

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Ciências Biológicas**

Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” por PCR-fingerprinting

Scheila Karina Brito dos Santos

**Recife
2006**

Scheila Karina Brito dos Santos

Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” por
PCR-fingerprinting

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Mestrado de Ciências
Biológicas do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco como pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, área de
concentração - Biologia molecular.

Orientador:
Prof. Dr.Marcos Antônio de Moraes Júnior

Recife, 2006

Santos, Scheila Karina Brito dos

Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” por PCR-fingerprinting / Scheila Karina Brito dos Santos. – Recife: O Autor, 2006.

71 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2006.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Biologia molecular 2. Leveduras híbridas 3. *Saccharomyces* 4. Fermentação I. Título.

577.21 CDU (2.ed.)

UFPE

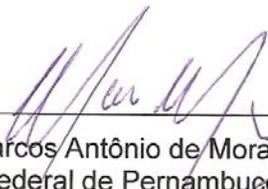
572.8 CDD (22.ed.)

CCB – 2007-127

Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* "sensu stricto" por
PCR-fingerprinting

Comissão Examinadora

ORIENTADOR:



Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE

EXAMINADORES:



Profª. Cristina Maria da Souza Motta
Departamento de Micologia - UFPE



Profª. Neiva Tinti de Oliveira
Departamento de Micologia - UFPE

SUPLENTE:

•

Prof. Valdir Balbino de Queiroz
Departamento de Genética - UFPE

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife-PE

Recife, 05 de dezembro de 2006.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar à oportunidade de encontrar pessoas importantes que contribuíram para minha formação como pessoa e por me dar forças para superar as adversidades.

A minha família, em especial aos meus pais, José Carlos dos Santos por todo apoio e segurança e a Ivanise Brito dos Santos por está sempre presente em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior pela oportunidade e pelo grande conhecimento passado.

A Anna Theresa de Souza Liberal pelo companheirismo e grande força prestada para a realização deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos colegas de laboratório de genética de microrganismo pela amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1.0 - INTRODUÇÃO	11
2.0 - JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO	13
3.0 - OBJETIVO	14
3.1 - Objetivo Geral.....	14
3.2 - Objetivos específicos.....	14
4.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
4.1 – Filo Ascomycota	15
4.2 – O gênero <i>Saccharomyces</i>	17
4.2.1 - O Complexo <i>Saccharomyces</i> “sensu stricto”	18
4.3 - Taxonomia convencional.....	19
4.4 - Taxonomia molecular	21
4.4.1 - Identificação genética	24
4.4.2 - Análises fenéticas	26
4.4.3 - Análises fenéticas de leveduras de fermentação alcoólica	28
4.5 - Considerações finais	30
5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
6.0 - ARTIGO CIENTÍFICO	37
7.0 – CONCLUSÕES	58
8.0 - ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

1) Revisão bibliográfica

- Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura de células das leveduras do Filo Ascomycota: *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Kluyveromyces marxianus* (B) e *Brettanomyces anomalus* (C). Retirado do banco de imagens da coleção CLIB (Thiverval-Grignon, França) (www.inra.fr/clib).....15
- Figura 2. Microscopia óptica de ascos formados pela esporulação de células de *S. cerevisiae* mostrando a formação de quatro ascosporos (A) ou de três e dois ascosporos (B). Retirado do banco de imagens da coleção CLIB (Thiverval-Grignon, França) (www.inra.fr/clib).....16
- Figura 3. Dendrograma de distância genética baseada na análise das seqüências do gene que codifica a glutamato desidrogenase em diferentes leveduras do complexo *Saccharomyces sensu stricto* e leveduras da família *Saccharomycetales* (Fonte: Laboratório Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPE).....22
- Figura 4. Padrão de bandas de DNA gerado pela amplificação de amostras de isolados industriais de leveduras da fermentação alcoólica com o oligonucleotídeo de microssatélite (GTG)₅. As linhas de 1 a 8 representam o padrão espécie-específico para *S. cerevisiae* e as linhas 9 e 10 representam o padrão espécie-específico para a levedura *D. bruxellensis* (Fonte: Laboratório Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPE).....30

2) Artigo Científico

- Figura 1. Perfis de amplificação das espécies de levedura do complexo *Saccharomyces sensu stricto* com a utilização dos oligonucleotídeos (GTG)₅ (painel A), (GACA)₄ (painel B), M13 (painel C) e E11 (painel D). Linha 1: *S. cerevisiae* Y 12632; Linha 2: *S. paradoxus* Y 17217; Linha 3: *S. paradoxus* CLIB 228; Linha 4: *S. bayanus* Y 12624; Linha 5: *S. bayanus* CLIB 181; Linha 6: *S.*

uvarum CLIB 533; Linha 7: *S. pastorianus* Y 27171; Linha 8: *S. carlsbergensis* CLIB 176; Linha 9: *S. monacensis* CLIB 180; Linha 10: *S. cariocanus* Y 27337; Linha 11: *S. mikatae* Y 27341; Linha 12: *S. kudriavzevii* Y 27339.....47

Figura 2. Perfis de amplificação com o oligonucleotídeo (GTG)₅ das leveduras *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 1), *S. bayanus* WY1 (Linha 2), *S. uvarum* WY2 (Linha 3), *S. pastorianus* Y 27171 (Linha 4), *S. pastorianus* GDB 776 (Linha 5), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 6), *S. uvarum* CLIB 533 (Linha 7), *S. uvarum* GDB 777 (Linha 8) e *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 9). Os valores apresentados correspondem ao tamanho das bandas da linhagem Y 12632.....48

Figura 3. Padrão de restrição do gene MET2 das linhagens *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 1), *S. bayanus* WY1 (Linha 2), *S. uvarum* WY2 (Linha 3), *S. pastorianus* GDB 776 (Linha 4), *S. uvarum* GDB 777 (Linha 5), *S. bayanus* CLIB 181 (Linha 7) e *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 8). O marcador de peso molecular 100 bp-ladder (Invitrogen) foi usado para se determinar o tamanho das bandas geradas (linha 6).....49

Figura 4. Perfis de amplificação com os oligonucleotídeos (GTG)₅ (painel A), (GACA)₄ (painel B), M13 (painel C) e EI1 (painel D) das linhagens *Saccharomyces* sp. GDB 276 (Linha 1), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 2) e *S. uvarum* WY2 (Linha 3).....50

Figura 5. Padrão de restrição dos fragmentos do gene MET2 (painel A) e do locus YCL008c (painel B) das linhagens *S. bayanus* CLIB 181 (Linha 1), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 2), *Saccharomyces* sp. GDB 276 (Linha 3) e do híbrido *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 8). O marcador de peso molecular 100 bp-ladder (Invitrogen) foi usado para se determinar o tamanho das bandas geradas (Linha 4).....50

LISTA DE TABELAS

1) Artigo

Tabela 1 - -Leveduras usadas neste trabalho e suas respectivas procedências	42
Tabela 2. - Leveduras usadas neste trabalho e seus padrões de restrição do loco ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.....	45
Tabela 3. - Linhagens reclassificadas de acordo com os resultados deste trabalho.....	51

RESUMO

A relação biológica de leveduras industrialmente importantes do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” causa equívoco na correta identificação das leveduras. Por isso, este trabalho apresenta a técnica de PCR - fingerprinting com diferentes marcadores que identificaram com eficiência as verdadeiras espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e indicaram os híbridos naturais isolados de processos industriais. Linhagens tipo, linhagens comerciais de vinho e leveduras isoladas de vinho artesanal foram submetidas à análise de PCR - fingerprinting usando oligonucleotídeos únicos (SPAR) e análise de restrição de genes ribossomais e estruturais. Todas as seis espécies reconhecidas do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” foram discriminadas e erros na taxonomia anterior das leveduras de vinho foram observados. Além disso, estes marcadores SPAR mostraram a complexidade da constituição híbrida dos isolados industriais. O uso de marcadores SPAR pode ajudar na identificação de leveduras isoladas da indústria e do meio ambiente dentre uma das seis espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e seus híbridos interespecíficos, e na reclassificação de linhagens depositadas em coleções de leveduras. Embora este conjunto de marcadores falhe em determinar a contribuição de parentais no processo de hibridização, pode eficientemente traçar a dispersão de leveduras híbridas que foram originadas em eventos simples de hibridização. O padrão único gerado pelos marcadores SPAR foi bastante eficiente no monitoramento da população de leveduras durante o processo de fermentação industrial e pode detectar a aproximação de leveduras híbridas em cada meio ambiente.

Palavras chaves: Taxonomia molecular, PCR - fingerprinting, Complexo *Saccharomyces* sensu stricto, SPAR, leveduras híbridas.

ABSTRACT

The biological relatedness of the industrially important yeast of the *Saccharomyces sensu stricto* complex causes mistakes in correct yeast identification. Therefore, this work presents a PCR-fingerprinting set of markers that can efficiently identify the true species of this complex and point out the hybrid nature of industrial isolates. Type strains, commercial wine strains and artizanal wine yeast isolates were submitted to PCR-fingerprinting analysis using Single Oligonucleotídeo Amplification Reactions (SPAR), PCR ribotyping and single gene RFLP analysis. All six recognizable yeasts species of the sensu stricto complex were discriminated and mistakes in previous taxonomy of wine yeasts were observed. Moreover, these SPAR markers showed the complexity of the hybrid constitution of industrial isolates. The use of SPAR markers can help in identifying industrial and environmental yeasts isolates within one of the six species of the sensu stricto, and their interspecific hybrids, and in re-classifying strains deposited at yeast collections. Although this set of markers fails in determining the contribution of parental yeasts in the hybridization process, it can efficiently trace the dispersion of yeast hybrids that can be originated in single events of hybridization. The unique patterns generated by the SPAR markers might be useful in monitoring the yeast population during industrial fermentation processes and can detect the appearance of yeast hybrids in such environment.

Keywords: molecular taxonomy, PCR-fingerprinting, sensu stricto, SPAR, yeast hybrids.

1.0 - INTRODUÇÃO

O complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” é constituído por seis espécies de leveduras que correspondem a *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii*, e pelos híbridos interespecíficos do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” *S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. monacensis* e *S. carlsbergensis* (Vaughan-Martini, A. and Martini, A., 1998). Estas leveduras apresentam características bioquímicas e fisiológicas muito semelhantes, o que faz com o que a identificação de seus isolados a partir dos métodos bioquímicos convencionais seja uma tarefa muito difícil (Vaughan-Martini, A. and Martini, A., 1998). Estas espécies de levedura são muito utilizadas do ponto de vista industrial, pois estão envolvidas na produção de bebidas alcoólicas fermentadas (cerveja, vinhos e cidras, dentre outras) e destiladas (cachaça e whisky, dentre outras) e a qualidade destas bebidas depende em grande parte da espécie e da linhagem utilizada, pois as células de levedura produzem, durante a fermentação, compostos que conferem aroma e sabor ao produto final (Walker, 1998). Portanto, a correta identificação das linhagens industriais tem relevância do ponto de vista comercial e biotecnológico, além de contribuir para o entendimento do processo de especiação do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”.

A grande similaridade fisiológica entre estas espécies decorre da alta semelhança genética que permite até a formação de híbridos interespecíficos que são viáveis, embora estéreis e a correta identificação desses híbridos é, portanto, uma tarefa ainda mais difícil quando se utilizam os métodos convencionais que se baseiam nas características morfológicas e nas propriedades fisiológicas de cada levedura (Naumova et al., 2000; Kurtzman e Robnett, 2003). Atualmente, os taxonomistas têm se utilizado de técnicas de biologia molecular para a identificação e diferenciação de organismos geneticamente muito próximos como as leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”. Tais técnicas podem gerar valiosas informações sobre a composição, e o arranjo genômico desse grupo de leveduras. No presente trabalho, apresentamos um conjunto de

marcadores moleculares capazes de identificar as seis diferentes espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”, além de identificar seus híbridos interespecíficos e discriminar as diferentes linhagens.

2.0 - JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

A identificação convencional de leveduras através das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas é trabalhosa e algumas vezes leva a classificação e identificação incorreta, além de consumirem bastante tempo. A partir disto tem-se buscado cada vez mais técnicas mais precisas para a identificação de leveduras através do DNA.

Pelo exposto acima, verifica-se que as técnicas moleculares de discriminação genética estão sendo cada vez mais utilizadas no auxílio da classificação taxonômica das leveduras, dadas as limitações dos testes convencionais. Em alguns casos é possível observar divergências em resultados de diferentes autores que utilizam variados métodos convencionais para a classificação taxonômica das leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”. Porém é possível utilizar técnicas moleculares como um método adicional à classificação taxonômica convencional para que se obtenham resultados mais rápidos e seguros quanto à correta classificação.

Neste aspecto, o presente trabalho deve contribuir para uma reclassificação das leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” que é um problema enfrentado pelos taxonomistas que utilizam métodos de classificação convencionais. Os resultados mostrados no corpo deste trabalho deverão ser considerados como prova da eficiência e rapidez das ferramentas da biologia molecular no auxílio à classificação convencional em termos de taxonomia de microorganismos.

3.0 - OBJETIVO

3.1 - Objetivo Geral

Identificar e diferenciar as leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” por PCR - fingerprinting.

3.2 - Objetivos específicos

- Estabelecer um padrão de amplificação para distinguir interespecificamente as espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”;
- Estabelecer um padrão de amplificação para distinguir interespecificamente os híbridos do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”.

4.0 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 – Filo Ascomycota

Segundo Alexopoulos et al. (1996) o filo Ascomycota é considerado como o maior grupo de fungos, compreendendo aproximadamente 32.000 espécies, estando entre estas inúmeras espécies de leveduras. Dentre as principais características apresentadas pelos Ascomycota, é possível citar o micélio septado, com paredes celulares contendo quitina e glicanas, e a produção de asco. Embora os Ascomycota possam se diferenciar macroscopicamente de fungos pertencentes a outras divisões, suas estruturas microscópicas, como exemplificado pela presença de ascos, são diagnósticos do grupo. Os ascos apresentam a forma de um saco ou clava, sendo este responsável pela formação dos ascosporos, que, em geral, são em número de quatro ou múltiplos de quatro, podendo ser liberados dos ascos quando maduros. Muitos representantes deste grupo apresentam importância industrial e comercial, na produção de pão, vinho e cerveja como *Saccharomyces cerevisiae*, bebidas lácteas do tipo Kefir como *Kluyveromyces marxianus* ou contaminando a produção de vinho como *Brettanomyces anomalus* (anamorfo de *Dekkera bruxellensis*). As células destas leveduras apresentam morfologias distintas (Figura 1).



Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura de células das leveduras do Filo Ascomycota *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Kluyveromyces marxianus* (B) e *Brettanomyces anomalus* (C). Retirado do banco de imagens da coleção CLIB (Thiverval-Grignon, França) (www.inra.fr/clib).

Alexopoulos et al. (1996) relata que as estruturas multicelulares produtoras de ascos são chamadas de ascomas ou ascocarpo e se apresentam em quatro formas principais, conhecidas como: apotécio (pode liberar muitos ascos ao mesmo tempo), cleistotécio (não tem abertura, apresentando diferente estratégia para dispersão), peritécio (permite a liberação de um asco de cada vez), e pseudotécio ou ascostroma (estrutura estromática na qual uma ou mais cavidades são formadas pelos ascos em desenvolvimento). Em alguns casos, não há formação de ascoma, sendo os ascos produzidos diretamente nas hifas ascógenas (“ascos nus”). Os Ascomycota que não produzem ascomas, apenas ascos solitários, não são numerosos, porém incluem muitas leveduras importantes, sendo estas abundantes em água doce e salgada, em solos, nas superfícies das frutas e nos exsudados foliares. O asco é uma estrutura de forma e diferenciação diversa e sua morfologia é de grande importância para a taxonomia do grupo (Figura 2).

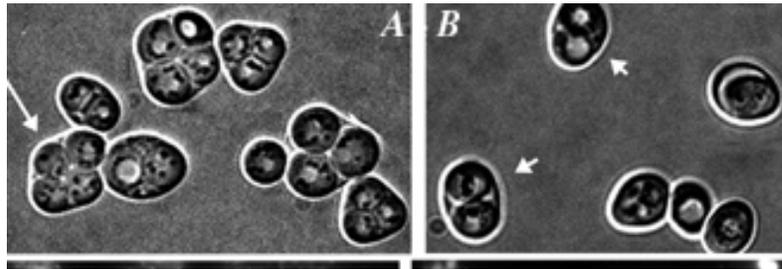


Figura 2. Microscopia óptica de ascos formados pela esporulação de células de *S. cerevisiae* mostrando a formação de quatro ascosporos (A) ou de três e dois ascosporos (B). Retirado do banco de imagens da coleção CLIB (Thiverval-Grignon, França) (www.inra.fr/clib).

Ainda segundo Alexopoulos et al. (1996) os ascos podem ser unitunicados (com uma única parede) ou bitunicados (com parede dupla). Os Ascomycota unitunicados liberam os seus ascosporos por dois modos: através de uma abertura circular com um opérculo (operculados), ou através de uma estrutura parecida com um anel ou um poro estreito (inoperculados). Produzem dois estados reprodutivos distintos, conhecidos como: teleomorfo ou estado perfeito, caracterizado pela formação de esporos sexuais (ascosporos), e anamorfo ou

estado imperfeito, quando há formação de esporos assexuados (blastosporos, conídios). Embora a reprodução dos Ascomycota se realize através desses dois processos, sua classificação é baseada nas estruturas reprodutivas sexuais e características fisiológicas.

4.2 – O gênero *Saccharomyces*

De acordo com Walker (1998), o gênero *Saccharomyces* constitui um dos mais importantes gêneros de leveduras pela sua grande importância na produção de alimentos e bebidas que remonta desde a época do antigo Egito. O nome *Saccharomyces* significa “fungo do açúcar”. Muitos membros desse gênero são bastante utilizados, como *S. cerevisiae* na produção de pão, cerveja e vinho, *S. bayanus* e *S. uvarum* na produção de vinhos, *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis* e *S. monacensis* na produção de cervejas e *S. boulardii* que é utilizado como probiótico e na suplementação alimentar. Estas leveduras são geralmente poliplóides, com algumas linhagens industriais apresentando diferentes graus de aneuploidia. As leveduras de cerveja são separadas em dois grupos: as linhagens “Ale” (*S. cerevisiae*) e as linhagens “Lager” (*S. pastorianus* e *S. carlsbergensis*). Estas linhagens “Lager” são classificados como híbridos interespecíficos de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* e são freqüentemente referidas como leveduras de baixa fermentação (“bottom fermenting yeasts”). Em contraste, as leveduras “Ale” são referidas como leveduras de alta fermentação (“top fermenting yeasts”).

Segundo Barnett et al. (1990) e Barnett et al. (2000) a levedura do gênero *Saccharomyces* possui reprodução assexuada por brotação multilateral; as células variam de esféricas, ovais, elipsóides, cilíndricas à alongadas; o pseudomicélio, quando formado, pode ser bem desenvolvido ou rudimentar; não forma micélio verdadeiro. Em meio líquido pode ocorrer a formação de uma película tênue. A reprodução sexuada se dá pela formação de ascos persistentes usualmente com 1 a 4 ascosporos lisos, redondos ou ovais; fermenta açúcares; não assimila lactose nem nitrato.

Van der Walt (1970) relata que a presença das leveduras no processo de fermentação alcoólica foi primeiramente sugerida em 1680, embora o gênero

Saccharomyces só tenha sido designado em 1837. Apenas em 1876 Louis Pasteur demonstrou cientificamente o envolvimento de seres vivos na fermentação e em 1888 o pesquisador E. Hansen isolou as leveduras fermentadoras. O desenvolvimento das técnicas de microscopia na época permitiu o estudo da morfologia e permitiu o isolamento e determinação do grau de pureza das primeiras preparações comerciais. Atualmente o gênero *Saccharomyces* inclui dois grandes grupos de leveduras separados segundo características fisiológicas e filogenéticas que são *Saccharomyces* “sensu lato” e *Saccharomyces* “sensu stricto” e as leveduras do complexo “sensu lato” são geneticamente muito distintas e possuem em comum baixa ou nenhuma atividade fermentativa, como é o caso das espécies *S. kluyveri*, *S. exiguous* e *S. castellii* e *S. servazzii*. Entretanto o detalhamento das características deste grupo está fora do escopo deste trabalho.

4.2.1 - O Complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”

O complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” possui leveduras geneticamente e fisiologicamente muito relacionadas e que estão envolvidas em processos fermentativos como apresentados acima. A primeira levedura a ser descrita do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” foi *S. cerevisiae* e atualmente existem seis espécies descritas para este grupo. Dentre estas espécies é comum ocorrer à troca de material genético, resultando em híbridos interespecíficos estéreis que produzem ascósporos não viáveis e alguns raros híbridos intraespecíficos que são férteis e produzem ascósporos viáveis (Naumov et al., 2000).

Mccullough et al. (1998) realizaram estudos filogenéticos do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” baseados no polimorfismo das seqüências espaçadoras do rDNA. A análise permitiu agrupar as leveduras em dois conjuntos: o grupo *Cerevisiae* que incluiu os isolados com nível de reassociação com o DNA genômico da espécie tipo *S. cerevisiae* CBS 1171 maior do que 89% e o grupo *Bayanus* que incluiu os isolados com nível de reassociação com o DNA nuclear da espécie tipo de *S. bayanus* CBS 380 superior a 72%. As espécies *S. paradoxus* e

S. pastorianus não puderam ser separadas e foram incluídas nos conjuntos *Cerevisiae* e *Bayanus*, respectivamente.

Ao longo dos últimos 30 anos a taxonomia das leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” vem sendo constantemente alterada pelo uso de técnicas taxonômicas cada vez mais sofisticadas que utilizam análises de seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos. Por exemplo, as espécies *S. diastaticus*, *S. oleaginosus* e *S. oleaceus* já foram agrupadas como subespécies de *S. cerevisiae* (Barnett et al., 1990), o que foi recentemente confirmado com o uso de marcadores moleculares de tipagem genética (Silva-Filho et al., 2005a). A grande proximidade genética e filogenética e a semelhança nos perfis fenotípicos das provas bioquímicas torna muito difícil a tarefa de identificação e classificação destas leveduras. A taxonomia convencional usa provas bioquímicas e características morfológicas que foram e serão muito úteis na taxonomia dos seres vivos, entretanto o uso de marcadores moleculares está auxiliando e de certa forma revolucionando a classificação das leveduras (Kurtzman e Robinet, 2003). Em conjunto, estas técnicas formam a taxonomia moderna.

4.3 - Taxonomia convencional

Segundo Barnett et al. (2000) as principais características usadas para a classificação das leveduras são a morfologia celular e da colônia, o modo de reprodução sexual, características fisiológicas como a fermentação e assimilação de diferentes açúcares (maltose, glicose, sacarose, galactose, melibiose, dentre outros) e assimilação das diferentes fontes de nitrogênio (nitrato, aminas, amônia, dentre outros), crescimento em meio com deficiência de vitaminas, crescimento em alta concentração de glicose ou NaCl (Cloreto de sódio), crescimento na presença de ciclohexamida (actidiona), dentre outras. O conjunto dessas características resulta numa planilha de dados fisiológicos cujos resultados são específicos para cada espécie. As espécies de leveduras do filo Ascomycota que assimilam amina como fonte de nitrogênio ou crescem em metanol ou adenina são consideradas filogeneticamente um grupo muito próximo (Middelhoven e Kurtzman, 2003).

A fermentação de glicose e de outros açúcares é uma característica importante na distribuição, em toda a árvore filogenética, das leveduras do filo Ascomycota, esta reação é mostrada apenas com baixa concentração de oxigênio, porém poucas leveduras fermentam com baixa condição aeróbica. O crescimento de leveduras na presença de ácido úrico e amônia, utilizando-os como fonte de carbono, também tem sido bastante utilizado na distribuição filogenética das leveduras do filo Ascomycota e também é verificado que muitas espécies que apresentam essa capacidade de crescimento também assimilam n-hexadecano como fonte de carbono e as espécies que compartilham estas características são distribuídas em um só grupo no topo da árvore filogenética dos Ascomycotas (Kurtzman e Robnett, 1998; Middelhoven e Kurtzman, 2003).

A taxonomia através da visualização microscópica das células de leveduras leva em consideração o seu tamanho, formato, modo e forma de reprodução assexuada, estrutura e modo de formação dos ascosporos, onde o formato freqüentemente indica o modo de reprodução vegetativo (Barnett et al., 2000).

Para as leveduras que se reproduzem sexuadamente, produzindo ascosporos, a importância taxonômica é dada de como os ascos são formados: de célula vegetativa, de duas células conjugadas ou de células mãe (Barnett et al., 2000). Entretanto, leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” são capazes de reprodução sexual e em muitos casos linhagens isoladas do ambiente natural ou usadas na indústria não ascosporam ou mostram anomalia na sua ploidia (freqüentemente poliplóide ou aneuplóides), ocorrendo meiose anormal ou defeituosa (Rainieri et al., 2003). A definição de espécies baseada na infertilidade de linhagens é normalmente um único critério seguro de distinção de espécie, entretanto, teórico, pelas razões mencionadas anteriormente, não podendo ser aplicada com sucesso para todas as linhagens (Naumov, 1996). Especificamente o tipo de reprodução sexual das leveduras é uma das ferramentas para a delimitação de espécie, na qual o conceito de espécies biológicas define um conjunto de organismos que são capazes de hibridizar e produzir descendentes viáveis e férteis (Rainieri et al., 2003).

4.4 - Taxonomia molecular

Taxonomia é o ramo das Ciências Biológicas que tem como objetivos: 1) o desenvolvimento de sistemas de classificação “natural” dos organismos baseados na história evolucionária e na relação filogenética entre os organismos contemporâneos e 2) o desenvolvimento de procedimentos para a identificação inequívoca dos indivíduos de uma determinada espécie. A disponibilidade dos métodos moleculares, iniciados com os procedimentos de seqüenciamento de proteínas e posteriormente dos genes levou ao desenvolvimento da chamada filogenética molecular que usa a comparação das seqüências de aminoácidos e nucleotídeos tanto para definir como para identificar as espécies. Da mesma forma que a taxonomia convencional utiliza os diferentes dados fisiológicos, a taxonomia molecular pode lançar mão de uma análise multigênica para aumentar o grau de especificidade dos resultados obtidos (Kurtzman e Robinett, 2003).

Na investigação filogenética, as seqüências dos genes são comparadas, as similaridades e as diferenças são averiguadas para se determinar o ancestral comum (Olsen e Woese, 1993). Os estudos filogenéticos moleculares tem sido focados principalmente nos genes que codificam as moléculas de RNA ribossômicos. Estas seqüências constituem excelentes sinais filogenéticos pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todos organismos celulares e desempenhando a mesma função, o que constitui um padrão de homologia de função altamente conservada (Rainieri et al., 2003).

A maioria dos estudos de filogenia utiliza a comparação de seqüências de nucleotídeos dos genes que codificam as moléculas de RNA ribossômicos, os quais apresentam taxas de mutação diferenciadas. Por exemplo, as regiões transcritas internas (ITS) do agrupamento de genes que definem a subunidade menor dos ribossomos apresentam altas taxas de mutação e podem ser utilizadas na identificação individual ou de espécies, enquanto que a seqüência de nucleotídeos do gene 18S é altamente conservada e pode ser utilizada na definição de espécies ou de gêneros (White et al., 1990). A seqüência do gene 26S também é muito conservada, entretanto existe uma região de aproximadamente 600 pb chamada de domínio variável D1/D2 que foi utilizada

para redefinir a classificação das cerca de 500 espécies de leveduras do filo Ascomycota (Kurtzman e Robnett, 2003). Também é possível a utilização da seqüência de genes codificadores de proteínas para se estabelecer às relações filogenéticas entre as leveduras. Estas informações são particularmente importantes quando se trata de leveduras muito próximas, como é o caso das espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” (Figura 3).

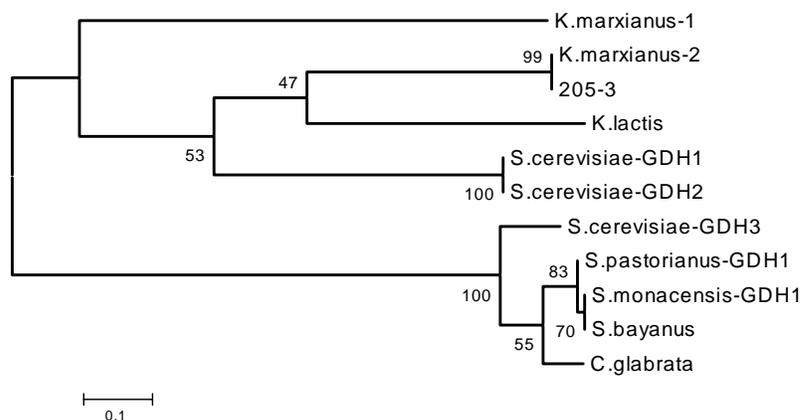


Figura 3. Dendrograma de distância genética baseada na análise das seqüências do gene que codifica a glutamato desidrogenase em diferentes leveduras do complexo *Saccharomyces* sensu stricto e leveduras da família *Saccharomycetales* (Fonte: Laboratório Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPE).).

As leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” são bastantes similares genética e fenotipicamente, dificultando a diferenciação entre elas com base nos testes convencionais (Naumova et al., 2003). As limitações no uso da taxonomia convencional e os problemas associados com a aplicação do conceito de espécies para as leveduras, vêm sendo diminuídos com o aumento do uso dos métodos moleculares (Rainieri et al., 2003). A taxonomia do gênero *Saccharomyces* foi submetida recentemente a uma significativa modificação com o uso de métodos genotípicos e fenotípicos de identificação de linhagens, tais como a determinação da porcentagem de guanina e citosina no DNA total (Kurtzman, 1985) e estudos de similaridade na reassociação genômica do DNA (Vaughan-Martini e Kurtzman, 1985), além da utilização da análise multigênica (Kurtzman e Robnett, 2003). Com isso, atualmente são reconhecidas seis espécies para o

complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” que são *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* e *S. kudriadzevii* (Naumova et al., 2000; Kurtzman e Robnett, 2003). Além disso, existem ainda híbridos interespecíficos que apresentam características fenotípicas quase que indistinguíveis de seus parentais, como é o caso de *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*. A origem e estrutura genéticas desses híbridos estão sendo determinadas a partir do uso das técnicas moleculares de análise estrutural e de seqüências de nucleotídeos utilizando diferentes tipos de genes (Masneuf et al., 1998; Jaspersen et al., 2000; Casaregola et al., 2001; Naumova et al., 2003). A possibilidade de formação desses híbridos nos processos industriais aumenta ainda mais a complexidade taxonômica do grupo.

Além das seqüências de nucleotídeos pode-se também analisar a estrutura física de partes ou de todo o genoma de um organismo que podem ser classificadas em métodos de análise de restrição gênica ou genômica, métodos de determinação de padrões cromossômicos e os métodos baseados em PCR, com suas variações. A exemplo do seqüenciamento de genes, essas técnicas também seriam capazes de identificar uma determinada espécie e seus indivíduos, cumprindo com o objetivo 2 da taxonomia apresentado acima, entretanto não são capazes de estabelecer uma relação filogenética entre as diferentes espécies. Portanto, essas técnicas indicam mais características fenotípicas (padrão de bandas de DNA, com a ausência ou presença de uma banda) do que genotípicas, e são classificadas como técnicas de análises fenéticas. Os dois tipos mais comuns de técnicas fenéticas moleculares atualmente utilizados são a cariotipagem molecular e as técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase, ou PCR. A de cariotipagem molecular por eletroforese de DNA em campo pulsado (PFGE) permite identificar o conjunto cromossômico de uma espécie, e seu polimorfismo associado, tanto em número quanto em relação ao peso molecular dos cromossomos e tem sido extensivamente utilizado na identificação de isolados industriais de *S. cerevisiae* (Lucena, 2003). Já a PCR apresenta variações que permitem a análise de uma série de padrões de bandas

amplificadas a partir do reconhecimento específico ou aleatório dos oligonucleotídeos (Silva-Filho et al., 2005a).

Recentemente tem-se utilizado o padrão do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial (RFLP-mtDNA) que consiste na extração e digestão com enzima de restrição do DNA mitocondrial dos isolados. Os padrões gerados são geralmente específicos e as pequenas diferenças geradas podem caracterizar as diferentes linhagens (Querol et al., 2003).

4.4.1 - Identificação genética

A análise genômica das diferentes espécies de leveduras permite a identificação de seqüências específicas para uma dada espécie. Kurtzman e Robnett (1998) fizeram uma revisão na classificação das leveduras do filo Ascomycota a partir do seqüenciamento dos genes que codificam para os RNAs ribossomais 26S e 18S. Esta análise revelou a relação filogenética entre as espécies e estabeleceu o número de 500 espécies para os Ascomycota. Adicionalmente, essa análise estabeleceu também o limite genético entre as espécies como sendo duas leveduras que distam entre si em mais de 1% de divergência na seqüência de 600 nucleotídeos da região variável D1/D2 do gene 26S e este limite tem sido atualmente aplicado para a identificação das espécies atuais do filo Ascomycota bem como na identificação de espécies novas. Com este procedimento experimental estabelecido foi possível se comprovar a taxonomia do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” como apresentando seis espécies e seus híbridos (Kurtzman e Robnett, 2003).

Baseado na análise de seqüência da região D1/D2 do gene 26S e da região espaçadora NTS2 que se localiza entre dois locos ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal, Pulvirenti et al. (2000) propuseram o reestabelecimento de *S. uvarum* como sendo uma espécie dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”. Esta proposição foi posteriormente suportada pela análise de seqüência do gene que codifica para a enzima glutamato desidrogenase (Nguyen e Gaillardin, 2005). Nesta análise a seqüência de nucleotídeos do gene *GDH* de *S. bayanus* difere em 11% de seu homólogo em *S. cerevisiae*. Entretanto, a seqüência do homólogo nas

diferentes linhagens de *S. uvarum* diverge na mesma proporção para estas duas espécies, indicando que *S. uvarum* deve realmente representar uma espécie distinta de *S. bayanus*. Entretanto, a composição híbrida do genoma de *S. uvarum* é bem mostrada na literatura. Por exemplo, Torriani et al. (2004) otimizou o método de PCR multiplex utilizando dois pares de oligonucleotídeos espécie-específicos com seqüências complementares aos locos YBR033w de *S. cerevisiae*. A amplificação com os oligonucleotídeos YC1f e YC2r gerou fragmentos de aproximadamente 1710 pb para os isolados da espécie *S. cerevisiae* e a amplificação com os oligonucleotídeos YB1f e YB2r gerou fragmentos de aproximadamente 329 pb para os isolados da espécie *S. bayanus*. Entretanto, os isolados que correspondiam aos híbridos amplificaram os dois fragmentos, como foi o caso de linhagens de *S. pastorianus* e *S. uvarum*. Masneuf et al. (1996) e Casaregola et al. (2001) conseguiram identificar diferentes linhagens das espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” isolados de vinícolas na França pela análise de restrição de um fragmento do gene *MET2*. Os dois grupos *Cerevisiae* e *Bayanus* apresentaram padrões distintos, enquanto os híbridos interespecíficos apresentaram em geral ambos os padrões. Masneuf et al. (1998) fizeram a identificação de dois isolados de leveduras, uma de vinho primeiramente identificada como linhagem de *S. uvarum* e uma de sidra foram caracterizadas pelo seu genoma nuclear e mitocondrial. A análise da cariotipagem eletroforética, o polimorfismo do fragmento de restrição da amplificação do gene *MET2* e a análise da seqüência da parte dos dois alelos do gene *MET2* deram suporte para afirmar que estas duas linhagens constituem híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Os dois híbridos tiveram padrão de restrição do DNA mitocondrial completamente diferente entre eles assim como diferentes seqüências do gene *OLI1*. A seqüência do gene *OLI1* da linhagem híbrida de vinho parece ser a mesma do gene de *S. cerevisiae*, entretanto o gene *OLI1* da linhagem híbrida de sidra é igualmente divergente de ambos os parentais apresentados, *S. bayanus* e *S. cerevisiae*. Algumas propriedades fermentativas foram analisadas e um fenótipo refletiu a natureza híbrida destas duas linhagens.

Um método biológico molecular baseado na análise eletroforética de fragmentos de PCR migrados em géis desnaturantes em gradiente (“Desnaturing Gradient Gel Electrophoresis” - DGGE) foi desenvolvido para distinguir entre linhagens dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” (Masneuf et al., 1998). Neste sistema, as bandas dos fragmentos de PCR que migram de forma diferencial são purificadas e submetidas a seqüenciamento para correta identificação dos isolados. Uma vez estabelecida a relação entre a mobilidade eletroforética da banda e a sua identificação da espécie pode-se utilizar a técnica de DGGE para identificar a presença das diferentes espécies em amostras industriais e ambientais (Manzano et al., 2004).

Da mesma forma, a análise de restrição do locus de rDNA é capaz de discriminar as 10 espécies aceitas de *Saccharomyces*, além de distinguir híbridos interespecíficos (McCullough et al., 1998). Embora este seja um marcador do tipo fenético, o fato de se conhecer as seqüências de nucleotídeos dos sítios de restrição e da localização física desses sítios faz com que estes marcadores possam ser utilizados em análises genéticas e filogenéticas. Isto também pode ser aplicado a análise de restrição de genes estruturais.

4.4.2 - Análises fenéticas

Os métodos de análise fenética são baseados em características fenotípicas dos organismos, e no caso das leveduras podem se valer das características morfológicas das células, esporos e colônias. Desde o final da década de 80 esta classificação numérica ganhou o auxílio dos marcadores moleculares que são capazes de discriminar indivíduos diferentes e identificar representantes de um mesmo grupo taxonômico. Esses métodos baseiam-se na análise do padrão de bandas gerados por diferentes marcadores, em uma análise binária de presença ou ausência de uma determinada banda, sem a necessidade de identificação e localização daquela banda no genoma dos indivíduos. Esta falta de informação não permite que estes marcadores informem a origem genética dos isolados, mas podem gerar informações valiosas sobre a clonalidade dos isolados, origem geográfica e distribuição espacial e temporal. Além do mais, padrões mínimos específicos podem ser identificados, caracterizando uma determinada

espécie. Alguns exemplos da utilização dessas técnicas são mostrados a seguir, focalizando principalmente as técnicas que utilizam a PCR.

Os procedimentos chamados PCR-fingerprinting utilizam a capacidade de certos oligonucleotídeos de se hibridizarem em diferentes regiões do genoma do organismo alvo. Uma das possibilidades é o uso de oligonucleotídeos de unidades repetidas que equivalem aos chamados microssatélites. Estes oligonucleotídeos hibridizam nas regiões de microssatélite no DNA alvo amplificando as seqüências entre estas regiões internas entre seqüências repetidas (ISSR – “Inter Single Sequence Repeats”). Estes procedimentos que utilizam um único oligonucleotídeos na PCR são chamados de Reação de Amplificação usando Oligonucleotídeos Únicos (SPAR - “Single Oligonucleotídeo Amplification Reaction”). Para leveduras os oligonucleotídeos que têm sido bastante utilizados são (GTG)_n, (GACA)_n, seqüência M13 e os oligonucleotídeos dos sítios de processamento de RNA do tipo 1. Estas reações correspondem a um tipo de RAPD com maior reprodutibilidade pelo uso de temperaturas de hibridização mais elevadas (Baleiras-Couto et al., 1996; De Barros-Lopes et al., 1996; Torriani et al., 1999; Naumova et al., 2000; Fernandez-Espinar et al., 2001; Schuller et al., 2004; Silva-Filho et al., 2005a; Silva-Filho et al., 2005b). Apesar da grande capacidade destes marcadores em discriminarem isolados de uma determinada espécie, é recomendada o uso de uma combinação desses marcadores para a completa identificação de linhagens genéticas diferentes (Fernandez-Espinar et al., 2001; Schuller et al., 2004), especialmente para propósitos de taxonomia e certificação comercial das linhagens.

Segundo White et al. (1990) as técnicas baseadas na análise dos padrões de digestão de DNA tanto genômico como mitocondrial, também estão sendo muito utilizadas pela grande estabilidade e conservação dos sítios de restrição naquela determinada região do genoma do organismo alvo. A região que compreende entre os genes que codificam os RNAs ribossômicos 18S e 26S são muito usadas neste sentido. Esta região contém a seqüência interna transcrita 1 (ITS1), o gene que codifica o RNA ribossomal 5.8S e a seqüência interna transcrita 2 (ITS2), a qual é comumente chamada de ITS1-5.8S-ITS2. O fragmento

de amplificação que contém esta região varia de tamanho entre as diferentes espécies do filo Ascomycota, embora algumas espécies possam apresentar o mesmo tamanho. Para permitir a distinção entre eles utiliza-se uma série de enzimas de restrição separadas ou em conjunto e o padrão de restrição deve discriminar as espécies. Mesmo assim, duas espécies muito próximas podem também apresentar o mesmo perfil de digestão, sugerindo que eles se diferenciaram muito recentemente. Em conjunto, a amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 seguida de digestão do fragmento amplificado é chamado de RFPL-rDNA.

Naumova et al. (2003) utilizou as técnicas de PCR-fingerprinting com o microssatélite (GTG)₅ e RFLP-rDNA em diferentes isolados *Saccharomyces* de cerveja no leste da África, comparando-os com as culturas tipo do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”. Os resultados mostraram a eficiência destas duas técnicas na discriminação interespecífica das seis espécies e seus híbridos, colaborando com os dados anteriores relativos ao emprego da RFPL-rDNA para as espécies *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* e *S. mikatae* obtidos por Naumov et al. (2000).

A digestão do DNA mitocondrial de leveduras Ascomycota também está sendo proposta como um método de identificação de espécies e até de discriminação de linhagens de uma espécie. A combinação da restrição do DNA total e do DNA mitocondrial tem permitido a identificação molecular de isolados industriais de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, separando bem estas duas espécies como no caso de isolados de vinho (Viti et al., 2000).

4.4.3 - Análises fenéticas de leveduras de fermentação alcoólica

De acordo com Silva-Filho et al. (2005a) o método de PCR-fingerprinting baseado no oligonucleotídeo de microssatélite (GTG)₅ foi utilizado para caracterizar a dinâmica da população de leveduras ao longo do período de fermentação em seis destilarias de álcool combustível no Nordeste do Brasil (Figura 4). Os resultados mostraram que linhagens autóctones de *S. cerevisiae* presentes no substrato cru podem se adaptar ao processo industrial de forma

diferencial ao tipo de substrato utilizado, se caldo de cana ou melação. Estes resultados foram confirmados com o acompanhamento mais prolongado destas populações de leveduras (Santos et al., 2005). Desta forma, linhagens que dominam a população de leveduras foram identificadas e selecionadas e que são mais presentes em destilarias e fermentam melação ou cana-de-açúcar. Estas linhagens foram propostas para serem usadas como fermento inicial nestes processos industriais (Silva-Filho et al., 2005b). Em adição a estes trabalhos, Basílio et al. (2005) mostrou que a técnica de PCR-fingerprinting com o oligonucleotídeo (GTG)₅ foi capaz de diferenciar 29 padrões de bandas distintos para leveduras contaminantes. Estes isolados não-*S. cerevisiae* foram identificados pelo seqüenciamento dos domínios D1/D2 da região 26S do rDNA. A levedura contaminante identificada como sendo da espécie *Dekkera bruxellensis* foi o padrão de amplificação não-*S. cerevisiae* mais freqüentemente encontrado no monitoramento, estando presente em 52% de todas as amostras com contaminação.

A levedura *Dekkera bruxellensis* foi estudada por De Souza-Liberal et al. (2005) com o uso de outros marcadores de SPAR e os resultados mostraram que diferentes linhagens podem ser encontradas na mesma população de dornas de fermentação e em destilarias diferentes. Com isso, foi possível se estabelecer um sistema de detecção específica destas leveduras contaminantes baseado na amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal para detectar a presença de leveduras não-*Saccharomyces cerevisiae* em mosto de caldo de cana no processo de fermentação do bioetanol. Neste método, a amplificação de um fragmento de 850 pb mostra a presença de células de *S. cerevisiae* nas amostras de mosto de fermentação, enquanto a presença de fragmentos de outros tamanhos mostra a presença de leveduras contaminantes na mesma amostra.

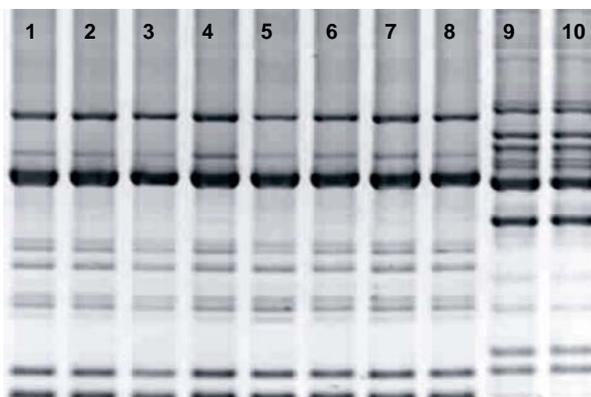


Figura 4. Padrão de bandas de DNA gerado pela amplificação de amostras de isolados industriais de leveduras da fermentação alcoólica com o oligonucleotídeo de microssatélite (GTG)₅. As linhas de 1 a 8 representam o padrão espécie-específico para *S. cerevisiae* e as linhas 9 e 10 representam o padrão espécie-específico para a levedura *D. bruxellensis* (Fonte: Laboratório Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da UFPE).

4.5 - Considerações finais

A taxonomia das leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”, tão próximas do ponto de vista genético, é dificultada pela grande semelhança fenotípica entre elas, tanto morfológica quanto bioquímica/fisiológica. Isto é ainda mais dificultado pela possibilidade de formação de híbridos interespecíficos. Exatamente por se tratar de um grupo importante de leveduras, dado o uso industrial na produção de alimentos e bebidas, a correta identificação dos isolados industriais e ambientais torna-se importante para a certificação comercial das linhagens, bem como para o controle do processo industrial. Adicionalmente, a correta identificação dos híbridos ganha relevância científica na medida que se podem estudar os mecanismos de formação, estabilização genética e evolução adaptativa destes organismos. Portanto, este trabalho visa disponibilizar um método baseado em múltiplos marcadores moleculares que podem contribuir para resolver os problemas taxonômicos neste grupo de leveduras.

5.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W. and Blackwell, M. (1996) *Introductory Micology*. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 272-285.

Baleiras-Couto, M.M., Eijsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. and van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Environment Microbiology* 62, 41–46.

Barnett, J., Painer, R.W. and Yarrow, D. (1990) *Yeasts: characteristics and identification*. 4th Ed. pp.1002. Cambridge: Cambridge University Press.

Barnett, J., Painer R.W and Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and identification*. 2^a Ed. New York: Port Chester. pp.1002.

Basílio ACM, Pinheiro W., Brasileiro B., Morais Jr. M. A. and Simões D. A. (2005) Utilização do padrão de amplificação com o marcador (GTG)₅ para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (Trabalho completo).

Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lapathitis, G., Kotyk, A. and Gaillardin, C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *International Journal Systematic Evolucion Microbiology* 51, 1607-1618.

De Barros Lopes, M., Soden, A., Martens, A.L., Henschke, P.A., Langridge, P. (1996). Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *International Journal Systematic Bacteriology* 48, 279 - 286.

De Souza-Liberal, A.T., Silva Filho, E.A., de Moraes, J.O., Simões, D.A. and de Moraes Jr, M. A. (2005) Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. Letters Applied Microbiology 40, 19-23.

Fernandez-Espinar, M.T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. International Journal Food Microbiology 70, 1–10.

Jaspersen, L., Van der Ar Kühle, A. and Petersen, K.M. (2000) Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. International Journal Food Microbiology 60, 43-53.

Kurtzman, C.P.: Molecular Taxonomy of fungi, p. 35-56. In Barnett, J. W. and Lasure, L. L. (ed.), Gene manipulation in fungi. Academic Press, New York (1985).

Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73, 331-371.

Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. FEMS Yeast Research 3, 417-432.

Lucena, B.T.L. (2003) análise da estabilidade cariotípica de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas para a produção de álcool combustível. Tese de mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Manzano, M., Cocolin, L., Longo, B. and Comi, G. (2004) PCR-DGGE differentiation of strains of *Saccharomyces sensu stricto*. Antonie Van Leeuwenhoek 85, 23-27.

Masneuf, I., Aigle, M. and Dubourdieu, D. (1996) Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. FEMS Microbiology Letters 138, 239-244.

Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. and Dubourdieu, D. (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. Applied Environment Microbiology 64, 3887-3892.

Mccullough, K.V., Michael, J., Clemons, J., Mccusker, H. and Stevens, D.A. (1998) Intergenic Transcribed Spacer PCR Ribotyping for Differentiation of *Saccharomyces* Species and Interspecific Hybrids. Journal of Clinical Microbiology. 36, 1035–1038.

Middelhoven, W.J. and Kurtzman, C.P. (2003) Relation between phylogeny and physiology in some ascomycetous yeasts. Antonie van Leeuwenhoek 83, 69-74.

Naumov, G.I. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Journal Industrial Microbiology Biotechnology 17, 295–302.

Naumov G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J. and Roberts, I.N. (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. International Journal Systematic Evolucion Microbiology 50, 1931-1942.

Naumova, E.S., Naumov, G.I. and Molina, E.I. (2000) Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting. Systematic Applied Microbiology 23, 86-92.

Naumova E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L. and Naumov, G.I. (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. FEMS Yeast Research 3, 177-184.

Nguyen, H.-V., and Gaillardin, C. (2005) Evolutionary relationships between the former species *Saccharomyces uvarum* and the hybrids *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*; reinstatement of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck) as a distinct species. FEMS Yeast Research 5, 471-483.

Olsen, G. J. and Woese, C. (1993) Ribosomal RNA: a key to phylogeny. FASEB J., 7, 113-123.

Pulvirenti A., Nguyen H.-V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S. and Zambonelli, C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. FEMS Microbiology Letters 192, 191-196.

Querol, A., Fernandez-Espinar, M.T, del Olmo M. and Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast International. Journal of Food Microbiology 8, 3-10.

Rainieri, S., Zambonelli, C. and Kaneko, Y. (2003) *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. Journal of Bioscience and Bioengineering 96, 1-9.

Santos, S.K.B., Resende, A.M., Silva-Filho, E.A., Morais, Jr.M.A. and Simões, D.A. (2005) Dinâmica da população de leveduras em destilarias de álcool do Nordeste do Brasil. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil (Trabalho completo).

Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. FEMS Microbiology Letters 231, 19–26.

Silva-Filho, E.A., Santos, S.K.B., Resende, A.M., de Moraes, J.O., de Moraes Jr, M.A. and Simões, D.A. (2005a) Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88, 13-23.

Silva-Filho, E.A., de Melo, H.F., Antunes, D.F., dos Santos, S.K., Resende, A.M., Simoes, D.A. and de Moraes Jr, M.A. (2005b) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 32, 481-486.

Torriani, S., Zapparoli, G. and Suzzi, G. (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75, 207–215.

Torriani, S., Zapparoli, G., Malacrino, P., Suzzi, G. and Dellaglio, F. (2004) Rapid identification and differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and their hybrids by multiplex PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 239-244.

Van der Walt, J. P.: Genus 16 *Saccharomyces* Meyen emend. Rees, p. 555-718. In Lodder, J. (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*, 2nd ed. North Holland Publishing Company. Amsterdam (1970).

Vaughan-Martini, A. and Kurtzman, C. P. (1985) Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *International Journal Systematic Bacteriology*, 35, 508-511.

Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1998) *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study* (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds.), 4th edn., pp. 358-371. Elsevier, Amsterdam.

Viti, C., Forni, D., Ventura, S., Messini, A., Materassi, R. and Giovannetti, L. (2000) Characterisation and typing of *Saccharomyces* strains by DNA fingerprinting. *Annals of Microbiology*, 50, 191-203.

Walker, G. M. (1998) *Yeast – Physiology and biotechnology*. John Wiley and sons Ltd. England., 350pp.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: a guide for methods and applications* ed. Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., Innis, N. and White, T. pp.315-322. London: Academic Press, Inc.

6.0 - ARTIGO CIENTÍFICO

Identificação de leveduras dentro do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” por PCR-fingerprinting

Scheila Karina Brito dos Santos e Marcos Antônio de Moraes Júnior
Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes
Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

Artigo enviado para publicação no *Letters in Applied Microbiology* (Blackwell Publishing, USA). ISSN: 0266-8254. Fator de impacto (JCR-2004): 1,461

RESUMO

A alta proximidade genética entre as leveduras importantes do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” tem causado equívocos na correta identificação das espécies do grupo. Por isso, este trabalho apresenta uma série de marcadores de PCR-fingerprinting que identificaram com eficiência as verdadeiras espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e indicaram os híbridos naturais isolados de processos industriais. Linhagens-tipo, linhagens comerciais de vinho e leveduras isoladas de vinho artesanal foram submetidas à análise de PCR-fingerprinting usando oligonucleotídeos únicos (SPAR), ribotipagem por PCR e análise de restrição gênica. Todas as seis espécies reconhecidas do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” foram discriminadas e erros na taxonomia anterior de leveduras do vinho foram observados. Além disso, estes marcadores SPAR mostraram a complexidade da constituição híbrida dos isolados industriais. O uso de marcadores SPAR pode ajudar na identificação de leveduras isoladas da indústria e do meio ambiente dentre uma das seis espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e seus híbridos interespecíficos, e na reclassificação de linhagens depositadas em coleções de leveduras. Embora este conjunto de marcadores falhe em determinar a contribuição de parentais no processo de hibridização, pode eficientemente traçar a dispersão de leveduras híbridas que foram originadas em eventos simples de hibridização. O único padrão gerado pelos marcadores SPAR foi bastante eficiente no monitoramento da população de leveduras durante o processo de fermentação industrial e pode detectar a aproximação de leveduras híbridas em cada meio ambiente.

INTRODUÇÃO

O complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” é composto pelas seis espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii* e pelos híbridos interespecíficos *S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. monacensis* e *S. calbergensis* que são dificilmente distinguidas umas das outras por métodos bioquímicos convencionais (Vaughan-Martini and Martini 1998). Elas representam um importante grupo de leveduras do ponto industrial pelo uso na produção de pão, bebidas alcoólicas e álcool combustível. Elas também compartilham quase o mesmo cariótipo (Naumov 1996 ; Naumov et al. 2000), estrutura física das seqüências do DNA ribossomal (Naumova et al. 2000) e a seqüência de nucleotídeos do domínio 26S rDNA D1/D2 (Kurtzman and Robnett 2003), o que gera maior dificuldade na distinção entre elas. Embora eles apresentem o mesmo tipo de sinal de acasalamento, os híbridos resultantes são em sua maioria estéreis e produzem esporos não viáveis, e esta característica tem sido utilizada como marcador de distinção entre as seis espécies (Naumov et al. 2000; Kurtzman and Robnett 2003). Muitos relatos na literatura mostram evidências da hibridização interespecífica entre as espécies deste complexo e este mecanismo aloploplóide pode ter envolvimento na promoção da adaptação evolutiva das espécies de leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” em diferentes meios ambientes (Matzke et al. 1999), especialmente nas condições de fermentação industrial. Esta hibridização interespecífica produz linhagens de interesse industrial (Masneuf et al. 1998; Jaspersen et al. 2000; Casaregola et al. 2001; Naumova et al. 2003) e aumenta a complexidade taxonômica deste grupo. Marcadores moleculares baseados em RFLP de genes individuais e PCR-fingerprinting têm sido usados como alternativa para análise taxonômica de cada tipo de espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”.

O método de PCR-fingerprinting pode utilizar oligonucleotídeos de seqüências repetidas que amplificam segmentos internos genômicos em regiões repetidas (ISSR). Este método nomeado SPAR usa oligonucleotídeos simples constituído de microssatélites com repetição assim como o GTGn e GACAn, além

de seqüências não repetidas mas dispersas no genoma do organismo alvo, tais como a seqüência M13 e a seqüência dos sítios de processamento de introns do tipo 1. Esses padrões de amplificação representam um tipo de análise de RAPD com maior reprodutibilidade devido ao uso de temperaturas de hibridização mais elevadas. Assim, a hibridização dos oligonucleotídeos torna-se menos aleatórias do que normalmente ocorre com o RAPD. Existem vários relatos na literatura que apresentam a utilidade de cada oligonucleotídeo para ambas as discriminações interespecíficas e intraespecíficas das leveduras (Baleiras-Couto et al. 1996; Torriani et al. 1999; Naumova et al. 2000; Fernandez-Espinar et al. 2001; Schuller et al. 2004; Silva-Filho et al. 2005a; Silva-Filho et al. 2005b). Apesar desta capacidade em detectar pequenas diferenças genômicas, tem sido recomendado o uso de mais de um desses marcadores moleculares para uma discriminação inequívoca das linhagens (Fernandez-Espinar et al. 2001; Schuller et al. 2004), especialmente quando a identificação correta é necessária para propósitos taxonômicos ou comerciais. Além disso, a análise genética dos híbridos a partir de análises de padrões de restrição multigênica pode identificar a contribuição das leveduras parentais no processo de hibridização (Masneuf et al. 1998; Casaregola et al. 2001; Kurtzman and Robnett 2003).

Neste trabalho nosso objetivo foi mostrar que todas as espécies conhecidas do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” podem ser inequivocadamente identificadas pelos oligonucleotídeos do tipo SPAR. Além disso, o uso destes oligonucleotídeos pode ajudar na reclassificação de linhagens de leveduras e na demonstração dos híbridos naturais dos isolados de leveduras.

MATERIAL E MÉTODOS

- Toda a metodologia deste trabalho foi realizada no departamento de genética no Laboratório de Genética de Microrganismo - UFPE.

Meio de cultura

Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose – YPD (p/1 L)

Extrato de Levedura (Biobrás).....	10,0 g
Peptona (Difco).....	20,0 g
Glicose (Nuclear).....	20,0 g

O meio YPD (Extrato de Levedura, Peptona e Dextrose) foi preparado de acordo com Techera et al. (2001), sendo seu volume ajustado para 1.000 mL com água destilada e autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

Soluções e Tampões

- As soluções e os tampões foram preparados de acordo com Sambrook et al. (1989).

Solução de Lise (Solução de Extração)

Tris-HCl 1 M pH 8,0 (Gibco).....	2,0 mL
EDTA 0,5 M pH 8,0 (Gibco).....	0,5 mL
SDS 10% (Sigma).....	1,0 mL
NaCl 0,5 M pH 8,0 (Reagen).....	0,5 mL
Água destilada esterilizada.....	6,0 mL

Tampão Tris/EDTA (TE) pH 8,0

Tris Cl (pH 8,0) (Sigma).....	10 mM
EDTA (pH 8,0) (Sigma).....	1 mM

Tampão Tris-Borato (TBE) 5X (p/1 L)

Tris base (Sigma).....	54,0 g
Ácido bórico (Gibco).....	27,5 g
EDTA 0,5 M pH 8,0 (Gibco).....	20,0 mL

O volume foi completado com água destilada para 1000 mL.

Linhagens das leveduras

As linhagens das leveduras relacionadas na Tabela 1 foram doadas pelo Dr. C. Kurtzman (NRRL, EUA) e pelo Dr. S. Casaregola (CLIB, França). As leveduras comerciais utilizadas na produção de vinho *S. bayanus* PB 2003 e *S. uvarum* PB 2027 foram doadas pela AEB Bioquímica Latino Americana A.S. (Paraná). Os isolados *Saccharomyces pastorianus* GDB 776 e *S. uvarum* GDB 777 são procedentes da produção de vinho artesanal no Brasil e identificadas por testes bioquímicos convencionais de acordo com Barnett et al. (1990). O isolado C18 (GDB 276) foi isolado a partir da produção de álcool combustível no período de 2003-2004. As células foram mantidas em placas de meio YPD e estocadas a -80°C em solução de glicerol estéril a 15%.

Tabela 1- Leveduras usadas neste trabalho e suas respectivas procedências.

Levedura	Linhagem
<i>S. bayanus</i>	EUA - NRRL Y 12624 ^T
<i>S. cariocanus</i>	EUA - NRRL Y 27337 ^T
<i>S. cerevisiae</i>	EUA - NRRL Y 12632 ^T
<i>S. mikatae</i>	EUA - NRRL Y 27341 ^T
<i>S. paradoxus</i>	EUA - NRRL Y 17217 ^T
<i>S. pastorianus</i>	EUA - NRRL Y 27171 ^T
<i>S. kudriavzevii</i>	EUA - NRRL Y 27339 ^T
<i>S. bayanus</i>	França - CLIB 181 ^T
<i>S. carlsbergensis</i>	França - CLIB176 ^T
<i>S. monacensis</i>	França - CLIB 180 ^T
<i>S. paradoxus</i>	França - CLIB 228 ^T
<i>S. uvarum</i>	França - CLIB 533 ^T
<i>Saccharomyces</i> sp.	GDB 276*
<i>S. pastorianus</i>	GDB 776 ^A
<i>S. uvarum</i>	GDB 777 ^A
<i>S. bayanus</i>	WY1 ^C
<i>S. uvarum</i>	WY2 ^C

* isolado C18 isolada a partir da produção de álcool combustível no período de 2003-2004.

^C isolados comerciais de vinho.

^A isolados artesanais de vinho.

^T Linhagem tipo.

Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada segundo Silva-Filho et al. (2005a). Os isolados foram inoculados em meio YPD líquido e incubados a 30°C, por 16 horas, a 150 rpm. Em seguida foi transferido 1,0 mL, de cada cultura, para microtubos de 1,5 mL e centrifugado por 3 minutos a 10.000 rpm em temperatura de 24°C. O sobrenadante foi descartado e 600 µL de solução de extração foram adicionados, agitado ao vortex e incubado em banho maria por 30 minutos, a uma temperatura de 65°C, com agitação por inversão a cada 5 minutos. Após a incubação, igual volume de fenol/clorofórmio (1:1) foi adicionado, agitado ao vortex e centrifugado por 10 minutos, a 13.000 rpm, numa temperatura de 24°C. Foram transferido em seguida 500 µL da fase superior para novos microtubos de 1,5 mL e 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) foram adicionados. As amostras foram centrifugadas mais uma vez por 10 minutos a 13.000 rpm com a mesma temperatura e 400 µL da fase superior foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL. A estes foram adicionados 800 µL de etanol absoluto gelado, deixando precipitar por 2 horas a -20°C ou por 30 minutos a -80°C. Após a precipitação, o DNA foi coletado por centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm com temperatura de 24°C, lavado em 300 µL de etanol, a 70%, uma vez, secado em estufa a 37°C por 30 minutos e em seguida ressuspendido em 100 µL de tampão TE pH 8,0 e mantido a -20°C para uso posterior.

Quantificação do DNA

A quantificação foi realizada por espectrofotometria com um comprimento de onda de 260 nanômetro (nm) após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA, utilizou-se a relação 1 DO=50 µg/mL (Sambrook et al. 1989).

Condição da PCR

A técnica de PCR-fingerprinting foi realizada utilizando os primers (GTG)₅, (GACA)₄, M13 (Silva-Filho et al. 2005a; Silva-Filho et al. 2005b) e E1 intron

(Baleiras-Couto et al. 1996). A técnica de ribotipagem por PCR foi realizada com a amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 com os primers Its4 and Its5 (De Souza-Liberal et al. 2005) seguida de análise de restrição. A análise de restrição gênica foi realizada de acordo com o procedimento descrito em Casaregola et al. (2001). As reações de amplificação continham 50 ng de DNA, 5 pmols dos primer, 37,5 nmol de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,625 µg BSA e 1,25 U Taq DNA polimerase em tampão de PCR 1x com volume final de 25 µl. Os tubos de amplificação foram submetidos a desnaturação a 94°C por 5 minutos seguido por 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos, com extensão final de 72°C por 6 minutos. Para análise de restrição, 3 µl do produto de PCR foi digerido com as enzimas *Hae*III ou *Eco*RI em um volume final de 20 µl por 2 h a 37°C. Os produtos de amplificação e de restrição foram separados em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE 0.5x a 10 V.cm⁻¹ por 150 minutos. As bandas de DNA nos géis foram visualizadas após coloração com brometo de etídio, fotografadas com sistema digital de fotodocumentação - programa PhotoCapt v 11.01 (Vilber Lourmat, França) e os tamanhos dos fragmentos comparados com marcadores moleculares. A reprodutibilidade dos padrões de amplificação foi avaliada a partir de pelo menos três reações independentes usando a mesma extração de DNA.

RESULTADOS

Diferenciação das seis espécies de leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”

Todas as seis espécies de leveduras deste complexo produziram um fragmento de 850 pb depois da amplificação do locus ITS1-5.8S-ITS2 como descrito na literatura. Estas espécies foram separadas em dois grupos baseado na análise de restrição do fragmento de DNA (rDNA-RFLP). O primeiro grupo compreendeu *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. cariocanus* e foi classificado como grupo Cerevisiae, enquanto o segundo grupo compreendeu *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavizevii* e foi classificado como grupo Bayanus. Todos os

híbridos interespecíficos (*S. pastorianus*, *S. uvarum*, *S. monacensis* e *S. carlsbergensis*) mostraram o padrão rDNA-RFLP similar ao do grupo Bayanus (Tabela 2).

Tabela 2- Leveduras usadas neste trabalho e seus padrões de restrição do locu ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal.

Levedura	Linhagem	ITS	Fragmentos de restrição <i>HaeIII</i> (bp)				
<i>S. cerevisiae</i>	Y 12632 ^T	850	-	325	230	175	125
<i>S. paradoxus</i>	Y 17217 ^T	850	-	325	230	175	125
<i>S. paradoxus</i>	CLIB 228 ^T	850	-	325	230	175	125
<i>S. cariocanus</i>	Y 27337 ^T	850	-	325	230	175	125
<i>S. bayanus</i>	WY1 ^C	850	-	325	230	175	125
<i>S. uvarum</i>	WY2 ^C	850	-	325	230	175	125
<i>S. pastorianus</i>	GDB 776 ^A	850	-	325	230	175	125
<i>Saccharomyces</i> sp.	GDB 276 [*]	850	-	325	230	175	125
<i>S. bayanus</i>	Y 12624 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. bayanus</i>	CLIB 181 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. uvarum</i>	CLIB 533 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. pastorianus</i>	Y 27171 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. carlsbergensis</i>	CLIB176 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. monacensis</i>	CLIB 180 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. mikatae</i>	Y 27341 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. kudriavzevii</i>	Y 27339 ^T	850	495	-	230	-	125
<i>S. uvarum</i>	GDB 777 ^A	850	495	-	230	-	125

* isolado C18 isolada a partir da produção de álcool combustível no período de 2003-2004.

^C isolados comerciais de vinho.

^A isolados artesanais de vinho.

^T Linhagem tipo.

Outras diferenças genômicas foram observadas quando o DNA dessas espécies de leveduras, se verdadeiramente espécies ou híbridos, foi submetido à análise de PCR-fingerprinting. Pode ser visto na Figura 1 que todas as espécies produziram um padrão próprio para todos os quatros oligonucleotídeos testados. Esta amplificação espécie-específica foi confirmada pelo uso dois diferentes isolados de cada *S. paradoxus* (linha 2-3) e *S. bayanus* (linha 4-5), assim como a linhagem de *S. cerevisiae* (linha 1) produziu o mesmo padrão de amplificação mostrado anteriormente por Silva-Filho et al. (2005a). A partir desses resultados as espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” e seus híbridos interespecíficos puderam ser apropriadamente discriminados por estes oligonucleotídeos. Interessantemente, a linhagem *S. uvarum* tipo CLIB 533 (linha

6) produziu um padrão de amplificação similar a ambas as linhagens de *S. bayanus* Y 12624 e CLIB 181, especialmente com os oligonucleotídeos microsatélites GTG₅ e GACA₄ (Figura 1a,b). Somente pequenas diferenças foram observadas pelo uso do oligonucleotídeos M13 e INTRON para estas linhagens (Figura 1c,d) as quais podem ser devido a um polimorfismo intraespecífico. Outra observação nestas análises foi a diferença observada para todos os quatro oligonucleotídeos entre os híbridos *S. monacensis* e *S. carlsbergensis* (Figura 1), que são geralmente considerados como sinônimos. Isto sugere que alguns híbridos igualmente pelos mesmos ancestrais podem ter sua própria constituição genética. Tomando isto em consideração, sugere-se que qualquer isolado de leveduras que apresente o locus ITS1-5.8S-ITS2 com 850 pb, mas nenhum dos padrões espécie-específicos das seis espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” pode ser considerado como híbrido interespecífico.

Identificação molecular de leveduras comerciais, industriais e selvagens

Leveduras de vinho que têm sido comercializadas como *S. bayanus* e *S. uvarum* foram submetidas à análise de PCR e produziram um fragmento de rDNA de 850 pb. Adicionalmente, a digestão deste fragmento mostrou o padrão do grupo *Cerevisiae* para ambas as leveduras (Tabela 2). A análise de PCR-fingerprinting mostrou que elas produziram um padrão de amplificação com GTG₅ e M13 similar ao de *S. cerevisiae* e diferentes de seus homônimos tipo *S. uvarum* e *S. bayanus* (Figura 2). Portanto, os resultados indicam que estes isolados foram inicialmente classificadas incorretamente e devem pertencer à espécie *S. cerevisiae*. Similarmente, leveduras de vinho artesanal que foram classificadas por métodos bioquímicos como *S. pastorianus* e *S. uvarum* tiveram sua identidade analisada pelo oligonucleotídeo GTG₅. Os resultados mostraram que a linhagem GDB 776 produziu um padrão de amplificação similar a *S. cerevisiae* e não ao da linhagem tipo *S. pastorianus*, ao mesmo tempo em que a linhagem GDB 777 produziu um padrão de amplificação similar a *S. monacensis* e não ao da linhagem tipo *S. uvarum* (Figura 2). Além disso, pequenas diferenças no padrão de bandas mostram diferenças representativas ao nível das linhagens. Análise de

restrição do fragmento rDNA de 850 pb confirmaram que a linhagem GDB 776 assemelha-se ao grupo *Cerevisiae*, enquanto a linhagem GDB 777 assemelha-se ao grupo *Bayanus* (Tabela 2).

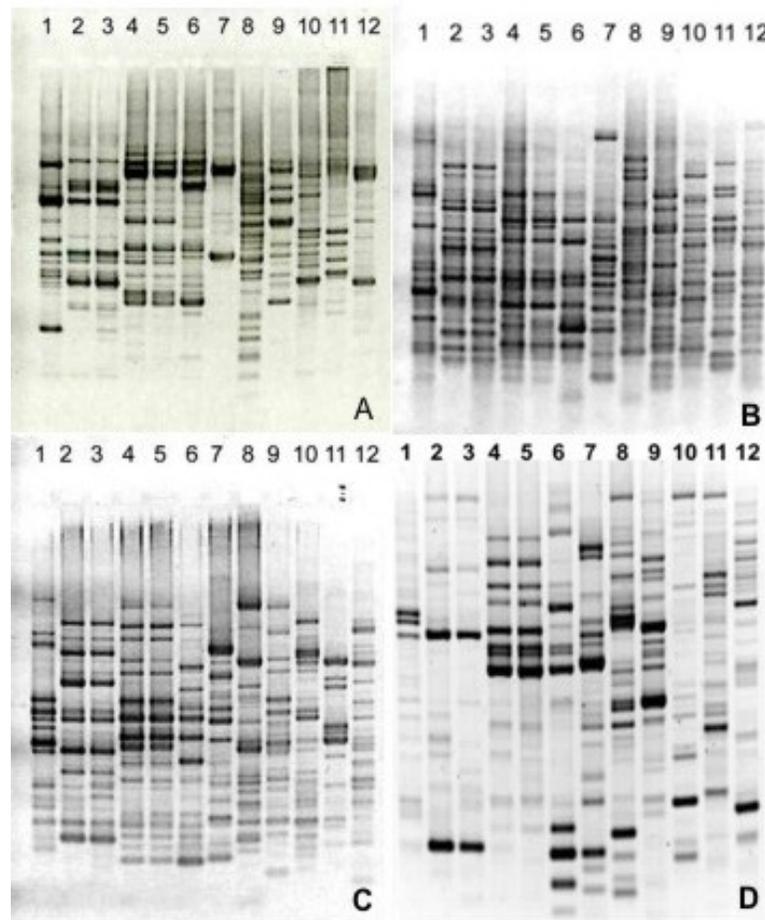


Figura 1. Perfis de amplificação das espécies de levedura do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” com a utilização dos oligonucleotídeos (GTG)₅ (painel A), (GACA)₄ (painel B), M13 (painel C) e E11 (painel D). Linha 1: *S. cerevisiae* Y 12632; Linha 2: *S. paradoxus* Y 17217; Linha 3: *S. paradoxus* CLIB 228; Linha 4: *S. bayanus* Y 12624; Linha 5: *S. bayanus* CLIB 181; Linha 6: *S. uvarum* CLIB 533; Linha 7: *S. pastorianus* Y 27171; Linha 8: *S. carlsbergensis* CLIB 176; Linha 9: *S. monacensis* CLIB 180; Linha 10: *S. cariocanus* Y 27337; Linha 11: *S. mikatae* Y 27341; Linha 12: *S. kudriavzevii* Y 27339.

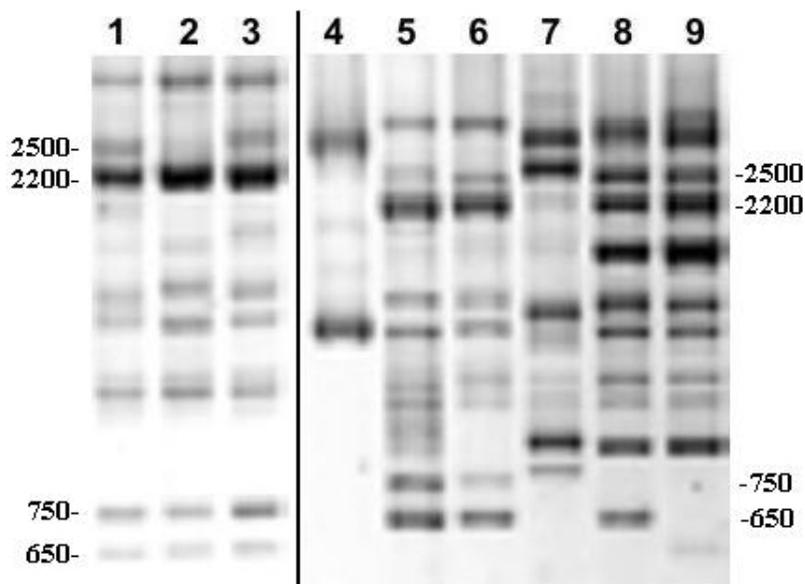


Figura 2. Perfis de amplificação com o oligonucleotídeo (GTG)₅ das leveduras *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 1), *S. bayanus* WY1 (Linha 2), *S. uvarum* WY2 (Linha 3), *S. pastorianus* Y 27171 (Linha 4), *S. pastorianus* GDB 776 (Linha 5), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 6), *S. uvarum* CLIB 533 (Linha 7), *S. uvarum* GDB 777 (Linha 8) e *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 9). Os valores apresentados correspondem ao tamanho das bandas da linhagem Y 12632.

A constituição genética destas leveduras de vinho foi confirmada por análise de RFLP do produto de amplificação de 0,6 kb do gene *MET2*. Da digestão com a enzima *EcoR1* o fragmento de *S. cerevisiae* produziu duas bandas de 0,39 kb e 0,21 kb (Figura 3, linha 1) enquanto o fragmento de *S. bayanus* produziu uma única banda de 0,6 kb (Figura 3, linha 7). Quando os fragmentos dos híbridos interespecíficos foram digeridos ambos os padrões foram produzidos (Figura 3, linha 5 e 8). Os resultados de restrição do gene *MET2* das leveduras de vinho comercial e da GDB 766 confirmaram sua identificação molecular como pertencente à espécie *S. cerevisiae* (Figura 3, linha 2-4), enquanto que a da linhagem GDB 777 mostrou o padrão de digestão dos híbridos (Figura 3, linha 5) similar ao padrão de digestão de *S. monacensis*. Os resultados obtidos com a digestão do produto de amplificação de 1,6 kb do locus YCL008c com a enzima *EcoRV* confirmaram os resultados acima, com o fragmento de *S. bayanus* permanecendo inteiro, o fragmento de *S. cerevisiae* produzindo bandas de 1 kb e 0,6 kb e os dos híbridos produzindo ambos os padrões (dados não mostrados).

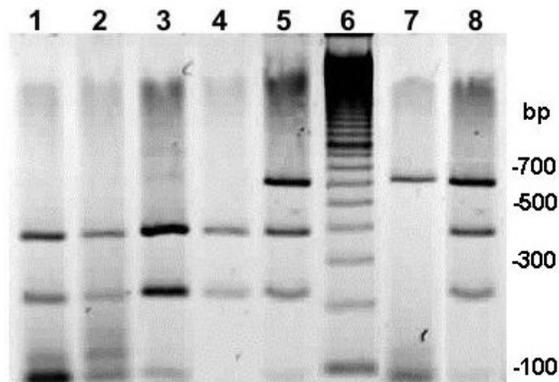


Figura 3. Padrão de restrição do gene *MET2* das linhagens *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 1), *S. bayanus* WY1 (Linha 2), *S. uvarum* WY2 (Linha 3), *S. pastorianus* GDB 776 (Linha 4), *S. uvarum* GDB 777 (Linha 5), *S. bayanus* CLIB 181 (Linha 7) e *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 8). O marcador de peso molecular 100 bp-ladder (Invitrogen) foi usado para se determinar o tamanho das bandas geradas (linha 6).

Identificação de híbridos na produção de álcool combustível

Trabalhos anteriores de nosso grupo concentraram-se na identificação da diversidade das leveduras no processo industrial de fermentação de álcool combustível. A partir deste trabalho, leveduras isoladas têm sido selecionadas baseada na análise de PCR do locus rDNA e por PCR-fingerprinting juntamente com o seqüenciamento do gene 26S do rRNA. Um desses isolados que foi nomeado C18, linhagem GDB 276, produziu um fragmento de 850 pb para o locus ITS1-5.8S-ITS2 e seu padrão de restrição foi característico do grupo *Cerevisiae* (Tabela 2). Entretanto, o padrão de PCR-fingerprinting para todos os quatros oligonucleotídeos testados foi diferente tanto de *S. cerevisiae* quanto das outras cinco espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”, bem como os seus híbridos (Figura 4). A análise de restrição do gene *MET2* e do locus YCL008c gerou fragmentos mostrando o padrão similar para *S. cerevisiae* (Figura 5), o que colabora com a análise de ITS1-5.8S-ITS2. Adicionalmente, o seqüenciamento da região D1/D2 do gene 26S do rRNA mostra seqüência de nucleotídeo semelhante à *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* (Basílio et al. 2005). Estes resultados sugerem fortemente que o isolado C18 pode corresponder a uma nova classe de híbridos que preserva principalmente o genoma da espécie *S. cerevisiae*.

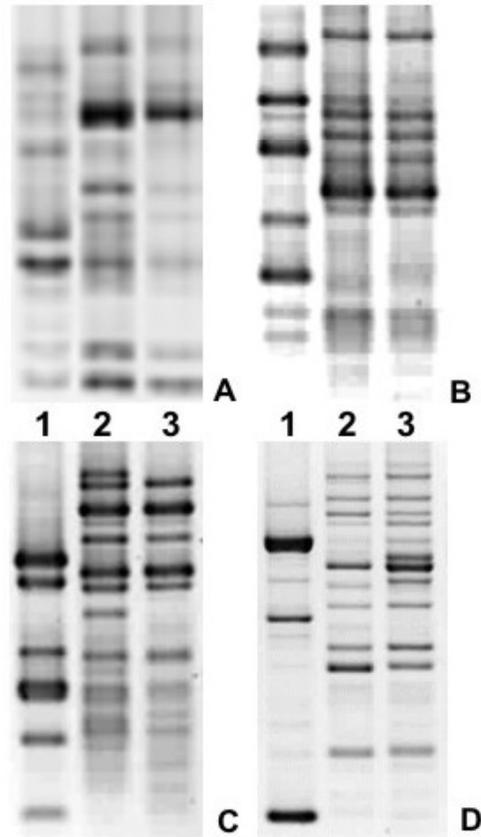


Figura 4. Perfis de amplificação com os oligonucleotídeos (GTG)₅ (painel A), (GACA)₄ (painel B), M13 (painel C) e E1 (painel D) das linhagens *Saccharomyces* sp. GDB 276 (Linha 1), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 2) e *S. uvarum* WY2 (Linha 3).

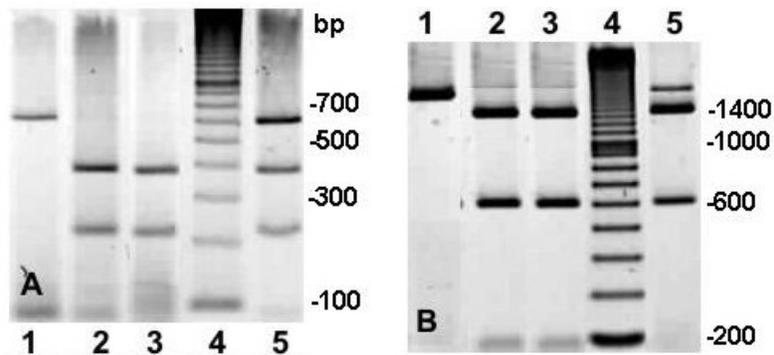


Figura 5. Padrão de restrição dos fragmentos do gene *MET2* (painel A) e do lócos *YCL008c* (painel B) das linhagens *S. bayanus* CLIB 181 (Linha 1), *S. cerevisiae* Y 12632 (Linha 2), *Saccharomyces* sp. GDB 276 (Linha 3) e do híbrido *S. monacensis* CLIB 180 (Linha 8). O marcador de peso molecular 100 bp-ladder (Invitrogen) foi usado para se determinar o tamanho das bandas geradas (Linha 4).

Tabela 3. Linhagens reclassificadas de acordo com os resultados deste trabalho.

Levedura	Linhagem	Levedura reclassificada
<i>S. bayanus</i>	WY1 ^C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. uvarum</i>	WY2 ^C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pastorianus</i>	GDB 776 ^A	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. uvarum</i>	GDB 777 ^A	<i>Saccharomyces monacensis</i>

^C isolados comerciais de vinho.^A isolados artesanais de vinho.

Discussão

O complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” é composto por seis espécies de leveduras reconhecidas que foram distintas por testes bioquímicos convencionais e são filogeneticamente muito próximas (Naumov 1996; Montrocher et al.1998; Kurtzman and Robnett 2003). Por isso somente o uso de marcadores moleculares baseado no uso do DNA, é vantajoso nas pequenas diferenças genômicas, esclarecendo problemas de identificação causados por sua relação biológica. A análise de restrição do fragmento de amplificação da ITS1-5.8-ITS2 rDNA definiu dois grupos no complexo. O primeiro grupo foi composto pelas espécies de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. cariocanus* e o segundo grupo foi composto por *S. bayanus*, *S. mikatae* e *S. kudriavzevii* (Tabela 2), o que está de acordo com Montrocher et al. (1998). A seqüência de nucleotídeos e RFLP-rDNA na região ITS mostrou que *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. cariocanus* foi apenas distinguidas umas das outras após análise de restrição com *HapII* e *ScrI*, assim como *S. mikatae* e *S. kudriavzevii* foram distinguidas da espécie *S. bayanus* pelo uso de *HapII* e *TaqI* respectivamente (Montrocher et al. 1998).

Analisando os resultados deste trabalho, todas as espécies foram claramente distinguidas por todos os quatro primers PCR-fingerprinting. Os oligonucleotídeos (GTG)₅ e M13 foram anteriormente utilizados para a análise das espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” (Torriani et al.1999) com o mesmo poder de discriminação mostrado no presente trabalho. Todavia, em

nossas análises foi usada uma reação com condições melhoradas e que produziu bandas mais nítidas e em maior quantidade (Figura 1). Contudo, a novidade foi a produção de padrões seguros de amplificação pelos oligonucleotídeos (GACA)₄ e Intron que estendeu o sinal genético para as seis espécies (Figura 1). A partir da combinação dos quatro oligonucleotídeos nos propomos a segura reclassificação de duas leveduras comerciais de vinho, inicialmente identificadas como *S. uvarum* e *S. bayanus* para novas linhagens de *S. cerevisiae*. Além disso, os resultados confirmaram a classificação da linhagem CLIB 553(CBS 99787) para *S. bayanus* (var. *uvarum*) como proposto no banco de dados da coleção de culturas CBS. O táxon *S. uvarum* foi modificado, a partir de espécies autênticas para *S. bayanus* e refletiu em diferentes momentos como espécie autêntica (Vaughan-Martini and Martini 1998). Recentemente, foi proposto por Pulvirenti et al. (2000) o restabelecimento como espécie própria baseada na restrição do locus NTS2 e no seqüenciamento parcial da região do gene 26s. Todavia, ele usou outras linhagens CLIB, as quais (CBS 395/CLIB 251) são anteriores ao tempo que a *S. uvarum* foi reconhecida como espécie autêntica. Considerando que diferentes linhagens a partir de leveduras de coleção foram reavaliadas por métodos taxonômicos baseada no DNA para a sua classificação atualizada.

Em adição à confirmação dos padrões espécie específicos, todos os quatro marcadores SPAR usados neste trabalho foram capazes de distinguir as leveduras consideradas híbridas. Já é consenso que *S. pastorianus* é um produto de hibridização entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Contudo *S. bayanus* foi considerada como um complexo de espécies crípticas (Casaregola et al. 2001). Adicionalmente, *S. carlsbergensis*, previamente considerada como sinônimo de *pastorianus* é uma levedura tetraplóide gerada a partir de uma hibridização entre *S. cerevisiae* e um membro do complexo *S. bayanus*, provavelmente *S. monacensis* (Hansen and Kielland-Brandt 1994). Ambas *S. carlsbergensis* CLIB 176 e *S. monacensis* CLIB 180 usadas neste trabalho foram consideradas sinônimos da *S. pastorianus* CBS 1513 e CBS 1508, respectivamente (Casaregola et al. 2001). De Barros Lopes et al. (2002) mostrou por análise de AFLP que *S. carlsbergensis* e *S. monacensis* são 35% e 30% similar para *S. pastorianus*

respectivamente. Desta forma os autores sugerem que após os eventos de hibridização devem ocorrer perdas genômicas ou rearranjos genéticos que produziram as diferentes linhagens de *S. pastorianus*. Em nossas análises, as linhagens *S. pastorianus* Y12171, *S. carlsbergensis* CLIB 176 e *S. monacensis* CLIB 180 produziram padrões de ampliações completamente distintos. Isto reforça a individualidade de cada híbrido mesmo que formado pelos mesmos parentais. A partir disso, parece que estes marcadores não seriam úteis na correta identificação dos híbridos, já que cada tipo de híbrido apresentaria padrões de amplificação distintos. Entretanto, propomos duas outras utilidades para este método. Primeiro padrão individual seria útil para seguir a dispersão destes tipos de células. Neste caso nos propomos que a linhagem isolada de vinho do Brasil é uma nova linhagem de *S. monacensis*. No banco de linhagens da coleção CBS *S. monacensis* é representada apenas pela linhagem CBS 1503 (correspondente a CLIB 180 usada neste trabalho), isolada por Hansen no começo do século XX na cervejaria Carlsberg da Dinamarca juntamente com a linhagem *S. carlsbergensis* 1513 (correspondente a CLIB 176 usada neste trabalho). Adicionalmente, as linhagens GDB 777 e CLIB 180 podem representar duas diferentes linhagens devido à presença do polimorfismo dos padrões de bandas do (GTG)₅. Por isso, a linhagem GDB 777 é tida como resultado da variação genética das células de CLIB 180 vinda para o Brasil de algum produtor local.

Segundo, nós consideramos uma das leveduras isoladas do processo de fermentação alcoólica industrial (isolado C18) como sendo um híbrido apresentando padrão ITS-RFLP do tipo *Cerevisiae* e com diferente padrão de amplificação SPAR. Este isolado foi identificado pelo seqüenciamento do gene rRNA-26s como *S. cerevisiae* ou *S. pastorianus* (dados não mostrados). Nós agora assumimos que corresponde a um novo tipo de híbrido produzido no processo de fermentação. Todos os híbridos neste complexo parecem ser produtos do cruzamento entre *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, com a maior parte do seu genoma a partir do parental não-*Saccharomyces cerevisiae*. A hibridização parece ser um evento complexo que envolve dois ou até mesmo três possíveis parentais, como mostra ser o caso da linhagem CID1 envolvida na produção de

sidras na França (Groth et al. 1999), e pode ainda envolver espécies do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” ou “sensu lato” (Marinoni et al. 1999). Por isso nós podemos especular que o híbrido C18 pode ter sido um produto de dois eventos independentes de hibridização nos quais um dos parentais sempre corresponde a uma célula de *S. cerevisiae*. Isto pode explicar a repetição do padrão RFLP de *S. cerevisiae* para os loci ITS, *MET2* e YCL008c, apesar dos diferentes padrões de PCR fingerprinting. Jaspersen et al. (2000) isolou leveduras *Saccharomyces* de várias cervejarias que apresentaram padrão rDNA-RFLP idêntico ao de *S. cerevisiae*, embora sua identificação fenotípica mostrou características comuns para ambas *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. Estes isolados mostraram correspondência com os híbridos formados durante a produção de cerveja. A formação de híbridos entre um raro cruzamento poliplóide de leveduras indústrias e leveduras laboratoriais suporta a possibilidade da formação de híbridos em condições industriais (Bell et al. 1998). Considerando esta hipótese, etapas adicionais mostrariam os possíveis parentais da linhagem C18 e o processo envolvido em sua formação na produção de etanol.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes pela sua grande contribuição nas discussões sobre o trabalho. Este trabalho foi financiado com recursos do CNPq, da Facepe e da Capes.

REFERENCIAS

- Baleiras-Couto, M.M., Eijsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. and van der Vossen, J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environm Microbiol* **62**, 41–46.
- Barnett, J., Painer, R.W. and Yarrow, D. (1990) *Yeasts: characteristics and identification*, 4th Ed. pp.1002. Cambridge: Cambridge University Press.

- Bell, P.J.L., Deere, D., Shen, J., Chapman, B., Bissinger, P.H., Attfeld, P.V. and Veal, D.A. (1998) A Flow Cytometric Method for Rapid Selection of Novel Industrial Yeast Hybrids. *Appl Environm Microbiol* **64**, 1669–1672.
- Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lapathitis, G., Kotyk, A. and Gaillardin, C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1607-1618.
- De Barros Lopes, M., Bellon, J.R., Shirley, N.J. and Ganter, P.F. (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* **1**, 323-331.
- De Souza-Liberal, A.T., Silva Filho, E.A., de Morais, J.O., Simões, D.A. and de Morais Jr, M.A. (2005) Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett Appl Microbiol* **40**, 19-23.
- Fernandez-Espinar, M.T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* **70**, 1–10.
- Groth, C., Hansen, J. And Piskur, J. (1999) A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int J Syst Bacteriol* **49**, 1933-1938.
- Hansen, J, and Kielland-Brandt M.C. (1994) *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene* **140**, 33-40.
- Jaspersen, L, Van der Ar Kühle, A. and Petersen, K.M. (2000) Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *Inter J Food Microbiol* **60**, 43-53.
- Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res* **3**, 417-432.
- Marinoni, G., Manuel, M., Petersen, R.F., Hvidtfeldt, J., Sulo, P. and Piskur, J. (1999) Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J Bacteriol* **181**, 6488-6496.

- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. and Dubourdieu, D. (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3887-3892.
- Matzke, M.A., Scheid, M.O., Matzke, A.J. (1999) Rapid structural and epigenetic changes in polyploid and aneuploid genomes. *Bioessays* **21**, 761-767.
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C. and Marmeisse, R. (1998) Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences. *Int J Syst Bacteriol* **48**, 295-303.
- Naumov, G. I. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J Ind Microbiol Biotechnol* **17**, 295–302.
- Naumov G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J. and Roberts, I.N. (2000) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1931-1942.
- Naumova, E.S., Naumov, G.I. and Molina, E.I. (2000) Genetic variation among European strains of *Saccharomyces paradoxus*: results from DNA fingerprinting. *Syst Appl Microbiol* **23**, 86-92.
- Naumova E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L. and Naumov, G.I. (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Res* **3**, 177-184.
- Pulvirenti A., Nguyen H.-V., Caggia, C., Giudici, P., Rainieri, S. and Zambonelli, C. (2000) *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters* **192**, 191-196.
- Sambrook, j., Fritsch, E.F. and Maniats, T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2^o ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbo: New York, 1989.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* **231**, 19–26.
- Silva-Filho, E.A., dos Santos, S.K.B., Resende, A.M., de Moraes, J.O., de Moraes Jr, M.A. and Simoes, D.A. (2005a) Yeast population dynamics of industrial fuel-

ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek* **88**, 13-23.

Silva-Filho, E.A., de Melo, H.F., Antunes, D.F., dos Santos, S.K., Resende, A.M., Simoes, D.A. and de Moraes Jr, M.A. (2005b) Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**, 481-486.

Techera, A.G., Jubany, S., Carrau, F.M., Gaggero, C. (2001) Differentiation of industrial Wine Yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology* **13**, 71-75.

Torriani, S., Zapparoli, G. and Suzzi, G. (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 207–215.

Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1998) *Saccharomyces Meyen ex Reess*. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study* (Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., Eds.), 4th edn., pp. 358-371. Elsevier, Amsterdam.

7.0 – CONCLUSÕES

- A utilização da técnica de PCR-fingerprinting permitiu identificar e diferenciar todas as leveduras do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”;
- A técnica de PCR-fingerprinting permitiu estabelecer um padrão próprio de amplificação para todas as espécies distinguindo-as interespecificamente;
- Também foi possível estabelecer um padrão de amplificação para distinguir interespecificamente os híbridos do complexo *Saccharomyces* “sensu stricto” através da técnica de PCR-fingerprinting;
- A amplificação da região ITS1-5.8-ITS2 rDNA permitiu definir dois grupos no complexo *Saccharomyces* “sensu stricto”;
- Os resultados com os oligonucleotídeos permitiu propor a segura reclassificação das leveduras comerciais de vinho *S. uvarum* e *S. bayanus* como *S. cerevisiae*;
- Os resultados obtidos com os quatros primers oligonucleotídeos na PCR-fingerprinting permite propor que alguns híbridos com os mesmos ancestrais possam apresentar a sua própria constituição genética;
- Os resultados apresentados permitem propor que a linhagem isolada de vinho artesanal seja uma nova linhagem de *S. monacensis*;
- Os resultados apresentados permitem propor também que a levedura isolada do processo de fermentação alcoólica industrial C18 trata-se de um híbrido.

8.0 - ANEXOS

Journal of Applied Microbiology

Including Letters in Applied Microbiology & Annual Symposium - the Official Journals of the Society for Applied Microbiology.

Published for the Society for Applied Microbiology

Edited by:

A. Gilmour

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2004: 51/133 (Biotechnology & Applied Microbiology); 48/84 (Microbiology)

Impact Factor: 1.835 (ISI Impact Factor for 2004)



Including *Letters in Applied Microbiology* & Annual Symposium. The Official Journals of the Society for Applied Microbiology.

Journal of Applied Microbiology publishes research and review papers on all aspects of applied microbiology; including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, taxonomy, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of relevance to the field as a whole.

Rapid Production: Average time from acceptance to publication is now around 5 months.

The preparation and presentation of manuscripts

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere.

Format of papers

Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively, and should have line numbers. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off. The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs. Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*.

Submissions

Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice. Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://appliedmicrobiology.manuscriptcentral.com/> . If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant jam@oxon.blackwellpublishing.com. A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc), Rich Text Format (.rtf), Portable Document Format (.pdf) or PostScript (.ps) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

1. Full-length papers

The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

The paper will have the following sections:

- (a) ABSTRACT: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- (b) INTRODUCTION: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;

- (c) MATERIALS AND METHODS: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control

(JAM 2004 96(2):221; available at <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>);

- (d) RESULTS: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- (e) DISCUSSION: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- (f) ACKNOWLEDGEMENTS;
- (g) REFERENCES: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

Layout of references

The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to *Index Medicus* (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127–135.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan Parasites in Water* ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91–96. London: The Royal Society of Chemistry.

Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

English usage

Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

Headings

The hierarchy of the headings used is: First Order

MATERIALS AND METHODS

Second Order

Sample preparation

Third Order

The media

First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

Abbreviations and units

The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (*g*). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group)

A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae). Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names: *Acet.*, *Acetobacter*; *Ac.*, *Acinetobacter*; *Act.*, *Actinomyces*; *Aer.*, *Aeromonas*; *Ag.*, *Agrobacterium*; *Alc.*, *Alcaligenes*; *Alt.*, *Alteromonas*; *B.*, *Bacillus*; *Bact.*, *Bacteroides*; *Bord.*, *Bordetella*; *Bran.*, *Branhamella*; *Br.*, *Brucella*; *Camp.*, *Campylobacter*; *Cit.*, *Citrobacter*; *Cl.*, *Clostridium*; *Coryne.*, *Corynebacterium*; *Cyt.*, *Cytophaga*; *Des.*, *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper); *Edw.*, *Edwardsiella*; *Ent.*, *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper); *Erw.*, *Erwinia*; *E.*, *Escherichia*; *Eu.*, *Eubacterium*; *Fl.*, *Flavobacterium*; *Fus.*, *Fusobacterium*; *G.*, *Gemella*; *H.*, *Haemophilus*; *Kl.*, *Klebsiella*; *Lact.*, *Lactobacillus*; *L.*, *Lactococcus*; *Leg.*, *Legionella*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Listeria*; *Meth.*, *Methanobacterium* or *Methanococcus* (spell out if both appear in same paper); *Mic.*, *Microbacterium*; *M.*, *Micrococcus*; *Mor.*, *Moraxella*; *Myco.*, *Mycobacterium*; *Myc.*, *Mycoplasma*; *N.*, *Neisseria*; *Nit.*, *Nitrobacter* or *Nitrosomonas* (spell out if both appear in same paper); *Noc.*, *Nocardia*; *Past.*, *Pasteurella*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Ple.*, *Plesiomonas*; *Pr.*, *Proteus*; *Ps.*, *Pseudomonas*; *Rh.*, *Rhizobium*; *R.*, *Ruminococcus*; *Salm.*, *Salmonella*; *Ser.*, *Serratia*; *Sh.*, *Shigella*; *Staph.*, *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *S.*, *Streptomyces*; *T.*, *Thiobacillus*; *V.*, *Vibrio*; *X.*, *Xanthomonas*; *Y.*, *Yersinia*. For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp. In this, many species names not included in the Approved Lists (www-sv.cict.fr/bacterio) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered. The nomenclature used when describing the species of salmonella should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word “serotype” and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalised

(for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm.* Typhimurium).

Nucleotide sequences

Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript;

Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information;

Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated. Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of JAM table style, [click here](#).

Figures

Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in JPEG and photomicrography indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular

mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

Electronic submission. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at:

<http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

Colour figures. It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf. If you are unable to download the form please contact the Editorial Office.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Supplementary material

Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at

the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

Review Articles

Review articles should not exceed 10–12 Journal pages.

Preparation of manuscript

These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available. The final manuscript must not exceed 32 pages (A4) with double-spaced typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only.

Manuscript presentation

The headings in these Review articles are of the author's choice; they should be listed under the heading 'Contents' on page 2 of the manuscript. A short SUMMARY of 150-200 words must be included. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and email address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

- A. The title should be as shown here. Lower case after first letter
- B. The author(s) – I.M. Able, J. Brown and A. Lincoln.
- C. Address – upper and lower case.
- D. List of contents, to follow title page.
- E. 1. Summary
- 2. Introduction
- 2.1
 3.
- 3.1
 3.2
 E. The manuscript
- F. 1 SUMMARY (left flush)
- G. 2 INTRODUCTION
- H. 3 INFECTIONS CAUSED BY PATHOGENS
- I. 3.1 Skin infections

- J. 3.2 Pulmonary infections
- K. 4 INCIDENCE
- L. 5 TREATMENT
- M. 6 CONCLUSIONS
- N. 7 REFERENCES

2. Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

Offprints

Authors will be provided with electronic PDF offprint of their article. This PDF may be posted on the Contributing Authors' own website for personal or professional use, or on the Contributing Authors' internal university or corporate network/intranet, or on a secure external website at the Contributing Authors' institution, providing access is limited to members of the Contributing Authors' university or corporation. Paper offprints may be ordered at prices as quoted on the order form that accompanies proofs.

Exclusive licence

Papers are accepted on the understanding that the *Journal* is granted exclusive licence to publish them.

OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via

Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of £1250 (equivalent to \$2500), excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM_OOF.pdf

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s) Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

Abbreviations

These are some examples of common abbreviations used in *Journal of Applied Microbiology*:

A, Absorbance

approx. or *ca*, approximately

at. wt., atomic weight

bp, base pairs

by vol, by volume (for greater than two component liquids)

cm², per square centimeter

cpDNA, chloroplast DNA

D, attenuation

(see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html>)

Da (kDa), daltons (kilodaltons)

edn, edition

ed., editor(s)

ergs. sq. mm⁻¹, ergs per square millimeter

IU, International unit

kbp, kilobase pair

Mabs, monoclonal antibodies

MIC, minimal inhibitory concentration

mol l⁻¹, moles per litre

Mr, molecular mass

nm, nanometre

OD, optical density

OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis

ORF or orf, open reading frame

P, probability

PFG, pulsed field gradient

ppm, parts per million

recDNA, recombinant DNA

rev min⁻¹, revolution per minute

SD, standard deviation

SE, standard error

subsp., subspecies

U, enzyme unit

UV, ultraviolet

vs, versus

v/v, volume per volume

w/v, weight per volume

w/w, weight per weight

There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, PLC, RNA or SDS-PAGE.

OnlineEarly

Journal of Applied Microbiology is covered by Blackwell Publishing's *OnlineEarly* service.

OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *OnlineEarly* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of *OnlineEarly* articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so *OnlineEarly* articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser

concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/jam_caf.pdf

Colourwork Agreement form:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf