

Caracterización de un cepario de levaduras para uso enológico mediante técnicas moleculares

Valeria Chimeno¹, María Laura Sánchez^{2,3}, Silvia Paladino², Marcos Maza², Marcela Bernardi², Silvina Farrando³, Mariana Combina¹ y Laura Mercado¹

¹ EEAMendoza, INTA Argentina

² Cátedra de Enología I, Facultad de Ciencias Agrarias, UNCUIYO Mendoza, Argentina

³ Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Agrarias, UNCUIYO Mendoza, Argentina

Resumen. La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo posee una colección de levaduras vínicas provenientes de Departamentos de importancia vitivinícola de la provincia de Mendoza. El objetivo de este estudio fue caracterizar microorganismos representantes de esta colección utilizando la técnica de diferenciación intraespecífica para *S. cerevisiae* PCR interdelta y el análisis de restricción del ADN mitocondrial. De 58 cepas analizadas solo 2 presentaron similitudes en su perfil de bandas por ambas técnicas.

1. Introducción

Saccharomyces cerevisiae es reconocida como la levadura vínica por excelencia [1]. Las especies de levaduras que intervienen en la fermentación del mosto de la uva, en particular la más extendida de ellas, *S. cerevisiae*, incluye un gran número de cepas cuyas propiedades tecnológicas son extremadamente variables [2-4]). Poder diferenciar a un nivel intraespecífico (cepas) las levaduras *S. cerevisiae* resulta fundamental en diversos aspectos de la microbiología enológica.

La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo posee una colección de levaduras vínicas conformada por 445 cepas provenientes de Departamentos de importancia vitivinícola de la provincia de Mendoza como Luján de Cuyo, Tupungato, Maipú, San Martín, Junín y Rivadavia. La finalidad de esta colección es disponer de material para su uso de acuerdo a diferentes objetivos enológicos, esto requiere tener una amplia información respecto de las características de las cepas que integran la misma. Los microorganismos aislados han sido previamente clasificados por sus características fenotípicas generales (formación de esporas y crecimiento en agar lisina), fenotípicas de importancia tecnológica (formación de película, anillo o sedimento, resistencia al alcohol, resistencia al SO₂, formación de espuma) y cualitativas (formación de ácido a partir de la glucosa, producción de H₂S, actividad β-glucosidasa) para ser seleccionados en función de objetivos particulares [5].

Con el objetivo de completar la caracterización de esta colección de microorganismos se realizó su evaluación mediante marcadores moleculares que permitan identificar, comparar y agrupar los miembros de la misma.

2. Materiales y métodos

Para el presente estudio se utilizaron cepas de microorganismos pertenecientes al cepario de la cátedra de Enología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza Argentina.

Las mismas han sido previamente aisladas al final de fermentaciones espontáneas y se encuentran ya descritas según sus características fenotípicas generales y tecnológicas y características cualitativas [5]. En base a esta caracterización los aislados fueron agrupados por su semejanza. Se seleccionaron representantes de los distintos grupos de cepas pre-clasificadas para ser estudiados mediante técnicas moleculares. Se realizó la extracción de ADN total mediante metodología química utilizando fenol/cloroformo/isoamílico [6] y se verificó la calidad del ADN por electroforesis en gel de agarosa. Las cepas fueron analizadas mediante un marcador intraespecífico altamente polimórfico para *S. cerevisiae* de origen vínico, PCR Interdelta [7]. Para confirmar si las levaduras que presentaron un perfil de bandas similar pertenecen a cepas similares o diferentes se analizó el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (Diferenciación intraespecífica de *S. cerevisiae* por RFLP ADN mitocondrial) [8]. Los perfiles de bandas obtenidos se analizaron visualmente y según las similitudes entre estas se determinaron los diferentes patrones tanto para la diferenciación intraespecífica PCR Interdelta como para RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial.

3. Resultados

De un total de 58 cepas analizadas se encontraron 44 patrones diferentes según la técnica de diferenciación intraespecífica para *S. cerevisiae* PCR Interdelta. Se observó la presencia de patrones repetidos para diferentes cepas de la colección. A uno de estos patrones denominado I correspondieron cinco cepas del departamento de Tupungato y al patrón denominado V refirieron 11 aislados provenientes de los departamentos de Lujan, Maipú, Junín, Rivadavia y San Martín; para el resto de las levaduras se obtuvieron patrones únicos.

Las cepas del patrón I presentaron además similitud en sus características fenotípicas. No se observó lo mismo en los individuos que responden al patrón V interdelta.

Mediante el análisis RFLP de ADN mitocondrial se obtuvieron diez nuevos patrones.

Cuatro cepas pertenecientes al departamento de Tupungato que responden al patrón interdelta I presentaron similitudes en su perfil de bandas por ambas técnicas respondiendo dos de ellas al mismo patrón mitocondrial (II_m) y las otras dos al patrón III_m mitocondrial. Por otro lado, tanto en el patrón I_m como en el II_m mitocondrial se agruparon cepas previamente clasificadas con distintos patrones interdelta.

Según este estudio solo dos cepas responden a similares perfiles de bandas por ambas técnicas indicando una identidad a nivel genético. Mientras que otras dos cepas representantes del mismo departamento vitivinícola, Tupungato, presentan las mismas características pero diferente patrón mitocondrial a las anteriores. Esto nos indica que de 58 cepas analizadas solo dos se repiten una vez y las restantes 54 cepas son diferentes entre sí según las técnicas moleculares utilizadas. Además podemos agregar que 11 de 58 individuos analizados no son idénticos pero probablemente comparten un parentesco cercano.

4. Conclusiones

Los marcadores moleculares propuestos fueron adecuados para la diferenciación de los integrantes de la colección

de levaduras en estudio. Siendo diferentes entre sí en su mayoría aunque un alto nivel de semejanza se verificó indicando estrechos vínculos entre aislados que provienen de similares ambientes.

La completa y correcta caracterización de una colección de levaduras con fines enológicos requiere la inclusión de herramientas moleculares que permitan asignar una identidad completa a los aislados y evitar errores como la repetición de cepas idénticas o el descarte de cepas consideradas idénticas por falta de información.

Referencias

- [1] P. Ribéreau Gayon. *Tratado de enología. Tomo I. Microbiología del vino. Vinificaciones.* (2003)
- [2] G.H. Fleet. *FEMS Yeast Res*, **8** 979–995. (2008)
- [3] M. Sipiczki, *Ann Microbiol* 61: 85–93. (2011)
- [4] C.A. Lopes, M.E. Rodríguez, M. Sangorrín, A. Querol, A.C. Caballero. *J Ind Microbiol Biot*, **34** (8): 539–546. (2007)
- [5] A. Bernardi. *Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza.* Tesis de grado, Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo (2013)
- [6] S.H. Hoffman, F. Winston. *Gene* **57**: 267–272. (1987)
- [7] J. Legras J. F. Karst. *FEMS Microbiol Lett* **221**: 249–255. (2003)
- [8] A. Querol, E. Barrio, D. Ramon. *Syst Appl Microbiol* **15**: 439–446 (1992)