12	MRC113	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P12	MRC116A	Mattana, colonial	SC	Não
	P12	MRC132	Branco, fino	SC	Não
	P12	MRC134	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P12	MRC158	Tinto Isabel, colonial	RS	Não
	P12	MRC185	Niagara, fino	RS	Não
<i>Pichia manshurica</i>	P13	MRC111	Branco, fino	SC	D1/D2
	P13	MRC115	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P13	MRC116B	Mattana, colonial	SC	Não
	P13	MRC125	Tinto Bordaux, fino	SC	Não

	P14	MRC107	Branco, fino	SC	Não
	P14	MRC114	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P15	62E	Branco, seco	SC	Não
	P15	MRC106B	Branco, fino	SC	Não
	P15	MRC80	Tinto suave, colonial	RS	Não
<i>Pichia membranifaciens</i>	P16	16E	Branco, Niagara	SC	D1/D2
<i>Pichia membranifaciens</i>	P16	MRC152B	Tinto Bordaux, colonial	RS	D1/D2
<i>Pichia membranifaciens</i>	P16	MRC165	Rosé, colonial	RS	D1/D2
<i>Pichia membranifaciens</i>	P16	MRC184	Niagara, Fino	RS	D1/D2
<i>Pichia membranifaciens</i>	P16	MRC168	Tinto Isabel, colonial	RS	ITS
	P16	59E	Tinto Bordaux, fino	SC	Não
	P16	MRC146	Branco DemiSec, fino	RS	Não
	P16	MRC173	Moscato Giallo, fino	RS	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P17	66E	Branco, seco	SC	D1/D2
	P17	60E	Tinto, cabernet	SC	Não
	P17	67E	Branco, seco	SC	Não
	P17	75E	Tinto, cabernet	SC	Não
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	P18	MRC162	Niagara, colonial	RS	D1/D2
	P18	37CE	Chardonnay	SC	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P18	MRC172	Bordaux/Isabel, colonial	RS	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P19	MRC177	Tinto Bordaux, fino	RS	D1/D2
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P19	MRC180	Tinto Isabel, colonial	RS	D1/D2
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P19	MRC88	Tinto suave, colonial	RS	D1/D2
	P19	16CE	Chardonnay	sc	Não
	P19	MRC152A	Tinto Bordaux, colonial	RS	Não
	P19	MRC178	Tinto Bordaux, fino	RS	Não

	P19	MRC183	Niagara, fino	RS	Não
	P19	MRC188	Niagara, fino	RS	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P20	MRC120	Tinto Bordaux, fino	SC	ITS
	P20	02CE	Chardonnay	SC	Não
	P20	19E	Tinto seco	SC	Não
	P20	22E	Tinto Bordaux	SC	Não
	P20	29CE	Chardonnay	SC	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P21	MRC181	Tinto Isabel, colonial	RS	ITS
	P21	01CE	Chardonnay	SC	Não
<i>Dekkera bruxellensis</i>	P22	MRC117	Mattana, colonial	SC	ITS
	P22	MRC154	Lorena, colonial	RS	Não

CURRICULUM VITÆ resumido

RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Mauricio Ramírez Castrillón

Local e data de nascimento: Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colômbia /

01 de Junho de 1988

E-mail: mauriciogeteg@gmail.com / mauriciogeteg@cbiot.ufrgs.br

2. FORMAÇÃO:

Graduação

Biólogo com ênfase em genética

Universidad del Valle, Cali-Colombia (2004-2009)

Trabalho de Conclusão de Curso: “aislamiento, identificación molecular y caracterización parcial de las levaduras asociadas a la chicha de arracacha”

Orientador: Esteban Osorio Cadavid, Ph.D.

3. ESTÁGIOS:

Fevereiro 2007 – junho 2008

Departamento de Biología, Universidad del Valle

Responsável: Katherine Muñoz Artunduaga, MSc.

Atividade: Monitor laboratório de docência de Biología.

Agosto – dezembro 2008

Laboratório de Microbiologia Industrial y Ambiental (MIA), Universidad del Valle

Responsável: Katherine Muñoz Artunduaga, MSc.

Atividade: Monitor serviço de extensão Laboratório de Microbiologia Industrial e Ambiental (MIA)

Fevereiro – junho 2009

Departamento de Biología, Universidad del Valle

Responsável: Esteban Osorio Cadavid, Ph.D.

Atividade: Monitor de docência disciplina “Biotecnología molecular para Biólogos”

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Premio Peter & Rosemary Grant 2008 – Melhor projeto de pesquisa

“I Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva”

Bogotá, Colômbia, 7 de Novembro de 2008

5. EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL OU DIDÁTICA ANTERIOR

“Universidad Icesi – Facultad de Ciencias Naturales”

Agosto – Dezembro 2009

Monitor externo laboratório de biologia celular (1 turma)

Fevereiro – Maio 2010

Monitor externo laboratório de biologia celular (2 turmas)

Coordenador de monitores de laboratório de biologia celular

Agosto - Dezembro 2010

Professor auxiliar – hora cátedra – laboratório de biologia celular

Coordenador de monitores y prácticas laboratório de biologia celular

Assistente de pesquisa – laboratório de genética y biotecnologia.

“Fundación Universidad del Valle”

Setembro – outubro 2009

Monitor biologia – “Plan de Nivelación Académica Talentos (PNAT)”

Universidad del Valle – Prefeitura de Santiago de Cali

Março – abril 2010

Professor reforço área de biologia – PNAT

Universidad del Valle – Prefeitura de Santiago de Cali

6. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

LOPEZ, W. A. ; RAMÍREZ, M. ; MAMBUSCAY, L. A. ; OSORIO, E. . Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. Revista Colombiana de Biotecnología, 12, 176-186, 2010.

OSORIO, E.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A. Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 125-131, 2009.

DIAZ, F.; PIZARRO, M. L.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MOLINA, Y. F.; SOLARTE, D. M.; BRAVO, D.; HURTADO, A.; CARDENAS, H. Evaluación de dos medios de cultivo y heredabilidad de productividad y tiempo de desarrollo para tres mutantes de *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae). *Acta Biologica Colombiana*, 13, 161-174, 2008.

7. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

1. SILVA-BEDOYA, L. M.; OSORIO, E.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. Aislamiento, identificación molecular y caracterización parcial de levaduras asociadas a los lagos de la Universidad del Valle (sede Melendez) Cali, Colombia. In: Tercer congreso colombiano de microbiología, 2012, Medellín. *Hechos Microbiológicos Memorias Tercer congreso colombiano de microbiología*. Medellín UDEA, 2012. v. 2. p. 80-80.

2. Ramírez, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E. . Diversidade e potencial biotecnológico de leveduras associadas à "chicha", uma bebida fermentada artesanal colombiana. In: V Simposio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2011, Porto Alegre. *V Simposio Brasileiro de Microbiologia Aplicada*. Porto Alegre : UFRGS, 2011. v. 1. p. 59-59.

3. ROSA, P. D.; Ramírez, M.; MENDES, S. D. C.; LANDELL, M.; TOSTA, A.; VAINSTAIN, M. H.; Valente, P. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS ISOLADAS DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL. In: V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 2011, Porto Alegre. ANAIS DO V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA. Porto Alegre : UFRGS, 2011. v. 1. p. 69-69.

4. MENDES, S. D. C.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; KELLER, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E.; Valente, P. ESTUDO DA DINÂMICA DE LEVEDURAS ASSOCIADAS A VINHOS DO SUL DO BRASIL E CHICHAS COLOMBIANAS. In: 9 Simposio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas/SP. CD de resumos 9 Slaca. Campinas : Unicamp, 2011. v. 1. p. 11574-11574.

5. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MENDES, S. D. C.; TOSTA, A.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; VAINSTAIN, M. H.; OSORIO, E.; Valente, P. Diversidade e Fingerprinting de leveduras associadas a vinhos e. In: XIII Reunião anual do Programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos XIII Reunião anual PPGBCM. Porto Alegre : Cbiot/UFRGS, 2011. v. 1. p. 92-92.

6. DIAZ, J. H.; DIAZ, F.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SOLARTE, D. M.; CARDENAS, H. HEREDABILIDAD DE LA PRODUCTIVIDAD Y EL TIEMPO DE DESARROLLO ASOCIADOS A LA INCIDENCIA DE LA CAPACIDAD VISUAL DURANTE EL CORTEJO EN *Drosophila melanogaster*. In: XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2009, Popayan. Memorias del XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2009. v. 1.

7. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; LOPEZ, W. A.; MAMBUSCAY, L. A.; OSORIO, E. Aislamiento, identificación molecular y caracterización parcial de las levaduras asociadas a las chichas de maíz, piña y arracacha. In: II Congreso Nacional de Estudiantes de Biología, 2009, Bogotá. Libro de Memorias II congreso nacional de estudiantes de biología. Bogotá : ARFO Editores, 2009. v. 1. p. 47-48.
8. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; DIAZ, J. H.; SIERRA, J. C.; OSPINA, O. E.; JURADO, L.; CARDENAS, H. EFECTO DE LA PIGMENTACIÓN DEL CUERPO EN LA REGRESIÓN PARENTAL-CRÍA DE LAS CEPAS black (b//b) Y Silvestre (+//+) DE *D. melanogaster* (DROSOPHILIDAE). In: Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva, 2008, Bogotá. Memorias del Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva, 2008. v. 1. p. 4-4.
9. DIAZ, F.; FONG, C.; CASTANO, L.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; PIZARRO, M. L.; OSORIO, J. C.; MOLINA, Y. F.; BRAVO, D.; SOLARTE, D. M.; CARDENAS, H. Efecto del medio de cultivo, las mutantes w, vg, CyLv y la densidad poblacional de huevos en diferentes parámetros del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*. In: XLI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, 2006, Quibdó, Chocó. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. Armenia, 2006. v. 18.
10. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MOLINA, Y. F.; OCAMPO, S. P. Comparación de la estructura y composición de la anurofauna presente en dos zonas con diferente grado de uso del suelo en la vereda Morales de Caloto (Cauca, Colombia). In: III COLOQUIO SOBRE INVESTIGACION ECOLOGICA EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, 2006, Cali. MEMORIAS DEL III COLOQUIO SOBRE INVESTIGACION ECOLOGICA EN EL DEPARTAMENTO

DE BIOLOGIA, GRUPO DE INVESTIGACION EN ECOLOGIA ANIMAL APLICADA. Cali : Universidad del Valle, 2006. v. 3. p. 16-16.

8. ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

1. RAMÍREZ, M.; MAMBUSCAY, L. A.; LOPEZ, W. A.; OSORIO, E. Curso de extensión teórico - práctico: Herramientas eficientes para la identificación de levaduras de interés agroindustrial. 2010. (Outro).

2. Vida y Obra de Charles Darwin. 2009. (Exposição).

3. Charles Darwin 200 años. 2009. (Festival).

4. II Simposio de la Red Colombiana de Biología Evolutiva. 2009. (Congresso).

5. IV Seminario de Tópicos Actuales de Investigación en Genética y I Seminario de Microbiología y Biotecnología de Microorganismos. 2007. (Congresso).

6. XL Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. 2005. (Congresso).

7. III Seminario de Tópicos Actuales de Investigación en Genética. 2005. (Congresso).

9. SUPERVISÕES E ORIENTAÇÕES CONCLUÍDAS

1. Lina Marcela Silva Bedoya. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LEVADURAS ASOCIADAS A LOS LAGOS DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE (SEDE MELÉNDEZ) CALI,

COLOMBIA. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biología) - UNIVERSIDAD DEL VALLE. Co-Orientador: Mauricio Ramírez Castrillón.

2. Luisa Maria Usman Rojas. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LEVADURAS ASOCIADAS A LA PULPA DE LOS FRUTOS DE MANGO (*Mangifera indica*) Y POMARROSO (*Syzygium malaccense*). 2012. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biología) - UNIVERSIDAD DEL VALLE. Co-Orientador: Mauricio Ramírez Castrillón