

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA A
CARACTERIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae*
ASSOCIADAS À PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

TAÍS LETÍCIA BERNARDI

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TAÍS LETÍCIA BERNARDI

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA A CARACTERIZAÇÃO
DE *Saccharomyces cerevisiae* ASSOCIADAS
À PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

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

Orientador

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Bernardi, Taís Letícia

Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae*
associadas à produção de cachaça / Taís Letícia Bernardi. – Lavras : UFLA, 2007.
38 p. : il.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.
Dissertação (Mestrado) - UFLA.
Bibliografia.

1. Cachaça. 2. *Saccharomyces*. 3. Técnicas moleculares. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-663.53

TAÍS LETÍCIA BERNARDI

**TÉCNICAS MOLECULARES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE
Saccharomyces cerevisiae ASSOCIADAS
À PRODUÇÃO DE CACHAÇA**

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

APROVADA em 6 de fevereiro de 2007.

Prof.. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Profa. Dra. Magnólia de Araújo Campos UFLA

Profa. Dra. Patrícia Gomes Cardoso UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

**Aos meus pais,
Erní e Nilsa,
Meus irmãos,
Eduardo e Tamiris,
Pelo amor que nos une,
OFEREÇO.**

**A todos meus familiares
e amigos,
DEDICO.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença sempre constante em minha vida, por ser luz no meu caminho.

Meus pais, Erní e Nilsa, pelo amor, carinho, incentivo, renúncias. Amo vocês!

Meus irmãos, Eduardo e Tamiris, pelo amor, carinho e amizade. Amo vocês!

A toda minha família, principalmente àqueles que sempre acreditaram em mim.

À Universidade Federal de Lavras.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Rosane Freitas Schwan, pela orientação e ensinamentos.

À professora Patrícia Gomes Cardoso, pela co-orientação, ensinamentos e paciência.

Aos professores Henrique Figueiredo e Magnólia Campos, por terem aceitado o convite para fazer parte da banca.

Às ex-orientadoras de iniciação científica, Mírian e Rosane, pelo incentivo, carinho e amizade, e às suas famílias, pelo carinho sempre dedicado.

Às amigas de república, Gláucia e Kris, pela amizade, carinho e momentos de descontração. Que a nossa amizade continue, mesmo com a distância.

À Lorena, pela amizade que surgiu durante este tempo.

Aos amigos Rafael, Paula e Gládis, pela amizade, mesmo que distantes.

Aos amigos André e Sandro, pelos bons momentos passados juntos, pelo carinho e pela amizade.

Às amigas Giselle e Milagros, pela amizade e carinho.

Ao estagiário de iniciação científica, Gilberto, pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho e, acima de tudo, pela amizade.

Aos estagiários Caio e Mateus, pela brilhante ajuda na execução deste trabalho.

A Ivani e Magda, pela disposição em ajudar sempre e pela amizade.

À amiga Carol, à Dona Beatriz e ao Rodrigo, pela acolhida em sua família.

À amiga Ana Paula, Dona Teresa, Seu Hugo, Raíssa e Gustavo, pelo carinho, amizade e acolhida. Minha família mineira...

À amiga Gra, Dona Ilma e Seu Moreira, pela amizade, carinho e acolhida.

Ao Lamartine, do Laboratório de Genética Molecular, pelos ensinamentos, paciência, carinho e amizade.

À amiga Cíntia, pela amizade, carinho e ajuda nos momentos de desespero.

Aos colegas de laboratório, Karina, Sandra, Maiara, Alexandre, Giuliana, Talita, Dani, Emerson, Michele, Whasley e João Paulo, pela amizade e convivência.

Às amigas Carla e Evânia, pela amizade e bons conselhos.

Aos amigos Amanda, Meire, Michele, Simone, Sheila, Cândido, Ivoney, Matheus, Douglas, Sidi e Rayris, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, Thaís, Karla, Admilson, Helton, Paula, Márcio, Marciane, Francine, Diego e Igor, pela amizade e carinho.

Aos amigos Cleber, Jú, João Paulo, Zé Rafael, Vivian, Henrique, Helen, Felipe, Fernando e Vanessa, pelos bons momentos passados juntos.

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram para que eu alcançasse este sonho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Importância das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2 O gênero <i>Saccharomyces</i>	4
2.3 Técnicas moleculares empregadas na caracterização de leveduras.....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Leveduras.....	13
3.2 Identificação de isolados de leveduras <i>S. cerevisiae</i> pela técnica da PCR.....	13
3.3 Análise de cariotipagem pela técnica de PFGE.....	14
3.4 Extração e análise de restrição do mtDNA.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Caracterização de <i>S. cerevisiae</i> por PCR com <i>primers</i> específicos.....	17
4.2 Cariotipagem de leveduras por PFGE.....	21
4.3 Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do mtDNA.....	24
5 CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXOS.....	35

RESUMO

BERNARDI, Taís Letícia. **Técnicas moleculares para a caracterização de *Saccharomyces cerevisiae* associadas à produção de cachaça.** 2007. 38p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

As leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, são os microrganismos responsáveis pela conversão dos açúcares do caldo de cana-de-açúcar em álcool e CO₂ durante o processo fermentativo para produção de cachaça. O objetivo deste trabalho foi utilizar as técnicas moleculares de PCR, PFGE e RFLP/mtDNA na caracterização de leveduras isoladas de alambiques do Sul de Minas Gerais. Foram utilizadas para caracterização molecular, leveduras inicialmente identificadas por técnicas morfológicas e bioquímicas. Das 106 leveduras caracterizadas por técnicas tradicionais, 36 apresentaram produto de amplificação por PCR utilizando-se primer específico para leveduras *S. cerevisiae*. A caracterização pela técnica de PFGE mostrou 9 diferentes perfis, onde 2 foram semelhantes ao marcador *S. cerevisiae*. A análise de restrição do mtDNA com 4 diferentes enzimas mostrou 10 diferentes perfis, dos quais, 3 para as enzimas *Rsa* I e *Hae* III e 2 para as enzimas *Hind* III e *Hinf* I. Foi verificado que as técnicas de PCR, PFGE e RFLP-mtDNA utilizando-se a enzima *Hinf* I mostraram-se eficientes na identificação de leveduras *S. cerevisiae*, podendo ser utilizadas isoladas ou associadas.

¹ Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan (orientadora); Patrícia Gomes Cardoso (co-orientadora)

ABSTRACT

BERNARDI, Taís Letícia. **Molecular techniques for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* associated the production of cachaça.** 2007. 38p. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Yeasts, mainly *Saccharomyces cerevisiae*, are microorganisms responsible by conversion of sucrose from sugarcane juice to alcohol and CO₂ during the fermentative process of cachaça. The aim of this work was to utilize molecular techniques such as PCR, PFGE and RFLP/mtDNA in the characterization of yeasts isolated of alambiques from South of Minas Gerais. Yeasts were initially identified by morphological and physiological methods and them characterized by molecular techniques. Of one hundred and six yeasts characterized by traditional techniques, 36 showed product of amplification by PCR using the specific primer to *S. cerevisiae*. The characterization by PFGE technique showed 9 different profiles, where 2 of them were similar to the *S. cerevisiae* utilized as standard. The restriction analysis of the mtDNA using 4 different enzymes showed 10 different profiles, 3 using *Rsa* I and *Hae* III enzymes and 2 when *Hind* III e *Hinf* I enzymes were used. It was verified that the PCR, PFGE and mtDNA-RFLP with *Hinf* I enzyme showed efficiency in the identification of *S. cerevisiae* yeasts and these methods can be used isolated or associated.

¹ Guidance committee: Rosane Freitas Schwan (advisor); Patrícia Gomes Cardoso (co-advisor).

1 INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos muito utilizados na indústria alimentícia, desempenhando um papel muito importante na produção de alimentos e bebidas alcoólicas (Hierro et al., 2004; Mayoral et al., 2005).

A cachaça é bebida alcoólica tradicional produzida no Brasil, sendo obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar. Seu teor alcoólico é de 38°GL a 48°GL, a 20°C (Pataro et al., 2000). O mercado brasileiro da cachaça movimenta um volume de, aproximadamente, 1,3 bilhão de litros e em relação ao consumo mundial, é o terceiro destilado mais consumido (Estanislau et al., 2002).

O processo fermentativo para a produção de cachaça é realizado pela ação de leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae*. O gênero *Saccharomyces* inclui linhagens comumente utilizadas na indústria de fermentação, bem como espécies de importância científica (Rainieri, et al., 2003). Espécies deste gênero se dividem em dois grupos: o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, no qual estão as espécies estritamente associadas com a indústria da fermentação, e o grupo *Saccharomyces sensu lato*, que compreende as espécies mais distantemente relacionadas a *S. cerevisiae* (Rainieri et al., 2003). O grupo *sensu stricto* inclui *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii* e o táxon estéril *S. pastorianus*, que não representa uma espécie biológica, mas um híbrido, provavelmente, originado de *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (Naumova et al., 2003). O grupo *sensu lato* inclui *S. exiguus*, *S. castellii*, *S. unisporus*, *S. dairenensis*, *S. servazzii* e *S. kuyveri* (Marinoni, et al., 1999).

A identificação e a caracterização de leveduras são de grande importância para os processos industriais de fermentações, uma vez que a qualidade das bebidas é consequência da diversidade e da composição dos

microrganismos (Guerra, et al., 2001). As técnicas de identificação mais empregadas são aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas, denominadas técnicas tradicionais, e, mais recentemente, têm também sido usadas técnicas moleculares.

A classificação das leveduras feita tradicionalmente é complexa e demorada, podendo levar, algumas vezes, à classificação incorreta (Hierro et al., 2004). Esta classificação incorreta se deve, em parte, ao fato de que as características fenotípicas podem ser influenciadas pela linhagem e pelas condições de cultivo (Mozina et al., 1997). Visando contornar estes problemas, as técnicas moleculares oferecem como vantagem a identificação de microrganismos baseada nas suas características genéticas (Canas, et al., 1997). Essas técnicas podem eliminar ambigüidade taxonômica e simplificar a identificação de microrganismos (Fernández, et al., 1999).

As técnicas baseadas no DNA apresentam a vantagem de serem independentes da expressão do gene (Clemente-Jimenez et al., 2004; Sanz, et al., 2005). Além disso, as seqüências de nucleotídeos não são influenciadas pelas condições de cultivo e há regiões do DNA com diferentes graus de variabilidade que podem ser utilizadas para a identificação dos grupos de microrganismos ou linhagens diferentes dentro de uma mesma espécie (Sanz, et al., 2005).

A diversidade genética de *S. cerevisiae* tem sido analisada por diversas técnicas, como cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) e *fingerprinting* baseado nas seqüências delta repetitivas (Schüller, et al., 2004).

O objetivo deste estudo foi estabelecer técnicas moleculares para a identificação de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em alambiques do Sul de Minas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são microrganismos muito utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica, desempenhando um papel importante na produção de alimentos, bebidas alcoólicas e metabólitos secundários, como antibióticos e vitaminas (Hierro et al., 2004; Mayoral et al., 2005).

O gênero *Saccharomyces* inclui linhagens comumente utilizadas na indústria de fermentação, bem como espécies de importância científica (Rainieri et al., 2003). A utilização de *S. cerevisiae* nos processos de fermentação alcoólica é muito ampla, uma vez que esta levedura suporta elevados níveis de etanol (12% a 15%), hidrolisa oligossacarídeos como maltotriose e maltotrealose em glicose, para a produção e a transformação em etanol, e tolera alta concentração de açúcar (osmotolerante) (Pataro et al., 2002).

No Brasil, a segunda bebida alcoólica mais consumida é a cachaça, que se origina de um processo fermentativo seguido por destilação. Cachaça, de acordo com o Decreto nº 4.857 de 2 de outubro de 2003, é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume, a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo haver a adição de açúcares até 6g.L⁻¹, expressos em sacarose (Brasil, 2003). O mercado brasileiro da cachaça movimenta um volume de, aproximadamente, 1,3 bilhão de litros e, em relação ao consumo mundial, é o terceiro destilado mais consumido (Estanislau et al., 2002).

O processo fermentativo para a produção de cachaça é realizado pela ação de leveduras da espécie *S. cerevisiae*, que são responsáveis pelo desdobramento dos açúcares presentes no substrato, convertendo-os em etanol e gás carbônico.

A melhoria da qualidade da cachaça e o aumento na eficiência do processo produtivo passam, necessariamente, pela seleção de uma ou mais leveduras apropriadas ao processo. A identificação das leveduras associadas à produção de cachaça é importante para determinar o papel destes microrganismos nos vários estádios das fermentações, buscando a tipificação tecnológica para o desenvolvimento de linhagens iniciadoras. A qualidade da bebida está fortemente relacionada com a ecologia dos tipos microbianos e suas populações durante os processos de fermentação e maturação, sendo determinantes, tanto do rendimento de etanol como da formação e proporções relativas dos compostos secundários (Pataro et al., 2002).

Saccharomyces sp. também pode ser utilizada na alimentação humana e animal, sob várias formas e para finalidades diversas. Seu uso mais extenso, no Brasil, é na panificação, com 120 toneladas/ano. Também é empregada como agente de fermentação nas indústrias de cerveja, vinhos e álcool. Na forma inativada, pela ação do calor, é usada como fonte de nutrientes na alimentação animal e na alimentação humana, na forma de levedura íntegra ou de derivados de levedura (Vilela et al., 2000). A levedura *S. cerevisiae* destaca-se, ainda, como excelente fonte de proteínas, pela sua capacidade de sintetizá-las, bem como a outros compostos, como vitaminas do complexo B e minerais essenciais e também por não ser patogênica (Rodrigues & Sant'Anna, 2001).

2.2 O gênero *Saccharomyces*

O gênero *Saccharomyces* inclui dois grupos de espécies: o grupo *Saccharomyces sensu stricto*, no qual estão as espécies estritamente associadas com a indústria da fermentação e o grupo *Saccharomyces sensu lato*, que compreende as espécies mais distantemente relacionadas a *S. cerevisiae* (Rainieri et al., 2003). O grupo *sensu stricto* inclui *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus* e *S. kudriavzevii* e o táxon estéril *S.*

pastorianus, que não representa uma espécie biológica, mas um híbrido provavelmente originado de *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (Naumova et al., 2003). O grupo *sensu lato* inclui *S. exiguus*, *S. castellii*, *S. unisporus*, *S. dairenensis*, *S. servazzii* e *S. kuyveri* (Marinoni et al., 1999). O grupo *sensu stricto* inclui as espécies mais importantes para a indústria cervejeira, de panificação e de vinho, sendo *Saccharomyces cerevisiae* a mais empregada (Duarte et al., 1999). Espécies do gênero *Saccharomyces* mostram uma elevada variabilidade nos aspectos fenotípico e genotípico. Dentre as *Saccharomyces sensu stricto*, a maioria das linhagens pertencentes à mesma espécie é altamente polimórfica. Linhagens de vinho da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, mostram uma variedade de características metabólicas (Rainieri et al., 2003).

2.3 Técnicas moleculares empregadas na caracterização de leveduras

A identificação e a caracterização de leveduras são de grande importância para os processos de fermentações industriais, uma vez que a qualidade das bebidas depende da composição, da dinâmica e da frequência dos microrganismos presentes (Guerra et al., 2001).

A origem da levedura *S. cerevisiae* na fermentação espontânea é bastante controversa. Em vinhos, alguns autores consideram que as leveduras sejam provenientes das comunidades microbianas presentes na vinícola, transportadas do solo para as uvas por insetos ou vento (Valero et al., 2006). Inúmeros estudos têm sido realizados para examinar a sucessão de leveduras e bactérias que ocorrem durante a fermentação alcoólica, visto que as leveduras são as principais responsáveis pelo processo e predominam durante esta fase, em que o baixo pH e o conteúdo nutricional favorecem seu crescimento (Blanco et al., 2006).

As técnicas de identificação e classificação de leveduras mais empregadas são aquelas baseadas em características morfológicas e fisiológicas,

denominadas técnicas tradicionais. A maioria destas técnicas é complexa e consome tempo, podendo, algumas vezes, levar a uma classificação incorreta (Hierro et al., 2004). Características fenotípicas podem ser influenciadas pela linhagem e pelas condições de cultivo (Mozina et al., 1997). Algumas limitações podem ser citadas para explicar a incorreta classificação de espécies deste gênero, como a instabilidade na morfologia das colônias das linhagens de uma mesma espécie, os poucos resultados que se obtêm a partir da fisiologia (uma ou duas características) para classificação e a possibilidade de mutação de um único gene alterando as características fisiológicas da linhagem (Rainieri et al., 2003).

Técnicas de biologia molecular têm sido usadas como alternativa às técnicas tradicionais de identificação e caracterização de leveduras. Estas técnicas oferecem vantagens, como a identidade de linhagens por suas características genéticas e não por seu perfil fisiológico (Canas, et al., 1997). Também eliminam ambigüidade taxonômica e simplificam a identificação de microrganismos (Fernández, et al., 1999).

As técnicas que utilizam DNA são independentes da expressão do gene não sendo influenciadas pelas condições de cultivo (Clemente-Jimenez et al., 2004; Sanz et al., 2005). As regiões do DNA com diferentes graus de variabilidade podem ser utilizadas para a identificação dos grupos de microrganismos ou linhagens dentro de espécies (Sanz et al., 2005). A diversidade de linhagens de leveduras tem sido extensivamente estudada em diferentes regiões produtoras de bebidas fermentadas, revelando a existência de grande polimorfismo entre linhagens de leveduras isoladas em diferentes áreas e dentro de áreas específicas (Blanco et al., 2006).

A diversidade genética de *S. cerevisiae* tem sido analisada por diversos métodos, como reação em cadeia da polimerase (PCR), cariotipagem por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de restrição do DNA

mitocondrial (RFLP-mtDNA) e *fingerprinting* baseado nas seqüências delta repetitivas (Schüller, et al., 2004).

A reação em cadeia da polimerase (do inglês *polimerase chain reaction*, ou PCR) tornou-se uma ferramenta essencial para estudo e diagnóstico, como alternativa para a identificação de leveduras (Ruiz-Barba et al., 2005; Lopes et al., 1996). Técnicas baseadas em PCR são específicas, podendo ser extremamente sensíveis e os resultados obtidos em poucas horas (Mayoral et al., 2005). Com isso, elas têm sido utilizadas na detecção de microrganismos em alimentos e bebidas (Sanz et al., 2005). Esta técnica consiste na síntese enzimática “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1998). As duas fitas do DNA servem como molde para a síntese, desde que seja fornecido um oligonucleotídeo *primer* para cada fita. Os *primers* utilizados irão demarcar a região alvo do DNA que deverá ser amplificada. Ao final, têm-se milhões de moléculas de DNA de fita dupla, que são cópias da seqüência de DNA entre os *primers* (Watson et al., 1997).

Valente et al. (1996), amplificando a região do espaço interno transcrito do rDNA por PCR, diferenciaram grupos de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*. As leveduras pertencentes ao grupo *Saccharomyces sensu stricto* apresentaram fragmento da região amplificada de tamanho superior a 800 pb e o grupo *Saccharomyces sensu lato* inferior a 800 pb.

A técnica da PCR foi utilizada para monitorar fermentações em que inóculo foi adicionado para produção de vinho (López et al., 2003). Estes autores testaram e desenharam oligonucleotídeos complementares à região de íntrons *COX 1* de *S. cerevisiae*, para a diferenciação de linhagens de leveduras de vinho. O uso destes oligonucleotídeos mostrou-se muito efetivo na diferenciação de linhagens de leveduras naturais e comerciais.

Fernández et al. (1999) identificaram leveduras não *S. cerevisiae* nativas de vinho, utilizando técnicas fisiológicas e moleculares, com a finalidade de comparar as informações obtidas pelas duas técnicas. Estes autores realizaram identificação tradicional seguindo os critérios taxonômicos, descritos por Barnett et al. (1990) e a caracterização genética por meio de PCR-RFLP (siglas em inglês para reação em cadeia da polimerase e polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, respectivamente). Como as informações fornecidas pelas duas metodologias foram muito semelhantes, os autores verificaram que a técnica da PCR-RFLP pode ser utilizada para corrigir identificações errôneas a partir de fenótipo e, em alguns casos, para complementar a diferenciação intra-espécies.

Naumova et al. (2003) utilizaram a técnica de PCR-RFLP da região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA para comparar linhagens de leveduras fenotipicamente diferentes, isoladas de cerveja de sorgo, em Gana e Burkina Faso, com culturas de seis espécies de *Saccharomyces sensu stricto* e o híbrido *S. pastorianus* e estimar a diversidade genética entre os isolados. Os autores demonstraram que a análise de todas as linhagens estudadas gerou fragmentos de mesmo tamanho molecular, de aproximadamente 850 pb. Os produtos da PCR foram digeridos com endonucleases de restrição (*Hae* III, *Hinf* I, *Hpa* III, *Scr* I e *Taq* I) e os resultados obtidos não diferenciaram *S. bayanus* de *S. pastorianus* e *S. cariocanus* de *S. paradoxus*. Entretanto, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* e *S. mikatae* foram claramente diferenciadas uma das outras e dos pares mencionados anteriormente, usando uma combinação das endonucleases *Hae*III, *Hpa*II, *Scr*I e *Taq*I. Esta última enzima de restrição apenas distingue entre *S. kudriavzevii* e os membros do complexo *Saccharomyces sensu stricto*.

A identificação e a diferenciação de leveduras também podem ser realizadas por meio da técnica de PFGE (sigla em inglês para eletroforese em gel de campo pulsado). Esta técnica é sensível para a separação de moléculas de

DNA de alto peso molecular, como cromossomos de leveduras. O princípio deste método é o de que as moléculas de DNA são forçadas a se reorientarem periodicamente, em campos elétricos, sendo o tempo de reorientação para moléculas grandes maior do que para moléculas menores. Por esta razão, moléculas grandes migram mais vagarosamente que as menores no gel de agarose, quando são submetidas a mudanças de campo elétrico (Steinkamp-Zucht & Fahrig, 1995). O número e o padrão de cromossomos das leveduras podem ser facilmente determinados por PFGE, estabelecendo-se um cariótipo eletroforético. Na maioria das linhagens de leveduras *S. cerevisiae*, 16 moléculas de DNA cromossomal, variando em tamanho de 230 a 1.622 kb, podem ser observadas, sendo que duas destas aparecem sobrepostas (Jong et al., 1995).

Diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mostram semelhante padrão PFGE, no entanto, as bandas individuais possuem mobilidade ligeiramente diferente, devido ao polimorfismo no comprimento dos cromossomos, que pode ser utilizado na identificação de linhagens (Jemec et al., 2001). Essa técnica tem sido também utilizada no estudo da evolução de diferentes linhagens, durante a fermentação (Briones et al., 1996).

Com o objetivo de determinar a variabilidade e também verificar a presença de uma população de leveduras característica em três adegas da região de Valdepeñas, Canas et al. (1997) estudaram *Saccharomyces* nativas presentes, durante dois anos consecutivos, por meio do perfil cromossomal. Isolados pertencentes ao gênero *Saccharomyces* resultaram em diferentes linhagens, algumas das quais representaram mais de 75% da população total. Com a aplicação da técnica de PFGE, os autores confirmaram que todos os isolados pertenciam ao gênero *Saccharomyces*, uma vez que mostraram 13 bandas de um tamanho variando entre 200 e 2.000 kb.

A análise do cariótipo eletroforético foi realizada por Briones et al. (1996), para estudar linhagens nativas de *S. cerevisiae* em adegas pertencentes à

Valdepeñas Appellation d'Origine Controlée, visando determinar a variabilidade e verificar a presença de uma população de leveduras características em cada adega. Os autores verificaram que os isolados pertenciam ao complexo *Saccharomyces sensu stricto* e também constataram a existência de uma diversidade genética nas diferentes adegas. Esta técnica também foi utilizada por Valero et al. (2006) para analisar a biodiversidade e a dinâmica da população natural de *S. cerevisiae* presente em uma vinícola, onde é utilizada levedura seca ativa como iniciadora da fermentação. As colônias isoladas e identificadas como *Saccharomyces* foram submetidas à análise do perfil cromossomal, revelando grande diversidade.

A análise de restrição do DNA mitocondrial também apresenta-se como uma técnica muito utilizada na diferenciação de espécies de leveduras. Este método consiste do isolamento do DNA mitocondrial e no uso de endonucleases de restrição específicas (López et al., 2001). As mitocôndrias são organelas essenciais de células eucarióticas, onde são responsáveis pela maior parte da produção da energia gerada por meio da fosforilação oxidativa (Dimmer et al., 2002; Shutt & Gray, 2006). Estas organelas desempenham uma variedade de processos metabólicos, incluindo reações do ciclo do ácido tricarboxílico e biossíntese de intermediários metabólicos (Dimmer et al., 2002).

O DNA mitocondrial de leveduras tem tamanho de 75 a 85 kb (Marinoni et al., 1999). O genoma mitocondrial de *S. cerevisiae* é caracterizado por baixa densidade do gene e elevado conteúdo de adenosina e timina (A + T). Sua composição básica é altamente heterogênea, enquanto o conteúdo de guanina e citosina (G + C) é de, aproximadamente, 30%, os espaços intergênicos são compostos de trechos quase puros de A+T de centenas de pares de bases, interrompidas por mais de 150 *clusters* ricos em G+C, com 10 a 80 pares de bases (Foury et al., 1998).

A análise de restrição do DNA mitocondrial foi inicialmente utilizada para distinguir linhagens de leveduras de cervejaria e tem sido recentemente aplicada para a seleção de leveduras de vinho, para monitorar fermentações espontâneas e inoculadas e para avaliar a diversidade genética e distribuição geográfica de linhagens de leveduras (Comi et al., 2000; Gutiérrez et al., 1997).

Um método para a extração do mtDNA foi desenvolvido por Querol & Barrio (1990). O método baseia-se na preparação de esferoplastos, lise da membrana celular e isolamento do mtDNA. O DNA resultante é utilizado para análises RFLP. Uma vez que fragmentos de restrição mitocondrial são facilmente observados por eletroforese em gel de agarose, é possível determinar diferenças no perfil de restrição do DNA mitocondrial de leveduras. O uso desta técnica na diferenciação de linhagens de leveduras é de particular interesse para indústrias que utilizam leveduras na produção de vinho, cerveja e pães (Querol et al., 1992).

Esteve-Zarzoso et al. (2000) isolaram e selecionaram linhagens autóctones para conduzir a fermentação na área de El Penèdes, na Espanha. Estes autores estudaram a microbiota presente na fermentação espontânea de vinhos com cinco variedades de uvas e realizaram caracterização molecular de isolados do gênero *Saccharomyces*. Para distinguir entre diferentes linhagens, análise de restrição do mtDNA foi realizada, utilizando a endonuclease *Hinf* I. Os autores demonstraram um elevado polimorfismo, uma vez que foi possível a detecção de diferentes padrões de restrição.

Análise de restrição do mtDNA com as endonucleases *Hinf* I e *Rsa* I, para a caracterização de 70 linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de uma região da Itália, foi realizada por Comi et al. (2000). Com a endonuclease *Hinf* I, os autores obtiveram oito perfis, enquanto que, com a *Rsa*I, nove padrões de restrição foram obtidos.

Beltran et al. (2002) avaliaram a população de leveduras em uma vinícola nova, durante seis anos consecutivos, objetivando analisar a ecologia de leveduras da adega, em condições de vinificação industrial. Os autores identificaram, por RFLP do rDNA, as espécies de leveduras não *Saccharomyces* e, por RFLP-mtDNA, as leveduras *Saccharomyces sensu stricto*, em relação a espécies e linhagens. Durante o período de estudo, verificaram que diferentes linhagens de *S. cerevisiae* nativas (ou não-inoculadas) estiveram envolvidas na fermentação ao mesmo tempo.

Pramateftaki et al. (2000) estudaram a composição de populações de leveduras do vinho, presentes na fermentação espontânea de mostos de duas áreas de produção da Grécia, durante dois anos consecutivos. O estudo foi feito com o uso de técnicas moleculares, como ribotipagem da região ITS, RFLP-mtDNA e polimorfismo do elemento δ amplificado. Com este estudo, os autores verificaram que a ribotipagem da região ITS mostrou-se como uma ferramenta segura para a caracterização rápida das espécies. A análise RFLP-mtDNA foi conveniente para a detecção da diversidade genética de espécies de *Saccharomyces* e outras diferentes de *Saccharomyces*. O polimorfismo do elemento δ amplificado consistiu em um critério adicional na diferenciação de linhagens *S. cerevisiae*. Análises comparativas da diversidade genética utilizando o padrão de restrição do mtDNA e perfis de amplificação do elemento δ demonstraram poder discriminatório semelhante; a combinação dessas duas técnicas permitiu a distinção e ou a caracterização de linhagens da mesma espécie.

Considerando-se as particularidades de cada técnica, pode-se verificar que, tanto as baseadas nas características morfológicas e fisiológicas quanto aquelas baseadas no DNA, consistem em ferramentas úteis na identificação e na caracterização de leveduras do gênero *Saccharomyces*, sendo, assim, técnicas complementares na identificação de microrganismos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Leveduras

Um total de 72 isolados de leveduras, pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (Anexo 1), isolados de alambiques do sul de Minas Gerais, foi utilizado para a caracterização por técnicas moleculares. Outras 34 leveduras foram isoladas diretamente de alambiques (Anexo 1). Para o isolamento, utilizaram-se amostras de caldo de cana-de-açúcar em fermentação para produção de cachaça.

As amostras foram diluídas em água peptonada 0,1% para 10^{-6} e 10^{-7} e, então, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para placas contendo meio de cultivo YEPG sólido (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 1,5% de ágar). Colônias pertencentes aos diferentes morfotipos foram isoladas. Após isolamento, as leveduras foram armazenadas a -20°C . Para a caracterização molecular, os isolados foram reativados em meio de cultivo YEPG líquido (1% de extrato de levedura, 2% de glicose e 2% de peptona) e incubados a 28°C . Após, foram transferidas para meio de cultivo YEPG sólido.

3.2 Identificação de isolados de leveduras *S. cerevisiae* pela técnica da PCR

Para a identificação dos isolados por PCR, as leveduras foram cultivadas, 18 horas, em meio de cultivo YEPG sólido. Uma colônia isolada foi retirada da placa e colocada diretamente na reação de amplificação usando o par de oligonucleotídeos SCREC114 F (5' CAATCAATGCTTGAGCCTCCTCAG 3') e SCREC114 R (5' AGCGACTCAGGACGCCAAAAC 3'). Estes primers foram desenhados a partir da seqüência do genoma da levedura *S. cerevisiae* (<http://www.genome.stanford.edu/Saccharomyces>). Cada reação de amplificação foi realizada em volume final de 12,5 μL : 6,25 μL de Mix GoTaq®

Green Master 2X (Promega), 0,5 µL de *primer* Fow (25 pmol) (Promega) e 0,5 µL de *primer* Rev (25 pmol) (Promega). As amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 94°C, por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação, a 94°C, por 1 minuto; anelamento, a 65°C, por 45 segundos e extensão, a 72°C, por 1 minuto e 30 segundos, e, um ciclo de extensão final, a 72°C, por 5 minutos.

Após amplificação, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%, por 2,5 horas, a 40 volts. O gel foi corado com brometo de etídeo por 20 minutos e os fragmentos de DNA foram visualizados em transluminador.

3.3 Análise de cariotipagem pela técnica de PFGE

As leveduras foram crescidas, por 48 horas, a 28°C, em meio de cultivo YEPG sólido. Após o crescimento, algumas colônias foram transferidas para Eppendorf contendo 40 µL de uma solução de *Lysing-enzymes* (7mg/mL), em tampão CPES (25 mL: 0,210g de ácido cítrico, 0,426 g de Na₂HPO₄, 0,186g de EDTA, 5,630g de sorbitol, 0,020g de dithiothreitol), homogeneizando-se cuidadosamente. Em seguida, adicionaram-se 40 µL de agarose, preparada em tampão CPE (200 mL: 1,68g de ácido cítrico, 3,41g de Na₂HPO₄, 1,49g de EDTA), em cada Eppendorf contendo as células com as enzimas. Homogeneizou-se delicadamente a mistura que, em seguida, foi transferida para o molde (cavidade de acrílico), para o preparo dos “plugs”. Após solidificação dos “plugs”, estes foram transferidos para Eppendorfs contendo 500 µL de solução CPE e incubados, por 4 horas, a 28°C. Em seguida, a solução CPE foi retirada e acrescentaram-se 500 µL de solução 3 (200 mL: 33,5g de EDTA, 0,24g de Tris, 2,0g de SDS) mais proteinase K (0,75mg de proteinase K/mL de solução 3), mantendo-se em banho-maria, a 50°C, *overnight*. Transcorrido este tempo de incubação, os “plugs” foram lavados com 500 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8,0:3 vezes, a 50°C, por 20 minutos e 4 vezes, a

temperatura ambiente (28°C), por 15 minutos. Os “plugs” foram, então, transferidos para gel de agarose a 1,1%, em tampão TAFE 1 X (1000 mL: 24,0g de Tris, 2,9g de EDTA.Na₂, 5,0 mL de ácido acético glacial).

A corrida eletroforética foi realizada em um sistema CHEF DR II (Bio Rad) contendo tampão TAFE 0,5 X. Para eletroforese, foi utilizada uma voltagem de 6 V/cm, com tempos de pulso de 5 segundos por 1 hora, 60 segundos por 8 horas e 100 segundos por 12 horas.

Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo por 2 horas, e o DNA visualizado em transluminador.

3.4 Extração e análise de restrição do mtDNA

A análise de restrição do mtDNA foi realizada de acordo com Querol et al. (1992), com algumas modificações. As células de leveduras foram crescidas, por 18 horas, em 5 mL de meio líquido YEPG. Em seguida, foram centrifugadas, por 2 minutos, a 10.000 rpm e ressuspensas em 500 µL de sorbitol 1 M, EDTA 0,1 M pH 7,5. Foram transferidas para tubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 20 µL de solução de lyticase (2,5 mg.mL⁻¹) (Sigma). Os tubos foram incubados, a 37°C, por 30 minutos, para a obtenção de esferoplastos. A mistura foi centrifugada, por 5 minutos, a 10.000 rpm e o pellet ressuspensado em 500 µL de TE (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM pH 7,4). Após a ressuspensão do pellet, 50 µL de SDS 10% foram adicionados, incubando-se, a 65°C, por 30 minutos. Foram adicionados 200 µL de acetato de amônia 7 M e, após homogeneização, foram mantidos no gelo. Esta mistura foi centrifugada, a 10.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, no qual o DNA foi precipitado adicionando-se 1 volume de isopropanol. Os tubos foram incubados, a -20°C, por 2 horas e centrifugados, a 10.000 rpm, por 15 minutos. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 20 µL de água Milli-Q autoclavada.

Foram realizadas algumas modificações no protocolo para a extração do mtDNA desenvolvido por Querol et al. (1992). A primeira modificação foi o uso da enzima Litycase. A adição de 20µL de enzima foi testada para duas diferentes concentrações: 2,5 e 5,0mg de enzima.mL⁻¹, não tendo sido verificada diferença, adotando-se, então, o uso de 2,5mg.mL⁻¹. Na etapa de precipitação de proteínas, diferentes soluções foram testadas: fenol:clorofórmio (1:1), clorofórmio:álcool iso-amílico (24:1) e acetato de amônio 7M. Como a precipitação, tanto com fenol:clorofórmio (1:1) quanto com acetato de amônio 7M, teve rendimento semelhante, optou-se pelo uso do acetato de amônio 7M.

A digestão do mtDNA foi realizada utilizando-se as enzimas de restrição *Hae* III (Promega), *Hind* III (Promega), *Hinf* III (Promega) e *Rsa* I (Promega). Cada reação de restrição foi preparada para um volume final de 20 µL. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0%, por 6 horas, a 60 volts. O gel foi corado com brometo de etídeo por 1 hora e o DNA visualizado em transluminador.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização de *S. cerevisiae* por PCR com *primers* específicos

Neste trabalho, foram analisadas, por PCR, 106 leveduras provenientes de 10 alambiques do Sul de Minas Gerais, disponíveis na coleção de culturas do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos. Destas, 72 já haviam sido caracterizadas como *S. cerevisiae* e não *S. cerevisiae*, por técnicas tradicionais, enquanto que 34 não haviam sido caracterizadas (Anexo 1).

A PCR utilizando o par de *primers* SCREC114 permitiu a amplificação de um fragmento único de DNA de tamanho esperado (665pb) em 36 leveduras (Figura 1). Este fragmento amplificado é parte do gene *REC114*, o qual codifica uma proteína de recombinação meiótica descrita até o momento somente no genoma de *S. cerevisiae*. Este gene está localizado no cromossomo XIII desta levedura e é transcrito apenas durante a meiose (Pittman et al., 1993). Como a PCR foi realizada sob condições de alta especificidade, em uma temperatura de anelamento de 65°C, visando favorecer a especificidade do anelamento, estas 36 linhagens amplificadas devem ser da espécie *S. cerevisiae*.

López et al. (2003), visando monitorar linhagens de *S. cerevisiae* inoculadas para a fermentação de vinho, utilizaram a identificação por PCR. A técnica permitiu avaliar a variação do número e da posição dos íntrons do gene mitocondrial *COX1*, na diferenciação de linhagens *S. cerevisiae* inoculadas de outras *S. cerevisiae* selvagens presentes no mosto. A técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos tem se mostrado uma ferramenta rápida e simples na identificação de *S. cerevisiae*.

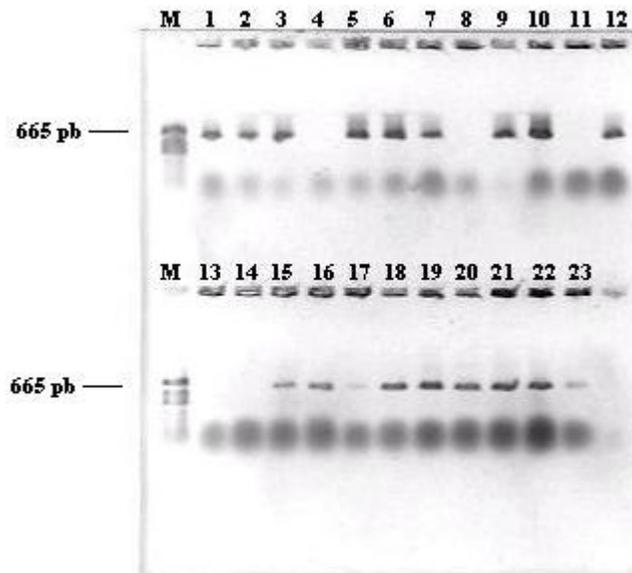


FIGURA 1 Gel de agarose 0,8% de produtos amplificados por PCR. Oligonucleotídeos específicos foram utilizados na amplificação do gene *REC114* de *S. cerevisiae*. M= Marcador phiX-174. Os números correspondem à identificação dos isolados, conforme Anexo 1 e Tabela 1.

Os resultados para todos os 106 isolados analisados por PCR estão compilados na Tabela 1, comparados com os dados da caracterização, por técnicas tradicionais, de cada alambique. A partir destes dados, é possível observar que o número de leveduras identificadas como *S. cerevisiae* por PCR foi menor do que aquele obtido pelas técnicas tradicionais. Uma possível explicação para este fato é o de que análises morfológicas e fisiológicas podem ser insuficientes ou levar a conclusões errôneas. Características fenotípicas refletem, geralmente, a adaptação das linhagens nas condições ambientais locais, mas não necessariamente seu status taxonômico (Montrocher et al., 1998). Uma observação importante foi que, em leveduras anteriormente classificadas como não *S. cerevisiae*, não foi observado nenhum produto de amplificação por PCR.

Todas as leveduras que não apresentaram amplificação foram submetidas a uma segunda reação para a confirmação destes resultados e, novamente, não foi observada a presença de produto de amplificação por PCR. A amplificação realizada diretamente da colônia foi muito eficiente, sendo rápida e simples, sem a necessidade da extração do DNA total das leveduras isoladas.

A grande vantagem de se ter um oligonucleotídeo específico para identificação de *S. cerevisiae*, como o SCREC114, seria uma identificação rápida e eficiente da presença e da persistência desta linhagem durante o processo de fermentação. Além disso, o uso desta técnica pode evitar ambigüidade taxonômica, já que este gênero frequentemente tem nichos ecológicos similares e fenótipos aparentemente idênticos a outros gêneros de leveduras. A correta identificação e classificação de microrganismos é de extrema importância prática, tanto para indústria quanto para a saúde dos consumidores. A qualidade do produto final da cachaça pode ser assegurada, acompanhando-se a persistência de um inóculo utilizado na fase inicial da fermentação por esta técnica.

TABELA 1 Identificação e caracterização de *S. cerevisiae*, por técnicas tradicionais e moleculares

Isolado	Alambique	Téc. Trad.*	PCR*	Perfil PFGE	Isolado	Alambique	Téc. Trad.*	PCR*	Perfil PFGE
1	1	+	+	I	54	3	+	-	III
2	1	+	-	IV	55	3	+	-	III
3	1	+	+	I	56	3	+	-	III
4	1	+	-	IV	57	3	+	-	III
5	1	+	+	I	58	3	+	-	III
6	2	+	+	I	59	3	+	+	III
7	2	+	+	II	60	3	+	+	IV
8	2	+	+	I	61	3	+	+	VI
9	2	+	+	I	62	3	+	-	VI
10	2	+	-	VII	63	6	+	-	VI
11	2	+	+	II	64	6	+	-	V
12	2	+	+	I	65	6	+	-	V
13	2	+	+	II	66	6	+	-	V
14	2	+	+	I	67	6	+	-	VI
15	3	+	+	II	68	6	+	-	VI
16	3	+	+	II	69	6	+	-	VI
17	3	+	+	II	70	6	+	-	III
18	3	+	+	II	71	6	+	-	III
19	3	+	+	II	72	6	+	-	III
20	3	+	+	II	73	8		+	IV
21	3	+	-	IV	74	8		+	III
22	4	+	-	VII	75	8		+	III
23	4	+	-	VII	76	8		+	III
24	4	+	+	IV	77	8		+	IV
25	4	+	-	VII	78	8		+	IV
26	5	+	-	VII	79	8		+	IX
27	5	+	+	I	80	8		+	IX
28	5	+	+	I	81	8		+	IX
29	5	+	+	I	82	8		+	IX
30	5	+	+	I	83	9		-	I
31	5	+	+	I	84	9		-	I
32	1	-	-	V	85	9		-	I

Continua...

TABELA 1, Cont.

33	5	-	-	VIII	86	9	-	I
34	5	-	-	VIII	87	9	-	VI
35	5	-	-	VIII	88	9	-	VI
36	6	-	-	III	89	9	-	VI
37	6	-	-	III	90	9	-	VI
38	6	-	-	IV	91	9	-	VI
39	6	-	-	IV	92	9	-	VI
40	7	-	-	VII	93	9	-	VI
41	7	-	-	IX	94	9	-	VI
42	7	-	-	IX	95	10	-	I
43	1	+	-	I	96	10	-	I
44	1	+	-	I	97	10	-	I
45	1	+	-	I	98	10	-	I
46	1	+	-	I	99	10	-	I
47	1	+	-	I	100	10	-	I
48	1	+	-	I	101	10	-	II
49	3	+	-	I	102	10	-	II
50	3	+	-	I	103	10	-	I
51	3	+	-	II	104	10	-	I
52	3	+	-	II	105	10	-	I
53	3	+	-	III	106	10	-	I

*+ = *S. cerevisiae*, presença de bandas por PCR e de características morfofisiológicas

- = Não *S. cerevisiae*, ausência de bandas por PCR e de características morfofisiológicas.

4.2 Cariotipagem de leveduras por PFGE

Todas as 106 leveduras analisadas por PCR também foram submetidas à análise do cariótipo, por meio de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), com o objetivo de verificar o perfil de cromossomos das leveduras isolados nos alambiques. Pequenas variações na mobilidade dos cromossomos podem ser resultado do seu polimorfismo de comprimento, o qual pode ser utilizado para a identificação de linhagens (Jemec et al., 2001). Dentre as leveduras isoladas, foram encontrados nove diferentes perfis eletroforéticos em relação ao perfil do marcador *S. cerevisiae* (Bio Rad), como indicados na Figura 2. Os diferentes perfis cromossomais para os 106 isolados foram incluídos na Tabela 1. Dois

perfis (I e II) foram semelhantes ao perfil da levedura *S. cerevisiae*, utilizada como marcador, em relação ao número de fragmentos de DNA, embora tenha sido verificada uma diferença na posição de um desses fragmentos de DNA.

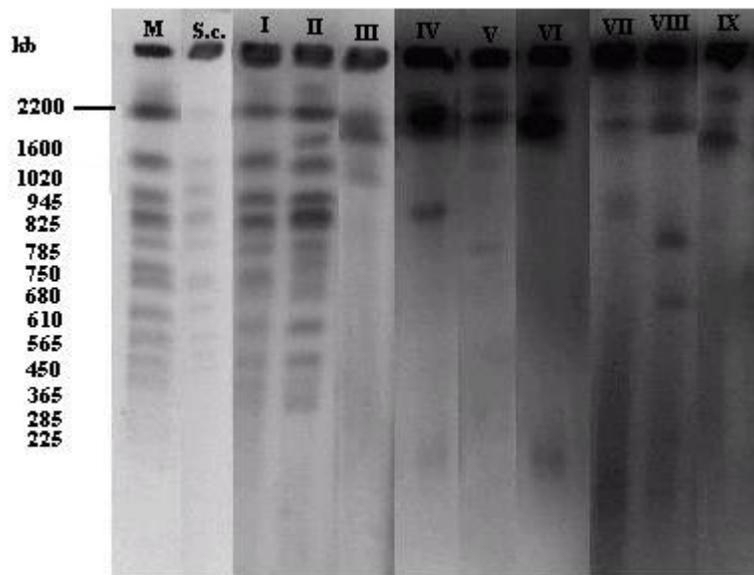


FIGURA 2 Gel de agarose de uma eletroforese de campo pulsado de leveduras. M = marcador *S. cerevisiae* (BioRad). S.c. = *S. cerevisiae* CA 116. Linhagens usadas: I – Isolado 3; II – Isolado 7; III – Isolado 54; IV – Isolado 21; V – Isolado 64; VI – Isolado 67; VII – Isolado 40; VIII – Isolado 33; IX – Isolado 41.

Na comparação entre o cariótipo da linhagem *S. cerevisiae* CA 116 (Figura 2) com os perfis I e II, estes parecem ser idênticos, sugerindo que podem ser a mesma linhagem.

Os demais perfis encontrados mostraram-se bem diferentes do marcador utilizado, uma vez que apresentaram um menor número de bandas. Alguns isolados de leveduras apresentaram número de bandas idêntico, porém, com

posições diferentes. Embora saibamos que estes perfis não pertençam a *S. cerevisiae*, não é possível afirmar a que gênero eles pertencem, uma vez que não foi usado um marcador apropriado para outros gêneros. Os diferentes gêneros de leveduras apresentam número de cromossomos diferentes. Por exemplo, *Schizosacharomyces* possui 3, *Kluyveromyces* de 6 a 13, *Hansenula* 4 e *Guilliermondella* 2 (Walker, 1998).

A maioria dos isolados considerados *S. cerevisiae* por PCR teve perfil de cromossomos semelhante ao do marcador utilizado (Tabela 1), uma vez que somente quatro isolados não apresentaram este padrão. Por outro lado, dezesseis leveduras isoladas não mostraram produto de amplificação e, no entanto, apresentaram perfil cromossomal semelhante ao do marcador.

Considerando-se a análise por técnicas tradicionais e os perfis eletroforéticos encontrados, verificou-se um maior número de resultados discordantes, ou seja, leveduras isoladas caracterizadas tradicionalmente como *S. cerevisiae* mostraram perfil diferente do marcador *S. cerevisiae*.

Utilizando-se a técnica de PFGE é possível também realizar o acompanhamento da levedura inoculada durante todo o processo fermentativo e, dessa forma, verificar sua persistência durante o processo. Para isso, é necessário que se tenha o perfil eletroforético da linhagem da levedura inoculada.

Um estudo de linhagens nativas de *S. cerevisiae* em diferentes adegas pertencentes à *Valdepeñas Appellation d'Origine Controlée* foi realizado por Briones et al. (1996), por meio de análise do cariótipo eletroforético. Visando determinar a variabilidade e verificar a presença de uma população de leveduras características em cada adega, estes autores verificaram que os 392 isolados estudados pertenciam ao complexo *Saccharomyces sensu stricto*, mostrando 13 cromossomos de tamanho variando entre 200 e 2.000 kb. Os autores demonstraram a existência de uma diversidade genética nas diferentes adegas,

uma vez que, dos 392 isolados, foram obtidos 174 perfis diferentes, dos quais 26 foram predominantes (9 na adega A, 11 na adega B e 6 na adega C).

Esta técnica também foi utilizada por Valero et al. (2006), para analisar a biodiversidade e a dinâmica da população natural de *S. cerevisiae* presente em uma vinícola onde se utiliza levedura seca ativa como iniciadora da fermentação. De 2.160 colônias isoladas, 608 foram identificadas como sendo do gênero *Saccharomyces* e, destas, 104 apresentaram padrões cromossômicos diferentes, sendo 91 únicos.

4.3 Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição do mtDNA

A análise de restrição do DNA mitocondrial também consiste de uma ferramenta bastante utilizada na diferenciação de espécies de leveduras presentes nos processos fermentativos (López et al., 2001).

Realizou-se a análise de restrição do DNA mitocondrial dos 36 isolados identificados, pela técnica da PCR, como *S. cerevisiae*. As enzimas utilizadas foram *Hae* III, *Hind* III, *Hinf* I e *Rsa* I. Os perfis de restrição apresentados pelos 36 isolados analisados pela técnica de RFLP-mtDNA, com cada uma das enzimas utilizadas, encontram-se na Tabela 2. A restrição com a enzima *Rsa* I (Figura 3A) resultou em 3 diferentes perfis (I, II e III), com predominância do perfil I, encontrado em 21 leveduras. Com a enzima *Hae* III (Figura 3B) também foram observados 3 perfis (IV, V e VI), tendo prevalecido o perfil V (29 isolados). A enzima *Hinf* I (Figura 3C) apresentou apenas 2 perfis (VII e VIII), com maior número de isolados pertencendo ao perfil VII (20 isolados), e a enzima *Hind* III (Figura 3D) apresentou 2 perfis (IX e X), sendo 18 isolados de cada perfil. A enzima *Hae* III revelou maior número de isolados com o mesmo perfil eletroforético, estando de acordo com os resultados obtidos pelo PCR de 36 isolados e a análise de PFGE de 32 isolados. Este resultado sugere que estes 29 isolados podem ser todos *S. cerevisiae*. As três técnicas apresentaram

resultados semelhantes em relação à identificação de leveduras *S. cerevisiae*, sendo 36 por PCR, 32 por PFGE e 29 por RFLP-mtDNA.

TABELA 2 Perfis de restrição do mtDNA apresentados pelos 36 isolados de leveduras identificados como *S. cerevisiae* por PCR

Isolados	<i>Rsa</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hlnf</i> I	<i>Hind</i> III
1	I	V	VII	IX
3	II	V	VIII	IX
5	II	V	VIII	X
6	I	IV	VIII	IX
7	I	V	VII	IX
8	II	V	VIII	X
9	II	V	VIII	X
11	II	V	VII	X
12	I	IV	VII	IX
13	II	V	VIII	X
14	I	V	VIII	IX
15	II	V	VII	X
16	I	V	VIII	X
17	II	V	VIII	IX
18	I	V	VIII	IX
19	I	IV	VII	X
20	I	V	VII	IX
24	I	V	VIII	IX
27	I	V	VII	X
28	II	V	VII	X
29	I	V	VII	IX
30	I	IV	VII	IX
31	I	V	VII	IX
59	III	VI	VII	IX
60	I	V	VIII	X
61	I	V	VII	X
73	III	VI	VII	X
74	I	V	VIII	IX
75	II	V	VII	X
76	I	VI	VII	X
77	I	V	VII	IX

Continua...

TABELA 2, Cont.

78	III	V	VII	X
79	I	V	VIII	X
80	II	V	VIII	IX
81	I	V	VII	IX
82	II	V	VIII	X

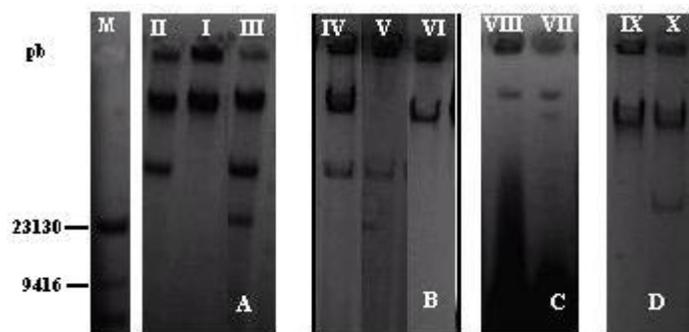


FIGURA 3 Análise de restrição do mtDNA de leveduras identificadas como *S. cerevisiae*. M = marcador λ *Hind* III. A= enzima *Rsa*I. B= enzima *Hae*III. C= enzima *Hinf*I. D= Enzima *Hind*III.

Para avaliar a eficiência da técnica RFLP-mtDNA para a caracterização dos isolados de alambiques, seria necessária a análise dos demais isolados caracterizados como não *S. cerevisiae*. Perfis diferentes daqueles observados para isolados *S. cerevisiae* com determinada enzima poderiam ser usados com sucesso na diferenciação de leveduras isoladas de diferentes sistemas de fermentação.

A diversidade genética de linhagens de *S. cerevisiae* isoladas durante a fermentação espontânea de mosto de três variedades de vinho branco de Galícia (Espanha) foi estudada, por meio de análise de restrição do mtDNA, por Blanco et al. (2006). De um total de 446 linhagens isoladas no início, meio e final da fermentação, foram encontrados 19 diferentes perfis. Alguns apareceram com elevada frequência, indicando que aquele isolado possui habilidade para

conduzir o processo de fermentação. Algumas linhagens foram encontradas em todas as etapas da fermentação, porém, a maioria apareceu em baixa frequência. Estes autores também verificaram que a linhagem predominante foi diferente para cada variedade, o que indica que algumas linhagens são mais adaptadas a certas condições do mosto.

Fernández-Espinar et al. (2001) estudaram a autenticidade de 45 leveduras *S. cerevisiae* comercializadas na forma desidratada, utilizando esta mesma técnica. A análise de restrição do mtDNA das leveduras utilizando a enzima *Hinf* I forneceu perfis únicos para 17 das 45 linhagens, que puderam, então, ser consideradas como linhagens individuais. As demais 28 linhagens apresentaram oito perfis diferentes.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as técnicas de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para *S. cerevisiae*, PFGE utilizando marcadores de *S. cerevisiae* e RFLP-mtDNA utilizando a enzima *Hae* III apresentaram resultados semelhantes em relação à identificação de linhagens de leveduras da espécie *S. cerevisiae* isoladas de alambiques do Sul de Minas Gerais.

5 CONCLUSÕES

A amplificação por PCR utilizando *primers* SCREC114, específicos para a identificação de leveduras *S. cerevisiae*, bem como a amplificação direta da colônia mostraram ser uma técnica fácil, rápida e eficiente na identificação de *S. cerevisiae*;

A análise do cariótipo mostrou perfil semelhante ao marcador, para a maioria dos isolados de leveduras identificados com *S. cerevisiae* por PCR, indicando ser uma técnica que pode ser também utilizada na caracterização e na identificação de leveduras;

As técnicas moleculares de PCR e PFGE mostraram-se como boas ferramentas para a identificação de leveduras *S. cerevisiae*, uma vez que seus resultados foram, para a maioria dos isolados, concordantes.

A técnica do polimorfismo de fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (RFLP/mtDNA) apresentou resultados semelhantes aos obtidos pelas técnicas PCR e PFGE utilizando a enzima *HaeIII* (29 perfis semelhantes para 36 isolados identificados como *S. cerevisiae*), porém, há necessidade de análises complementares para a verificação do perfil eletroforético de isolados identificados como não *S. cerevisiae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. Yeast: characteristic and identification. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press,1990. 1002p.

BELTRAN, G.; TORIJA, M.J.; NOVO, M.; FERRER, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; ROZÈS, N.; MAS, A. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. **Systematic and Applied Microbiology**, v.25, p.287-293, 2002.

BLANCO, P.; RAMILO, A.; CERDEIRA, M.; ORRIOLS, I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). **Antonie van Leeuwenhoek**, v.89, p.351-357, 2006.

BRASIL. Decreto n.º 4.851, de 2 de outubro de 2003. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.senado.gov.br>. Acesso em 20 jul. 2006.

BRIONES, A.I.; UBEDA, J.; GRANDO, M.S. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.369-377, 1996.

CANAS, P.M.I.; IRANZO, J.F.U.; PEREZ, A.I.B. Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepenas in two consecutive vintages. **Food Microbiology**, v.14, p.221-225, 1997.

CLEMENTE-JIMENEZ, J.M.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F.J.; RODRÍGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, v.21, p.149-155, 2004.

COMI, G.; MAIFRENI, M.; MANZANO, M.; LAGAZIO, C.; COCOLIN, L. Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). **International Journal of Food Microbiology**, v.58, p.117-212, 2000.

- DIMMER, K.S.; FRITZ, S.; FUCHS, F.; MESSERSCHMITT, M.; WEINBACH, N.; NEUPERT, W.; WESTERMANN, B. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.847-853, 2002.
- DUARTE, F.L.; PAIS, C.; SPENCER-MARTINS, I.; LEÃO, C. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1907-1913, 1999.
- ESTANISLAU, M.L.L.; CANÇADO JÚNIOR, F.L.; PAIVA, B.M. de. Mercado atual e potencial da cachaça. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.19-24, 2002.
- ESTEVE-ZARZOSO, B.; GOSTÍN CAR, A.; BOBET, R.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the 'El Penèdes' area (Spain). **Food Microbiology**, v.17, p.553-562, 2000.
- FERNÁNDEZ, M.T.; UBEDA, J.F.; BRIONES, A.I. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. **FEMS Microbiology Letters**, v.173, p.223-229, 1999.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T.; LÓPEZ, V.; RAMÓN, E.; BARTRA, E.; QUEROL, A. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.1-10, 2001.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FOURY, F.; ROGANTI, T.; LECRENIER, N.; PURNELLE, B. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v.440, p.325-331, 1998.
- GUERRA, J.B.; ARAÚJO, R.A.C.; PATARO, C.; FRANCO, G.R.; MOREIRA, E.S.A.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; ROSA, C.A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.106-111, 2001.

GUTIÉRREZ, A.R.; LÓPEZ, R.; SANTAMARÍA, M.P.; SEVILLA, M.J. Ecology of inoculated and spontaneous fermentations in Rioja (Spain) musts, examined by mitochondrial DNA restriction analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.241-245, 1997.

HIERRO, N.; GONZÁLEZ, A.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M. New PCR-based methods for yeast identification. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.792-801, 2004.

JEMEC, K.P.; CADEZ, N.; ZAGORC, T.; BUBIC, V.; ZUPEC, A.; RSAPOR, P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. **Food Microbiology**, v.18, p.247-259, 2001.

JONG, A.Y.; WANG, B.; ZHANG, S.Q. Pulsed field gel electrophoresis labeling method to study the pattern of *Saccharomyces cerevisiae* chromosomal DNA synthesis during the G1/S phase of the cell cycle. **Analytical Biochemistry**, v.227, p.32-39, 1995.

LOPES, M.B.; SODEN, A.; HENSCHKE, P.A., LANGRIDGE, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4514-4520, 1996.

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

LÓPEZ, V.; QUEROL, A.; RAMÓN, D.; FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, p.75-81, 2001.

MARINONI, G.; MANUEL, M.; PETERSEN, R.F.; HVIDTFELDT, J.; SULO, P.; PISKUR, J. Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.20, p.6488-6496, 1999.

MAYORAL, M.B.; MARTÍN, R.; SANZ, A.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; GARCÍA, T. Detection of *Kluyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using a PCR-culture technique. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p.27-34, 2005.

MONTROCHER, R.; VERNER, M.C.; BRIOLAY, J.; GAUTIER, C.; MARMEISSE, R. Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group

based on polymorphism of rDNA spacer sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.1, p.295-303, 1998.

MOZINA, S.S.; DLAUCHY, D.; DEAK, T.; RASPOR, P. Identification of *Saccharomyces sensu stricto* and *Torulaspota* yeasts by PCR ribotyping. **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.311-315, 1997.

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

PATARO, C.; GOMES, F.C.O.; ARAÚJO, R.A.C.; ROSA, C.A.; SCHWAN, R.F.; CAMPOS, C.R.; CLARET, A.S.; CASTRO, H.A. de. Utilização de leveduras selecionadas na fabricação da cachaça de alambique. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.23, n.217, p.37-43, 2002.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.24-31, 2000.

PITTMAN, D.; LU, W.; MALONE, R.E. Genetic molecular analysis of REC114, an early meiotic recombination gene in yeast. **Current Genetic**, n.23, v.4, p.295-304, 1993.

PRAMATEFTAKI, P.V.; LANARIDIS, P.; TYPAS, M.A. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.236-248, 2000.

QUEROL, A.; BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Research**, v.18, n.6, p.1657, 1990.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RÁMON, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. **Systematic Applied Microbiology**, v.15, p.439-446, 1992.

RAINIERI, S.; ZAMBONELLI, C.; KANEKO, Y. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetic diversity and evolution. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 1, p.1-9, 2003.

RODRIGUES, A.M.; SANT'ANNA, E.S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.1, p.57-62, jan.-abr. 2001.

RUIZ-BARBA, J.L.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Small scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. **Analytical Biochemistry**, v.347, p.333-335, 2005.

SANZ, A.; MARTÍN, R.; MAYORAL, M.B.; HERNÁNDEZ, P.E.; GONZÁLEZ, I.; LACARRA, T.G. Development of a PCR-culture technique for rapid detection of yeast species in vacuum packer ham. **Meat Science**, v.71, p.230-237, 2005.

SCHULLER, D.; VALERO, E.; DEQUIN, S.; CASAL, M. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.231, p.19-26, 2004.

SHUTT, T.E.; GRAY, M.W.; Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. **Trends in Genetics**, v.22, n.2, p.90-95, 2006.

STEINKAMP-ZUCHT, A.; FAHRIG, R. Monitoring of induced chromosomal aberrations in *S. cerevisiae* in agarose gels by pulsed field gel electrophoresis. **Environmental Mutagenesis**, v.335, n.285-292, 1995.

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

VALERO, E.; CAMBON, B.; SCHULLER, D.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. **FEMS Yeast Research**, 2006.

VILELA, E.S.D.; SGARBIERI, V.C.; ALVIM, I.D. Determinação do valor protéico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, v.13, n.3, p.185-192, set./dez. 2000.

WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chicheste, England: John Willy, 350p. 1998.

WATSON, J.D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **O DNA recombinante**. 2. ed. 646p. 1997.

ANEXO

TABELA 1A Leveduras isoladas de alambiques pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras

TABELA 1A Isolados de leveduras pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Fisiologia e Genética de Microrganismos, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras

Isolados	Leveduras
1	<i>S. cerevisiae</i> 15
2	<i>S. cerevisiae</i> 20
3	<i>S. cerevisiae</i> 33
4	<i>S. cerevisiae</i> 36
5	<i>S. cerevisiae</i> 76
6	<i>S. cerevisiae</i> 93
7	<i>S. cerevisiae</i> 108
8	<i>S. cerevisiae</i> 112
9	<i>S. cerevisiae</i> 123
10	<i>S. cerevisiae</i> 128
11	<i>S. cerevisiae</i> 135
12	<i>S. cerevisiae</i> 142
13	<i>S. cerevisiae</i> 143
14	<i>S. cerevisiae</i> 147
15	<i>S. cerevisiae</i> 155
16	<i>S. cerevisiae</i> 162
17	<i>S. cerevisiae</i> 163
18	<i>S. cerevisiae</i> 208
19	<i>S. cerevisiae</i> 218
20	<i>S. cerevisiae</i> 219
21	<i>S. cerevisiae</i> 220
22	<i>S. cerevisiae</i> 271
23	<i>S. cerevisiae</i> 272
24	<i>S. cerevisiae</i> 381
25	<i>S. cerevisiae</i> 498
26	<i>S. cerevisiae</i> 503
27	<i>S. cerevisiae</i> 506
28	<i>S. cerevisiae</i> 508
29	<i>S. cerevisiae</i> 509
30	<i>S. cerevisiae</i> 526
31	<i>S. cerevisiae</i> 526*
32	Não <i>S. cerevisiae</i> 19
33	Não <i>S. cerevisiae</i> 502
34	Não <i>S. cerevisiae</i> 562
35	Não <i>S. cerevisiae</i> 582

Continua...

TABELA 1A, Cont.

36	Não <i>S. cerevisiae</i> 632
37	Não <i>S. cerevisiae</i> 635
38	Não <i>S. cerevisiae</i> 680
39	Não <i>S. cerevisiae</i> 693
40	Não <i>S. cerevisiae</i> 723
41	Não <i>S. cerevisiae</i> 731
42	Não <i>S. cerevisiae</i> 750
43	MF1 inoc 24/02/05 – 01/03/05
44	MF2 inoc 24/02/05 – 01/03/05
45	MF2 inoc 24/02/05 – 01/03/05 Ab
46	MF3 inoc 24/02/05 – 01/03/05
47	MF3 inoc 24/02/05 – 01/03/05 Ab
48	MF4 inoc 24/02/05 – 01/03/05
49	MF5 inoc 24/02 – 01/03/05
50	MF 24/01 - /03/05*
51	MF 24/01 - /03/05**
52	MF 16/02 - /03/05
53	MF 26/02
54	MC 16/02 - /03/05
55	MC 16/02 - /03/05*
56	MC 24/01 - /03/05
57	MC 24/01 - /03/05*
58	MC 26/12
59	MF 16/02 - 03/05*
60	“outra”
61	MC1 inoc 24/02/05 – 01/03/05
62	MC2 inoc 24/02/05 – 01/03/05
63	MC3 inoc 24/02/05 – 01/03/05
64	MC4 inoc 24/02/05 – 01/03/06
65	MC5 inoc 24/02/05 – 01/03/05
66	MC 24 inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
67	MC 25 inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
68	MC 26 inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
69	MC 29 inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
70	MC 29* inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
71	MC 30 inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
72	MC 30* inoc 24/02/05 estr 02/03 19/03/05
73	D1M1
74	D2M1

Continua...

TABELA 1A, Cont.

75	D3M1
76	D4M1
77	D1M2
78	D2M2
79	D3M2
80	D4M2
81	B01
82	B02
83	M1.1
84	M1.2
85	M1.3
86	M1.4
87	M2.1
88	M2.2
89	M2.3
90	M2.4
91	M3.1
92	M3.2
93	M3.3
94	M3.4
95	1.1
96	1.2
97	1.3
98	1.4
99	2.1
100	2.2
101	2.3
102	2.4
103	3.1
104	3.2
105	3.3
106	3.4

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)