



Revista Brasileira de Ciências Agrárias

ISSN: 1981-1160

editorgeral@agraria.pro.br

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Brasil

Santos, Igor L. V. de L.; da Silva, Carliane R. C.; dos Santos, Sérgio L.; de Souza, Paulo R. E.; Maia, Maria de M. D.; de Moraes Júnior, Marcos A.

Avaliação dos parâmetros de transformabilidade genética de linhagens sucroalcooleiras da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*

Revista Brasileira de Ciências Agrárias, vol. 7, núm. 2, abril-junio, 2012, pp. 328-336

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Pernambuco, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=119023684020>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Igor L. V. de L. Santos¹**Carliane R. C. da Silva²****Sérgio L. dos Santos²****Paulo R. E. de Souza²****Maria de M. D. Maia²****Marcos A. de Moraes Júnior^{3,4}**

Avaliação dos parâmetros de transformabilidade genética de linhagens sucroalcooleiras da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

A avaliação dos parâmetros de transformabilidade genética de linhagens utilizadas na produção de etanol pela indústria tais como viabilidade celular, eficiência de transformação e freqüência de transformação são passos essenciais para identificar quais as linhagens mais propícias aos programas de melhoramento genético. Este trabalho teve como objetivo avaliar linhagens da levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae* que são mais propícias a experimentos de modificação genética, tanto aquelas que já são comercialmente utilizadas quanto linhagens isoladas da Destilaria Japungú Agroindustrial S/A. Adicionalmente a linhagem padrão MM10-2a foi utilizada como referência. Todas foram submetidas à transformação pelo método químico (LiAc/ssDNA/PEG) com o plasmídio de expressão pNatCre. Os resultados mostraram que a maior e a menor viabilidade celular foram encontradas, respectivamente, nas linhagens GDBMF1-1 (P18A) e GDB226-1 (P19). A linhagem que apresentou maior eficiência de transformação foi a GDB24 (P5) e as menores eficiências foram igualmente verificadas nas linhagens GDB114-2 (P18) e GDB226-1 (P19). A maior freqüência de transformação, parâmetro mais importante a ser considerado, foi observada na linhagem GDB24 (P5) e a menor foi observada na GDB116-3 (P4A). Os dados obtidos demonstraram que a linhagem industrial isolada mais propícia para experimentos de modificação genética é a GDB24 (P5) e a linhagem industrial comercial mais propícia é a CAT1.

Palavras-chave: Leveduras, plasmídio, acetato de lítio, fermentação alcoólica, cana-de-açúcar

Evaluation of genetic transformability parameters of sucro-alcoholic budding yeast strains *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

The evaluation of the genetic transformability parameters of strains used in ethanol production industry such as cell viability, transformation efficiency and frequency of transformation are essential steps to identify which strains are the most adequate for breeding programs. This study aimed to evaluate the strains of budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* that are more prone to genetic modification experiments, both those that are already used commercially, as well as strains isolated from distillery Japungú Agroindustrial S/A, where the standard strain MM10-2a was used as reference. All of them were subjected to transformation by chemical method (LiAc/ssDNA/PEG) with the expression vector pNatCre. The results showed that the highest and lowest cell viability were found, respectively, in strains GDBMF1-1 (P18A) and GDB226-1 (P19). The strain that showed the highest transformation efficiency was GDB24 (P5) and the lowest efficiency was observed in strains GDB114-2 (P18) and GDB226-1 (P19). The highest frequency of transformation, most important factor to be considered, was observed in the strain GDB24 (P5) and the lowest in GDB116-3 (P4A). The data showed that the industrial strain most suitable for experiments of genetic modification is GDB24 (P5) and the most suitable commercial strain is the CAT1.

Key words: industrial yeast, plasmid, lithium acetate, fermentation, sugar-cane

¹Universidade Estadual do Piauí, Departamento de Biologia, Campus São Raimundo Nonato, Rua Antônio de Carvalho, s/n, Centro, CEP 64770-000, São Raimundo Nonato-PI, Brasil. Fone: (89) 3582-1312. E-mail: igorsantosbiologo@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE, Brasil. Fone: (81) 3320-6314. E-mail: carliane.rebeca@gmail.com; mascenadiniz@hotmail.com; [ssrsergio@yahoo.com.br](mailto:srssergio@yahoo.com.br); prsouza30@gmail.com

³ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife-PE, Brasil. Fone/Fax: (81) 2126-8522. E-mail: marcos.morais@pq.cnpq.br

⁴ Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq

INTRODUÇÃO

A *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie de levedura mais amplamente estudada em experimentos de genética molecular devido ao seu importante papel na indústria pelo processo bioquímico da fermentação alcoólica. É comumente utilizada na fabricação de etanol a partir da cana-de-açúcar e em diversos outros processos biotecnológicos (Silva Filho et al., 2005a; Alencar et al., 2009). Características vantajosas similares a de organismos procariontes como genoma de tamanho reduzido, alta taxa de crescimento e maior facilidade de manipulação fazem desta levedura um alvo propício para experimentos de maior aproveitamento do processo fermentativo (Alexopoulos et al., 1996). Além disso, por ser um eucarionte inferior, apresenta alguma homologia genética e bioquímica com organismos eucariontes superiores, o que possibilita estudos comparativos de algumas funções celulares básicas como expressão gênica e síntese protéica (Santos, 2003; Nevoigt, 2008).

O etanol produzido nas destilarias pela *S. cerevisiae* trata-se de um químico muito importante devido ao seu uso como fonte de energia renovável principalmente na forma de combustível automotivo (Melo, 2006). A produção mundial de álcool combustível foi estimada em 83,4 bilhões de litros em 2010, ante 73 bilhões de litros em 2009 e na safra 2009/10, a produção de etanol no Brasil foi de 24 bilhões de litros (IICA, 2010), sendo considerado o maior produtor de álcool de cana-de-açúcar (Silva Filho et al., 2005a).

Devido a tais índices, tem sido notado um crescente aumento no incentivo econômico para promover o aumento da produção de álcool combustível por parte de microrganismos presentes no processo fermentativo das destilarias (Elsztein et al., 2008). Para este fim faz-se necessária a aplicação de técnicas da engenharia metabólica, genética, bioquímica e biologia molecular na tentativa de aperfeiçoar a produtividade deste químico por parte das linhagens presentes no processo (Steen et al., 2010). Para experimentos dessa natureza é essencial a escolha de um vetor de expressão plasmidial eficiente que esteja sob a indução de fortes promotores e seja mantido na levedura durante várias gerações. Além disso, é necessário que o vetor seja propício para experimentos futuros, principalmente de deleção e inserção gênica, que favoreçam análises multivariadas com genes de diferentes vias metabólicas (Gueldener, et al., 2002; Nevoigt, 2008).

Plasmídios para leveduras têm sido desenvolvidos utilizando elementos do DNA das próprias leveduras que conferem propriedades replicativas independentes do cromossomo eucarionte (Dubey et al., 1996; Huberman, 1999; Kelly & Brown, 2000). Esses fragmentos de DNA foram descobertos em 1979, durante experimentos preliminares para desenvolver métodos de transformação de células de *S. cerevisiae*, sendo então denominados de ARS (*Autonomously Replicating Sequences*) (Antunes et al. 2003). Essas sequências específicas de DNA atuam como uma origem de replicação quando transferidas do DNA cromossomal para um novo local em um DNA circular - esses plasmídios com seqüências ARS chegam a transformar células de levedura até

1000 vezes mais eficientemente que plasmídios que não contêm ARS (Miyake et al., 2004; Srivastava & Dubey, 2007). Plasmídios com fragmentos de DNA denominados de CEN (*Centromere Sequence*) são mantidos em uma a duas cópias por célula (Stearns & Botstein, 1990; Kim & Huberman, 1999). Estas seqüências conferem uma alta freqüência de transformação mantendo o DNA circular de forma extracromossômica e com boa estabilidade mitótica. Plasmídios possuindo seqüências CEN são perdidos numa taxa de 0,001% das células por geração, sem pressão seletiva, enquanto que plasmídios que não possuem este tipo de seqüência são perdidos numa média de 10% das células por geração (Stearns & Botstein, 1990).

O plasmídio pNatCre contém todas essas características e devido a isto foi utilizado no presente trabalho. Ele foi construído contendo uma origem de replicação (oriC), um cassete ARSHCEN6 que confere a replicação autônoma e a estabilidade celular, além do gene de resistência seletiva ao antibiótico ampicilina (*amp*'), o gene para o clonNAT (pTEF-nat-tTEF) sob a indução do promotor do fator de alongamento tradicional 1 (TEF) e um cassete de expressão da enzima Cre-recombinase sob a indução de um promotor forte da galactose (pGAL1-Cre-tCYC1) (Steensma & Ter Linde, 2001; Carter & Delneri, 2010). A importância da utilização de vetores com o gene seletivo para o antibiótico clonNAT (nome comercial para a nourseotricina - 2-[4-O-Carbamoyl- 2-deoxy-2- (3,6-diaminohexan-amido)- β - D - gulopyranosylamino] - 3,3a,5,6,7,7 a-hexahydro- 5-hydroxy- 4H-imidazo [4,5-c] pyridin-4 - one dihydrogensulphate - produzida pelo *Streptomyces noursei*) reside no fato de que ele não é usado como uma droga em medicina humana ou veterinária, possui um amplo espectro de atividade, requer baixas concentrações para exercer sua função seletiva, não demonstra resistência cruzada com os antibióticos e agentes terapêuticos seletivos em outros sistemas. Por ser considerado como não perigoso é extremamente útil para a seleção de cepas de leveduras além de ser produto de um gene pequeno de fácil manipulação laboratorial (Goldstein & McCusker, 1999).

A modificação genética de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, tais como aquelas utilizadas no processo de fermentação alcoólica, requer o desenvolvimento de sistemas de transformação genética utilizando DNA exógeno. Nesse processo, plasmídios episomais ou fragmentos de DNA integrativos que carreguem os genes de interesse para produção de certas proteínas ou alteração de vias metabólicas são introduzidos nas células-alvo das leveduras. Com isso, pode-se alterar a dosagem da expressão dos genes ou modificar vias metabólicas de modo a aumentar o rendimento da produção de etanol. Estes plasmídios, como o pNatCre, devem ser capazes de se auto-replicar e se manterem no hospedeiro por gerações. Cada linhagem apresenta um conjunto de informações fisiológicas e genéticas que as tornam mais ou menos capacitadas a receberem DNA exógeno. A isto se dá o nome de transformabilidade genética.

A partir dessas considerações, este trabalho teve como objetivo quantificar os parâmetros de transformabilidade genética, tais como viabilidade celular, freqüência e eficiência de transformação, em linhagens de *S. cerevisiae*

comercializadas bem como isoladas de indústrias utilizando um vetor de expressão plasmidial. Visto que esses são os primeiros parâmetros a serem considerados em futuros projetos de seleção para melhoramento e modificação genética dessas leveduras a fim realizar experimentos em larga escala com o intuito de obter uma maior produção de etanol nas usinas sucroalcooleiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de bactérias e leveduras

A linhagem DH5a (Stratagene, San Diego, CA) da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para amplificar o plasmídio de acordo com o protocolo de Sambrook et al. (1989).

Foram isoladas linhagens industriais de *S. cerevisiae* por *fingerprinting* genético com SSRs (Silva Filho et al., 2005b) a partir do processo fermentativo da Destilaria Japungú Agroindustrial S/A, Santa Rita-PB e fazem parte da coleção da Genetech Bioprodutividade Ltda., catalogadas como: GDB81-1 (P1), GDB69-1 (P1A), GDB17-3 (P3), GDB15 (P4), GDB116-3 (P4A), GDB24 (P5), GDB68-1 (P6), GDB113-2 (P14), GDB113-4 (P15), GDB113-6 (P15A), GDB114-2 (P18), GDBMF1-1 (P18A), GDB226-1 (P19), GDB181 (P21) e GDB185-3 (P22).

As linhagens comerciais de *S. cerevisiae* foram obtidas da Lallemand Inc. (Toulouse, França): Danstilâ BG1, SA1, CR1, PE2, VR1 e CAT1.

A linhagem de *S. cerevisiae* MM10-2a de genótipo (*MATA gal- leu2-3/I12 lys1-1 his7-2 trp-289 ura3-52*) foi utilizada como referência nas análises de transformação genética por sua comprovada eficiência em tais experimentos (Antunes et al., 2003).

Meios de cultivo para bactérias e leveduras

O meio de cultivo para as bactérias não transformadas com o plasmídio foi o LB (*Luria-Bertani*) de 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 0,1% de NaOH 1N. Para a seleção das bactérias transformantes foi adicionado o antibiótico ampicilina (100 μ g mL⁻¹) e o crescimento se deu a 37°C (Ausubel et al., 1989).

Para manutenção do estoque das linhagens de leveduras foi utilizado o meio WLN (*Wallerstein Laboratories Nutrient*) composto de 5% de glicose, 0,5% de caseína hidrolisada enzimaticamente ou triptona, 0,4% de extrato de levedura, 10 mL de KH₂PO₄, 10 mL de KCl, 10 mL de CaCl₂·2H₂O, 10 mL de MgSO₄·7H₂O, 1 mL de FeCl₃·6H₂O, 1 mL de MnSO₄·4H₂O, com o pH ajustado para 5,5.

O meio completo YPD (*Yeast extract, Peptone e Dextrose*), composto de 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose, foi utilizado para crescimento das leveduras não transformadas e para os testes de viabilidade celular. Elas foram cultivadas por 3 dias a 30°C. Quando acrescido do antibiótico clonNAT (50 μ g mL⁻¹) este meio foi utilizado para selecionar as colônias transformadas (Antunes, 2003).

Todas as concentrações citadas foram utilizadas para preparar 1 L de meio de cultura com água destilada e quando foi necessária a preparação de placas com meio sólido foram

adicionados 2% de ágar-ágar (Steensma & Ter Linde, 2001; Ribeiro et al., 2007).

Plasmídio

O vetor de expressão pNatCre foi gentilmente cedido por Raymond Brandt (Universidade de Dusseldorf, Alemanha). Este possui genes de resistência aos antibióticos Ampicilina e clonNAT, além de uma seqüência ARSHCEN6 que permite sua manutenção e replicação autônoma em células de *S. cerevisiae* (Figura 1) (Steensma & Ter Linde, 2001; Ribeiro et al., 2007). O mapa físico do plasmídio foi confirmado com corte pelas enzimas de restrição *Hind*III e *Bam*HI (Sambrook et al., 1989). Foi analisado em gel de agarose 0,8% (Figura 2). É essencial ressaltar que as duas primeiras linhas apresentam as duas formas que os plasmídios se apresentam após a extração: acima a forma (circular relaxada) e abaixo (super helicoidizada).

Procedimentos genéticos em bactérias e leveduras

Foi utilizado o protocolo de transformação bacteriana com DNA plasmidial pelo método químico do cloreto de cálcio (Ausubel et al., 1989). A extração plasmidial foi realizada pelo protocolo de minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina (Sambrook et al., 1989). Após a extração dos plasmídios por lise alcalina, a solução foi digerida com 500 μ g de RNase por 1 hora, a 37°C (Sambrook et al., 1989).

As linhagens comerciais e industriais da levedura *S. cerevisiae* na fase de crescimento exponencial de 10⁹ céls. mL⁻¹ foram submetidas à transformação por Acetato de Lítio em triplicata com o plasmídio pNatCre utilizando um protocolo adaptado de Soni et al. (1993) e Gietz & Woods (2002). Dentre as modificações realizadas nas transformações se cita a utilização de 1 μ g de DNA plasmidial, concentração final do DNA carreador de 40 μ g e do PEG de 32%.

Quantificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial extraído foi levado ao espectrofotômetro para quantificação em comprimento de onda $\lambda = 260\text{nm}$. A absorbância da solução foi utilizada para determinar a concentração dos DNAs onde 1 DO (Densidade Óptica) \equiv 50 ng mL⁻¹ (Sambrook et al., 1989). Isto permitiu que todas as linhagens de *S. cerevisiae* fossem submetidas à transformação com quantidades idênticas de DNA plasmidial.

Parâmetros avaliados

A viabilidade celular foi obtida em céls. mL⁻¹ para este cálculo utilizou-se a média das colônias nas triplicatas das placas para cada linhagem multiplicando este valor por 5 devido a aplicação na placa de apenas 200 μ L da diluição para 1mL e em seguida multiplicando também pelo fator de diluição no semeio. Para a viabilidade foram utilizadas placas sem antibióticos. A eficiência total dos transformantes (Transf. mL⁻¹ μ g⁻¹ de DNA) foi calculada pela média das colônias nas triplicatas também multiplicada por 5 e pelo fator de diluição no semeio em placas com os antibióticos ampicilina e clonNAT (Antunes, 2003). Para essas duas características foi utilizada a análise estatística de variância ANOVA com posterior teste de Tukey ($P = 0,05$). As análises estatísticas

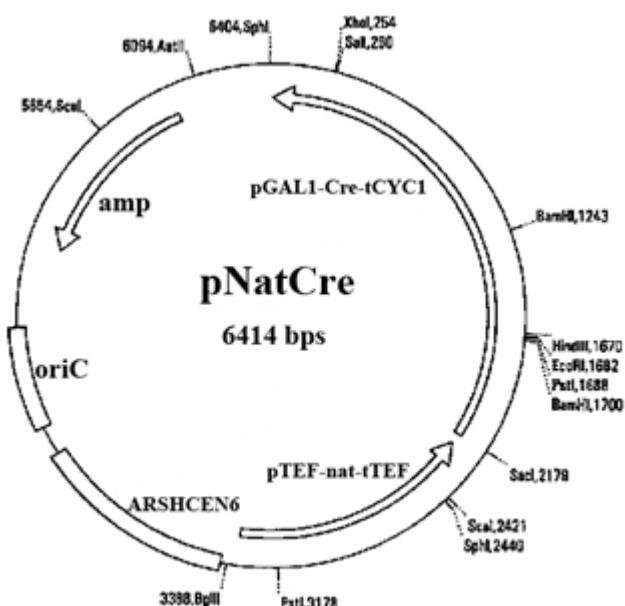


Figura 1. Desenho esquemático do plasmídio pNatCre mostrando os genes de resistência aos antibióticos clonNAT (pTEF-nat-tTEF) e a ampicilina (amp); gene codificador da enzima cre-recombinase sob indução do promotor da galactose (pGAL1-Cre-tCYC1) e o cassete ARSHCEN6 (Steensma & Ter Linde, 2001)

Figure 1. pNatCre schematic drawing showing plasmid genes conferring resistance to antibiotics clonNAT (pTEF-nat-tTEF) and ampicillin (amp) gene encoding cre-recombinase under the promoter of the galactose induction (pGAL1-Cre-tCYC1) and the ARSHCEN6 cassette (Steensma & Ter Linde, 2001)

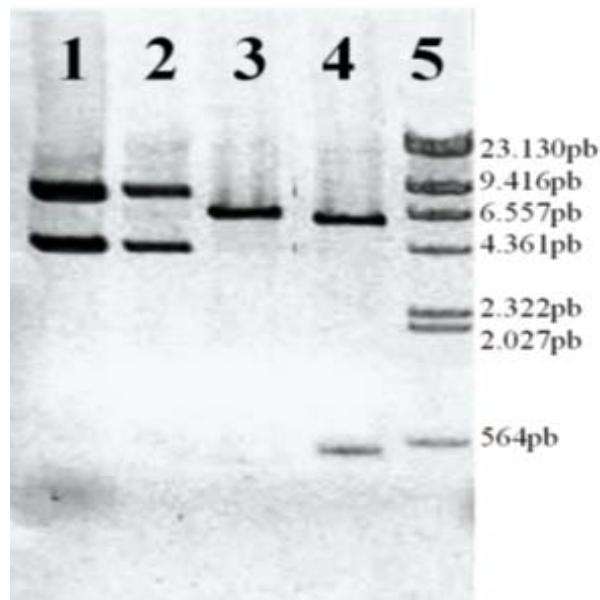


Figura 2. Corrida em gel de agarose 0,8% a 100V e 50mA por 40 minutos. Linhas: 1- pNatCre concentrado $9,37 \text{ mg mL}^{-1}$; 2- pNatCre 1 mg mL^{-1} ; 3- pNatCre digerido com *Hind*III, um fragmento (6.414pb); 4- pNatCre digerido com *Bam*HI, dois fragmentos (457pb e 5.957pb); 5- marcador *lHind*III

Figure 2. 0,8% agarose gel running at 100V and 50mA for 40 minutes. Rows: 1- pNatCre concentrated $9,37 \text{ mg mL}^{-1}$; 2- pNatCre diluted 1 mg mL^{-1} ; 3- pNatCre digested with *Hind*III, one fragment (6.414bp); 4- pNatCre digested with *Bam*HI, two fragments (457bp e 5.957bp); 5- *lHind*III marker

foram realizadas com o auxílio do software estatístico GraphPad Prism 5.0. A Freqüência de Transformação foi calculada com base nos dois dados anteriores através da fórmula: Transformantes $\times 10^9$ céls. = Freqüência de Transformação \times Viabilidade Celular, com a unidade de freqüência em Transformantes $\text{mg de DNA}^{-1} 10^9$ céls $^{-1}$, isto permite a relação da quantidade de DNA plasmidial utilizada com a quantidade de células que foram submetidas ao processo, considerando ainda que análise estatística desse parâmetro já está implícita nos anteriores (Steensma & Ter Linde, 2001; Santos, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes preliminares de transformação celular realizados com a metodologia descrita por Gietz & Woods (2002) demonstraram a necessidade de modificações adicionais para obter resultados de transformabilidade mais eficientes para as linhagens estudadas. Entre as principais modificações recomendadas por diversos autores estão: diferentes temperaturas e tempos de choque térmico, concentração de DNA plasmidial, de DNA carreador, e de polietileno glicol (PEG) ao final do procedimento. Para um melhor entendimento e aproveitamento de cada componente no protocolo de transformação de leveduras se recomenda a consulta dos artigos (Soni et al., 1993; Gietz & Woods, 2002; Antunes, 2003).

A linhagem isolada de *S. cerevisiae* que apresentou maior viabilidade celular, ou seja, capacidade de proliferar formando colônias nas placas após o estresse físico-químico causado pelo procedimento de transformação, foi a GDBMF1-1 (P18A) que manteve uma viabilidade de $3,34 \times 10^8$ cél. mL^{-1} e a linhagem que apresentou a menor viabilidade foi a GDB226-1 (P19) com $2,05 \times 10^7$ cél. mL^{-1} . A linhagem comercial que se mostrou mais eficiente na manutenção da viabilidade celular foi a CR1 com $6,61 \times 10^7$ cél. mL^{-1} e a menos viável foi a BG1. A linhagem padrão MM10-2a apresentou $1,06 \times 10^8$ cél. mL^{-1} , este valor para esta linhagem reflete a competência em utilizá-la como padrão por apresentar viabilidade mediana quando comparada com os valores mínimos e máximos encontrados para as linhagens de *S. cerevisiae* que foram de $2,05 \times 10^7$ e $4,58 \times 10^8$ cél. mL^{-1} respectivamente (Figura 3, Tabela 1).

Ressalta-se, entretanto, o fato de que a linhagem GDB181 (P21) tenha apresentado a maior viabilidade entre todas as linhagens estudadas com $4,58 \times 10^8$ cél. mL^{-1} . Contudo esta levedura foi posteriormente identificada pela Micoteca do Departamento de Micologia da UFPE como pertencente à espécie *Brettanomyces intermedius* (anamorfo *Dekkera intermedius*). Desta forma, todos os resultados apresentados para esta linhagem servem como parâmetro de comparação entre estas duas espécies de leveduras (Tabela 1). Além disso, este microrganismo é um dos maiores contaminantes presentes nas fermentações alcoólicas ocorridas em indústrias de produção de vinhos e etanol puro (Nobre, 2005; Alencar et al., 2009). Desse modo, estes dados são relevantes visto que é possível elaborar estratégias genéticas visando futuramente o controle da incidência desta espécie nos pro-

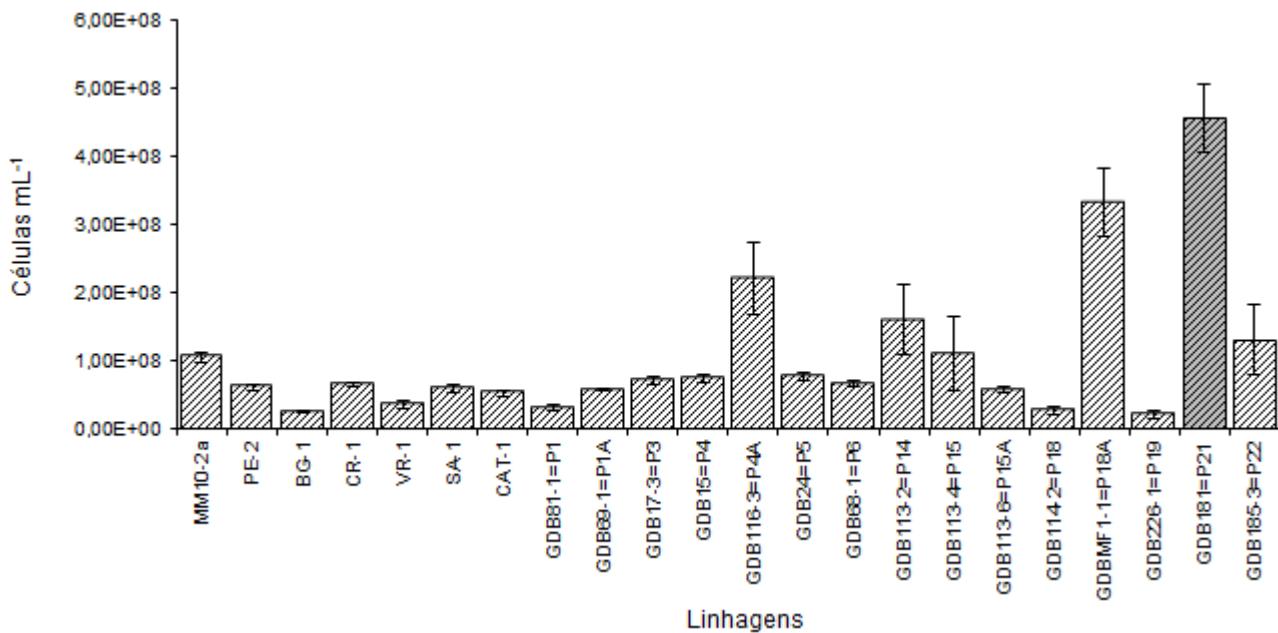


Figura 3. Gráfico da viabilidade celular das diferentes linhagens de *S. cerevisiae* ao fim do tratamento de transformação genética por LiAc com o plasmídio episomal pNatCre

Figure 3. Cell viability graph of different *S. cerevisiae* strains in the end of the genetic transformation treatment by LiAc with episomal plasmid pNatCre

Tabela 1. Média das triplicatas dos valores de todos os parâmetros avaliados neste trabalho, os valores maiores e menores de cada parâmetro dentro de cada grupo estão em negrito

Table 1. Triplicate media values of all parameters studied, the highest and lowest values of each parameter inside each group are in bold

Linhagens	Viabilidade Celular (Céls. mL ⁻¹)	Eficiência de Transformação (Transf. mL ⁻¹ µg ⁻¹ de DNA)	Freqüência de Transformação (Transf. µg ⁻¹ de DNA 10 ⁹ Cél. ⁻¹)
Linhagem Padrão			
MM10-2a	1,06x10 ⁸ +/- 7,21x10 ⁶	1,57 x 10 ³ +/- 1,85x10 ²	1,61 x 10 ⁴
Linhagens Comerciais			
BG1	(2,61x10 ⁷) +/- 2,10x10 ⁶	(4,66 x 10 ¹) +/- 2,50x10 ⁰	(1,79 x 10 ³)
SA1	5,96x10 ⁷ +/- 5,66x10 ⁶	1,50 x 10 ² +/- 1,00x10 ¹	2,54 x 10 ³
CR1	(6,61x10 ⁷) +/- 3,07x10 ⁶	4,25 x 10 ² +/- 2,02x10 ¹	6,43 x 10 ³
PE2	6,22x10 ⁷ +/- 4,13x10 ⁶	1,43 x 10 ² +/- 1,08x10 ¹	2,30 x 10 ³
VR1	3,63x10 ⁷ +/- 5,06x10 ⁶	7,00 x 10 ¹ +/- 4,04x10 ⁰	1,94 x 10 ³
CAT1	5,27x10 ⁷ +/- 5,17x10 ⁶	(4,73 x 10 ²) +/- 2,76x10 ¹	(9,09 x 10 ³)
Linhagens Isoladas			
GDB81-1 (P1)	3,14x10 ⁷ +/- 5,41x10 ⁶	1,20 x 10 ² +/- 1,00x10 ¹	3,87 x 10 ³
GDB69-1 (P1A)	5,76x10 ⁷ +/- 1,39x10 ⁶	1,81 x 10 ³ +/- 1,05x10 ²	3,15 x 10 ⁴
GDB17-3 (P3)	7,16x10 ⁷ +/- 6,29x10 ⁶	2,23 x 10 ² +/- 1,57x10 ¹	3,11 x 10 ³
GDB 15 (P4)	7,41x10 ⁷ +/- 5,03x10 ⁶	0	0
GDB 116-3 (P4A)	2,22x10 ⁸ +/- 5,25x10 ⁷	3,50 x 10 ¹ +/- 2,52x10 ⁰	(1,57 x 10 ²)
GDB24 (P5)	7,83x10 ⁷ +/- 5,35x10 ⁶	(4,27 x 10 ³) +/- 2,01x10 ²	(5,45 x 10 ⁴)
GDB68-1 (P6)	6,68x10 ⁷ +/- 5,11x10 ⁶	5,20 x 10 ² +/- 2,52x10 ¹	7,78 x 10 ³
GDB113-2 (P14)	1,61x10 ⁸ +/- 5,04x10 ⁷	0	0
GDB113-4 (P15)	1,11x10 ⁸ +/- 5,48x10 ⁷	3,00 x 10 ¹ +/- 1,53x10 ⁰	2,70 x 10 ²
GDB113-6 (P15A)	5,85x10 ⁷ +/- 5,39x10 ⁶	3,00 x 10 ¹ +/- 2,65x10 ⁰	5,12 x 10 ²
GDB114-2 (P18)	2,75x10 ⁷ +/- 5,20x10 ⁶	(1,00 x 10 ¹) +/- 2,08x10 ⁰	3,63 x 10 ²
GDBMF1-1 (P18A)	(3,34x10 ⁸) +/- 5,08x10 ⁷	1,33 x 10 ³ +/- 1,97x10 ²	3,97 x 10 ³
GDB226-1 (P19)	(2,05x10 ⁷) +/- 5,63x10 ⁶	(1,00 x 10 ¹) +/- 2,00x10 ⁰	4,87 x 10 ²
GDB181 (P21)	4,58x10 ⁸ +/- 5,02x10 ⁷	1,56 x 10 ³ +/- 2,03x10 ²	3,41 x 10 ³
GDB185-3 (P22)	1,32x10 ⁸ +/- 5,11x10 ⁶	1,00 x 10 ³ +/- 2,00x10 ²	7,61 x 10 ³

cessos fermentativos, fato este que diminui a produção devido à competição pelo mesmo substrato gerando produtos diferentes (Silva, 2005).

A viabilidade é um parâmetro que deve ser bem observado nos processos químicos de melhoramento genético molecular das espécies por constituir a base da propagação celular. Ela também é um dos indicadores de resistência celular que certas espécies possuem ao próprio processo fermentativo. Não é funcional transformar as células de interesse sem que essas sejam capazes de se multiplicarem carregando os novos genes inseridos. Em alguns casos até mesmo a própria concentração de etanol nos processos de fermentação alcoólica é a responsável pela diminuição da viabilidade celular nos microrganismos envolvidos com a sua produção. Essa ação tóxica reflete-se principalmente na desorganização da membrana citoplasmática das leveduras (Muller et al., 2007).

Dentre as linhagens isoladas estudadas a que apresentou maior eficiência de transformação foi a GDB24 (P5) com $4,27 \times 10^3$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA e a menor eficiência foi verificada nas linhagens GDB114-2 (P18) e GDB226-1 (P19), ambas com $1,0 \times 10^1$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA (Figura 4, Tabela 1). A linhagem comercial que mostrou maior eficiência foi a CAT1 com $4,73 \times 10^2$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA e a com menor foi a BG1 $4,66 \times 10^1$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. Mais uma vez a competência da linhagem padrão MM10-2a foi observada apresentando um valor entre os mínimos e máximos, observou-se para esta linhagem a eficiência de $1,57 \times 10^3$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA de DNA. Além disso, o fato de termos obtido células transformadas da linhagem GDB181 (P21) com o plasmídeo pNatCre numa eficiência de $1,56 \times 10^3$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA, sugere que além de ter se tornado resistente ao antibiótico clonNAT o cassette ARSHCEN6 desenvolvido para *S. cerevisiae* é funcionalmente ativo como origem de

replicação e região centromérica em células de *B. intermedius* (Figura 4, Tabela 1).

O protocolo inicialmente estabelecido promoveu a obtenção de até $5,0 \times 10^4$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA, eficiência maior do que a obtida por (Steensma & Ter Linde, 2001) que foi de 5×10^3 transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA utilizando o mesmo plasmídeo, porém com outras linhagens haplóides. A presença de DNA de fita simples (ssDNA) é essencial para se obter uma eficiência de transformação de até 10^7 transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA (Gietz & Woods, 2002), porém tal eficiência de transformação não é fácil de se atingir, principalmente em linhagens industriais, e na literatura atual poucos trabalhos ultrapassam 10^5 transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. Utilizando o procedimento LiAc/ssDNA/PEG com plasmídios da série YCplac em células de *S. cerevisiae*, Gietz & Woods (2002) encontraram até $2,2 \times 10^7$ transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. Esse alto rendimento de transformantes pode ser devido à interação favorável dessas células com o plasmídeo visto que a eficiência da transformação muitas vezes depende do plasmídeo que está sendo utilizado. Alguns plasmídios apresentam a capacidade de transformação 10 vezes menor que os da série YCplac. Isto se deve basicamente ao reconhecimento da origem de replicação utilizada no plasmídeo pelas proteínas de replicação da célula hospedeira. Como dito anteriormente algumas linhagens de leveduras e plasmídios não transformam tão bem com o protocolo LiAc/ssDNA/PEG. Isto pode ser a explicação para a ausência de transformantes nas linhagens GDB15 (P4) e GDB113-2 (P14). Por outro lado, para transformar tais linhagens protocolos mais invasivos de transformação podem ser utilizados com sucesso usando a técnica de eletroporação.

Células tratadas com o protocolo por LiAc são transformadas geralmente numa eficiência de 5×10^2 a 5×10^3 transf. $\text{mL}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ de DNA. Isto é semelhante à maior parte dos

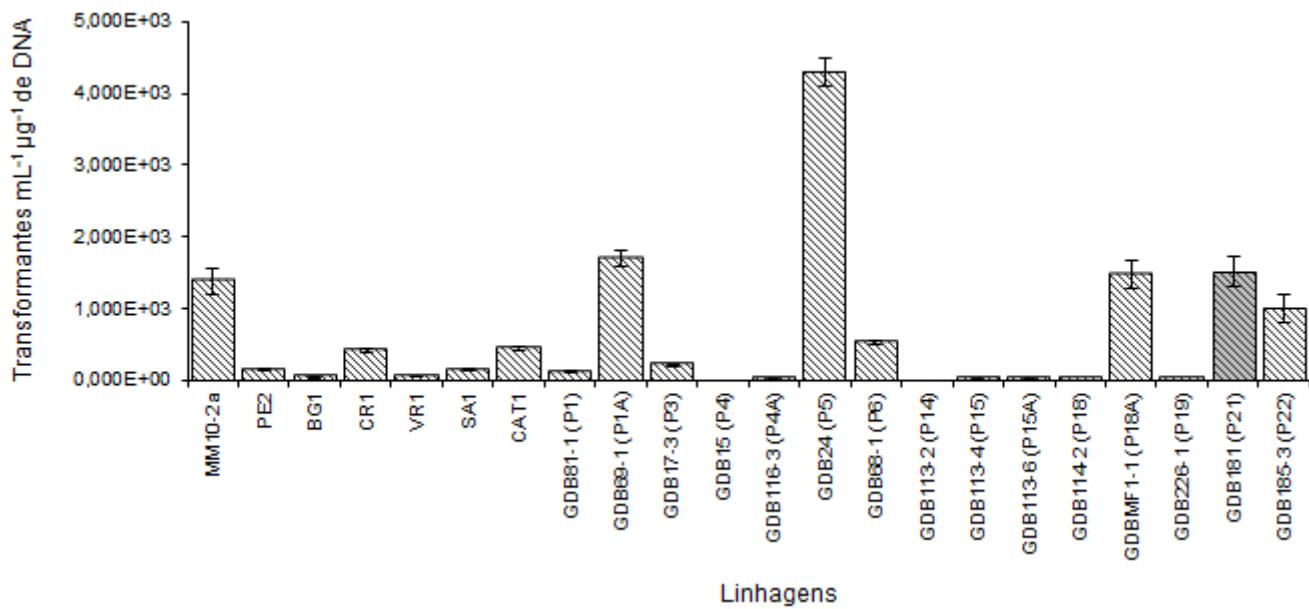


Figura 4. Eficiência da transformação genética das linhagens de *S. cerevisiae* com o plasmídeo episomal pNatCre

Figure 4. Genetic transformation efficiency of the *S. cerevisiae* strains with episomal plasmid pNatCre

valores encontrados neste trabalho, contudo, autores chegam a encontrar valores de até 10^7 transformantes dependendo do método empregado, da junção de métodos, utilizando outras espécies, ou da presença de certos compostos como o próprio etanol (Lauermann, 1991; Soni et al., 1993; Antunes et al., 2000). O mecanismo pelo qual o etanol estimula a captura de DNA transformante é desconhecido, mas é provável que ele afete a porosidade celular causando principalmente alterações na membrana da célula (Soni et al., 1993). Isto coincide com o fato de que o etanol pode afetar a viabilidade celular causando danos a membrana citoplasmática dependendo da concentração existente no meio extracelular. Muller et al., (2007) informaram que concentrações acima do teor de 7,2% vol/vol de etanol no meio extra-cellular já são suficientes para inibir o crescimento celular. Em contrapartida a presença de alguns compostos como o DTT (DiThioThreitol), por si só, aumentam a obtenção de transformantes enquanto que o DMSO (DiMetil SulfÓxido) afeta negativamente a eficiência da transformação como demonstrado por Antunes et al., (2000) trabalhando com linhagens de *Kluyveromyces marxianus*.

A freqüência de transformação é o aspecto mais importante a ser considerado pelo fato de ser a relação entre a viabilidade celular e a eficiência de células transformadas, visto que não adianta possuir alta viabilidade e não incorporar bem DNAs exógenos e vice-versa. Portanto, é a relação entre sobrevivência e captação de DNA que torna uma linhagem mais propícia à transformação genética e posterior expressão heteróloga em larga escala. A freqüência de transformação nas linhagens isoladas foi maior e menor na GDB24 (P5) com $5,45 \times 10^4$ transf. μg^{-1} de DNA. 10^9 céls $^{-1}$ e GDB116-3 (P4A) com $1,57 \times 10^2$ transf. μg^{-1} de DNA. 10^9 céls $^{-1}$, respectivamente (Figura 5). Entre as linhagens comerciais a que apresentou maior freqüência foi a CAT1 com $9,09 \times 10^3$ transf. μg^{-1} de

DNA. 10^9 céls $^{-1}$ e a menor foi a BG1 com $1,79 \times 10^3$ transf. μg^{-1} de DNA. 10^9 céls $^{-1}$. A linhagem padrão MM10-2a apresentou a terceira maior freqüência com $1,61 \times 10^4$ transf. μg^{-1} de DNA. 10^9 céls $^{-1}$.

Verifica-se que as maiores freqüências de transformação foram observadas nas linhagens que apresentaram maiores eficiências de transformação, pois estes valores são diretamente proporcionais. A viabilidade celular afeta de forma inversamente proporcional a freqüência de transformação ao passo que quanto menos agressivo é o método para a célula mais células permanecerão viáveis, no entanto menos transformantes serão obtidos. Além disso, é possível observar que duas linhagens isoladas, a GDB69-1 (P1A) e a GDB24 (P5), apresentaram freqüências maiores que todas as linhagens comerciais estudadas. Isto indica que é possível encontrar leveduras isoladas da indústria que sejam mais susceptíveis aos experimentos de transformação genética com o intuito de obtenção de melhores rendimentos na produção de etanol ainda assim mantendo linhagens do próprio processo.

De acordo com informações do fabricante todas as leveduras comerciais DANSTIL™ foram selecionadas a partir de uma gama de diferentes fermentações industriais. Em muitos casos essas linhagens oferecem um ganho significativo em termos de sabor, rendimento de álcool e produtividade nas mais diversas indústrias onde são aplicadas. Estas cepas foram selecionadas de indústrias no Brasil sendo todas de metabolismo rápido, evitam floculência e demonstram uma produtividade de álcool excepcional, bem como facilidade de implantação e altos índices de sobrevivência durante a temporada. Contudo, a escolha em muitos casos não deve recair apenas sobre linhagens comerciais. É possível o monitoramento e isolamento de linhagens locais mais adaptadas a cada indústria.

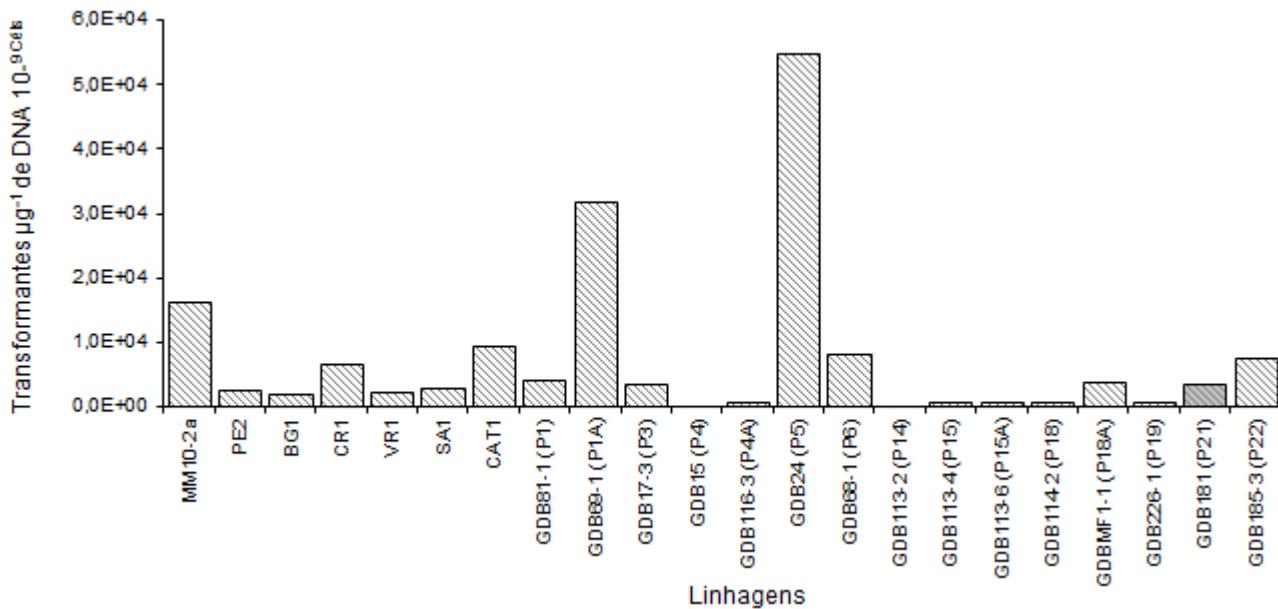


Figura 5. Freqüência de transformação das linhagens de *S. cerevisiae* com o vetor de expressão pNatCre

Figure 5. Transformation frequency of *S. cerevisiae* strains with the expression vector pNatCre

CONCLUSÕES

As linhagens isoladas podem ser mais eficientes, em relação às comerciais, quando submetidas a experimentos de melhoramento genético visando maior produtividade de etanol empregando, em muitos casos, a engenharia metabólica.

A escolha das linhagens e dos plasmídios a serem utilizados é um passo essencial haja vista que algumas linhagens podem não ser facilmente transformadas devido a suas características intrínsecas.

O cassete de replicação ARSHCEN6 contido no vetor plasmidial de expressão pNatCre mostrou-se funcional tanto para linhagens de *S. cerevisiae*, quanto para linhagens de *B. intermedius*.

As linhagens isoladas mais propícias para experimentos de modificação genética são a GDB24 (P5) seguida da GDB69-1 (P1A) e a linhagem comercial que pode gerar melhores resultados neste tipo de experimento é a CAT1.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a FACEPE pelo apoio financeiro bem como ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (UFPE) e ao Laboratório de Genética, Bioquímica e Seqüenciamento de DNA (UFRPE) por oferecer a estrutura necessária para a conclusão do trabalho.

LITERATURA CITADA

- Alencar, E.M.B; Souza-Motta, C.M.; Walter, B.S.; Santos, R.M.P.; Marques, O.M.; Queiroz, L.A. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.52, n.4, p.819-824, 2009. <<http://www.scielo.br/pdf/babt/v52n4/v52n4a04.pdf>>. doi:10.1590/S1516-89132009000400004. 12 Set. 2010.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. Introductory Micology. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 272-285.
- Antunes, D.F. Soo-Mi Kim,; Huberman, J.A.; Morais Jr, M.A. Motifs in *Schizosaccharomyces pombe* ars3002 important for replication origin activity in *Saccharomyces cerevisiae*. Plasmid, v. 50, n. 2, p.113-119, 2003. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147619X03000490>>. doi:10.1016/S0147-619X(03)00049-0. 17 Set. 2010.
- Antunes, D.F. Uso da engenharia metabólica em *Saccharomyces cerevisiae* para a otimização da produção de álcool. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2003. 108p. Dissertação de Mestrado.
- Antunes, D.F.; Souza Junior, C.G.; Morais Junior, M.A. A simple and rapid method for lithium acetate-mediated transformation of *Kluyveromyces marxianus* cells. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v.16, n.7, p.653-654, 2000. <<http://www.springerlink.com/content/r9290816x514k732/>>. doi: 10.1023/A:1008984403732. 15 Set. 2011.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J.A.; Struhl, K. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, 1989. 1512p.
- Carter, Z.; Delneri, D. New generation of loxP-mutated deletion cassettes for the genetic manipulation of yeast natural isolates. Yeast, v.27, n.9, p.765-775, 2010. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.1774/abstract;jsessionid=8E8BBC09461D75C2D624B80EB46709F2.d03t02>>. doi:10.1002/yea.1774. 21 Set. 2010.
- Dubey, D. D.; Kim, Soo-Mi; Todorov, I.T.; Huberman, J.A. Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. Current Biology, v.6, n.4, p.467-473, 1996. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982202005146>>. doi:10.1016/S0960-9822(02)00514-6. 21 Set. 2010.
- Elsztein, C.; Menezes, J.A.S.; Morais Jr, M.A. Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel-ethanol fermentation process. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v.35, n.9, p.967-973, 2008. <<http://www.springerlink.com/content/6l43437407560132/>>. doi:10.1007/s10295-008-0371-4. 17 Jul. 2010.
- Gietz, R.D.; Woods, R.A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods in Enzymology, v.350, p.87-96, 2002. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687902509575>>. doi:10.1016/S0076-6879(02)50957-5. 18 Set. 2010.
- Goldstein, A.L.; McCusker, J.H. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, v.15, n.14, p.1541-1553, 1999. <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14%3C1541::AID-YEA476%3E3.0.CO;2-K/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14%3C1541::AID-YEA476%3E3.0.CO;2-K/pdf)>. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K. 17 Set. 2010.
- Gueldener, U.; Heinisch, J.; Koehler, G.J., Voss, D.; Hegemann, J.H. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. Nucleic Acids Research, v. 30, n.6, p.e23, 2002. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101367/pdf/gnf022.pdf>>. doi: 10.1093/nar/30.6.e23. 21 Jul. 2010.
- Huberman, J.A. Genetic method for characterizing the *cis*-acting components of yeast DNA replication origins. Methods, v.18, n.3, p.356-367, 1999. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104620239907922>>. doi:10.1006/meth.1999.0792. 17 Sep. 2010.
- Kelly, T.J.; Brown, G.W. Regulation of chromosome replication. Annual Reviews in Biochemistry, v.69, p.829-80, 2000. <<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.biochem.69.1.829>>. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.829. 28 Jul. 2010.
- Kim, Soo-Mi; Huberman, J.A. Influence of a replication enhancer on the hierarchy of origin efficiencies within a cluster of DNA replication origins. Journal of Molecular Biology, v.288, n.5, p.867-882, 1999. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283699927286>>. doi:10.1006/jmbi.1999.2728. 18 Jun. 2010.

- Lauermann, V. Ethanol improves the transformation efficiency of intact yeast cells. *Current Genetics*, v.20, n.1-2, p.1-3, 1991. <<http://www.springerlink.com/content/t100j68w55446832/>>. doi:10.1007/BF00312757. 21 Jun. 2010.
- Melo, H.F. Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação industrial. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006. 118p. Tese Doutorado.
- Miyake, T.; Reese, J.; Loch, C.M.; Auble, D.T. Li, R. Genome-wide analysis of ARS (Autonomously Replicating Sequence) binding factor 1 (Abf1p)-mediated transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 33, p.34865-34872, 2004. <<http://www.jbc.org/content/279/33/34865.long>>. doi:10.1074/jbc.M405156200. 15 Jun. 2010.
- Muller, J.L.; Prottik, L.; Machado, M.S.; Lacerda, L.L.V.; Bresolin, T.M.B.; Podlech, P.S.P. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, v.27, n.4, p.688-693, 2007. <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n4/03.pdf>>. doi:10.1590/S0101-20612007000400003. 16 Ago. 2010.
- Nevoigt, E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.72, n.3, p.379-412, 2008. <<http://mmbr.asm.org/content/72/3/379.full>>. doi:10.1128/MMBR.00025-07. 22 Jun. 2010.
- Nobre, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005. 111p. Dissertação Mestrado.
- Ribeiro, O.; Gombert, A.K.; Teixeira, J.A.; Domingues, L. Application of the Cre-loxP system for multiple gene disruption in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Journal of Biotechnology*, v.131, n.1, p.20-26, 2007. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165607003835>>. doi:10.1016/j.biotech.2007.05.027. 22 Jun. 2010.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edn. Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 3v.
- Santos, I.L.V.L. Avaliação dos parâmetros de transformabilidade genética de linhagens comerciais e industriais de *Saccharomyces cerevisiae*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2003. 56p. Monografia Graduação.
- Silva Filho, E. A. S.; Melo, H.F.; Antunes, D.F; Santos, S.K.B.; Resende, A.M.; Simões, D.A; Morais Jr, M.A. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.32, n.10, p.481-486, 2005a. <<http://www.springerlink.com/content/u4888u701xq24x65/fulltext.pdf>>. doi:10.1007/s10295-005-0027-6. 17 Jul. 2010.
- Silva Filho, E. A. S.; Santos, S.K.B; Resende, A.M.; Morais, J.O.F; Morais Jr, M.A; Simões, D.A Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.88, n.1, p.13-23, 2005b. <<http://www.springerlink.com/content/r630r50158463v3t/>>. doi:10.1007/s10482-004-7283-8. 28 Jul. 2010.
- Silva, G.A. *Dekkera e Brettanomyces*: leveduras não competitivas que deterioram vinhos. Bento Gonçalves: Embrapa, 2005. 72p. (Documento Embrapa Uva e Vinho, 41).
- Soni, R.; Carmichael, J.P.; Murray, J.A.H. Parameters affecting lithium acetate-mediated transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and development of a rapid and simplified procedure. *Current Genetics*, v.24, n.5, p.455-459, 1993. <<http://www.springerlink.com/content/v330p7u10517n284/>>. doi:10.1007/BF00351857. 13 Jul. 2010.
- Srivastava, V.K.; Dubey, D.D. Mapping autonomously replicating sequence elements in a 73-kb region of chromosome II of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Genetics*, v. 86, n. 2, p.139-148, 2007. <<http://www.ias.ac.in/jgenet/Vol86No2/139.pdf>>. doi:10.1007/s12041-007-0018-7. 12 Jun. 2010.
- Stearns, T.M.; Botstein, D. Manipulating yeast genome using plasmid vectors. *Methods in Enzymology*, v.185, p.280-297, 1990. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799085025J>>. doi:10.1016/0076-6879(90)85025-J. 17 Jul. 2010.
- Steen, E.J.; Kang, Y.; Bokinsky, G.; Hu, Z.; Schirmer, A.; McClure, A.; del Cardayre, S.B.; Keasling, J.D. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, v.463, n.7280, p.559-563, 2010. <<http://www.nature.com/nature/journal/v463/n7280/full/nature08721.html>>. doi:10.1038/nature08721. 18 Jul. 2010.
- Steensma, H.Y.; Ter Linde, J.J.M. Plasmids with the Cre-recombinase and the dominant nat marker, suitable for use in prototrophic strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, v.18, n.5, p.469-472, 2001. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/yea.696/pdf>>. doi:10.1002/yea.696. 12 Jun. 2010.