

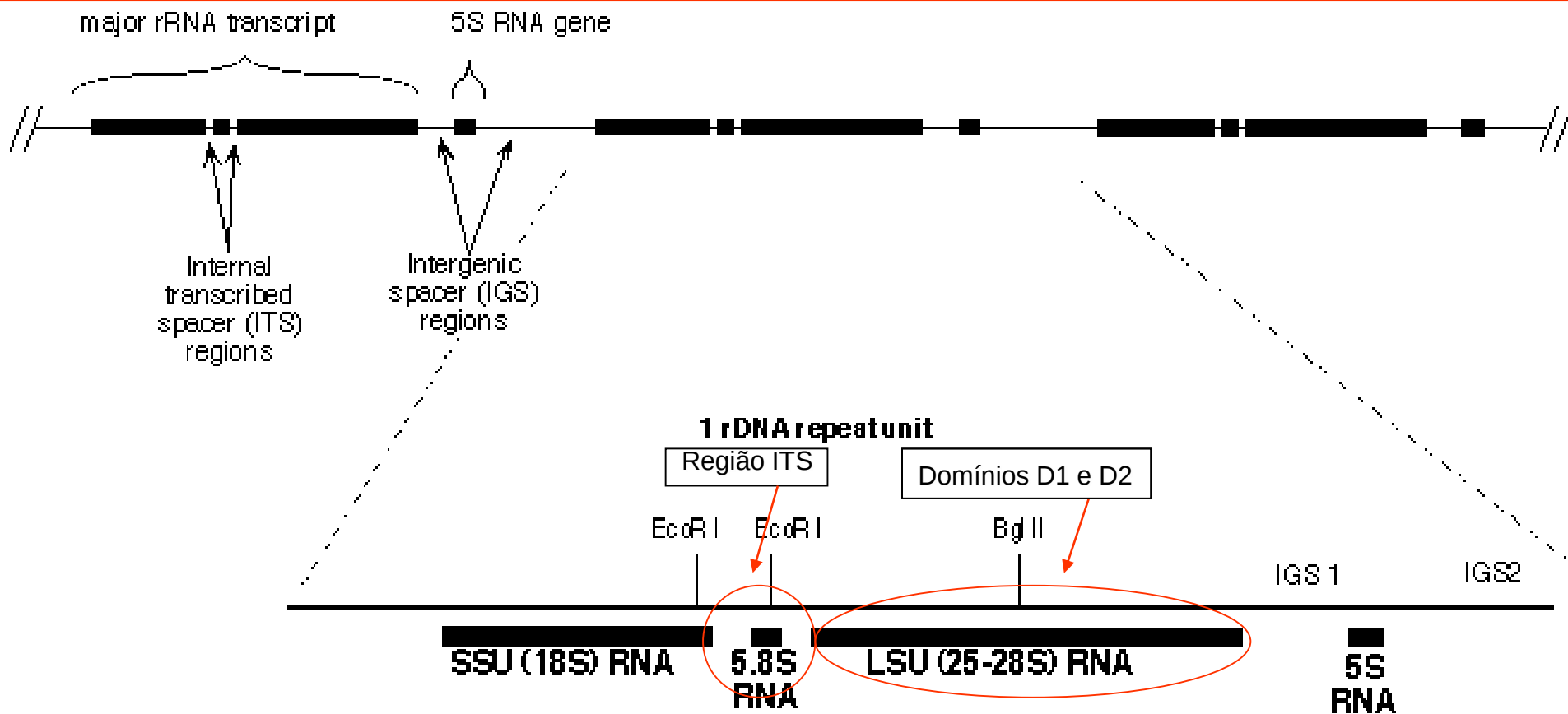
Identificação de leveduras

Métodos moleculares

DNA ribossomal

- Os genes de RNA ribossomal de fungos existem como uma família de genes com múltiplas cópias compostas de sequências de DNA altamente similares (tipicamente de 8 a 12 kb cada). Cada repetição tem regiões codificadoras para um transcrito maior (contendo os rRNAs primários para um único ribossomo) pontuada por uma ou mais regiões intergênicas (IGS).
- DNA ribossomal são sequências que codificam o RNA ribossomal, regulam a amplificação e transcrição e contém segmentos transcritos e não-transcritos. Estas unidades estão agrupadas em *tandem* (repetições).
- A baixa taxa de polimorfismo na transcrição do rDNA permite a caracterização do rDNA de cada espécie usando somente poucos espécimes e torna este DNA muito útil para comparações inter-específicas.

DNA ribossomal



Internal transcribed spacer (ITS) region primers

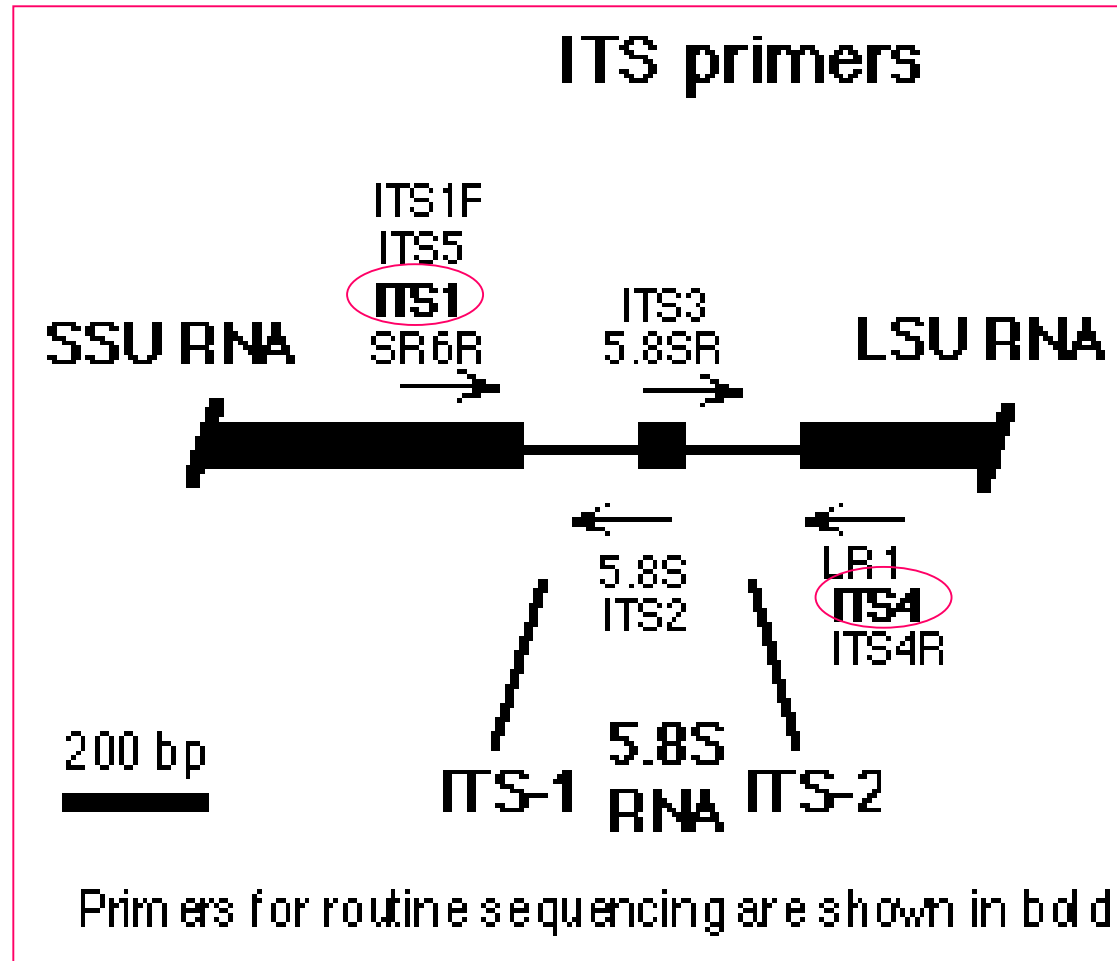
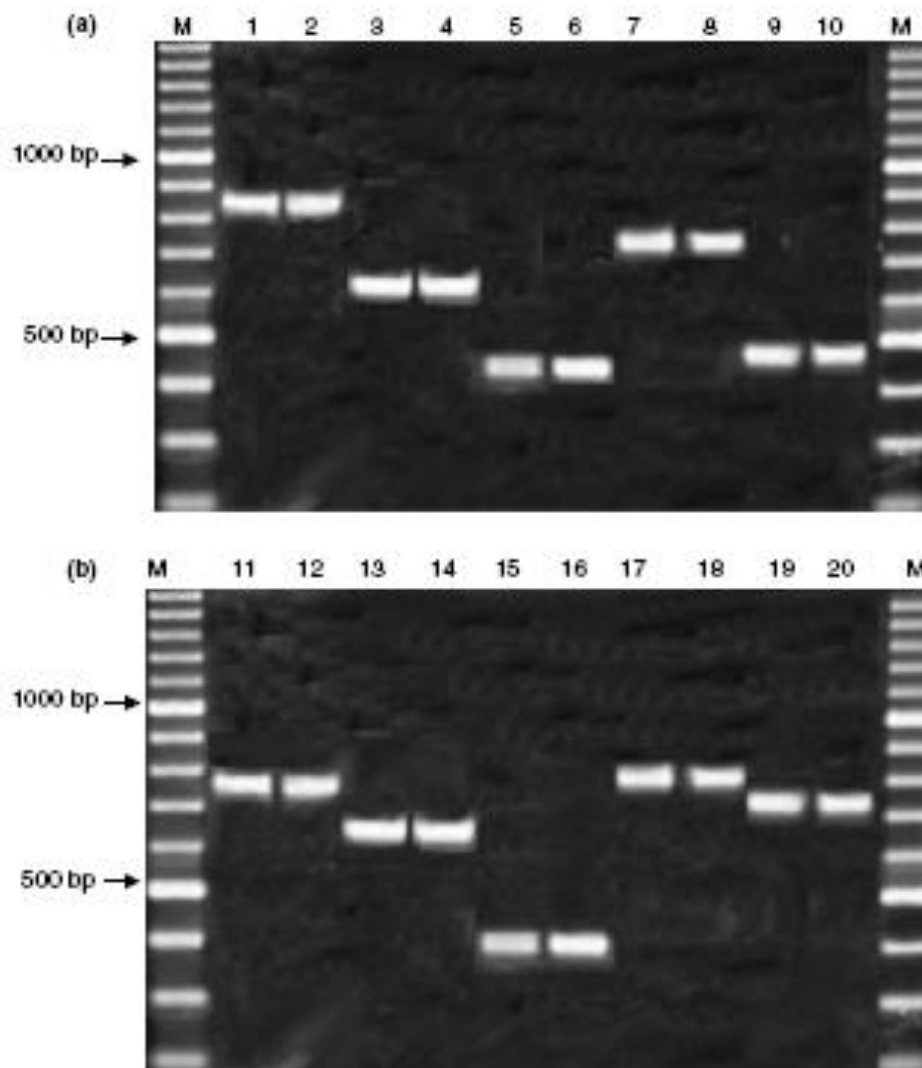


Fig. 1 (a) PCR products obtained using the primers ITS1 and ITS4. Lanes 1–10: (1) *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 76, (2) *Saccharomyces cerevisiae* BM1, (3) *Pichia guilliermondii* NCYC 443, (4) *Pichia guilliermondii* BM5, (5) *Pichia fermentas* NCYC 562, (6) *Pichia fermentas* BM43, (7) *Hanseniaspora uvarum* NCYC 2739, (8) *Hanseniaspora uvarum* BM34, (9) *Brettanomyces bruxellensis* NCYC 2818, (10) *Brettanomyces bruxellensis* BM 23. M is a 100-bp ladder. (b) PCR products obtained using the primers ITS1 and ITS4. Lanes 11–20: (11) *Saccharomyces ludwigii* NCYC 734, (12) *Saccharomyces ludwigii* BM 26, (13) *Pichia anomala* NCYC 750, (14) *Pichia anomala* BM19, (15) *Metchnikowia pulcherrima* NYC 373 (16) *Metchnikowia pulcherrima* BM 33, (17) *Brettanomyces anomalus* NCYC 749, (18) *Brettanomyces anomalus* BM11, (19) *Debaryomyces polymorphus* NCYC 947, (20) *Debaryomyces polymorphus* BM53. M is a 100-bp ladder.



The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations

W.F. Morrissey^{1,2}, B. Davenport², A. Querol³ and A.D.W. Dobson²

¹National Food Biotechnology Centre and ²Microbiology Department, University College Cork, National University of Ireland, Cork, Ireland, and ³Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia, Spain

Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation

A.T. de Souza Liberal¹, A.C.M. Basilio¹, A. do Monte Resende¹, B.T.V. Brasileiro¹, E.A. da Silva-Filho², J.O.F. de Morais³, D.A. Simões⁴ and M.A. de Morais Jr¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Departamento de Biologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió AL, Brazil

³ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

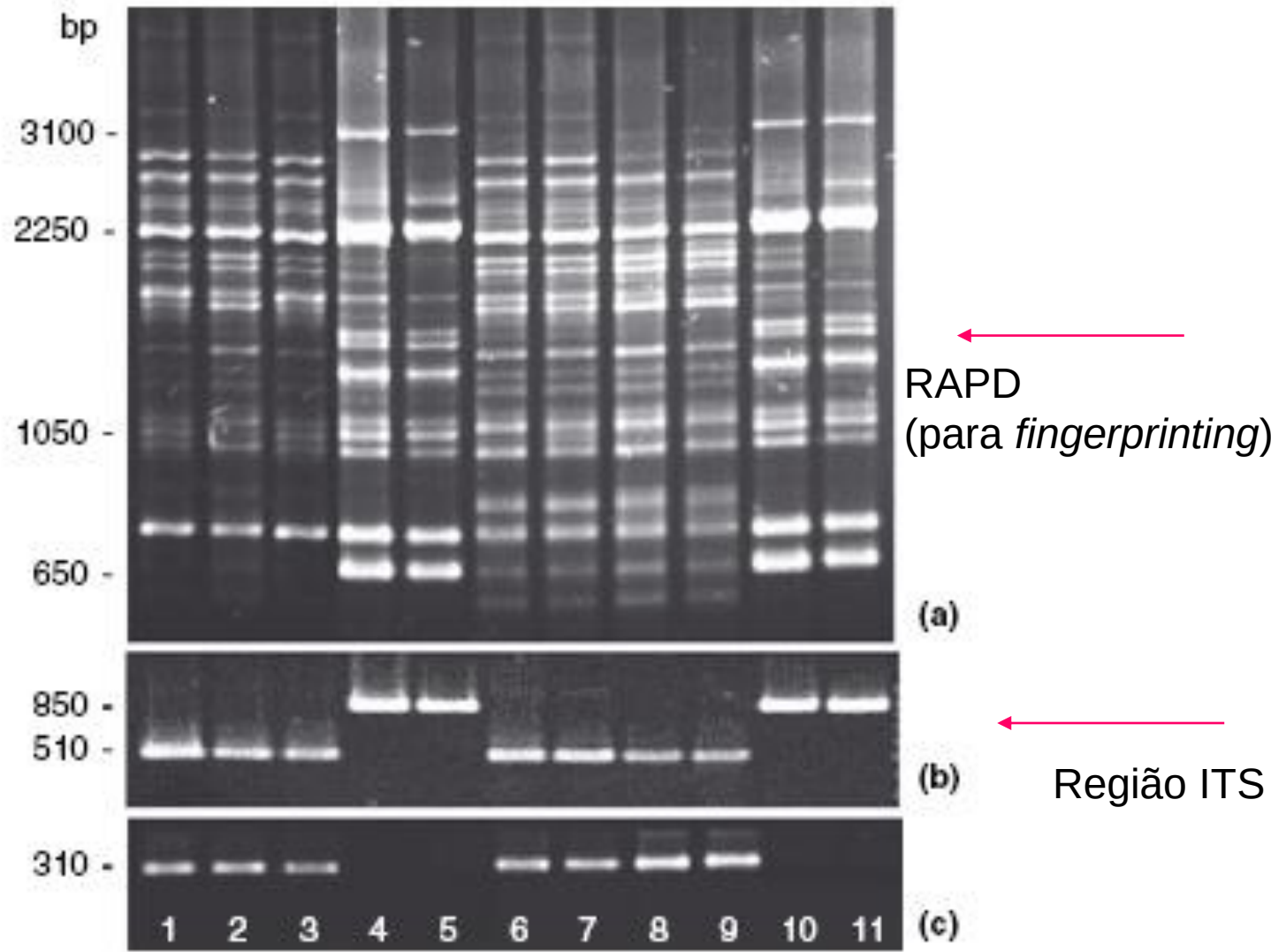
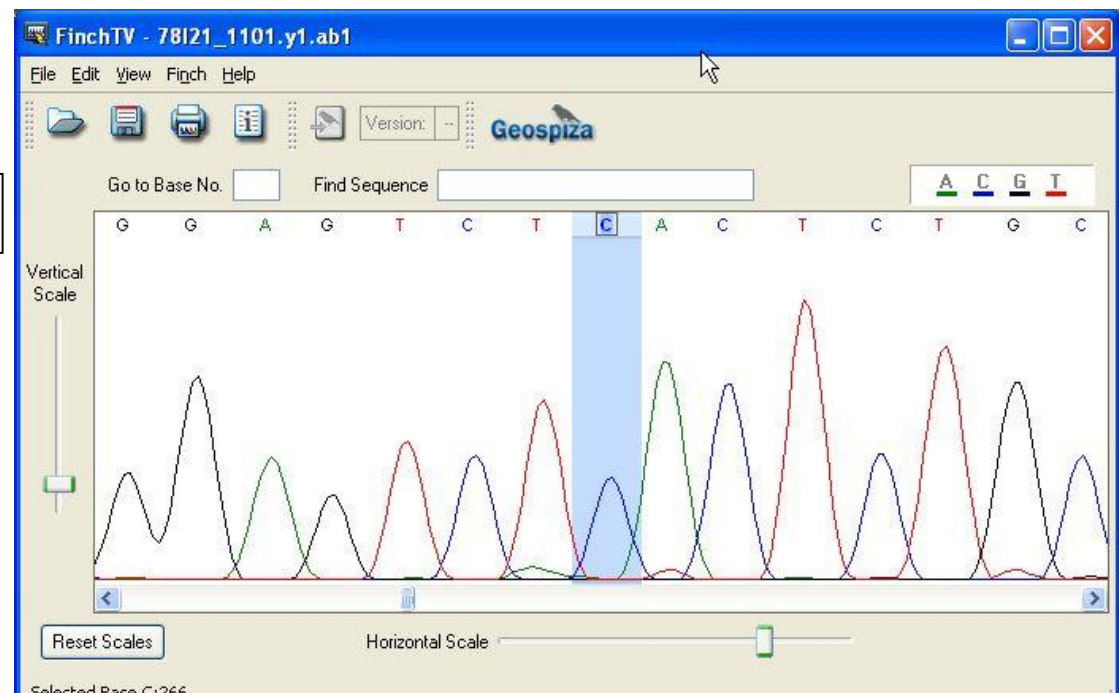


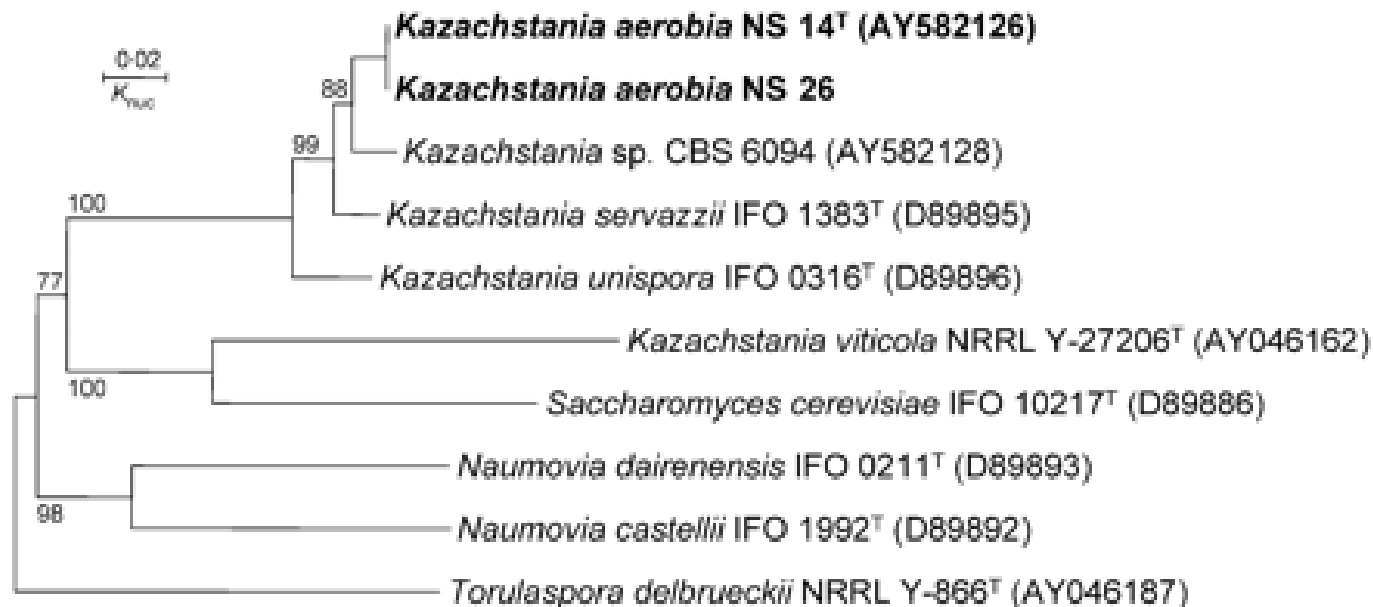
Figure 3 Amplification profile of yeasts isolated from the fermentation process at Distillery A. Industrial samples were plated onto WLN plates and the DNA from individual yeast colonies were submitted to amplification with primers (GTG)₅ (a), *Its4-Its5* (b) and DB90F-DB394R (c).

Sequenciamento

www.ncbi.nlm.nih.gov/



Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
AY939806.1	Kluyveromyces marxianus isolate VA 116042-03 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1199	1199	95%	0.0	98%
AF543841.1	Kluyveromyces marxianus 26S ribosomal RNA, 18S ribosomal RNA genes, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1194	1194	96%	0.0	98%
DQ249191.1	Kluyveromyces marxianus strain ATCC 4135 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1184	1184	94%	0.0	98%
DQ249190.1	Kluyveromyces marxianus strain 00-81-1864 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	1173	1173	94%	0.0	98%



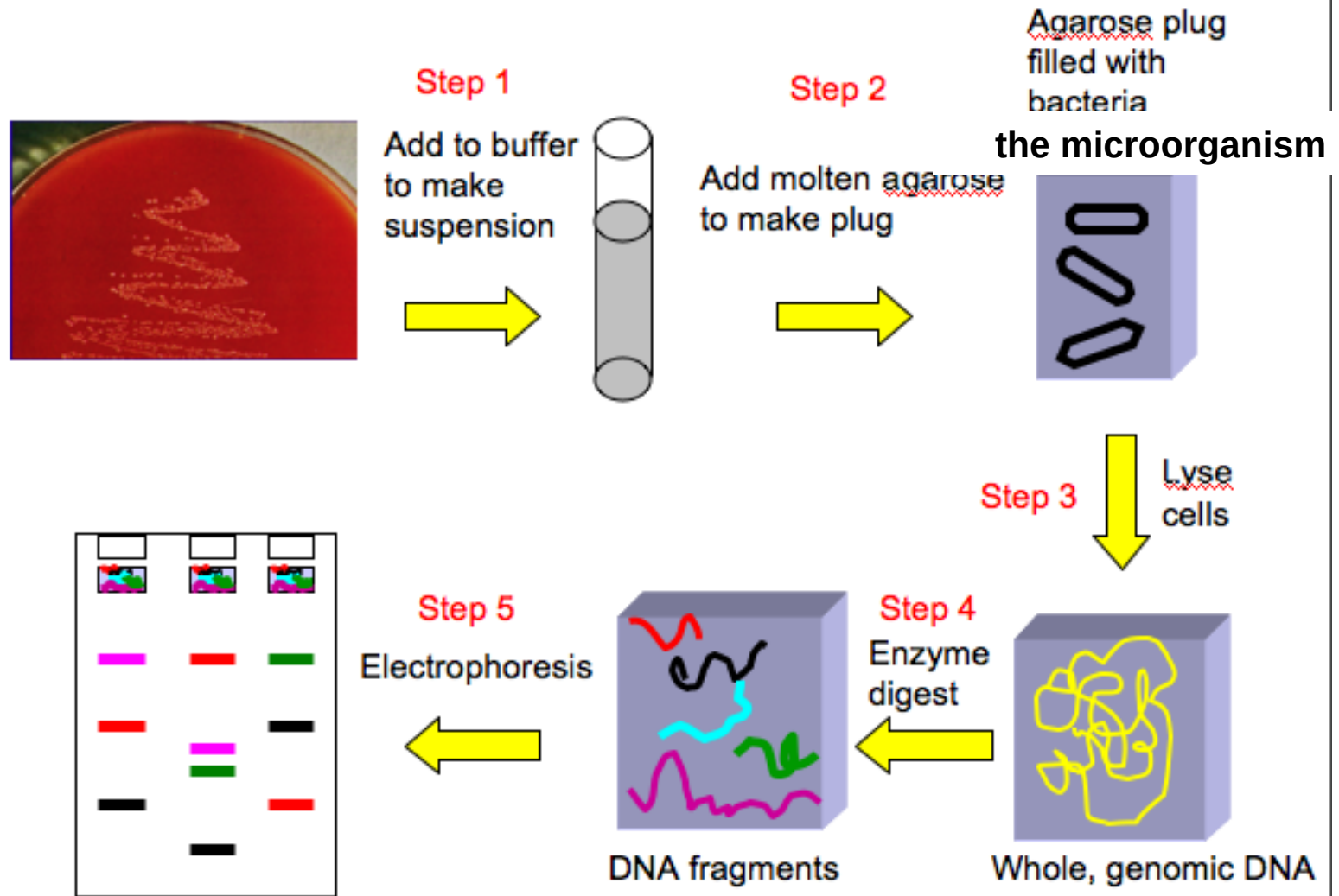
Phylogenetic tree drawn from neighbour-joining analysis of the ITS (including the 5.8S rRNA gene) sequences, depicting the relationship between *K. aerobia* sp. nov. and closely related taxa. Bootstrap percentages over 50% from 1000 bootstrap replicates are shown. Reference sequences were retrieved from GenBank under the accession numbers indicated.

Cariotipagem

- A cariotipagem através da eletroforese de campo pulsátil consiste em uma eletroforese especializada para moléculas de DNA muito longas, capaz de separar moléculas com cerca de 10 Mb de tamanho. Baseia-se na utilização de vários campos elétricos oscilantes orientados em diferentes posições.
- Metodologia empregada para estudar cromossomos que não são facilmente visualizados através de técnicas citológicas devido ao seu pequeno tamanho, como é o caso de cromossomos de fungos.

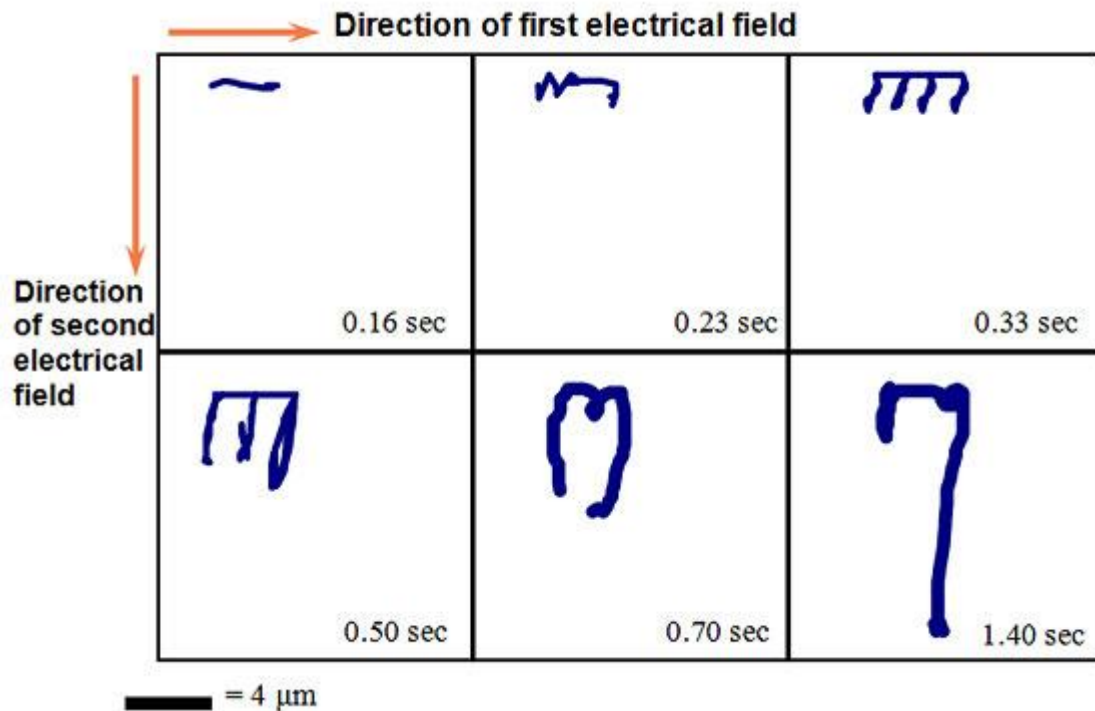


Pulsed Field Gel Electrophoresis PFGE





<http://biomodel.uah.es/tecnicas/elfo/inicio.htm>

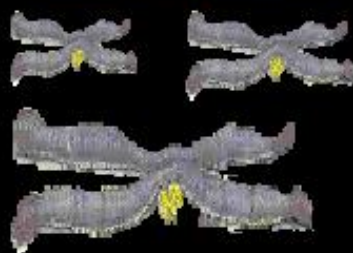


<http://www.bio-rad.com/pt-br/applications-technologies/pulsed-field-gel-electrophoresis>

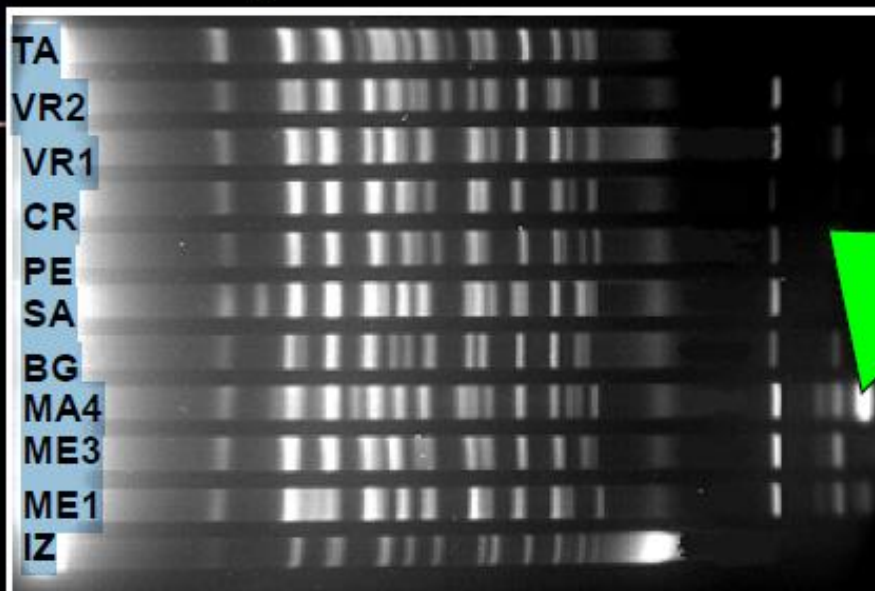
**Colonias
individuais**



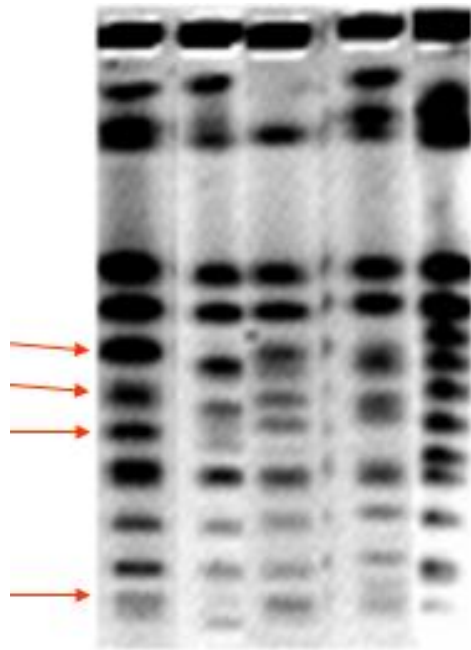
DNA intacto



Eletroforese



CARIOTIPAGEM



Linhagens de *S. cerevisiae*

Eletroforese em campo pulsado



Separação eletroforética dos cromossomos das leveduras

O cariótipo eletroforético de leveduras difere quanto ao número, tamanho e intensidade de bandas, permitindo assim a identificação de cada cepa por seu padrão cromossômico. O padrão cromossômico de cada linhagem fornece um padrão único, como se fosse uma impressão digital .

- O cariótipo de linhagens de laboratório de *S. cerevisiae* apresenta cerca de 16 cromossomos, variando entre 230 a 2000 Kb.

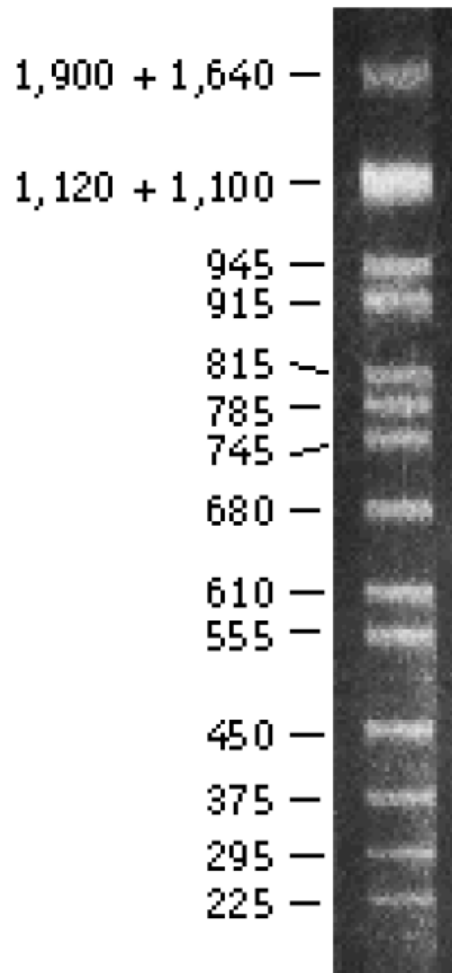
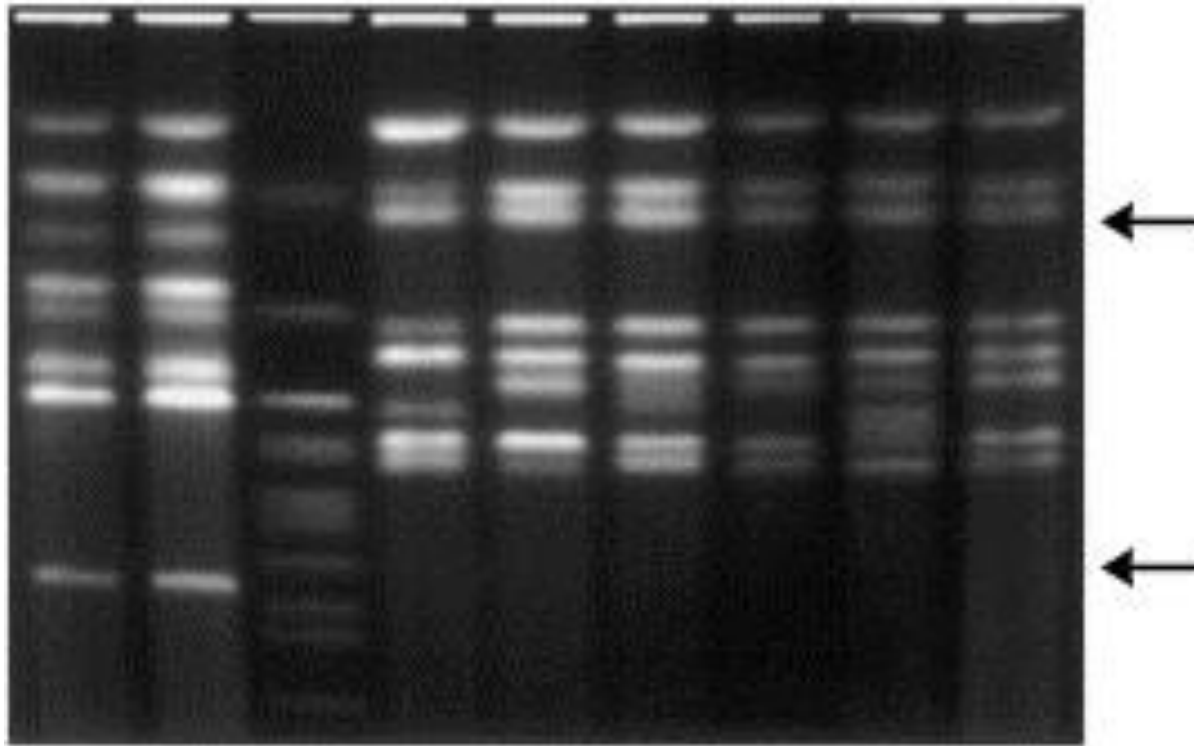


Figura 1: Eletroforese em campo pulsátil de cromossomos da linhagem YPH80 de *Saccharomyces cerevisiae* migrado em gel de agarose a 1% através do sistema CHEF (BioRad). À esquerda estão representados os tamanhos das bandas de cromossomos em kb. (Fonte: BioLabs Inc. <http://circuit.neb.com/neb/>).



DNA types of *Candida parapsilosis* obtained by electrophoretic karyotyping. Lanes 1 to 9 from left to right. Lanes 1 and 2, DNA type I; lane 4, DNA type V; lanes 5 and 9, DNA type II; lanes 6 and 7, DNA type III; lane 8, DNA type IV. Lane 3, *Saccharomyces cerevisiae* chromosome DNA size standard; lower and upper arrow indicate 750 and 2200 Kb, respectively.

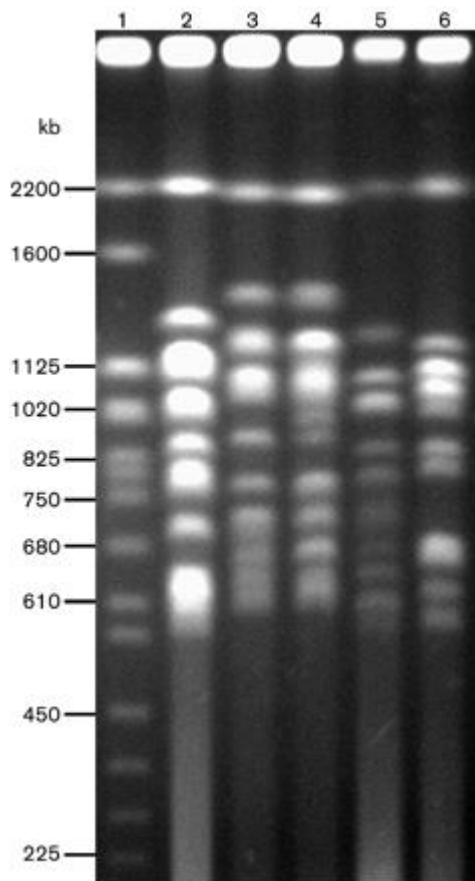


Outbreak of fungemia due to *Candida parapsilosis* in a pediatric oncology unit

F Barchiesi^a, G Caggiano^b, L Falconi Di Francesco^a, M.T Montagna^b, S Barbuti^b, G Scalise^a

^a Istituto di Malattie Infettive e Medicina Pubblica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

^b Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica, Sezione Igiene, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy



Electrophoretic karyotypes. Lanes: 1, *S. cerevisiae* YNN 295; 2, *K. unispora* CBS 398T; 3, *K. aerobia* NS 14T; 4, *K. aerobia* NS 26; 5, CBS 6904; 6, *K. servazzii* CBS 4311T.

IJSEM

International Journal of
Systematic and Evolutionary
Microbiology

Kazachstania aerobia sp. nov., an
ascomycetous yeast species from
aerobically deteriorating corn silage

Hui-Zhong Lu^{1,3}, Yimin Cai², Zuo-Wei Wu^{1,3}, Jian-Hua Jia¹ and Feng-Yan Bai¹

doi: 10.1099/ijms.0.63257-0
IJSEM November 2004 vol.
54 no. 6 2431-2435

- A alta frequência de rearranjos cromossômicos observada para os isolados do processo industrial deve estar relacionada às condições de estresse às quais as células são continuamente submetidas (alta concentração de etanol, altas temperaturas e anaerobiose). Foram observados rearranjos cromossômicos a partir de 150 gerações de crescimento em condições de laboratório. Nos processos industriais, os rearranjos cromossômicos devem ocorrer em um intervalo ainda menor devido às condições adversas nas quais as células são submetidas ao longo do reciclo celular durante a safra.
- A técnica de cariotipagem molecular pode ter sua aplicabilidade comprometida para estudos de dinâmica populacional em processos industriais de fermentação alcoólica, pois a ocorrência de rearranjos cromossômicos pode comprometer em certo nível a confiabilidade dos resultados obtidos.

Identificação específica

~~Caracterização intraespecífica~~