

Utilização do Intron Splice Site *primer* EI-1 na discriminação de leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica

Use of Intron Splice Site primer EI-1 in the discrimination of contaminant yeasts from the alcoholic fermentation process

Rodrigo Bacelar da COSTA-SILVA^{1,2}, Mario Ribeiro de MELO-JÚNIOR^{1,3*}, Marcos Antônio de MORAES JUNIOR⁴

Resumo

Neste trabalho, utilizamos o Intron Splice Site *primer* EI-1 para a análise do perfil de amplificação de diferentes espécies de leveduras consideradas contaminantes no processo de fermentação alcoólica, originadas de uma destilaria no Estado da Paraíba na safra 2004/2005. Foram realizadas as etapas analíticas para discriminação molecular das leveduras a partir da extração do DNA total, amplificação por PCR e análise do perfil genético. Os resultados obtidos indicam que o Intron Splice Site *primer* EI-1 é muito eficaz na discriminação das diferentes espécies de *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*, evidenciando padrões de bandas específicos para as leveduras analisadas. Este *primer*, por ser complementar a uma região muito conservada do genoma das leveduras, mostrou-se incapaz de uma discriminação intraespecífica. Isto demonstra a utilidade deste marcador no auxílio à taxonomia de leveduras.

Palavras-chave: leveduras contaminantes; *Saccharomyces cerevisiae*; Intron.

Abstract

In the present study, the Intron Splice Site *primer* EI-1 was used for the analysis of the profile amplification of different species of yeasts considered contaminants (16) in the alcoholic fermentation process obtained from a distillery in the State of Paraíba in 2004/2005. Analytic stages for the molecular discrimination of the yeasts from the total DNA extraction, PCR amplification, and genetic profile analysis were performed. The results indicate that Intron Splice Site *primer* EI-1 is highly efficient at discriminating between different *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species showing specific band standards for the yeasts analyzed. This *primer*, which is part of a conserved region of yeast genome, proved incapable of intra-specific discrimination. This finding demonstrates that this marker may be useful in yeast taxonomy.

Keywords: contaminant yeasts; *Saccharomyces cerevisiae*; Intron.

1 Introdução

Atualmente, o acompanhamento microbiológico de rotina do processo fermentativo é baseado apenas na observação da morfologia de colônias crescidas em placa de Petri, metodologia que não permite uma boa discriminação das leveduras presentes no processo, além de ser muito laborioso. (LOPEZ et al., 2003).

É imprescindível então, obter-se um rápido diagnóstico sobre a composição e dinâmica das populações de leveduras existentes durante todo o processo, a fim de exercer um controle microbiológico mais apropriado que reduza os transtornos operacionais, assegurando uma redução de custos no processo de fermentação (CHAUD; SCARBIERI, 2006).

Na tentativa de se obter uma ferramenta mais eficaz para o controle de contaminações nos vários processos fermentativos, diferentes técnicas utilizadas para análise do polimorfismo de DNA vêm sendo utilizadas na identificação e caracterização de leveduras contaminantes presentes no processo, dentre estas podemos destacar: RAPD e PCR (LEICKFELDT; MEYER; BORNER, 1993; PATARO et al., 2000; GUERRA et al., 2001).

Métodos de análise por PCR utilizando *primers* que anelam a regiões intrônicas do genoma vêm sendo utilizados para identificação e mapeamento genético do polimorfismo de contaminantes em cereais (BARROS LOPES et al., 1996; HALLS et al., 2007). Recentemente, os estudos destes *primers*, homólogos a regiões flanqueadoras dos introns, demonstraram também eficiência na discriminação de linhagens de leveduras nativas e comerciais da fermentação do vinho (LOPEZ et al., 2003). Alguns autores, testando a eficiência de vários Intron Splice Site *primers* na identificação de diferentes linhagens que habitam os vários processos fermentativos, chegaram à conclusão de que o *primer* EI-1 apresenta-se como uma excelente ferramenta para detectar polimorfismo entre linhagens contaminantes destes processos (BARROS LOPES et al., 1996; GUERRA et al., 2001).

A partir destes dados, surgiu o interesse em investigar a eficiência de técnicas baseadas em PCR, com o intuito de viabilizar uma possível ferramenta para estudos de populações

Recebido para publicação em 2/8/2008

Aceito para publicação em 8/7/2009 (003745)

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Cidade Universitária, CEP 50670-910, Recife – PE, Brasil, E-mail: mariormj@gmail.com

² Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

³ Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

⁴ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

*A quem a correspondência deve ser enviada

de leveduras utilizadas em processos fermentativos industriais. Sendo assim, utilizamos o Intron Splice Site *primer* EI-1 para a análise do perfil de amplificação de diferentes espécies de leveduras consideradas contaminantes no processo de fermentação alcoólica.

2 Material e métodos

2.1 Linhagens de leveduras e condições de cultivo

As linhagens de *S. cerevisiae* e não *S. cerevisiae* de coleção foram adquiridas, respectivamente, das coleções do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, do Departamento de Micologia, da coleção A.T.C.C., da Zanini S/A, e a linhagem de Laboratório FF18733 pertence à coleção do Setor de Biologia Molecular-LIKA/UFPE (Tabelas 1 e 2).

Os isolados utilizados neste trabalho foram obtidos da fermentação de álcool combustível, durante a safra 2004/2005, da destilaria Japungu Agro-Industrial S/A, Santa-Rita – PB.

Tabela 1. Espécies *Saccharomyces* de coleção e de laboratório.

| Linhagens <i>Saccharomyces</i> | Origem |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> ATCC9763 | Coleção A.T.C.C. |
| <i>S. cerevisiae</i> LACIA | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> FF18733 | Laboratório (LIKA) |
| <i>S. cerevisiae</i> IA1238 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> 1460-1 | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> 1460-2 | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> IA1211 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> IA1255 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> IA1194 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> IA1236 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> IZ1194 | Departamento de Antibióticos (UFPE) |
| <i>S. cerevisiae</i> Fleishmann | Fleishmann S/A |
| <i>S. cerevisiae</i> ZANI-FLOC | ZANINI S/A |
| <i>S. chevalieri</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. diastaticus</i> A e B | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. oleaginosus</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. pastorianus</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>S. oleaceus</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |

Tabela 2. Linhagens não-*Saccharomyces* de coleção mais frequentes em episódios de contaminação em unidades de produção de álcool carburante.

| Linhagens não- <i>Saccharomyces</i> | Origem |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Torulopsis pulcherrime</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Torula utilis</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Candida valida</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Candida diversa</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Dekkera anomala</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Dekkera intermedia</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Hansenula anomala</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Kluyveromyces polysporus</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Kloeckera faecalis</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Rhodotorula minuta</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |
| <i>Brettanomyces intermedia</i> | Departamento de Micologia (UFPE) |

Estas foram previamente caracterizadas morfológicamente e também ao nível molecular através do *primer* (GTG)₅, a partir do qual 16 perfis genéticos foram identificados (Tabela 3). Todas as amostras puras foram cultivadas em meio YPD (extrato de leveduras, peptona e glicose) *overnight* a 30 °C para extração do DNA total.

2.2 Extração do DNA Total

O DNA genômico dos isolados foi extraído segundo Sambrook, Fritsch e Maniatis (1986). Cada isolado foi incubado *overnight* em 20 mL de YPD a 30 °C e, em seguida, centrifugado por 10 minutos a 14000 RPM. O sobrenadante foi descartado e o material coletado suspenso em Tampão de Extração (EDTA, TRIS-HCl, NaCl, SDS 10%), agitado em vórtex e aquecido a 65 °C por 30 minutos. Após esta etapa, foi adicionado fenol/clorofórmio (v/v) e, em seguida, centrifugou-se. Transferiu-se a fase superior para novo tubo e para a precipitação do DNA foi utilizado etanol absoluto (a -20 °C) por 2 horas. O DNA foi lavado com álcool 70%, dissolvido em 100 µl de TE (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) e, posteriormente, quantificado em espectrofotômetro a 260/280 nm. O material foi estocado a -20 °C até sua utilização.

2.3 Amplificação por PCR

A tipagem com o *primer* Intron foi em seguida aplicada a 16 linhagens de leveduras isoladas no contexto de um trabalho anterior de acompanhamento da população de leveduras em uma unidade industrial produtora de etanol.

A reação de PCR foi conduzida num volume total de 25 µl, utilizando-se o Intron Splice Site *primer* EI-1 (CTGGCTTGGTGTATGT), descrito por Barros Lopes et al. (1996), contendo 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1x Tampão *Taq* buffer, 50 ng de DNA genômico, 25 pmoles de

Tabela 3. Linhagens Isoladas do processo fermentativo de uma unidade industrial de produção de álcool combustível, que foram submetidos a previa amplificação por PCR com o *primer* (GTG)₅. PG = Perfil (GTG)₅ e MF = Mosto Fermentado.

| Perfis genéticos (GTG) ₅ | Representante (Isolado) |
|-------------------------------------|-------------------------|
| PG 1 | MF16-1 |
| PG 1 A | MF69-1 |
| PG 3 | MF17-3 |
| PG 4 | MF15 |
| PG 4 A | MF278-2 |
| PG 5 | MF24 |
| PG 6 | MF68-1 |
| PG 14 | MF113-2 |
| PG 15 | MF113-4 |
| PG 15A | MF113-6 |
| PG 18 | MF114-2 |
| PG 18A | MF1-1 |
| PG 19 | MF261-8 |
| PG 20 | MF163-3 |
| PG 21 | MF181 |
| PG 22 | MF185-3 |

primer, 0.25 U de *Taq* polymerase e 0.25 µg de BSA. As amostras foram inicialmente desnaturadas a 94 °C por 3 minutos e, em seguida, submetidas a 33 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 48 °C por 2 minutos e polimerização a 74 °C por 9 segundos, além de uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

2.4 Análise dos perfis genéticos

O produto de amplificação foi visualizado em gel de agarose 1,3% após eletroforese a 70 V por 2 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados em transluminador de UV e fotografados com câmera Polaróide®. Os perfis genéticos resultantes da caracterização com o *primer* EI-1, tiveram seus pesos moleculares estimados por comparação com o marcador de peso molecular 100-pb (invitrogen) em todos os géis. O dendrograma foi obtido através do programa NTSYS (JENCER, 1989), no qual os dados foram introduzidos em uma matriz binária do tipo 1 e 0, que indica a presença (1) ou ausência (0) de bandas de um determinado peso molecular.

Os perfis foram agrupados levando-se em consideração o coeficiente de Jaccard, um coeficiente de associação cujos valores de similaridade variam entre 0 e 1, e não considera o intervalo (0,0) como elemento de similaridade (CRISI; ARMENGOL, 1993).

3 Resultados

Inicialmente foram analisadas 11 espécies de leveduras pertencentes a diversos gêneros (Tabela 2), que são frequentes

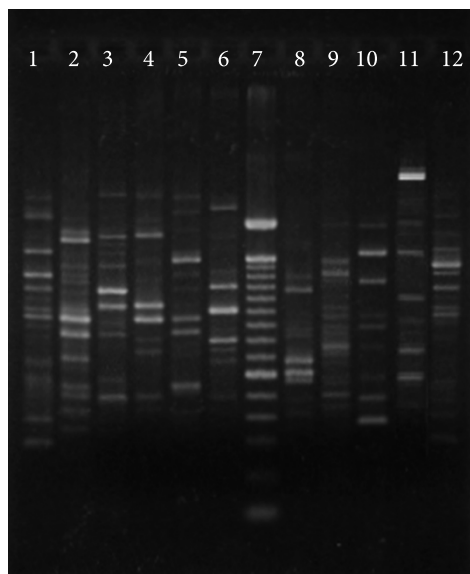


Figura 1. Perfil de amplificação com o *primer* EI-1 de diferentes espécies de leveduras de coleção, frequentes em episódios de contaminação em unidades industriais produtoras de álcool combustível. Linha 1) *Torulopsis pulcherrime*; Linha 2) *Torula utilis*; Linha 3) *Candida valida*; Linha 4) *Candida diversa*; Linha 5) *Dekkera anomala*; Linha 6) *Dekkera intermedia*; Linha 8) *Hansenula anomala*; Linha 9) *Kluyveromyces polysporus*; Linha 10) *Kloeckera faecalis*; Linha 11) *Rhodotorula minuta*; Linha 12) *Brettanomyces intermédia*. Linha 7) Padrão de Peso Molecular (MPM) 100 pb-Ladder (GIBCO).

em episódios de contaminação em unidades industriais de produção de álcool combustível. Os perfis genéticos obtidos da amplificação com o *primer* EI-1 evidenciou um alto polimorfismo com padrões de bandas claramente diferenciados, específicos para cada espécie (Figuras 1 e 2).

Estas 16 linhagens apresentam perfis genéticos distintos quando classificadas por uma metodologia baseada no uso do *primer* (GTG)₅ (resultados não mostrados). As Figuras 3, 4, 5 e 6 demonstram que o *primer* Intron foi capaz de distinguir 8 das 16 linhagens testadas.

A maioria dos isolados apresentaram perfis genéticos muito semelhantes ao padrão espécie-específico apresentado pelas linhagens *Saccharomyces cerevisiae* testadas, diferenciando-se entre si pela presença ou ausência de 4 bandas polimórficas de 1.600, 2.200, 1.030 e 800 pb, podendo um perfil apresentar mais de uma destas bandas. É importante notar que a banda de 1.750 pb, que aparentemente poderia constituir um bom marcador, teve que ser desconsiderada por não apresentar reprodutibilidade entre diferentes ampliações de um mesmo isolado. O perfil P21, representado pelo isolado MF181, apresentou um perfil completamente distinto das demais.

4 Discussão

A identificação e a caracterização de linhagem de leveduras são de grande importância para o processo de fermentação industrial, pois a qualidade de bebidas, como o vinho, é uma consequência direta da diversidade e da dinâmica das populações de micro-organismos presentes no processo (GUERRA et al., 2001).

Quando aplicada a um universo de 11 espécies de leveduras pertencentes a gêneros distintos, visto na Tabela 3, a técnica de PCR com o *primer* EI-1 gerou perfis genéticos únicos para cada espécie analisada. O alto grau de polimorfismo desta região revelado pelo *primer* EI-1 nessas amostras permite,

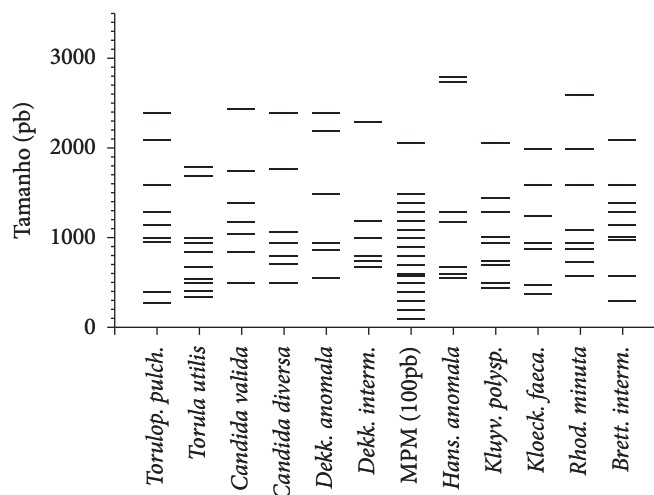


Figura 2. Representação gráfica dos perfis de amplificação com o *primer* EI-1 das diferentes linhagens de leveduras frequentes em episódios de contaminação.

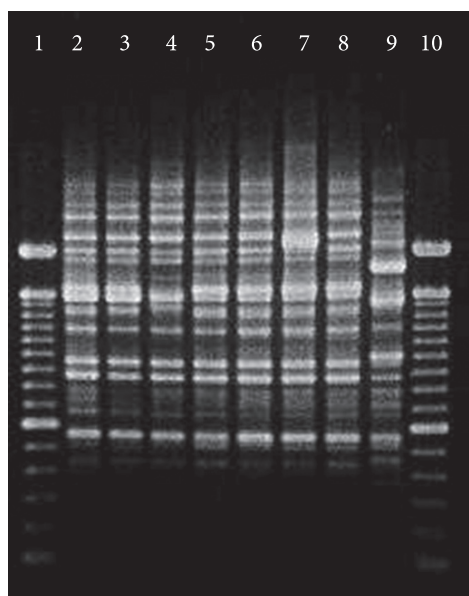


Figura 3. Perfil de amplificação com o *primer* EI-1 dos isolados representantes dos 16 perfis genéticos, previamente caracterizados pelo *primer* (GTG)₅. Linha 2) MF16-1(P1); Linha 3) MF69-1(P1A); Linha 4) MF17-3(P3); Linha 5) MF 15(P4); Linha 6) MF278-2(P4A); Linha 7) MF24(P5); Linha 8) MF68-1(P6); Linha 9) MF113-2(P14). Linha 1 e 10) Padrão de Peso Molecular (MPM) 100 bp-Ladder (GIBCO).

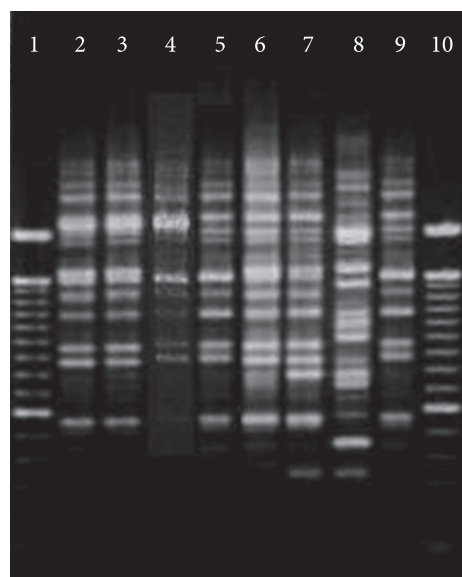


Figura 5. Perfil de amplificação com o *primer* EI-1 dos isolados representantes dos 16 perfis genéticos, previamente caracterizados pelo *primer* (GTG)₅. Linha 2) MF113-4(P15); Linha 3) MF113-6(P15A); Linha 4) MF114-2(P18); Linha 5) MF1-1(P18A); Linha 6)MF261-8(P19); Linha 7) MF163-3(P20); Linha 8) MF181(P21); Linha 9) MF185-3(P22). Linha 1 e 10) Padrão de Peso Molecular (MPM) 100 bp-Ladder (GIBCO).

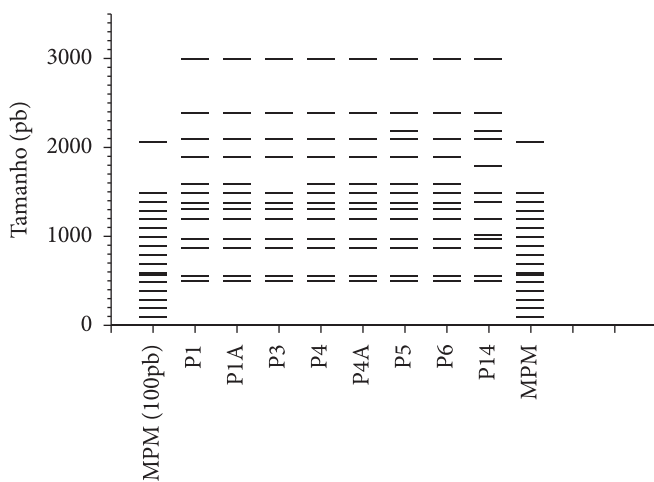


Figura 4. Representação gráfica dos perfis de amplificação com o *primer* EI-1 dos isolados representantes dos 16 perfis genéticos, previamente caracterizados pelo *primer* (GTG)₅.

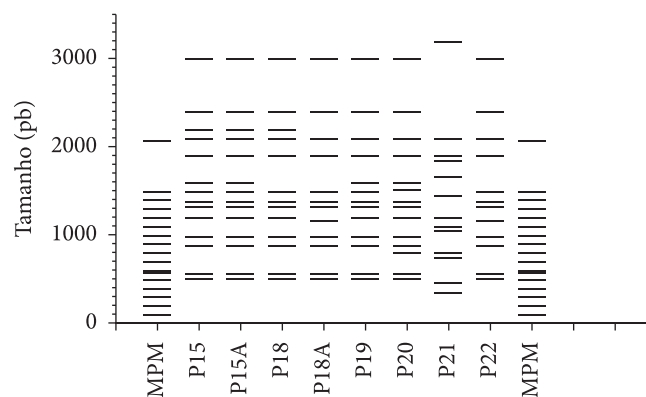


Figura 6. Representação gráfica dos perfis de amplificação com o *primer* EI-1 dos isolados representantes dos 16 perfis genéticos, previamente caracterizados pelo *primer* (GTG)₅.

portanto, uma discriminação fácil e rápida dessas espécies de contaminantes. Estes resultados confirmam os de Barros Lopes et al. (1998) que, analisando leveduras nativas de diferentes gêneros isoladas da fermentação alcoólica do vinho, observaram elevada eficiência do *primer* EI-1 na discriminação entre diferentes espécies. Outras metodologias de PCR, como por exemplo, o uso de um *primer* para regiões intermicrossatélite (GTG)₅, também apresentam resultados muito satisfatórios em amostras semelhantes (SILVA FILHO et al., 2002).

Sintetizado por Barros Lopes et al. (1996), o Intron Splice Site *primer* EI-1 mostrou-se muito eficaz na discriminação de linhagens comerciais de *S. cerevisiae* isoladas na fermentação do vinho. Segundo o autor, a maior vantagem desta técnica é que ela é simples, rápida e acessível para laboratórios industriais com limitada experiência e recursos. A rapidez da técnica e a possibilidade da análise de vários exemplares em um único dia permitem seu uso no monitoramento do crescimento de leveduras durante o processo fermentativo propiciando um melhor controle de qualidade. Pataro et al. (2000), também utilizando PCR com o *primer* intron EI-1, voltaram a destacar a utilidade deste *primer* na discriminação de linhagens de *S. cerevisiae*, agora isoladas na fermentação da aguardente.

No presente estudo, a linhagem IA 1194 se destacou, dentre as demais, por apresentar um perfil completamente distinto da *S. cerevisiae*. Esta levedura foi classificada inicialmente por métodos clássicos. Embora estes métodos, baseados em características morfológicas e bioquímicas, continuem sendo o critério mais utilizado para a classificação de isolados desconhecidos (BARNETT; PAINER; YARROW, 1990), outras características fisiológicas importantes podem ser determinadas por somente uma pequena fração do genoma (BARROS LOPES et al., 1998; GRANCHI et al., 1999).

Em outro trabalho que está sendo desenvolvido, a partir da análise preliminar das 16 linhagens nativas do processo de fermentação do álcool carburante, submetidas à amplificação com o *primer* (GTG)₅, foi possível observar o alto polimorfismo dos isolados deste processo (resultados não mostrados).

Este alto polimorfismo não foi repetido pelo *primer* EI-1, pois este não foi capaz de diferenciar os 16 isolados testados, mas em contrapartida ele evidenciou a predominância de linhagens *S. cerevisiae* no processo, já que 90% dos isolados apresentaram padrões de bandas muito próximos ao padrão espécie-específico da *S. cerevisiae*, estabelecido neste trabalho. O alto polimorfismo observado entre linhagens de *S. cerevisiae* constitui uma poderosa ferramenta para análise da população nativa que é formada durante a fermentação espontânea da uva (POL SINELLI et al., 1996), o que pode ser observado também na produção de álcool etanol. É possível que o alto polimorfismo encontrado seja resultado de características únicas do processo de fermentação do álcool combustível. Trata-se de uma fermentação de ciclo curto de 8 horas, conduzida em altas temperaturas (32 a 38 °C), com alto teor alcoólico (8 a 10%) e ciclos fermentativos diários durante 7 a 8 meses. Estas particularidades estariam atuando como pressões seletivas nas linhagens que vão surgindo, justificando a diversidade complexa observada (LUCENA, 2002).

O isolado MF181, representante do perfil genético P21, que apresentou um perfil genético completamente distinto das espécies *Saccharomyces* testadas, apenas confirma os resultados obtidos por outros autores, que, utilizando técnicas de cariotipagem molecular e PCR com o *primer* para regiões intermicrossatélite (GTG)₅, comprovaram que este mesmo isolado é muito distante de espécies de *Saccharomyces* (LUCENA, 2002; SILVA FILHO et al., 2002).

5 Conclusões

A técnica de PCR, utilizando o Intron Splice Site *primer* EI-1, não foi desenvolvida com o intuito de substituir técnicas já existentes de taxonomia e sistemática de leveduras, mas sim como uma ferramenta preliminar e confirmatória para estas. Esta técnica pode facilitar, para os taxonomistas, a identificação de leveduras pertencentes a diferentes gêneros.

Por se tratar de um marcador molecular relativamente barato, que não requer mão de obra especializada e que apresenta resultados rápidos, o *primer* EI-1 deve ser utilizado como um marcador específico para identificação de isolados *S. cerevisiae* retirados diretamente do processo fermentativo. Posteriormente, seriam utilizados outros *primers*, tal como

o (GTG)₅, para identificar dentre os isolados *S. cerevisiae*, as possíveis linhagens genéticas que coabitam o processo fermentativo.

Referências bibliográficas

- BARNETT, J.; PAINER, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 4. ed. Cambridge University Press, 1990.
- BARROS LOPES, M. A. et al. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 279-286, 1998.
- BARROS LOPES, M. A. ET AL. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site *primers*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4514-4520, 1996.
- CHAUD, S. G.; SGARBIEIRI, V. C. Propriedades funcionais (tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica e frações glicana, manana e glicoproteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 369-379, 2006.
- CRISI, J. V.; ARMENGOL, M. F. L. **Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica**. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos, 1993. p. 131.
- GRANCHI, L. et al. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 949-956, 1999.
- GUERRA, J. B. et al. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, p. 106-111, 2001.
- HALLS, C. et al. Involvement of DEAD-box proteins group I and group II Intron splicing. **Journal of Molecular Biology**, v. 365, n. 3, p. 835-855, 2007.
- JENCER, R. J. NTSYS-PC- Numerical taxonomy and multivariate analysis system-version 1.40. **Quarterly Review of Biology**, v. 64, n. 2, p. 250-252, 1989.
- LEICKFELDT, E.; MEYER, W.; BORNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, p. 413-126, 1993.
- LOPEZ, V. et al. A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 63-71, 2003.
- LUCENA, B. T. L. **Cariotipagem molecular de leveduras de fermentação alcoólica**. 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)-Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, 2002.
- PATARO, C. et al. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 24-31, 2000.
- POL SINELLI, M. et al. Multiple strains of *Saccharomyces cerevisiae* on a single grape wine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 110-114, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning, a laboratory manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- SILVA FILHO, E. A. et al. Utilização do Marcador Molecular (GTG)₅ na Tipagem Genética de Leveduras de fermentação Alcoólica. In: CONGRESSO DA STAB, 8., 2002. **Anais...** v. 8, p. 694-699.