


# ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE COX2 DA LEVEDURA DEKKERA BRUXELLENSIS

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.814112402102>

Data de aceite: 16/10/2024

### Felipe Moraes Alecrim

Docente do curso de Farmácia da Faculdade Maurício de Nassau – Garanhuns e Docente do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas (AFYA) – Garanhuns

### Edvânia Maria Soares da Silva

### Maria Isabel Pereira Marques

### Paulo Sérgio Rocha Lima

### Marlon Alves Cordeiro

### Karla Roberta Alves de Carvalho

### Maria Júlia Florentino dos Santos

### Valdilene Apolônia da Silva Domingos

### Gerlaine Cardoso dos santos

### Sidnei Soares e Silva

### Luiz Pinheiro Filho

### Jailson da Silva

**RESUMO:** A levedura *Dekkera bruxellensis*, teleomorfo de *Brettanomyces bruxellensis*, é a maior contaminante nas destilarias que utilizam caldo de cana no mundo, provocando a diminuição da produtividade de etanol e, conseqüentemente, ocasionando prejuízos à indústria. A despeito de sua importância, poucos estudos genéticos estão publicados na literatura científica. Os trabalhos recentes do nosso grupo mostram que esta levedura apresenta uma grande adaptabilidade ao processo industrial e propomos uma análise genômica ampla para identificar os fatores responsáveis por esta característica. No presente trabalho, avaliamos o polimorfismo do gene *COX2* que codifica a enzima citocromo oxidase II. Os resultados mostraram uma inesperada maior similaridade entre as seqüências do gene *COX2* de isolados industriais de *D. bruxellensis* com seu ortólogo em *D. custersii* do que com a seqüência de *COX2* da linhagem tipo de *D. bruxellensis* depositada no GenBank. Além disso, iniciamos a análise *in silico* comparada do genoma mitocondrial das leveduras ascomicota que possuem genoma mitocondrial seqüenciado e depositado GenBank. Com isso foi possível a construção de um mapa físico do genoma mitocondrial deste clado.

Seis espécies apresentando similaridade genômica nuclear com *D. bruxellensis* foram submetidos a alinhamentos múltiplos através do programa computacional Mega v. 4.0. A ordem gênica foi definida como L-rRNA COII COIII S-rRNA COI ATPase 8 ATPase 6 Cyt b ATPase 9 Var 1, baseado no genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Os programas CODEHOP e Codon Usage foram usados com a finalidade de refinar o desenho de primers degenerados a fim de se amplificar os genes ortólogos de *D. bruxellensis*. Os alinhamentos se mostraram representativos para construção dos primers, uma vez que foi observada uma alta variabilidade entre as seqüências gênicas sintênicas dos genes estruturais anteriormente citados. Estes dados proporcionam a base para futuras análises da genética e da evolução da população de *D. bruxellensis*, que servirá de base para o estabelecimento de correlações entre a variabilidade e genética e as capacidades fisiológicas de diferentes cepas industriais de *D. bruxellensis* em busca de melhor entendimento desse —fitness competitivoll desta levedura no ambiente industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** microbiologia, levedura, bioinformática, genética molecular.

## PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE COX2 GENE OF DEKKERA BRUXELLENSIS YEAST

**ABSTRACT:** The yeast *Dekkera bruxellensis*, the teleomorph of *Brettanomyces bruxellensis*, is the main of distilleries spoilage worldwide, provoking the reduction of the productivity of ethanol and, consequently, causing economical losses to industries that use sugar cane juice. Despite of this importance, few genetic studies of this yeast can be found in the scientific literature. The recent works of our group show that this yeast presents a great adaptability to the industrial process and we propose wild genomic analysis to identify the responsible factors for this characteristic. In the present work, we evaluated the polymorphism of the *COX2* gene that encodes the cytochrome oxidase II. The results showed an unexpected higher similarity of the *COX2* nucleotides sequences of industrial isolates of *D. bruxellensis* with its orthologous in *D. custersii* than with the *COX2* sequence of the *D. bruxellensis* type strain deposited at NCBI. The explanation for that similarity requires further investigation. We also started the *in silico* comparative analysis of the mitochondrial genome of all ascomycota yeast sequenced so far, whose sequences are deposited at the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Thus, a putative physical map of the mitochondrial genome of this clade was possible. Six species presenting nuclear genomic similarity with *D. bruxellensis* had been submitted to the alignments through the computational program Mega v. 4.0. The gene order was defined as L-rRNA COII COIII S-rRNA COI ATPase 8 ATPase 6 Cyt b 9 ATPase 9 Var 1, based in the genome of *Saccharomyces cerevisiae*. The program CODEHOP and Codon Usage was used with the objective to refine the design of degenerated primers in order to amplify *D. bruxellensis* orthologous genes. The alignments had shown representative for construction of primers, a time that had a good conservation between the nearly genetic sequences of the structural genes previously cited. These dates provide resource to further analyses of the population genetics and evolution of *D. bruxellensis* and of the genetic bases of its physiological capabilities

**KEYWORDS:** molecular biology, yeasts, microbiology, bioinformatics.

## INTRODUÇÃO

As leveduras ocupam uma posição de destaque no campo da biotecnologia industrial em vista de sua utilização nos processos de fermentação tradicional. Tem-se a previsão de que a produção tradicional de produtos, por indústrias cervejeiras, vinícolas, indústrias de bebidas destiladas e de combustíveis, e a produção de biomassa, pela indústria alimentícia, irão continuar a fornecer a maior quantidade de produtos fermentados do mundo.

Do ponto de vista fisiológico dois grupos de leveduras desenvolveram a habilidade de crescer mesmo na ausência de oxigênio: os clados *Saccharomyces* e *Dekkera/Brettanomyces*. Isto sugere que o ancestral dos ascomicetos modernos deve ter sido completamente dependente da presença de oxigênio para o crescimento, demonstrando uma vantagem adaptativa frente aos outros clados.

Os estudos de genômica comparativa com as várias outras espécies de hemiascomicetos com genomas já seqüenciados têm permitido situar os fungos em seus respectivos clados. Os dados produzidos pelo grupo da UFPE mostram uma alta variabilidade genética entre isolados de *S. cerevisiae* de álcool combustível, a exemplo do que se tem mostrado para isolados da indústria vinícola. O mesmo não ocorre para o grupo *Dekkera/Brettanomyces*, que tem pouquíssimas seqüências publicadas. Atualmente, o nosso grupo de pesquisa tem utilizado os dados do seqüenciamento parcial do genoma de *Dekkera bruxellensis* fornecidos pelo Prof. Jure Piskur, da Universidade de Lund, na Suécia, para identificar genes envolvidos em vários aspectos do metabolismo e resposta às condições ambientais nessa espécie. Entretanto, informações sobre os genes mitocondriais seriam muito importantes no contexto dos mecanismos de adaptabilidade desta levedura ao ambiente industrial, bem como na exploração de sua capacidade fermentativa, já demonstrada também em trabalhos recentes do grupo.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo a análise do gene mitocondrial *COX2* com o intuito de reconstruir sua filogenia junto aos hemiascomicetos, avaliar o padrão de evolução do genoma mitocondrial em comparação com o genoma nuclear e auxiliar em futuros trabalhos de fisiologia molecular desta levedura.

## REVISÃO DA LITERATURA

### Fermentação alcoólica

#### *Histórico*

As leveduras estão ligadas ao homem, participando dos processos de panificação, produção de vinho, de cerveja, da produção de álcool combustível e de outras bebidas fermentadas. Na década de 1970 o processo fermentativo se tornou mais importante, comercial e socialmente, em âmbito nacional com a implantação do Programa Pró-Álcool do governo federal. Este programa estimulou não apenas a produção do etanol como um combustível ambientalmente limpo, mas todo o parque industrial automotivo brasileiro. A partir desta perspectiva houve um crescimento na demanda de álcool combustível obtendo assim um aumento na produção de etanol. Com isso várias iniciativas de desenvolvimento científico e tecnológico foram apoiadas com recursos públicos e privados.

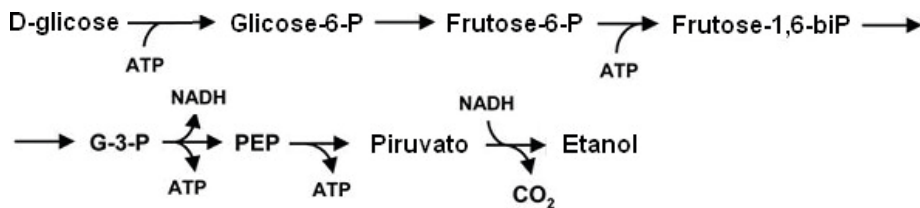
A levedura *S. cerevisiae* é tradicionalmente o microrganismo mais utilizado nos processos fermentativos industriais. Esta levedura apresenta características fisiológicas importantes para o processo industrial, tais como o metabolismo do tipo —Crabee-treell positivo, produzindo etanol mesmo na ausência de oxigênio, com alta eficiência fermentativa e alta tolerância a etanol. Varias linhagens desta levedura estão presentes nos processos fermentativos industriais (Silva-Filho *et al.*, 2005a; Silva-Filho *et al.*, 2005b).

#### *O metabolismo fermentativo*

O metabolismo celular pode ser compreendido por um conjunto de reações altamente coordenadas, interligadas de forma que o produto de uma primeira reação torna-se substrato de uma segunda reação e assim sucessivamente. O metabolismo é formado por duas fases : catabolismo também denominada de fase degradativa e anabolismo, denominado de biossíntese. Nas vias catabólicas ocorre liberação de energia química na forma de ATP e NADH, os quais são utilizados na via anabólica para converter moléculas precursoras pequenas em macromoléculas celulares.

Sob o ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo catabólico anaeróbico que não envolve a cadeia respiratória ou citocromos. O processo da fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose), no interior da célula de *S. cerevisiae* até a formação de etanol e CO<sub>2</sub> havendo liberação de energia química e térmica.

O fenômeno de crescimento anaeróbico ocorre quando as enzimas da cadeia respiratória e do ciclo de Krebs têm sua síntese reprimida, um fenômeno chamado de repressão catabólica por glicose, assim quando essa é consumida ocorre depleção de açúcares no meio favorecendo as enzimas do metabolismo respiratório as quais, passam a ser sintetizadas .



**Figura 1.** Esquema da fermentação alcoólica em *S. cerevisiae*. PEP = Fosfoenolpiruvato. Adaptado.

### *Microbiologia do processo fermentativo*

Tradicionalmente as indústrias produtoras de álcool combustível utilizavam levedura de panificação para iniciar o processo fermentativo. Hoje já existem até linhagens comerciais específicas para esta fermentação, tais como as linhagens PE- 2, CAT-1 e BG-1 (Lallemand Inc., Canadá). Atualmente, mais uma linhagem foi adicionada a esse elenco, chamada JP1, que foi isolada e seqüenciada por Silva- Filho *et al.*, (2005b) e é comercializada atualmente sob a marca Fermol Distiller® (AEB Group, Brasil). Em contrapartida, o processo industrial também apresenta uma população de não *S. cerevisiae* chamadas de contaminantes pelo fato de a fermentação alcoólica industrial para produção de álcool combustível ser realizada sem esterilização prévia do meio de cultura, e da população de leveduras utilizada (*Saccharomyces cerevisiae*) ser reciclada para o processo após centrifugação. As contaminações bacterianas no processo industrial são controladas mantendo-se o pH em valores baixos (cerca de 3,5), ou, em vários casos, utilizando-se antibióticos. Estas medidas não são, entretanto, eficazes para combater contaminações do processo por leveduras não-*S. cerevisiae*.

Ocasionalmente, observam-se problemas operacionais de queda do rendimento e retardo na fermentação associados às contagens elevadas dessas leveduras contaminantes. Um amplo trabalho de monitoramento em destilarias da região Nordeste mostrou que *Dekkera bruxellensis* é a levedura contaminante mais freqüente nas destilarias que utilizam caldo de cana bruto em sistemas de fermentação, sendo também a responsável pelos episódios de contaminação mais severos (Basílio *et al.*, 2005).

Sherata (1960) identificou a presença de 14 espécies de levedura não-*S. cerevisiae* do caldo de cana que pertenciam aos gêneros *Candida*, *Endomyces*, *Hansenula*, *Kloekera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torulopsis*. Logo após, espécies de *Debaromyces*, *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram também identificadas neste substrato (de Azeredo *et al.*, 1998). Nos últimos anos, mais espécies dos gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kloekera*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* e *Pichia* têm sido identificadas no processo fermentativo industrial tanto para a produção de etanol combustível quanto para a produção de cachaça (Cabrine & Gallo 1999; Guerra *et al.*, 2001; Schwan *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2002; Olasupo *et al.*, 2003). Recentemente, Basílio *et al.*, (2008) utilizaram pela primeira vez no Brasil técnicas moleculares para tipagem e identificação e mostraram a presença de mais de 30 espécies de leveduras no processo fermentativo em várias destilarias da região Nordeste (Basílio *et al.*, 2008), dentre as quais destacam-se as espécies *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis* e *Pichia galeiformis*.

## DEKKERA BRUXELLENSIS: BIOLOGIA E FISILOGIA DA ESPÉCIE

### Ecologia

Em 1960 van der Walt e van Kerken relataram a formação de ascosporos em linhagens de leveduras previamente classificadas como leveduras *Brettanomyces*, tidas como não esporulantes, e propuseram o novo gênero *Dekkera* para acomodar esta fase teleomorfa. Barnett *et al.* (2002) reconheceu quatro espécies neste gênero: *D. bruxellensis*, *D. anomala*, *D. curstesianus* e *D. naardenensis*.

Ao microscópio as células desta levedura são esferoidais a elipsoidais, muitas vezes ogivais (Figura 1), ou podem também ser cilíndricas ou alongadas, e ainda podem exibir pseudomicélio. A reprodução vegetativa se dá por brotamento.

Na reprodução sexuada, os ascos são evanescentes e possuem um a quatro ascosporos. Os ascosporos apresentam um formato de chapéu ou esférico com uma borda tangencial. Quando liberados, os esporos tendem a se agrupar. Como características gerais, além das citadas, podem ainda ser listados seu lento crescimento, curta duração de vida em placas, aroma característico, forte produção de ácido acético a partir de glicose, estímulo da fermentação pelo oxigênio molecular e exigência de fonte externa de vitaminas.



**Figura 1.** Células da levedura *Dekkera bruxellensis* CBS74.

Fonte: <http://www.ncyc.co.uk/photo-ncyc-CBS74.html>

A *D. bruxellensis* é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono, entre as quais, glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e etanol. As fontes de nitrogênio utilizadas por esta levedura incluem amônia, prolina, arginina e nitrato (Conterno *et al.*, 2006). Além disto, assim como *S. cerevisiae*, *D. bruxellensis* é tolerante a etanol, possui anaerobiose facultativa, é petite positiva (capaz de sobreviver sem DNA mitocondrial) e Crabtree positiva, ou seja, apresenta metabolismo fermentativo quando altas concentrações de glicose estão presentes no meio mesmo em condições aeróbicas (Woolfit *et al.*, 2007; Piskur *et al.*, 2006).

Este tipo de metabolismo produz certos componentes que apresentam odores fenólicos e o ácido acético, lembrando “couro” ou “urina de cavalo” em vinhos tintos, dentre outros (Licker *et al.*, 1998; Olsen, 2002). O aumento na produção de ácido acético e compostos fenólicos inibem o crescimento de *S. cerevisiae* e, portanto, diminui a capacidade desta levedura em produzir etanol (Lema *et al.*, 1996; Gerós *et al.*, 2000).

Apesar de *S. cerevisiae* ser o principal microrganismo fermentador, outras espécies foram identificadas nestes processos. Embora a maioria das leveduras encontradas pareça não exercer qualquer efeito, algumas podem agir como contaminantes (Basílio *et al.*, 2005). Um estudo realizado em diversas destilarias do Nordeste do Brasil mostrou que a espécie *D. bruxellensis* é a principal levedura contaminante dos sistemas de fermentação. Este mesmo trabalho mostrou que a sub-população de *D. bruxellensis* substitui a de *S. cerevisiae*, mesmo com repetidas ocasiões de troca da biomassa celular total (de Souza Liberal *et al.*, 2007). Por causa desta habilidade de substituir a *S. cerevisiae* na população de leveduras, *D. bruxellensis* representa um dos contaminantes mais significativos em destilarias que fermentam o caldo da cana em sistemas contínuos. Na produção de etanol combustível, quando as contagens de *D. bruxellensis* estão aumentadas, observa-se uma diminuição da produtividade volumétrica do etanol, acompanhada de significativo prejuízo econômico (de Souza Liberal *et al.*, 2007). Além disso, a maioria dos estudos realizados tem mostrado que *D. bruxellensis* é a espécie prevalente em eventos de contaminação de produtos de fermentação (de Souza Liberal *et al.*, 2007; Röder *et al.*, 2007; Renouf & Lonvaud-Funel, 2007; Phister & Mills, 2003; Miot-Sertier & Lonvaud-Funel, 2007).

Embora haja a percepção de que *D. bruxellensis*, principalmente na sua forma anamorfa *B. bruxellensis*, representa um contaminante industrial (o conceito de contaminação foi revisto por Loureiro & Malfeito-Ferreira, 2003), dados recentes mostram que esta levedura é capaz de produzir etanol em rendimentos muito próximos àqueles apresentados por *S. cerevisiae* (de Souza Liberal *et al.*, 2007) e existe até a proposta de utilizar esta levedura em processos fermentativos em associação com a bactéria *Lactobacillus vini* (Passoth *et al.*, 2007). Por outro lado, o problema causado pela presença desta levedura em altas contagens no meio é o maior tempo de fermentação que é necessário para converter o açúcar em etanol (de Souza Liberal *et al.*, 2007), o que provoca atraso na produção e no rendimento diário do processo. Esta baixa produtividade pode estar relacionada, por exemplo, com a menor capacidade fermentativa específica em decorrência da menor metabolização da sacarose (Basílio *et al.*, 2008).

Para se tornar predominante na população de leveduras, *D. bruxellensis* deve crescer a uma taxa mais alta do que *S. cerevisiae* nas mesmas condições. Uma hipótese sugerida é que *D. bruxellensis* provavelmente possui maior resistência ao etanol do que *S. cerevisiae*, conseguindo desta forma, superar a população desta última nas fases finais da fermentação (Renouf *et al.*, 2006). Adicionalmente, em um sistema de fermentação contínua com reciclagem de células, altas densidades celulares são atingidas e o suprimento de nutrientes para o crescimento celular torna-se limitado. Nestes ambientes, a competição é determinada principalmente pela habilidade de utilizar o fator limitante do crescimento. Se *D. bruxellensis* é capaz de metabolizar um nutriente disponível mais eficientemente, ou se for capaz de captá-lo com maior afinidade do que *S. cerevisiae*, sua taxa de crescimento pode ser bem maior nesta condição particular.

Dentre as evidentes diferenças metabólicas entre *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* destaca-se a capacidade desta última de usar vias metabólicas diferentes, utilizando a via do ácido tricarboxílico e os genes agregados a eles na produção de etanol.

## Genética de *Dekkera*

*A genética de Dekkera é pouco conhecida*

O gênero *Dekkera* pertence à família Saccharomycetacea e é considerado um parente distante de *Saccharomyces*, ambos os gêneros fazendo parte do grupo dos hemiascomicetos. A validação do gênero *Dekkera* foi feita a partir das análises de restrição do DNA ribossomal que estabeleceu inequivocamente a equivalência entre os gêneros *Brettanomyces* (anamorfo) e *Dekkera* (teleomorfo) e suas espécies (Molina et al. 1993). Posteriormente, a separação das duas espécies *D. bruxellensis* e *D. anomala* foi validada a partir das análises filogenéticas do locus 18S do DNA ribossomal (Cai et al. 1996). O seqüenciamento da região variável D1/D2 do gene ribossomal 26S também mostrou que isolados industriais podem ser inequivocamente identificados com *D. bruxellensis*, sendo diferenciados da espécie *D. anomala*. Das quatro espécies reconhecidas no gênero, *D. bruxellensis* é capaz de crescer na ausência de oxigênio (Viser et al., 1990), e apresenta metabolismo do tipo *Crabtree*-positivo, ou seja, fermenta hexoses produzindo etanol mesmo na presença de oxigênio (Renouf et al., 2006). Estas características a torna muito semelhante à espécie *S. cerevisiae*.

De fato, na natureza apenas dois grupos de leveduras parecem ter desenvolvido a habilidade de se desenvolver na ausência de oxigênio: um deles pertence ao clado *Saccharomyces* e o outro ao clado *Dekkera/Brettanomyces* (Piskur e Langkjaer, 2004). Isto indica que o ancestral dos ascomicetos modernos deve ter sido completamente dependente da presença de oxigênio para o crescimento. Após os eventos de especiação, algumas linhagens de leveduras foram diminuindo progressivamente a dependência do oxigênio pelo remodelamento de vias metabólicas e pelo aparecimento de novos genes. Para o grupo *Saccharomyces*, estudos de comparação de genes mitocondriais com as várias outras espécies de hemiascomicetos com genomas já seqüenciados têm permitido situar os principais eventos desse processo. O mesmo não ocorre para o grupo *Dekkera/Brettanomyces*, que tem pouquíssimas seqüências publicadas (Woolfit et al., 2007).

Com base na descoberta feita Ephrussi (1950), Woolfit et al., em 2007 selecionou a cepa CBS 2499 para análises genômicas por esta ser: representante maior no clado *D. bruxellensis*, por seu tamanho do genoma ser estimado em 19,4 Mb, ser de fácil manipulação em laboratório e principalmente por esta produzir mutantes —petitell, permitindo o sequenciamento para construção de clones sem contaminação do DNA mitocondrial, contudo dentre os contigs gerados alguns deles apresentam similaridade com genes mitocôndriais quando comparados por BlastX. A partir desse sequenciamento foram



obtidos 14.860 quadros de leitura aleatórios desta biblioteca genômica que se encontram dentro de 5.407 contigs, totalizando aproximadamente 7,6 Mb dos dados da seqüência, dando uma estimativa do tamanho do genoma, indicando assim que apenas foi seqüenciado 40% deste com uma densidade gênica estimada na ordem de 7.430 genes codificadores de proteínas (Woolfit et al., 2007). Foram identificadas 2.606 seqüências gênicas com homologia parcial ou total com *S. cerevisiae* e 277 genes ortólogos a espécie não- *S. cerevisiae* que, contudo, pertenciam a família *Saccharomycetales* evidenciando ,assim, a alta taxa de transferência horizontal destas espécies a *D. bruxellensis* . Repetições do locus de DNA ribossomal 18S, 5.8S, 25S e 5S foram observadas e ainda ,pelo menos, 24 genes de RNAt.

Para tentar precisar a posição filogenética dentro dos hemiascomicetos, Woolfit et al (2007) construiu 366 modelos de árvores baseadas nas seqüências protéicas dos genes ortólogos a *D.bruxellensis* e nove de outras espécies de fungos. Foi feita uma análise de agrupamento, na qual destas 366 árvores foram feitas exclusões sucessivas das espécies mais afastadas de *D. bruxellensis* com o intuito de verificar a topologia mais aceita dentre estas 366 possíveis árvores. Três topologias foram criadas e aceitas como a explicação da posição de *Dekkera* dentro dos hemiascomicetos e de como esta divergiu. Estas topologias contrastavam em como esta espécie realmente se posicionava dentre as três topologias geradas. Para elucidar esta questão, foi realizado um teste estatístico de Shimodaira-Hasegawa que rejeitou a topologia 3 que posicionava *D. bruxellensis* num clado isolado das outras espécies de hemiascomicetos e a topologia 1, no qual a mais significativamente aceita foi a topologia 2 que explica que *D. bruxellensis* divergiu num dado momento do seu grupo irmão composto por *C. albicans* e *D. hansenii*.

Para precisar se realmente existia alguma relação entre *C. albicans* e *S. cerevisiae* com *D. bruxellensis* foi feita uma análise comparando as seqüências de aminoácidos desta com espécies sintênicas verificando assim a identidade entre cada uma delas com *D. bruxellensis*. Esta comparação mostrou que *D. bruxellensis* sofreu uma tricotomia das demais espécies citadas dando uma noção de que a taxa de evolução de *D. bruxellensis* era bem maior do que as demais. Esta perspectiva só foi comprovada quando se comparou o conteúdo de GC destas espécies, verificando que, expressivamente, *D. bruxellensis* continha um alto conteúdo de GC quando comparado às outras duas espécies em questão (Woolfit et al, 2007).

Ainda no intuito de verificar a taxa de rearranjos entre a tricotomia predita para confirmar se esta em *D. bruxellensis* foi gerada por um evento de duplicação cromossômica, uma comparação da ordem gênica foi feita. O resultado foi elucidado onde a taxa de genes conservados entre *S. cerevisiae* e *D. bruxellensis* é maior do que em *C. albicans* e onde a taxa de genes rearranjados é maior em *C. albicans* do que em *S.cerevisiae*. Ainda neste estudo foi observado que existiam espaços entre os genes codificantes os quais não se mostravam similares com nenhum outro gene em todo banco de dados através

de BlastX, estas regiões foram supostamente identificadas como regiões intergênicas. Foi feito uma comparação onde foi visto que estes espaços contém intons que são ortólogos a *S. cerevisiae* e outros que são específicos de *D. bruxellensis*, evidenciando parentesco e a hipótese desta estar tão perto de *S. cerevisiae*. Sendo esta espécie uma levedura de alto valor agregado, por participar de processos fermentativos, esta característica demonstra um excelente indício que *D. bruxellensis* possa ser usada como levedura fermentadora (Woolfit *et al.*, 2007).

### *DNA mitocondrial*

A biogênese da maquinaria da síntese do ATP requer contribuição dos dois genomas fisicamente separados: um no núcleo e o outro na mitocôndria. A mitocôndria supre muito dos processos energéticos da célula, produzindo ATP pela fosforilação do aparato oxidativo da membrana mitocondrial externa. Em humanos, mais de 80 proteínas participam diretamente da fosforilação oxidativa, das quais 13 são codificadas pelo DNA mitocondrial. A distribuição dos componentes da fosforilação oxidativa que são codificados pelos genomas nuclear e mitocondrial variam entre espécies. Contudo, em todas as espécies a contribuição essencial do genoma mitocondrial exige que este mtDNA seja herdado com fidelidade para assegurar que a função respiratória seja mantida durante o crescimento e desenvolvimento (Chen e Butow, 2005).

Desde a descoberta de que a mitocôndria apresenta um genoma próprio, independente do genoma nuclear, levantou-se a questão se eles estavam sujeitos aos mesmos mecanismos de reparo os quais ocorrem no genoma nuclear. Entretanto, por muito tempo acreditou-se que o reparo de DNA não estava presente no genoma dessa organela. Nesse sentido, o reparo não seria necessário devido à redundância da informação genética presente nas várias cópias do DNA das organelas. Essa visão era reforçada pelas observações de que o genoma dessa organela não possui nenhum gene que codifique enzimas responsáveis no reparo do DNA (Britt, 1996). O DNAm<sub>t</sub> apresenta maior taxa de mutação quando comparado com o nuclear (Richter *et al.*, 1988), e a partir deste fato, algumas lesões com irradiação UV, produzindo dímeros de pirimidina, não são removidas eficientemente no mtDNA (LeDoux *et al.*, 1992).

A região controle é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o mtDNA. A replicação tem início nesta região e é realizada por deslocamento de uma fita em relação à outra, formando uma alça, denominada D- Loop. Na região controle, são verificados os polimorfismos do mtDNA (Upholt e Dawid, 1977).

Estas organelas apresentam membrana dupla e estão presentes no citoplasma, sendo responsáveis por muitos processos metabólicos cruciais como a fosforilação oxidativa. Por essa razão, as mitocôndrias são conhecidas como as usinas energéticas das células. Acredita-se que as mitocôndrias são evolutivamente derivadas de uma bactéria ancestral, a qual teria formado uma relação simbiótica intracelular com as primeiras células

eucarióticas, isto explica o fato de possuir genoma próprio (Gray, 1992). Com o passar de centenas de milhões de anos, esse ancestral perdeu a habilidade de funcionar como um organismo independente, de modo que seu genoma tornou-se muito atenuado. De fato, a maioria das proteínas funcionais da mitocôndria está codificada por genes do núcleo (Lang *et al.* 1997). O que restou na mitocôndria de *Saccharomyces* foi um genoma circular de 42.889 pares de bases (pb) que contém 43 genes, dos quais 27 codificam RNAs transportadores, dois codificam RNAs ribossomais e 19 codificam proteínas/enzimas envolvidas na cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa e produção de ATP (Wallace 1992).

O DNA mitocondrial evolui cerca de cinco vezes mais rápido que o DNA nuclear (Cann e Wilson 1983). Essa variação se deve, em primeiro lugar, ao fato da mitocôndria ser uma grande geradora de radicais livres, proporcionando um ambiente favorável a mutações no DNA. Outra causa seria a ausência de histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear (Yakes e Van Houten, 1997). Além disso, a enzima DNA polimerase mitocondrial possui baixa atividade corretora quando comparada à DNA polimerase nuclear (Kunkel e Loeb, 1981) e a reparação do DNA dependente de excisão de nucleotídeos não está presente em mitocôndrias (Croteau *et al.* 1999). Em relação à região codificante, algumas porções da região controle são altamente variáveis entre indivíduos, evoluindo cinco vezes mais rápido que o resto da molécula (Greenberg *et al.* 1983), presumidamente devido à fraca seleção exercida sobre a região não-codificante do DNA. Também se deve considerar que a típica estrutura *D-loop*, onde há a formação momentânea de fita- simples, pode influenciar o padrão de mutação pontual (Reyes *et al.* 1998), já que a taxa de depuração de DNA fita-simples é quatro vezes maior que do DNA fita- dupla (Lindahl e Nyberg, 1972). Por essas razões, os testes de identificação filogenética têm em foco a variação de seqüências dentro das regiões variáveis dos genes (Holland *et al.* 1993; Wilson *et al.* 1993; Parson *et al.* 1998).

## **Análises filogenéticas**

Filogenética é o campo da Biologia que busca identificar e compreender as relações evolutivas entre as diferentes formas de vida na Terra. Os primeiros critérios objetivos para a reconstrução filogenética baseavam-se em dados morfológicos. Com o acesso recente à estrutura de macromoléculas (DNA, RNA e proteínas), as análises filogenéticas passaram a ter um avanço vertiginoso. Para se trabalhar com reconstrução filogenética baseada em dados moleculares é preciso conhecer algumas propriedades das seqüências a serem comparadas.

Na reconstrução de qualquer tipo de filogenia, a preocupação primordial de um sistemata deve ser a homologia (Hennig, 1966; Phillips et al, 2000), isto é devemos sempre comparar caracteres homólogos nas diferentes espécies. O termo homologia foi cunhado no século XIX por Owen, um anatomista inglês que, embora contemporâneo de Darwin, não acreditava em evolução (Lewin, 1997).

Atualmente entende-se por homologia uma propriedade relativa a entidades que tenham uma origem comum. Mais simplificada, dois caracteres são homólogos se suas partes idênticas ou semelhantes possuem origem comum (Patterson, 1988; Titus e Frost, 1996; Lewin, 1997; Graur e Li, 2000). Homologia é, portanto, um termo qualitativo e não quantitativo. Ainda assim, vários autores ainda utilizam erroneamente o conceito de homologia como sinônimo de similaridade.

Há três tipos de homologia: ortologia, quando as seqüências têm um único e mesmo ancestral comum; paralogia, quando se originam de uma duplicação gênica; e xenologia, quando se originam por incursão lateral (ou horizontal). Apenas seqüências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas na história de organismos.

Uma vez obtidas às seqüências, estas devem ser alinhadas corretamente. Para tal, apesar de haver muitos programas computacionais que realizam essa tarefa, as seqüências devem ser alinhadas manualmente. Entretanto, alinhamentos automáticos podem ser um primeiro passo. Essa etapa é de extrema importância, pois um alinhamento errado comprometerá toda a análise. Para um alinhamento coerente, devem-se conhecer os diferentes tipos de mutações e substituições de nucleotídeos. Mutações ocorrem ao acaso em qualquer parte do genoma e podem ser transições, transversões, deleções/inserções e inversões. Substituições referem-se a regiões codificantes e podem ser sinônimas (quando não há alteração do aminoácido codificado), não sinônimas (quando há alteração) e sem sentido (quando um códon de parada é gerado).

O objetivo do alinhamento é fazer com que a posição de cada base que esteja sendo comparada entre as seqüências consideradas seja homóloga. Por causa do problema de perdas ou ganhos de trechos é necessário que se insiram intervalos nas seqüências das espécies que perderam trechos ou que não os ganharam (Phillips *et al*, 2000). Existem, hoje em dia, diversos programas de computador para alinhar seqüências de aminoácidos e nucleotídeos (ClustalX, ESEE, Macaw, Pileup, TreeAlign etc.) Tais programas são eficientes e recomendáveis.

No programa ClustalW (Thompson ET AL, 1994) e na maior parte dos programas, o alinhamento é feito em duas etapas. Na primeira todas as seqüências são comparadas par a par e uma medida de similaridade máxima entre cada duas seqüências é calculada. Para calcular essa medida de similaridade um gráfico de pontos é construído onde seus dois eixos representam as duas seqüências comparadas. Para cada identidade entre as bases, um ponto é colocado no gráfico. No caso de duas sequencias idênticas, uma fileira de pontos será encontrada em toda diagonal no gráfico, independentemente de

composição de nucleotídeos. Com base nessa matriz de pontos, o programa irá maximizar a similaridade entre as seqüências, usando o que é chamado de penalidades. Dois tipos de penalidades são usados nesse caso: a penalidade de intervalo que é o número de bases idênticas que devemos adicionar para inserir um intervalo, e a penalidade de substituições. O valor da similaridade final entre cada duas sequencias é calculado com o total de bases idênticas menos o número de substituições, menos o número de intervalos multiplicado pela penalidade de intervalos.

A partir dos dados de similaridade par a par, um dendrograma é construído e o alinhamento final é feito a partir dos nós mais internos. Ou seja, o programa de alinhamento múltiplo começa alinhando primeiro as seqüências mais semelhantes, em seguida as que se conectam a estas e, assim por diante, até que todas as sequencias estejam alinhadas. O resultado final do alinhamento é na realidade um excelente indicador de quão adequado é o seu gene para o problema filogenético específico.

Em todas as métodos de filogenética molecular, cada posição ocupada na seqüência (nucleotídeo ou aminoácido) é considerada como um caráter do tipo multi-estado (podendo ser um dos quatro nucleotídeos ou um dos vinte aminoácidos) e cada caráter é considerado independente dos demais. A variação dos estados de caracteres fornecerá informações filogenéticas. Métodos filogenéticos são essencialmente estatísticos e podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com seus critérios: quantitativos (métodos de distância); 2) qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança). Nos métodos de distância, as diferenças entre duas seqüências são reduzidas a uma só variável (número de diferenças) e suas relações evolutivas não são consideradas. Nesse método, primeiramente calcula-se a distância, para, a seguir, reconstruir a árvore filogenética, utilizando um algoritmo específico. Existem diferentes modelos que podem ser utilizados para a construção de uma matriz de distância (NEI *et al*, 2000; MATIOLI, 2001).

A partir dessa matriz será reconstruída a árvore com um dado algoritmo, sendo os mais utilizados o UPGMA e Neighbor-Joining. Nos critérios qualitativos, as diferenças entre as moléculas são consideradas como uma série de variáveis descontínuas. Os métodos mais empregados, embora não sejam os únicos, são a MáximaParcimônia (MP) e a Máxima Verossimilhança (MV). O princípio da MP é que a hipótese mais simples, ou seja, aquela em que a árvore que apresente o menor número de passos (=menor número de mudanças de estado de caráter) será a escolhida para explicar um determinado conjunto de dados. Desse modo, não há um modelo evolutivo explícito embasando essa metodologia (Lesk *et al.*, 2008).

Problemas operacionais podem ser evitados apenas com a observação de um número muito grande de árvores igualmente mais parcimoniosas ou a influência demasiada de homoplasias. Porém, a questão mais crítica é de cunho filosófico: A Natureza é parcimoniosa? A MV baseia-se em modelos evolutivos explícitos de substituição de nucleotídeos. Esses modelos são avaliados quanto a sua probabilidade de explicar um conjunto de dados de

forma que reflita a história evolutiva mais verossímil. O modelo que apresentar o melhor valor de verossimilhança, que, por questões operacionais, é dado em forma logarítmica, será o escolhido como base para a reconstrução da árvore. Tanto para a MP, quanto para MV, existem dois tipos de algoritmo de busca da melhor árvore: 1) Busca Exaustiva, em que todas as possibilidades de topologias são verificadas; 2) Busca Heurística, em que apenas um subconjunto de árvores probabilisticamente mais prováveis é examinado. Este último, em termos práticos, reduz sensivelmente o tempo de processamento computacional que, em alguns casos, dependendo do número de seqüências comparadas, pode durar dias e até meses (NEI *et al*, 2000; MATIOLI, 2001).

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

- Analisar o gene mitocondrial COX2 das diferentes cepas industriais

### Objetivos Específicos

- Analisar a característica evolutiva do gene mitocondrial e suas seqüências das diferentes linhagens de *D. bruxellensis*.
- Determinar se ocorre polimorfismos entre as seqüências de *D. bruxellensis* em caldo de cana industrial.
- Investigar se as linhagens de *Dekkera* pertencem filogeneticamente ao grupo dos hemiascomicetos.
- Construir primers para os genes estruturais mitocondriais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagens e meios

#### *Linhagens celulares*

As linhagens de *D. bruxellensis* GDB237, GDB239, GDB240, GDB242, GDB248 e GDB251 foram provenientes de diferentes destilarias de álcool do Nordeste do Brasil. As linhagens CBS60, CBS739, CBS5512, CBS9919 CBS79, CBS74 foram gentilmente cedidas pelo prof. Desmond Clark-Walker da Universidade Nacional da Austrália, Camberra, Austrália.

### *Meios de cultivo celular*

As células foram cultivadas em meio YPD (2% glicose, 2% peptona, 1% extrato de levedura) para crescimento celular ou em YPA (2% acetato de potássio, 2% de peptona 1% de extrato de levedura) para indução de esporulação. Este meio foi utilizado com a finalidade de aumentar o conteúdo celular de DNA mitocondrial, já que induz a respiração celular. As células foram pré-cultivadas em 20 ml de meio YPA por 24 h e essas culturas foram utilizadas para inocular mais 180 ml do mesmo meio. As culturas foram incubadas por mais 24 h ou até atingir 3 g de biomassa.

## **Análises genéticas**

### *Extração de DNA com meio enriquecido com mtDNA*

As células foram inoculadas em meio YPA e cultivadas por 48 horas a 30°C. Depois de coletadas por centrifugação, as células foram incubadas com 3 ml na solução de protoplastização (20 mg. ml<sup>-1</sup> da enzima lítica glucanex; 10 mg. ml<sup>-1</sup> de BSA; 0.8 M de KCl; 20 mM de citrato de sódio) por 3 horas a 30°C. Os protoplastos foram lavados com a solução 01 (1 M sorbitol, 50 mM tampão citrato pH 5.8) e ressuspensos em 2 ml da solução 02 (200 mM de sucrose; 65 mM de KCl; 20 mM de EGTA; 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 50 mM de HEPES-KOH pH 7.2). Logo após foram acrescidos 3 ml da solução 03 (20mM de sucrose; 65mM de KCl; 20mM de EDTA; 50mM de HEPES-KOH pH 7.2) e 1 ml da solução de DNase A 10 U.ml<sup>-1</sup> para hidrólise da maior parte do DNA nuclear. Depois da incubação por 3 horas a 75°C, foram adicionados 3 ml da solução 04 (10mM de EDTA; 50mM de Tris-HCl pH 8.2; 50µg.ml<sup>-1</sup> de proteinase K; 0,3% de SDS) para lise da membrana da mitocôndria, seguido de extração e purificação do DNA mitocondrial a partir de extração fenólica com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA foi precipitado com etanol absoluto a 4°C. O precipitado foi ressuspenso três vezes com etanol a 70% e ressuspendido em 30 µl tampão TE (10mM Tris-HCl ph 8.0, 1mM EDTA). O DNA extraído foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e sua concentração foi estimada por espectrofotometria e gel de agarose com marcador Hindλ onde a concentração de DNA foi mensurada em 60 ng/µl.

### *Quantificação e avaliação da integridade do DNA total*

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro. A quantificação foi realizada, utilizando-se a seguinte conversão: uma unidade de absorbância a 260 nm representa 50 µg/ml de DNA. As amostras foram diluídas (1:100) e a DO mensurada. Para a determinação da concentração e pureza, as absorbâncias de 260 nm e 280 nm foram observadas. A relação Abs260/Abs280 ideal deve ser próxima de dois para o DNA puro, sendo aceitáveis valores entre 1,9 e 2,1. Para a determinação da integridade das amostras de DNA, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se tampão de corrida apropriado. Para a corrida, foram utilizados 4 µl de DNA e 1 µl de tampão

de amostra. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV. A eficiência do método foi testada a partir de ensaios de PCR semi-quantitativa utilizando os primers nuclear Db e o mitocondrial DbCOX2 desenhados a partir do programa Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 0,8% e visualizado após coloração com brometo de etídeo.

### *Análise da seqüência do gene COX2*

As seqüências homólogas ao gene *COX2* de *S. cerevisiae* foram retiradas do GenBank. As seqüências foram alinhadas pelo CLUSTALX e as regiões consenso foram identificadas onde os primers foram desenhados a partir dos consensos. Os *primers* foram desenhados com auxílio do *software Primer 3* (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Para a construção dos *primers* foram obedecidos os seguintes critérios: tamanho do amplicon em torno de 607pb, tamanho do oligo entre 20 e 25 nucleotídeos, conteúdo GC entre 20 e 80% e Tm médio de 60°C. A reação ocorreu em tubos de 100µL contendo tampão Taq DNA polimerase (20mM Tris-HCl pH 8.0, 50mMKCl), MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 200µM de cada dNTP, 10pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 500ng de DNA extraído e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os reagentes foram misturados e aquecidos a 94°C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamentos a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A visualização da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando um padrão de peso molecular de 1 kb Plus (Invitrogen) para comparação (Sambrook e Russell, 2001). O produto da amplificação foi então purificado utilizando-se o kit de purificação de PCR (High Pure PCR purification Kit - PROMEGA) e sendo quantificado por eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando-se o marcador de peso molecular λ Hind III. A partir da amplificação da linhagem GDB237 as linhagens industriais GDB237, GDB239, GDB240, GDB242, GDB248 e GDB249 e as linhagens cedidas pelo Prof. Clark walker CBS60, CBS739, CBS5512, CBS9919 CBS79, CBS74 foram extraídas, purificadas e seqüenciadas e submetidas a análise das seqüências.

### *Reação de sequenciamento*

Os trabalhos iniciais foram realizados utilizando-se 2µl de Big dye num volume total de reação de 10µl. Então montou-se uma reação de PCR nas seguintes proporções: 2µl de DNA, 3µl de água miliQ, 2µl de tampão, 1µl de primer forward COX2 ( ) 3,2 mM e 2µl de BigDye. Após a reação da cadeia da polimerase, as placas (PCR- Optical 96 well reaction plate number N-801-0560) são retiradas do termociclador, recebem isopropanol na concentração de 65%. São seladas com adesivo resistente a álcool (Adhesive PCR Film N- 21950), misturadas por inversão durante três vezes, a seguir permanecem ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente são centrifugadas por 45 min a 3400rpm. O excesso de isopropanol é descartado e as placas invertidas em papel toalha. Acrescenta-se etanol 60 % e centrifuga-se à mesma velocidade por 10 min. Descarta-se novamente o excesso de etanol e invertem-se as placas sobre o papel toalha. Para



secar, as placas são submetidas a um spin de 300 rpm com as placas invertidas sobre papel toalha e em seguida encaminha-se para a estufa a 37 °C durante 15 minutos após secas, as placas recebem 10 mL de formamida e são encaminhadas para o termociclador para a reação de desnaturação. Após esta etapa, as placas foram encaminhadas para o seqüenciador automático de DNA, modelo ABI 3700 Prism Analyser.

#### *Análise filogenética das seqüências do gene COX2 dos diferentes isolados.*

As seqüências de nucleotídeos do gene *COX2* foram realinhadas usando-se o programa ClustalW. À distância do alinhamento das seqüências par a par foram derivadas usando o método descrito por Feng et al. (1985) e Feng e Doolittle (1990) os quais corrigem a composição de bases parciais usando a seguinte relação:  $D = -\ln(S_{\text{real}} - S_{\text{ao acaso}}) / (S_{\text{idênticas}} - S_{\text{ao acaso}}) * 100$ , no qual  $S_{\text{real}}$  é o placar dos alinhamentos originais,  $S_{\text{ao acaso}}$  é o placar das seqüências aleatórias de mesmo tamanho e de mesma composição de bases e  $S_{\text{idênticas}}$  será a média das duas seqüências, cada uma alinhada com elas mesmas. A árvore filogenética foi construída pelo método —neighbor-joiningll de Saito e Nei (1987).

#### *Coleta das seqüências gênicas, construção de primers degenerados e condições de amplificação*

Para a construção dos primers degenerados foram analisadas várias topologias a partir do trabalho de Woofit et al (2007) o qual relaciona os clados referentes aos gêneros e espécies mais próximas a *Dekkera bruxellensis* a partir da análise de genes nucleares. Com isso foi possível inferir um mapa físico do genoma mitocondrial deste clado. Seis espécies apresentando similaridade genômica nuclear com *D. bruxellensis* foram submetidos a alinhamentos múltiplos através do programa computacional Mega v. 4.0 (<http://www.megasoftware.net>) a partir da seguinte ordem gênica baseada no genoma do DNA mitocondrial de *S. cerevisiae*: COX2, COX3, COX1, ATPase8, ATPase6, CYTb, ATPase9 e VAR1. Os programas CODEHOP (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il>) e Codon Usage ([http://www.bioinformatics.org/sms2/codon\\_usage.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html)) foram usados com a finalidade de refinar o desenho de primers degenerados a fim de se amplificar os genes ortólogos de *D. bruxellensis*.

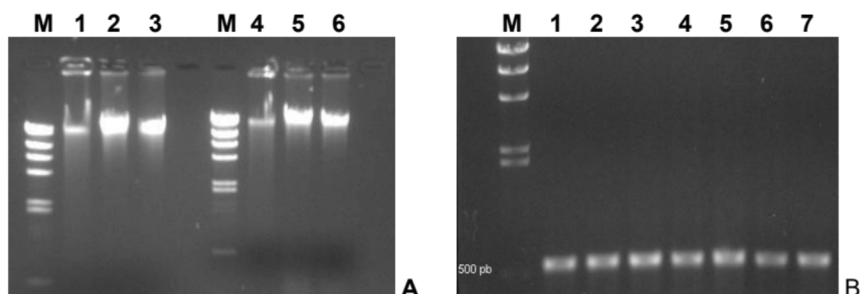
## RESULTADOS

### Seleção das Linhagens

Todas as linhagens apresentaram bom crescimento celular em meio YPA, no qual acetato foi a única fonte de carbono. Isto significa que *D. bruxellensis* pode se desenvolver em metabolismo puramente respiratório. Porém, a linhagem GDB237 foi selecionada para a continuidade dos ensaios devido ao melhor crescimento observado.

## Avaliação da extração e amplificação do gene COX2.

O protocolo desenvolvido para extração de DNA mitocondrial apresentou alto rendimento pela grande quantidade de material obtido ao final do processo (Figura 1). A eficiência do processo foi avaliada a partir dos experimentos de PCR semi-quantitativa, a partir do qual se verificou a maior amplificação do material extraído a partir dos primers DbCOX2, que amplificam um fragmento de 650 pb relativo ao gene *COX2* mitocondrial (Figura 1), e a menor amplificação com os primers Db, que amplificam o gene nuclear que codifica o RNA ribossomal 26S.



**Figura 1.** Otimização do protocolo de extração de DNA mitocondrial de *D. bruxellensis*. **A.** Gel de agarose das amostras de DNA mitocondrial respectivamente (GDB237, GDB239, GDB240, GDB242, GDB248 GDB249). **B.** Amplificação do gene mitocondrial *COX2* das amostras de DNA mitocondrial (GDB237). Linha M: marcador  $\lambda$ -HindIII.

## Avaliação das seqüências.

Estes isolados tornam interessantes do ponto de vista de evolução do genoma mitocondrial em *D. bruxellensis*, já que estudos anteriores do grupo mostraram que esses foram consistentemente identificados como *D. bruxellensis*, mas apresentam marcadores moleculares únicos no genoma mitocondrial por conta da variação intraespecífica. Estas modificações se traduziram em alterações pontuais na seqüência de aminoácido de Ile para Met, ou vice-versa (Figura 3). Ainda nestas alterações únicas notam-se na seqüência de DNA (Figura 2) duas mudanças únicas no uso de códons: a primeira mudança no 31º aminoácido é evidente nas linhagens industriais seqüenciadas onde um códon do tipo ACA difere das linhagens *D. bruxellensis* e *B. custersii* do Genbank por apresentar ACT, a segunda se encontra no 65º aminoácido onde se evidencia TTT para as linhagens industriais sequenciadas e TTC em *D. bruxellensis* e *B. custersii*.

Do total de alterações, 18 foram transições e 30 foram transversões. Este resultado se mostra satisfatório quando comparado com a mutabilidade do DNA mitocôndrial de mamíferos, nos quais a taxa de transversões excede a taxa de transições na relação 2:1.

```

#MEGA
!Title Cox2;
!Format
!DataType=Nucleotide CodeTable=Yeast_Mitochondrial
NSeqs=14 NSites=579
Identical=. Missing=? Indel=-;

!DomainData property=Coding CodonStart=1;
#D.bruxellensis_mitochondrial   ATG GAA GGT ATG ATA GAA TTA CAT AAT AAT GAA ATA TTT TAT TTA TGT ATA ATA TTA GGA TTT GAA TCA TAT ATG TTA
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#D.bruxellensis_mitochondrial   .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

#B.custersii_mitochondrial      TAT AAC ATA TTA ACT ACA TAT AAT CAT TCA GTA TTA CCA TAT AAA TAT TTA TAT CAT GGA CAA TTT AAT GAA ATT GAA
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#D.bruxellensis_mitochondrial   .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

#B.custersii_mitochondrial      TGA ACA ACA TTC CCA GCT ATA ATT TTA TTA ATT ATA GCT TGC CCT AGT TTT ATT TTA TTA TAT ATT TGT GAT GAA GGT
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#D.bruxellensis_mitochondrial   .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

```

**Figura 2.** Alinhamento múltiplo da sequência de nucleotídeo do gene *COX2* de linhagens industriais de *D. bruxellensis* e de linhagens de coleção de *D. bruxellensis* e *B. custersii*.

```

#MEGA
!Title Cox2;
!Format
!DataType=Protein
NSeqs=14 NSites=193
Identical=. Missing=? Indel=-;

!DomainData;
#D.bruxellensis_mitochondrial   MEGMMLLHNN VMFYLCMLG FVSYMLYNML TTYNHVLPY KYLYHGQFIE IWWTFFAMI LLIIAPPSPFI LLYICDEVIA
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#B.custersii_mitochondrial      .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

#D.bruxellensis_mitochondrial   FAMTIKAMGL QWYWKYEYSD FIDDKGETIE FESYMPEDL LEEGQLRQLD VDSPIVCVVD THMRFIVTAA DVIHDFAMPS
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#B.custersii_mitochondrial      .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

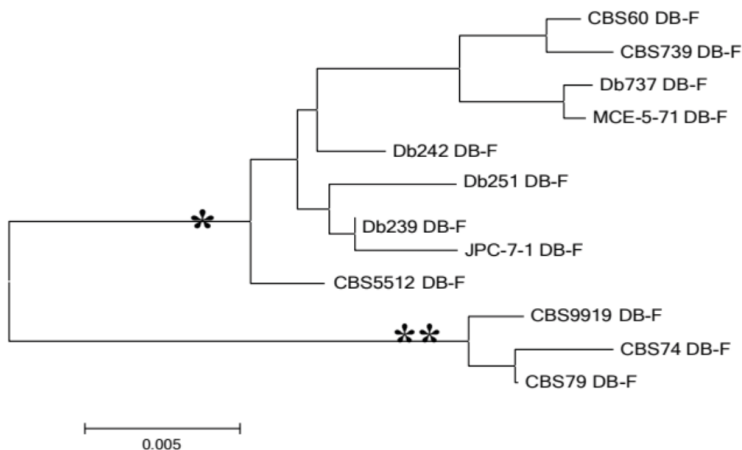
#D.bruxellensis_mitochondrial   LGKKIDAVPG RLNQTSLIQ REGVYVYQCS ELC
#CB560_DB-F                    .....
#CB5739_DB-F                   .....
#CB5512_DB-F                   .....
#Db239_DB-F                    .....
#Db242_DB-F                    .....
#Db251_DB-F                    .....
#Db737_DB-F                    .....
#JPC-7-1_DB-F                 .....
#MCE-5-71_DB-F                .....
#B.custersii_mitochondrial      .....
#CB5919_DB-F                   .....
#CB574_DB-F                    .....
#CB579_DB-F                    .....

```

**Figura 3.** Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos do gene *COX2* de linhagens industriais de *D. bruxellensis* e de linhagens de coleção de *D. bruxellensis* e *B. custersii*.

## Análise filogenética

Quando submetidas a uma análise de agrupamento, as seqüências do gene *COX2* das linhagens industriais de *D. bruxellensis* agruparam-se no clado da levedura *B. custersii* (linhagem tipo CBS 5512) (Figura 5).



**Figura 5.** Análise filogenética pelo método de agrupamento Neighbor joining das seqüências de nucleotídeos do gene *COX2* das linhagens industriais de *D. bruxellensis* comparadas com as linhagens de coleção do clado *B. custersii* (\*) e do clado *D. bruxellensis* (\*\*). colocar bootstrap e quantidade de pares bases alinhadas

Entretanto, pode-se verificar uma grande variabilidade genética dentro desse grupo. Isto sugere que o gene *COX2* está sob grande pressão seletiva onde, na maioria dos casos, a substituição de resíduos de Met (presente na linhagem tipo de *D. bruxellensis* CBS 74) para resíduos de Ile são característicos de *B. custersii*

## Análise “*in silico*” do genoma mitocondrial

Uma vez que o genoma mitocondrial de *D. bruxellensis* não foi seqüenciado, a construção de primers para amplificação e clonagem de seus genes estruturais foi realizada com o uso de ferramentas computacionais através do programa MEGA4, utilizando seqüências depositadas nos bancos NCBI e Génolevures. Os seguintes genes foram considerados: *COX1*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *ATP9*, *CYTb* e *VAR1*, segundo a discriminação para *S. cerevisiae*. A primeira análise foi feita com o objetivo de se avaliar a relação filogenética entre os genomas mitocondriais dos ascomicetos disponíveis. Com isso foi possível a construção de um mapa físico do genoma mitocondrial deste clado. (Figuras 6 a 12)

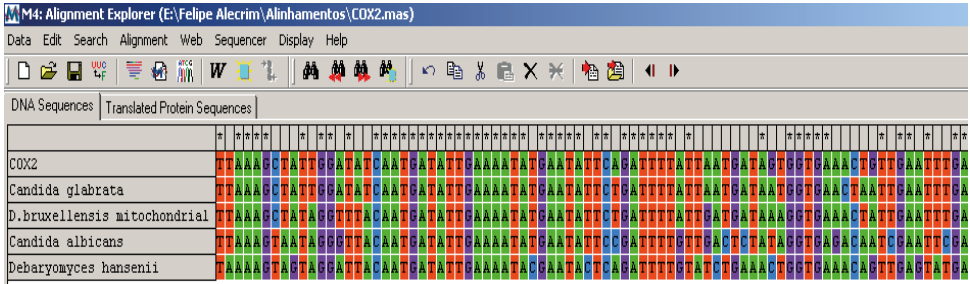


Figura 6. Alinhamento múltiplo do gene *COX2* para as leveduras ascomicetos.

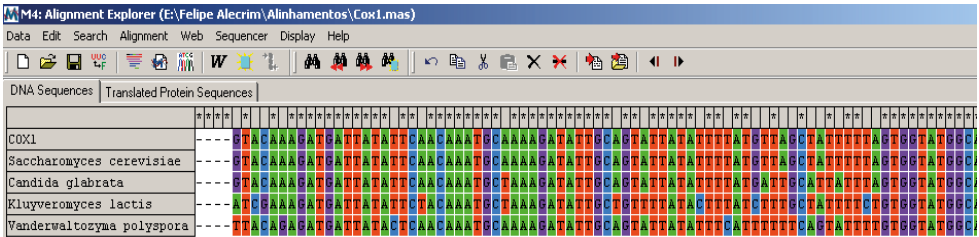


Figura 7. Alinhamento múltiplo do gene *COX1* para as leveduras ascomicetos.

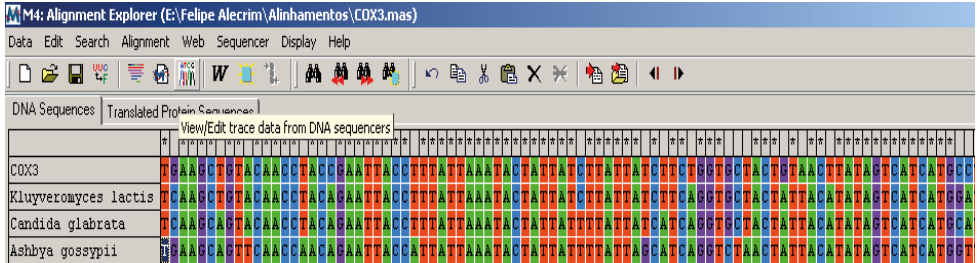


Figura 8. Alinhamento múltiplo do gene *COX3* para as leveduras ascomicetos.

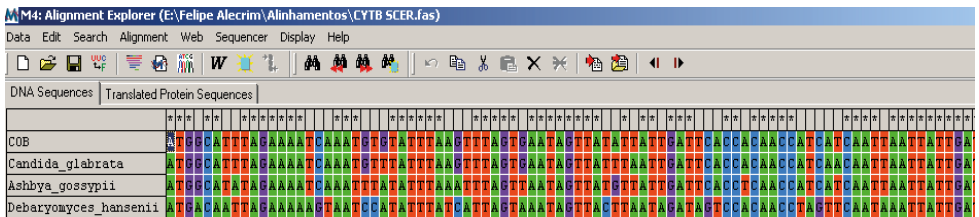


Figura 9. Alinhamento múltiplo do gene *CYTb* para as leveduras ascomicetos

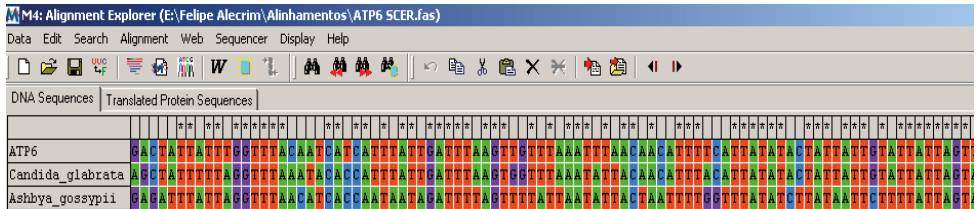


Figura 10. Alinhamento múltiplo do gene *ATP6* para as leveduras ascomicetos.

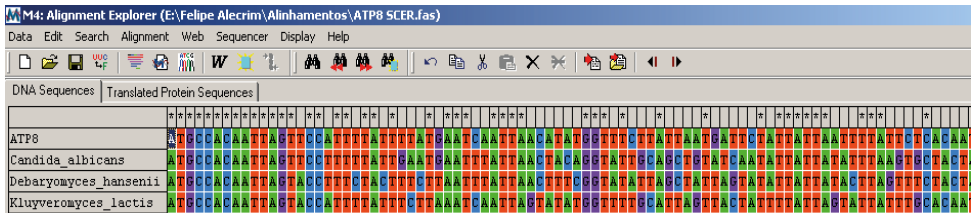


Figura 11. Alinhamento múltiplo do gene *ATP8* para as leveduras ascomicetos.

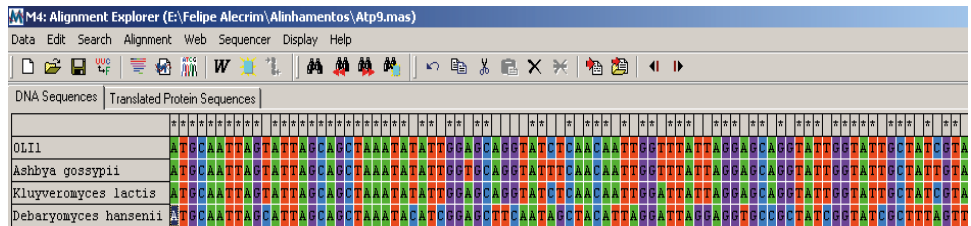


Figura 12. Alinhamento múltiplo do gene *ATP9* para as leveduras ascomicetos.

Os resultados mostraram que a levedura *Debaryomyces hansenii* não agrupou com os ascomicetos estudados e sim com as seqüências que, em princípio, serviriam como outgroups.

**DBATP6**  
Primer forward

S	P	L	E	Q	F	E	Aminoácido do alim	MEGA4
TCT	CCA	TTG	GGA	CAA	TTT	GAA	CODEHOP	
TCT	CCA	TTG	GAA	CAA	TTT	GAA	NT correspondente ao Alim	
A	G	A	T	G	T	G	MEGA4	
T <sub>Cw</sub>	CCA	TTG	GAr	CAA	TTT	GAr	CODON USAGE + alif	degener
5'	T <sub>Cw</sub>	CCA	TTG	GAr	CAA	TTT	GAr	3'
							Primer Forward	

Características:

TM	57,8° C
Hairpin loops	4,4° C
Dimers	-83,6° C
Bulge loops	-59,2° C
Internal loops	-79,7° C

**DBATP6**  
Primer reverse

I	M	C	L	E	F	A	I	Aminoácido do alim	MEGA4
TAA	TAC	ACA	AAC	CTT	AAA	CGA	TAA	CODEHOP	
ATT	ATG	TGT	TTG	GAA	TTT	GCT	ATT	Complemento	
ATT	ATG	TGT	TTA	GAA	TTT	GCT	ATT	NT correspondente ao Alim	
G	A	ATG	C	G				MEGA4	
ATT	A <sub>T</sub>	T <sub>G</sub>	TTA	GAA	TT <sub>T</sub>	GCT	ATT	CODON USAGE + alif	degener
3'	ATT	A <sub>T</sub>	T <sub>G</sub>	TTA	GAA	TT <sub>T</sub>	GCT	ATT	5'
5'	TTA	TCG	YET	AAG	ATT	yGT	rTA	TTA	3'
								Primer Reverse (para Blast N)	
								Primer Reverse (para GenScan)	

Características:

TM	57,9° C
Hairpin loops	0° C
Dimers	-93,1° C
Bulge loops	-89,4° C
Internal loops	-88,6° C

Figura 13. Análise das seqüências consenso para os genes mitocondriais dos ascomicetos com vistas a construção de primers degenerados para amplificação e seqüenciamento dos ortólogos em *D. bruxellensis* (exemplo gene *ATP6*).

Os programas CODEHOP e Codon Usage foram usados com a finalidade de refinar o desenho de primers degenerados para amplificação dos genes ortólogos de *D. bruxellensis* (Figura 13). Os alinhamentos se mostraram representativos para construção dos primers, uma vez que foi observada uma boa conservação entre as seqüências gênicas sintênicas dos genes estruturais anteriormente citados. Estes dados promovem uma base para futuras análises da genética e da evolução da população de *D. bruxellensis*, que servirá de base para o estabelecimento de correlações entre a variabilidade e genética e as capacidades fisiológicas de diferentes cepas. Os primers foram desenhados (Tabela 1) e encomendados. Os experimentos de amplificação dos genes de *D. bruxellensis* com os primers degenerados foram parcialmente expressivos onde 50% dos primers testados

amplificaram e serão submetidos à seqüenciamento. Inicialmente estão sendo feitos testes de adequação da reação da PCR, tanto nas concentrações dos reagentes da reação como do programa de amplificação. Até o momento os genes *COX1* e *ATP6* foram amplificados. Estes fragmentos serão clonados e seqüenciados.

Nome do primer	Seqüência (5'-3')		
cons-Cox3-FW	CAACAACATCCWTTYCATATRG	cons-ND1-RV	TAATTCWGATTACGCTTCAAC
cons-Cox3-RV	ATRTATAARAATAATCARATWAC	cons-ND4-FW	CATACWTGATTACCWGTWGTWCA
cons-Atp6-FW	TCWCCATTAGARCAATTTG	cons-ND4-RV	TAAWCCTTGATAATAATAWAT
cons-Atp6-RV	AATAGCRAATTCTAACAWYATAAT	cons-CytB-FW	TTATTAGGWTTATGTTTAGTWA
cons-Cox1-FW	AGATGATTATAYTCWACAAATGC	cons-CytB-RV	TAAACTTTTAAWGTATTWCCTCT
cons-Cox1-RV	CWGCWGGWGGWSWWGTAA	cons-ND5-FW	GCTACWCGTAAAAGTGCWCAA
cons-ND1-FW	TTAATGGCTATWGCTGATG	cons-ND5-RV	CCWTATAATGATTCDATAATRATATCTTT

**Tabela 1.** Seqüências dos primers degenerados para amplificação e seqüenciamento dos ortólogos em *D. bruxellensis*

## DISCUSSÃO

Os experimentos de crescimento celular revelaram que glicose e sacarose são as fontes de carbono mais adequadas para apoiar o crescimento da levedura *D. bruxellensis*. Conterno *et al.* (2006) realizaram caracterização fisiológica de diversas linhagens desta levedura e verificaram que estas mesmas fontes de carbono são mais prontamente utilizadas por *D. bruxellensis*. Entretanto, Basílio *et al.*, (2008) mostraram que o consumo de sacarose por células de *D. bruxellensis* é menor do que o observado para células de *S. cerevisiae*. Portanto, este fator não deve contribuir para a melhor adaptação de *D. bruxellensis* ao mosto de caldo de cana. Em contraposição, os experimentos de cultivo celular mostraram que *D. bruxellensis* cresce melhor em meio com acetato de potássio como fonte alternativa de carbono proporcionando uma melhor velocidade de crescimento do que os meios contendo glicose, glicerol e acetato de cálcio. Como o meio YPA favorece a respiração, há indícios que esta levedura, que possui um metabolismo Crabtree positivo, esteja utilizando a via oxidativa e seus genes para se manter nas dornas mesmo quando a sacarose é completamente depletada pela *Saccharomyces cerevisiae*.

A partir do DNA extraído foi possível a amplificação do gene *COX2* de todas as amostras. Estes fragmentos foram submetidos a seqüenciamento de nucleotídeos e os resultados mostraram uma intensa variação com doze mudanças identificadas. Segundo Hoeben *et al* (1993) estas mudanças estão de acordo com a alta taxa de evolução do gene *COX2* nessas espécies. O DNA mitocondrial evolui cerca de cinco vezes mais rápido que o DNA nuclear (Cann e Wilson 1983). Essa variação intraespecífica se deve, em primeiro lugar, ao fato da mitocôndria ser uma grande geradora de radicais livres, proporcionando um ambiente favorável a mutações no DNA. Outra causa seria a ausência de histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear (Yakes e Van Houten, 1997). Além disso, a enzima DNA polimerase mitocondrial possui baixa atividade corretora quando comparada à DNA polimerase nuclear (Kunkel e Loeb, 1981) e a reparação do DNA dependente de excisão de

nucleotídeos não está presente em mitocôndrias (Croteau *et al.* 1999). A partir deste fato, das doze mudanças evidenciadas nas seqüências de DNA apenas a segunda e a sexta mudança merecem atenção. Onde se evidencia trincas de bases nas linhagens industriais que são exclusivas e não se comparam nem a *D. bruxellensis* nem a *B. custersii*. As trincas ACA e TTT das linhagens industriais se diferenciam de ACT e TTC das linhagens de *D. bruxellensis* e *B. custersii*. Do total de alterações, 18 foram transições e 30 foram transversões.

Em comparação, a seqüência de aminoácidos, traduzida com o código universal através do programa Mega 4.0 demonstrou que as linhagens industriais se identificam mais com *B. custersii* do que com *D. bruxellensis* como levedura predominante nas destilarias de caldo de cana. Liberal *et al.* (2005) descreveram estas leveduras industriais como *D. bruxellensis* através de primers específicos porém, o estudo realizado mostra que as alterações na seqüência dos aminoácidos no gene *COX2* demonstra que estas são mais parecidas com *B. custersii*. Segundo Hoeben *et al* (1993) *Dekkera bruxellensis* codifica ATA para isoleucina no código universal, porém as linhagens industriais codificam ATT metionina evidenciando o mesmo códon na espécie *B. custersii* e vice versa. Clark-Walker *et al* (1992) dizem que há uma grande semelhança entre *D. bruxellensis* e *B. custersii*, esta é enfatizada pela identidade das seqüências de aminoácidos a despeito das seqüências de DNA na qual, só foram localizadas 13 alterações pontuais. Contudo estas alterações ocorrem sempre na terceira posição o que suporta a teoria vista no trabalho de Jupeng *et al* (1996) que separa estas duas espécies em clados diferentes, demonstrando que são espécies filogeneticamente diferentes, o que nos leva a crer que as linhagens industriais são *B. custersii* e não *D. bruxellensis*

Este tipo de identificação pela seqüência de DNA e aminoácidos já vem se mostrando utilizável. Gerdini *et al* (2000) tipificaram espécies patogênicas de *Candida glabrata* por comparação das seqüências de DNA e aminoácidos de diferentes espécies e cepas demonstrando assim a eficácia do método através do gene da citocromo oxidase dois.

A análise filogenética do gene *COX2* foi precisa no que diz respeito à suspeita de que as linhagens industriais se agrupam próximos a *B. custersii* e não a *Dekkera bruxellensis*, porém, como descrito por Hoeben *et al* (1986), este gene se encontra sob grande pressão seletiva verificando que a taxa de mutação é grande gerando controvérsias sob a certeza da classificação.

Apesar de sua importância, *D. bruxellensis* ainda é pouco caracterizada geneticamente. De fato, Woolfit *et al.* (2007) foram pioneiros no estudo genético desta levedura, tendo fornecido muitos dos dados utilizados para as atuais pesquisas envolvendo a base genética de suas capacidades fisiológicas. Estes pesquisadores realizaram um seqüenciamento parcial que cobriu aproximadamente 40% do genoma de *D. bruxellensis*, identificando cerca de 3000 genes. Dentre estes, é interessante notar a presença de genes envolvidos apenas com os genomas nucleares, uma vez que linhagens *petite* foram utilizadas pelo grupo do professor Piskur. No intuito de elucidar esta questão, primers degenerados foram sintetizados para que fosse realizado uma filogenia, através da concatenação de genes estruturais. Esta análise foi feita —in silico, gerando sete pares de primers



Em contraposição ao trabalho de Woolfit et al, 2007, no qual neste só foi utilizado mutantes sem mtDNA, este trabalho é relevante para o presente trabalho no sentido de orientar na determinação das seqüências consenso para os diferentes genes do metabolismo oxidativo. Baseado no genoma de *Saccharomyces cerevisiae* a ordem gênica foi definida como L-rRNA COII COIII S-rRNA COI ATPase 8 ATPase 6 Cyt b ATPase 9 Var 1, através de dados do Genbank *aromyces cerevisiae*. Os programas CODEHOP (<http://bioinformatics.weizmann.ac.il>) e Codon Usage ([http://www.bioinformatics.org/sms2/codon\\_usage.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html)) foram usados com a finalidade de refinar o desenho de primers degenerados para amplificação dos genes ortólogos de *D. bruxellensis*. Kurtzein et al, (2007) concatenou genes através da análise —in silico para o grupo dos hemiascomicetos definindo que *Dekkera bruxellensis* se encontra entre os hemiascomicetos. Dos primers testados 50% amplificaram com a quantidade de pares de bases prevista pelo Programa CAP3 porém não foram seqüenciados e nem clonados sendo esperado que estes primers sirvam para futuras pesquisas no âmbito de se elucidar o genoma mitocondrial desta levedura.

A partir de estudos destes genes concatenados será possível ter uma informação precisa da posição filogenética das espécies industriais, *apesar de no estudo feito o grau de identidade com B. custerssii ser bem maior do que em D. bruxellensis*. Duas únicas mudanças pontuais das linhagens industriais que se encontram na terceira base no 31º aminoácido e na terceira base do 62º aminoácido identificam um certo polimorfismo neste gene em questão. Porém a taxa de bases idênticas que se alinham num grau de semelhança faz com que as linhagens industriais preditas sejam classificadas como *B. custerssii*.

## CONCLUSÃO

- O processo do protocolo da extração do mtDNA favoreceu a respiração e conseqüentemente a obtenção da seqüência do gene COXII.
- A análise das seqüências de DNA foram expressivas no que diz respeito à identificação de novas trincas advindas das linhagens industriais.
- A análise de aminoácidos confirma que as linhagens industriais se assemelham a *B. custerssii*.
- A síntese dos primers é benéfica no que diz respeito a servir de base para futuros estudos.
- Portanto a análise do gene COXII mostrou que as linhagens industriais ditas *D. bruxellensis* nas destilarias de caldo de cana são mais semelhantes a *B. custerssii*.

## REFERÊNCIAS

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5350-5354.

Andrianopoulos A, Kourambas S, Sharp JA, Davis MA, Hynes MJ (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans* *nmrA* gene involved in nitrogen metabolism repression. *J. Bacteriol.* 180, 1973–1977.

Attfield PV (1997). Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat. Biotechnol.* 15:1351–1357.

Avila J, Perez MD, Brito N, Gonzalez C, Siverio JM (1995). Cloning and disruption of YNR1 gene encoding the nitrate reductase apoenzyme of the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEBS Lett.* 366,137-142.

Avila J, Gonzalez C, Brito N, Siverio JM (1998). Clustering of the YNA1 gene encoding a Zn(II)2Cys6 transcriptional factor in the yeast *Hansenula polymorpha* with the nitrate assimilation genes YNT1, YNI1 and YNR1, and its involvement in their transcriptional activation. *Biochem.J.* 335,647-652.

Avila J, Gonzalez C, Brito N, Machin F, Perez MD, Siverio JM (2002). A second Zn(II)2Cys6 transcriptional factor encoded by the YNA2 gene is indispensable for the transcriptional activation of the genes involved in nitrate assimilation in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 19,537-544.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D (2002). *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press, 1002p

Basílio ACM, Pinheiro W, Morais Jr MA, Simões DA (2005). Utilização do padrão de amplificação com o marcador (GTG)5 para identificação rotineira de leveduras contaminantes da fermentação alcoólica industrial. In: XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife. Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos. Recife: Editora da UFPE, v. 15. p. 1-7.

Basílio AC, de Araújo PR, de Morais JO, da Silva Filho EA, Morais Jr MA, Simões DA (2008). Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol. Apr*;56(4):322-6.

Bertram PG, Choi JH, Carvalho J, Ai W, Zeng C, Chan TF, Zheng XF (2000). Tripartite regulation of Gln3p by TOR, Ure2p, and phosphatases. *J. Biol. Chem.* 275, 35727–35733.

Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MDW, de Winde JH, Pronk JT, Daran JM (2007). Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res* 7 604–620.

Brazma A, Vilo J (2000). Gene expression data analysis. *FEBS Letters* 480 (2000). 17-2418.

Brito N, Avila J, Pérez MD, Gonzalez C, Siverio JM (1996). The genes YNI1 and YNR1, encoding nitrite reductase and nitrate reductase, respectively, in the yeast *Hansenula polymorpha*. *Biochem. J.* 317, 89-95.

Brito N, Perez MD, Perdomo G, Gonzalez C, Garcia-Lugo P, Siverio JM (1999). A set of *Hansenula polymorpha* integrative vectors to construct lacZ fusions. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 23–29.

Burger G, Tilburn J, Scazzocchio C. (1991a). Molecular cloning and functional characterization of the pathway-specific regulatory gene *nirA*, which controls nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 795–802.

Burger G, Strauss J, Scazzocchio C, Lang BF (1991b). *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5746–5755.

- Cabrini KT, Gallo CR (1999). Identificação de leveduras no processo de fermentação alcoólica em usina do Estado de São Paulo, Brasil. *Sci. agric.* vol.56 n.1 Piracicaba
- Caddick MX, Arst Jr HN, Taylor L.H, Johnson RI, Brownlee AG (1986). Cloning of the regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 5, 1087–1090.
- Carvalho J, Bertram PG, Wentz S, Zheng XF (2001). Phosphorylation regulates the interaction between Gln3p and the nuclear import factor Srp1p. *J. Biol. Chem.* 276, 25359–25365.
- Chatonnet P, Dubourdieu JN Boidron. (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeast and lactic acid bacteria on the ethyl phenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 46:463-468.
- Chatonnet P, Viala C, Dubourdieu D (1997). Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.* 48:443- 448.
- Chiang, TY & Marzluf GA (1994). DNA recognition by the NIT2 nitrogen regulatory protein: importance of the number, spacing, and orientation of GATA core elements and their flanking sequences upon NIT2 binding. *Biochemistry* 33, 576–582.
- Coffman JA, Rai R, Cunningham T, Svetlov V, Cooper TG (1996). Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 847–858.
- Cogoni C, Valenzuela L, Gonzalez-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P, Gonzalez A (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* 177, 792–798.
- Conterno L, Joseph CML, Arvik TJ, Henick-Kling T, Bisson LF (2006). Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57:139–147.
- Cooper TG (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 223-238.
- Coschigano PW, Magasanik B (1991). The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione transferases. *Mol. Cell. Biol.* 11, 822–832.
- Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S, Sohier D (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 130–135.
- Courchesne WE, Magasanik B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J. Bacteriol.* 170, 708–713.
- de Azeredo LA, Gomes EA, Mendonca-Hagler LC, Hagler AN (1998). Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Int Microbiol* 1, 205–208.
- de Souza Liberal AT, da Silva Filho EA, de Moraes JO, Simões DA, Moraes Jr MA (2005). Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. *Lett Appl Microbiol.* 40(1):19-23.
- de Souza Liberal AT, Basílio ACM, Resende AM, Brasileiro BTV, da Silva-Filho EA, de Moraes JOF, Simões DA, de Moraes JR MA (2007). Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 102, 538–547.
- Feng B & Marzluf GA (1998). Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3983–3990.

- Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 26:112–125.
- Fu YH, Feng B, Evans S, Marzluf GA (1995). Sequencespecific DNA binding by NIT4, the pathway-specific regulatory protein that mediates nitrate induction in *Neurospora*. *Mol. Microbiol.* 15, 935–942.
- Garcia-Lugo P, Gonzalez C, Perdomo G, Brito N, Avila J, de la Rosa JM, Siverio JM (2000). Cloning, sequencing, and expression of HaYNR1 and HaYNI1, encoding nitrate and nitrite reductases in the yeast *Hansenula anomala*. *Yeast* 16, 1099-1105.
- Gerós H, Azevedo MM, Cássio F (2000). Biochemical studies on the production of acetic acid by the yeast *Dekkera anomala*. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 59- 62.
- Godard P, Urrestarazu A, Vissers S, Kontos K, Bontempi G, van Helden J, Andre B (2007). Effect of 21 Different Nitrogen Sources on Global Gene Expression in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* p. 3065–3086.
- Gomes FC, Pataro C, Guerra JB, Neves MJ, Correa SR, Moreira ES, Rosa CA (2002). Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Can J Microbiol* 48, 399–406.
- Granchi L, Bosco M, Messini A, Vincenzini M (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR- RLFP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87, 949–956.
- Grenson M, Dubois E, Piotrowska M, Drillien R, Aigle M (1974). Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. Evidence for the *gdhA* locus being a structural gene for the NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* 128, 73–85.
- Grenson M & Dubois E (1982). Pleiotropic deficiency in nitrogen uptake systems and derepression of nitrogen-catabolite enzymes in *npr-1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 121, 643-647.
- Guerra JB, Araújo RA, Pataro C, Franco GR, Moreira ES, Mendonca-Hagler LC, Rosa CA (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett Appl Microbiol* 33, 106–111.
- Hahn S (2004). Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struc. & Mol. Biol.* 11:394-403.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6:986– 994.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413 – 417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 11:1026 – 1030.
- Horak J (1997). Yeast nutrient transporters. *Bioch. Biophys. Acta.* 1331, 41–79.
- Ibeas JI, Lozano I, Perdignes F, Jimenez J (1996). Detection of *Dekkera*– *Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl Environ Microbiol* 62: 998–1003.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999). *Cell* 98, 285–294.

- Kornberg RD (2007). The molecular basis of eukaryotic transcription. PNAS August 7, 2007 vol. 104 no. 32 12955–12961.
- Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo L (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albariño wine aroma. *Am. J. Enol. Viticult.* 47, 206–216.
- Lima UA (2001). *Biotecnologia industrial. Processos fermentativos e enzimáticos*. Vol.1, SP, Editora Blucher LTDA.
- Lin Y, Tanaka S (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69: 627–642.
- Liu W, Saint DA (2002). Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Commun* 294:347–353.
- Livak KJ (2001). User Bulletin #2, ABI PRISM 7700 Sequence detection system. Applied Biosystems. <http://www.docs.appliedbiosystems.com/pebi docs/ 04303859.pdf>.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* 25:402-408.
- Loureiro V & Malfeito-Ferreira M. (2003) Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 86, 23–50.
- Magasanik, B (1992). Regulation of nitrogen utilization. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression* (Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R., Eds.), pp. 283-317. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Magasanik B & Kaiser CA (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 290: 1–18.
- Magasanik B (2003). Ammonia Assimilation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, p. 827–829
- Marzluf GA (1997). Genetic Regulation of Nitrogen Metabolism in the Fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* p. 17–32. Vol. 61, No. 1
- Miller SM, Magasanik B (1990). Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 4927–4935.
- Miot-Sertier C & Lonvaud-Funel A (2007). Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. *J. Appl. Microbiol.* 102 555–562.
- Mitchell AP, Magasanik B (1983). Purification and properties of glutamine synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 258, 119–124.
- Mitchell AP (1985). The GLN1 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes glutamine synthetase. *Genetics* 111, 243–258.
- Mitrakul CM, Henick-Kling T & Egli CM (1999) Discrimination of *Brettanomyces/ Dekkera* yeast isolates from wine by using various DNA fingerprint methods. *Food Microbiol* 16: 3–14.
- Mo X & Marzluf GA (2003) Cooperative action of the NIT2 and NIT4 transcription factors upon gene expression in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 42, 260–267.

- Molina FI, Shen P, Jong SC (1993) Validation of the species concept in the genus *Dekkera* by restriction analysis of genes coding for rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:32-35.
- Narendja F, Goller SP, Wolschek M, Strauss J (2002). Nitrate and the GATA factor AreA are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 44, 573–583.
- Navarro FJ, Marchin F, Martín Y, Siverio JM (2006). Down-regulation of Eukaryotic Nitrate Transporter by Nitrogen-dependent Ubiquitinylation. *The Journal of Biol. Chem.* Vol. 281, No. 19, pp. 13268–1327.
- Olasupo NA, Bakre S, Teniola OD, James SA (2003). Identification of yeasts isolated from Nigerian sugar cane peels. *J. Basic Microbiol.* 43, 530–533.
- Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P (1993). Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. *Nucleic Acids Res.* 21 :57 7 – 58 3.
- Parthun MR, Jaehning JA (1990). Purification and characterization of the yeast transcriptional activator GAL4. *J. Biol. Chem.* 265, 209–213.
- Passoth V, Blomqvist J, Schnürer J (2007). *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol process. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Pérez MD, González C, Ávila J, Brito N, Siverio JM (1997). The YNT1 gene encoding the nitrate transporter in the yeast *Hansenula polymorpha* is clustered with genes YNI1 and YNR1 encoding nitrite reductase and nitrate reductase, and its disruption causes inability to grow in nitrate. *Biochem. J.* 321, 397±403
- Phister TG & Mills DA (2003). Real-Time PCR Assay for Detection and Enumeration of *Dekkera bruxellensis* in Wine. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 7430–7434. Vol. 69, No. 12.
- Pignocchi C, Berardi E, Cox BS (1998). Nitrate reduction and the isolation of Nit mutants in *Hansenula polymorpha*. *Microbiology* 144, 2323–2330.
- Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A & Compagno C (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22:183– 186.
- Pretorius IS (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675–729.
- Renouf V & Lonvaud-Funel A (2007). Development of an enrichment medium to detect *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis*, a spoilage wine yeast, on the surface of grape berries. *Microbiological Research* 162 154–167.
- Renouf V, Falcou M, Miot-Sertier C, Perello MC, De Revel G, Lonvaud-Funel A (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *J. Appl. Microbiol.* 100:1208– 1219.
- Reue K (1998). mRNA Quantitation Techniques: Considerations for Experimental Design and Application. *Am. Soc. Nutr. Sci. J. Nutr.* 128: 2038–2044.
- Röder C, König H & Fröhlich J (2007). Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by Fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. *FEMS Yeast Res* 1–14.
- Rossi B, Manasse S, Serrani F, Berardi E (2005). *Hansenula polymorpha* NMR2 and NMR4, two new loci involved in nitrogen metabolite repression. *FEMS Yeast Res.* 2005 Nov;5(11):1009-17. Epub 2005 Sep 27.

- Rowen DW, Esiobu N, Magasanik B. (1997). Role of GATA factor Nil2p in nitrogen regulation of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 179, 3761–3766.
- Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. *Journal of molecular medicine.* Nov;84(11):901-10.
- Schwan RF, Mendonca AT, da Silva JJ, Jr Rodrigues V, Wheals AE (2001). Microbiology and physiology of Cachaca (Aguardente) fermentations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 89–96.
- Serrani F, Rossi B, Berardi E (2001). Nitrogen metabolite repression in *Hansenula polymorpha*: the nmrl1 mutation. *Curr. Genet.* 40, 243–250.
- Sherata AM (1960). Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Appl Microbiol* 8, 73–75.
- Silva Filho EA (2003) Caracterização genética de populações de leveduras em destilarias de álcool combustível com vistas a seleção de linhagens promissoras para expressão heteróloga de genes de interesse industrial. Tese de Doutorado, UFPE – Biologia de Fungos. 120p.
- Silva-Filho EA, Santos SKB, Resende AM, Morais JOF, Morais Jr MA, Simões DA (2005a). Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88, 13- 23.
- Silva-Filho EA, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SK, do Monte Resende A, Simões DA, Morais Jr MA (2005b). Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* Oct;32(10):481-6.
- Siverio JM (2002). Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* 26 277-284.
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517.
- Stanbrough M, Magasanik B (1995). Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 174, 94–102.
- Stanbrough M, Rowen DW, Magasanik B, (1995). Role of the GATA factors Gln3p and Nil1p of *Saccharomyces cerevisiae* in the expression of nitrogen- regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9450–9454.
- ter Schure EG, Sillje HHW, Vermeulen EE, Kalthorn JW, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT (1998). Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 144, 1451–1462.
- ter Schure EG, van Riel NAW, Verrips CT (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 67-83.
- The Basics: Northern Analysis. Ambion Applied Biosystems. <http://www.ambion.com/techlib/basics/northern/index.html>
- VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* 44:619-626

- van Maris AJA, Abbott DA, Bellissimi E, van den Brink J, Kuyper M, Luttik MAH, Wisselink HW, Scheffers WA, van Dijken JP, Pronk JT (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90:391–41
- Wheals AE, Basso LC, Alves DMG, Amorim HV (1999). Fuel ethanol after 25 years. *Tibtech*, Vol 17.
- Wiame JM, Grenson M, Arst Jr H.N (1985). Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* 26, 1–88.
- Wilhelm J, Pingoud A (2003). Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 4:1120– 1128.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130 – 138.
- Woolfit M, Rozpedowska E, Piskur J, Wolfe KH (2007). Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera* (*Brettanomyces*) *bruxellensis*. *Eukaryotic Cell*, Apr. 2007, Vol. 6, No. 4, p. 721–733.
- Wray GA, Hahn MW, Abouheif E, Balhoff JP, Pizer M, Rockman MV, Romano LA (2003). The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. *Mol. Biol. E* vol. 20(9):137 7–1419.
- Xiao X, Fu YH, Marzluf GA (1995). The negative-acting NMR regulatory protein of *Neurospora crassa* binds to and inhibits the DNA-binding activity of the positive-acting nitrogen regulatory protein NIT2. *Biochemistry* 34, 8861–8868.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 32:e103.