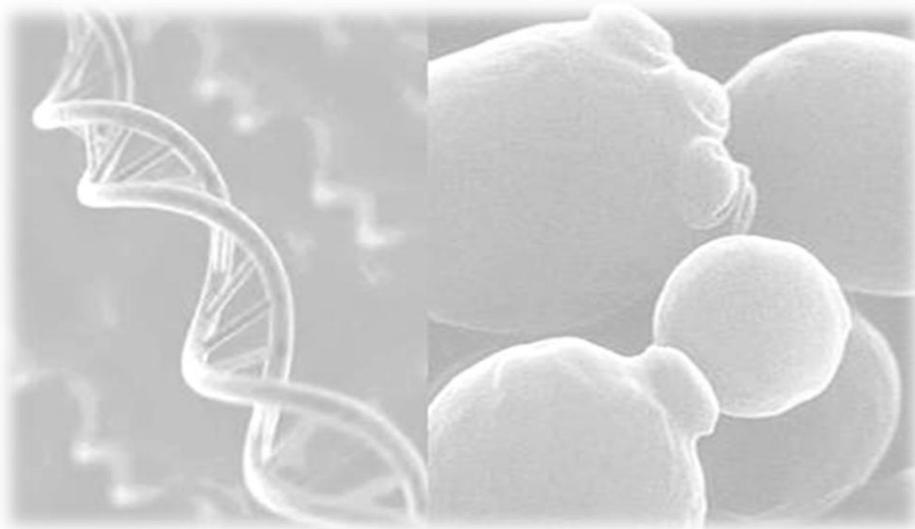


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
Facultad de Ciencias Agrarias



CARACTERIZACIÓN DE UN CEPARIO DE LEVADURAS PARA USO ENOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES



Autor: Selva Valeria Chimeno
Mendoza, Junio 2015

Tesis de grado de LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE UN CEPARIO DE LEVADURAS PARA USO ENOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Autor: Selva Valeria Chimeno

Correo electrónico: valeriachimeno@gmail.com

Directora: Mg. María Laura Sánchez

Codirectora: Dra. Laura Analía Mercado

Comité evaluador:

Presidente: MSc. Ing. Agr. Jorge Nazrala

Vocales: Ing. Agr. Cora Dediol

Dr. Ivan Ciklic



I. INTRODUCCIÓN



II. OBJETIVOS

The background of the slide is a light gray collage of scientific illustrations. On the left, there is a prominent white DNA double helix. To its right, there are several white, semi-transparent molecular models, including what appears to be a cell or a large protein structure, and various smaller molecular shapes. The overall aesthetic is clean and scientific.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

The background of the slide is a light gray collage of scientific illustrations. On the left, there is a prominent DNA double helix. To its right, there are several 3D molecular models, including a large, complex protein structure and several smaller, simpler molecular shapes. The overall aesthetic is clean and academic.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



V. CONCLUSIONES



VI. BIBLIOGRAFÍA

CARACTERIZACIÓN DE UN CEPARIO DE LEVADURAS PARA USO ENOLÓGICO MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Autor: Selva Valeria Chimeno

Correo electrónico: valeriachimeno@gmail.com

Directora: Mg. María Laura Sánchez

Codirectora: Dra. Laura Analía Mercado

Comité evaluador:

Presidente: ▪ MSc. Ing. Agr. Jorge Nazrala

Vocales: ▪ Ing. Agr. Cora Dediol

 ▪ Dr. Ivan Ciklic

RESÚMEN

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. Esta colección ha sido constituida a fin de disponer de material para su uso de acuerdo a diferentes objetivos enológicos. La finalidad de este estudio fue caracterizar microorganismos representantes de esta colección mediante técnicas moleculares. Para un total de 56 cepas analizadas se encontraron 39 patrones diferentes según la técnica de diferenciación intraespecífica para *S. cerevisiae*, PCR interdelta. La mayoría de las levaduras analizadas mostraron un perfil molecular único, aunque se observaron algunas coincidencias. Cinco patrones moleculares interdelta agruparon individuos que presentaron similitudes en su perfil de bandas aún cuando fenotípicamente habían sido considerados como diferentes en trabajos anteriores. Mediante la construcción de un dendrograma, utilizando la metodología UPGMA, se realizó el agrupamiento de los patrones PCR interdelta obtenidos para todas las cepas analizadas, con la finalidad de visualizar cómo se relacionan y/o agrupan la totalidad de los individuos en base a las semejanzas en sus perfiles moleculares. Por otro lado, se analizó la similitud encontrada a nivel molecular entre cepas con respecto a las características fenotípicas generales y de importancia tecnológica para poder comparar si su comportamiento también fue similar a este nivel, observándose que las cepas agrupadas en tres de estos cinco patrones repetidos, también presentaron similitudes en las mencionadas características coincidiendo también en su procedencia. Por otro lado, se realizó una comparación visual de los principales patrones obtenidos con respecto a patrones Interdelta de cepas comerciales, pudiendo verificarse la similitud de dos patrones de la colección con aislados comerciales. Con el propósito de confirmar si efectivamente las levaduras que presentaron similitud según el análisis interdelta, corresponden a una misma cepa, se realizó un nuevo análisis intraespecífico aplicando otro marcador molecular: polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP del ADN mitocondrial). Finalmente pudo observarse que de 56 cepas analizadas solo tres pares resultaron idénticos y las restantes 50 cepas serían diferentes entre sí según las técnicas utilizadas. Además podemos agregar que 11 de 56 individuos analizados no resultaron idénticos pero, dada su elevada similitud, probablemente comparten un parentesco cercano. El uso de herramientas moleculares es necesario por la importancia de preservar los recursos genéticos. La completa y correcta caracterización de los cultivos microbianos, requiere de 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 iguales por falta de información.

Palabras clave:

Saccharomyces cerevisiae, Colección de levaduras enológicas, Caracterización molecular de levaduras, PCR interdelta, RFLP del ADN mitocondrial.

AGRADECIMIENTOS

A mi Pablo por su apoyo incondicional.

A mi hija, por ser la luz de mis ojos.

A mi familia por estar siempre a mi lado, principalmente a mis padres por darme la posibilidad de estudiar.

A mi Directora Laura Sánchez y Codirectora Laura Mercado por el apoyo e incentivo constante aún en los momentos más difíciles y por darme la posibilidad de realizar este trabajo. Sin ellas no hubiese sido posible.

A los integrantes de los Laboratorios de Microbiología enológica de FCAUNCUYO y de EEA INTA por la ayuda y compañerismo brindado.

INDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
I.	1. Las levaduras	1
I.	2. Origen de las levaduras del vino	1
I.	3. Fermentación alcohólica	2
I.	4. Sucesión de especies durante la fermentación alcohólica	3
I.	5. Fermentación alcohólica inoculada	4
I.	5. 1. Selección de cepas de levaduras nativas	4
I.	5. 2. Levaduras secas activas	5
I.	6. Clasificación – Taxonomía de levaduras	5
I.	7. Características del genoma de las levaduras vínicas	8
I.	8. Diferenciación entre cepas de levaduras enológicas	9
I.	8. 1. Técnicas moleculares de diferenciación entre cepas de levaduras	10
I.	8. 1. 1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	11
I.	8. 1. 2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a secuencias δ	12
I.	8. 1. 3. Análisis del ADN mitocondrial – RFLP (Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) de ADN mitocondrial.	14
I.	9. Colecciones de cultivos microbianos	15
I.	10. Importancia enológica de una colección de microorganismos.	17
I.	11. Importancia económica de la vitivinicultura en Mendoza	18
I.	12. Hipótesis	19
II.	OBJETIVOS	20
II.	1. Objetivo general	20

II. 2.	Objetivos particulares	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
III. 1.	Microorganismos del trabajo	21
III. 2.	Diferenciación intraespecífica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
III. 2. 1.	Extracción de ADN genómico total	22
III. 2. 2.	Reacción PCR Interdelta	23
III. 2. 3.	Extracción enzimática de ADN total de levaduras	24
III. 2. 4.	Diferenciación intaespecífica de <i>S. cerevisiae</i> por RFLP (Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) de ADN mitocondrial.	24
III. 2. 5.	Análisis de datos.	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
IV. 1.	Diferenciación intraespecífica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por PCR Interdelta	27
IV. 1. 1.	Patrones interdelta obtenidos por departamento	29
IV. 1. 2.	Agrupamientos de patrones interdelta - Dendrograma	31
IV. 1. 3.	Análisis de los principales patrones obtenidos	33
IV. 1. 4.	Comparación con cepas comerciales	37
IV. 2.	Diferenciación intraespecífica de <i>S. cerevisiae</i> por RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial	39
V.	CONCLUSIONES	42
VI.	BIBLIOGRAFÍA	43

I. INTRODUCCIÓN

1. Las levaduras

El rol de las levaduras en la fermentación alcohólica, en particular en la transformación del jugo de la uva en vino, fue claramente establecido a mediados del siglo XIX. En 1680, Antonie van Leeuwenhoek, utilizando un microscopio de su fabricación, llevó a cabo las primeras observaciones de levaduras a partir de un mosto de cerveza, aunque sin establecer relación entre esos corpúsculos y la fermentación alcohólica. A fines del siglo XVIII, comenzaron los estudios químicos de la fermentación alcohólica con los trabajos de Lavoisier y luego por Gay-Lussac. Sin embargo la primera demostración de que la levadura fuera un organismo vivo, capaz de multiplicarse, y cuya actividad vital se encontrase en el origen de la fermentación de los líquidos dulces, fue llevada a cabo por el químico francés, Charles Cagnard de La Tour, en 1837. Esta teoría fue confirmada por Schwann quién demostró además que la fermentación alcohólica es un proceso que puede ser detenido por el calor o por ciertos productos químicos; llamó a la levadura de cerveza “zuckerpilz” es decir “hongo del azúcar”, nombre que dio origen al termino *Saccharomyces* utilizado por primera vez por Meyen en 1838. Finalmente, Louis Pasteur en sus dos famosas obras, “Estudios sobre el vino” (1866) y “Estudios sobre la cerveza” (1876), acreditó esta concepción vitalista o biológica del rol de la levadura en la fermentación alcohólica. Pasteur demostró que las levaduras responsables de la fermentación espontánea de la vendimia prensada o del mosto, provienen de la superficie de la uva, y que de éstas existen muchas variedades y especies que pueden ser aisladas. Mencionó incluso que las características gustativas de los vinos pueden verse influenciadas por la naturaleza de las levaduras al efectuarse la fermentación alcohólica. Precisó el efecto del oxígeno en la asimilación de los azúcares por las levaduras y probó que éstas, además del alcohol y el gas carbónico, forman otros productos, en menor cantidad, entre los cuales encontramos la glicerina (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

2. Origen de las levaduras del vino

Aunque las levaduras se hallan diseminadas por toda la naturaleza, aquellas que intervienen en la fermentación alcohólica para la producción de vinos pueden originarse a partir de la uva o de la bodega (Fleet, 1993).

Las levaduras se encuentran formando parte del ecosistema del viñedo constituyendo parte de la microbiota del mismo (Combina y col., 2005). Llegan a la uva por el viento y los insectos siendo retenidas en la pruina, una sustancia cerosa que recubre la piel del fruto. De ahí pasan al mosto cuando se rompe la baya en las operaciones enológicas de la molienda (Mesas y col., 1999).

Por otro lado, las células de las levaduras también están presentes en las paredes de las bodegas y equipamientos, incluidos los depósitos de fermentación (Beltran y col., 2002; Sabate y col., 2002; Sangorrin y col., 2002; Le Jeune y col., 2006; Mercado y col., 2007) y desde allí pueden pasar a formar parte de las fermentaciones (Ciani y col., 2004).

Los restos sólidos generados luego de la fermentación, el denominado orujo, son utilizados de manera habitual como fertilizantes en los viñedos, y podrían permitir que algunas de las cepas de levaduras permanecieran en el campo hasta la siguiente vendimia. De esta forma las cepas podrían estar presentes en las uvas cosechadas al año siguiente favoreciéndose su rápida proliferación durante las fermentaciones espontáneas (Ganga y Martínez, 2004). Cabe destacar que esta práctica podría influir en la biodiversidad provocando modificaciones de las posibles poblaciones autóctonas de la zona (Mercado y col., 2009).

3. Fermentación alcohólica

Muchas han sido las variaciones que ha sufrido el significado de la palabra “fermentación” a lo largo del tiempo, tanto en el lenguaje vulgar como en el científico. El nombre de fermentación se dio en principio a los fenómenos de descomposición de la materia orgánica con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas, y la raíz del nombre procedía del verbo hebraico *fervere*, que significa hervir (Suarez Lepe e Iñigo Leal, 2003).

La producción del vino es un proceso muy complejo no solo desde el punto de vista microbiológico, sino también bioquímico. Microbiológicamente implica interacciones entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Aranda y col., 2005). Entre estos organismos, las levaduras desempeñan un papel principal ya que son responsables de llevar a cabo el proceso metabólico central, la fermentación alcohólica, ruta catabólica consistente en la transformación de las hexosas presentes en el mosto en etanol y CO₂. Además se originan otros compuestos fundamentales para las propiedades organolépticas del vino (Fleet, 1993; Aranda y col., 2005).

El mosto aporta a las levaduras fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, que permiten el crecimiento de las mismas. Las fuentes de carbono más importantes presentes en el mosto, son las hexosas glucosa y fructosa, que permiten a las células de levadura obtener energía mediante la fermentación alcohólica. Esta vía metabólica llamada ruta de Embden- Meyerhof-Parnas conocida también como glucolisis, tiene lugar en el citoplasma y puede expresarse mediante la siguiente ecuación global simplificada:



La fermentación del mosto suele desencadenarse de forma natural y espontánea a partir de las propias levaduras presentes en el mosto, a este tipo de proceso se le denomina fermentación espontánea. Se caracteriza porque en el transcurso de la misma intervienen varias especies de levaduras, algunas de las cuales coexisten en el tiempo y otras que se suceden secuencialmente en función de distintos factores, como su poder alcoholígeno y la tolerancia a la toxicidad del etanol.

4. Sucesión de especies de levaduras durante la fermentación alcohólica

La transformación del mosto de uva en vino mediante la fermentación alcohólica, es el resultado de la acción combinada de varias especies de levaduras que se suceden durante dicho proceso. Se puede afirmar que estas fermentaciones comienzan con el crecimiento de especies de levaduras procedentes de la superficie de la uva, pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces*, denominadas en conjunto como no-*Saccharomyces*, también llamadas levaduras de bajo poder fermentativo. Sin embargo, el número de especies y su presencia durante la fermentación dependen del área de producción, las características de las prácticas enológicas y del tipo de vino producido (Vazquez y col., 2005). El crecimiento de estas especies de levaduras está limitado a los primeros días de fermentación, después de los cuales mueren por el efecto tóxico del etanol. Al mismo tiempo que éstas van desapareciendo, las levaduras del género *Saccharomyces* y principalmente de la especie *S. cerevisiae*, también llamadas de alto poder fermentativo, empiezan a multiplicarse hasta convertirse en las únicas responsables de la fermentación alcohólica (Carrascosa y col., 2005; Aranda y col., 2005; Combina y col., 2005; Le June y col., 2006).

Las levaduras *S. cerevisiae*, al igual que especies de los géneros *Kloeckera*, *Torulaspota*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Hansenula* y *Pichia*, han sido aisladas también, de la superficie de maquinarias de bodega (Pretorius, 2000; Sabate y col., 2002; Ciani y col., 2004; Malandra y col., 2003; Aranda y col., 2005). Diversos estudios sobre la microbiota levaduriforme asociada con ambientes de bodegas reportaron la presencia de *S. cerevisiae* como una especie mayoritaria (Pretorius, 2000; Sangorrín y col., 2002; Cocolin y col., 2004; Santamaría y col., 2005; Sangorrín y col., 2007).

Dos situaciones diferentes han podido observarse en el estudio de las fermentaciones espontáneas para producción de vinos: un gran número de cepas en bajo porcentaje y un menor número de cepas con un patrón dominante; este tipo de escenarios ha sido reportado en investigaciones similares sobre fermentaciones espontáneas (Schütz y Gafner, 1999; Pramateftaki y col., 2000; Van der Westhuizen y col., 2000; Santamaría y col., 2005, Mercado, 2009). Por otro lado, diferentes estudios previos han observado un cambio en las poblaciones de levaduras presentes en la fermentación año a año, siendo la microbiota de

cada temporada caracterizada por la aparición de nuevas cepas y por una frecuencia diferente de cepas previamente detectadas (Zilio y col., 1998; Schütz y Gafner, 1999; Torija y col., 2001; Schüller y col., 2005, Mercado, 2009).

5. Fermentación alcohólica inoculada

Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica en bodega pueden originarse desde tres fuentes: la superficie de la uva, las superficies de los equipamientos de bodega y los cultivos inoculados (Fleet 1993). En ocasiones la combinación de un sulfitado excesivo y bajas temperaturas retardan el inicio de la fermentación. En estos casos, y en aquellos en los que el productor de vinos desea conducir la fermentación alcohólica con un tipo concreto de levaduras, se recurre a la adición de cultivos puros de levaduras al mosto, a esto se le denomina fermentación inoculada. Se pueden emplear como inóculo o bien levaduras nativas o bien levaduras comerciales (Mesas y Alegre, 1999). Se denominan levaduras nativas a aquellas que se aíslan y utilizan en vinificaciones de una misma zona. Por otro lado las levaduras seleccionadas comerciales disponibles en el mercado han sido aisladas de una determinada región pero se comercializan para ser utilizadas en cualquier otra zona distinta de donde fue seleccionada (Mesas y Alegre, 1999).

La inoculación de levaduras se justifica porque aporta una serie de ventajas al proceso de vinificación si se compara con la fermentación espontánea. Entre estas ventajas cabe destacar un inicio y desarrollo de fermentación más rápido y menor producción de acidez volátil, asociado a una calidad del producto más uniforme entre diferentes tanques y cosechas. Se aprecian también aportes concretos a la calidad organoléptica debidas a las características específicas de cada cepa de levadura y que sirven como criterios de selección de estas para su uso enológico (Gonzales y col., 2005).

5.1. Selección de cepas de levaduras nativas

El uso de cepas locales seleccionadas ofrece algunas ventajas como su capacidad de competencia en el mosto debido fundamentalmente a que las levaduras locales presentan adaptaciones a distintas condiciones ambientales características de una región en particular, lo cual permitiría que dicha cepa sea el agente biológico más importante en cuanto a su responsabilidad en el proceso de vinificación (Vazquez y col., 2005). La selección de una levadura nativa apropiada podría ser una buena solución para mantener las características típicas de los vinos de una región vitivinícola y así minimizar la pérdida de tipicidad de los

vinos inoculados, garantizando una uniformidad del producto a lo largo de los años (Versavaud y col. 1995; Torija y col., 2002).

El proceso de selección de nuevas cepas de levadura para uso en enología comienza con el aislamiento de levaduras a partir de diferentes sustratos como uvas, mostos frescos o vinos en última fase de la fermentación (Gonzalez y col., 2005).

5.2. Levaduras secas activas

La necesidad de asegurar la fermentación y la calidad del producto, ante el hecho de que hay un gran número de variables que intervienen en una fermentación espontánea, ha favorecido que el uso de las levaduras secas activas (LSA) se haya convertido en una práctica habitual en enología. La inoculación con LSA favorece un inicio más rápido de fermentación (normalmente se reduce la fase de latencia) y un consumo total de los azúcares fermentables, reduciendo los posibles problemas enológicos como: comienzos de fermentación tardíos, fermentaciones languidecentes, detenciones del proceso antes del agotamiento completo del azúcar. Estas interrupciones constituyen un peligro grave, no solamente por la dificultad de reiniciar el proceso, sino también porque en tal situación puede temerse que ocurran desviaciones bacterianas que provocarían un aumento de la acidez volátil, deteriorando la calidad del producto final (Suarez Lepe e Iñigo Leal, 2003).

El uso de levaduras secas activas (LSA) ayuda a la obtención de un producto reproducible y reduce los riesgos de contaminación (Vazquez y col., 2005). Esta práctica permite tanto un mayor control microbiológico, lo que no es posible en fermentaciones espontáneas, como así también la obtención de un producto de calidad más uniforme a lo largo de las diferentes vendimias. Por otro lado, contrariamente a estos beneficios, puede perderse algo de complejidad organoléptica en el producto final (Torija y col., 2002).

6. Clasificación – Taxonomía de levaduras

Las levaduras constituyen un vasto grupo de hongos unicelulares, taxonómicamente heterogéneo y profundamente complejo. Desde la primera clasificación de Hansen a principios del siglo XX, la taxonomía de las levaduras ha suscitado numerosos trabajos. Según las últimas clasificaciones, las levaduras ligadas a los Ascomicetos, Basidiomicetos y a los Hongos Imperfectos (Deuteromicetos) se distribuyen en 81 géneros a los cuales se relacionan 590 especies. Sin embargo, las especies de levaduras capaces de estar

significativamente presentes en la uva y el vino, interviniendo como agentes de la fermentación alcohólica o causando enfermedades del vino, son cerca de quince (Tabla 1) (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

Las levaduras enológicas pertenecen solamente a los Ascomicetos y a los Hongos Imperfectos o Deuteromicetos. En los Ascomicetos, las esporas y las ascosporas haploides están contenidas en ascos, es decir una especie de sacos formados a partir de la célula vegetativa. Las levaduras no esporógenas, en las cuales no se pudo evidenciar un modo de reproducción sexuada, están clasificadas entre los hongos imperfectos.

Tabla 1: Clasificación de los géneros de levaduras más frecuentes en mostos y vinos (Mesas y Alegre, 1999).

Levaduras esporógenas			
Subdivisión	<i>ASCOMYCOTINA</i>		
Clase	<i>HEMIASCOMYCETES</i>		
Orden	<i>ENDOMYCETALES</i>		
Familia	<i>SACCHAROMYCETACEAE</i>		
Subfamilia	<i>SCHIZOSACCHAROMYCETOIDAE</i>	<i>NADSONIOIDEAE</i>	<i>SACCHAROMYCETOIDEAE</i>
Géneros	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomycodes</i>	<i>Dekkera</i> <i>Hansenula</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Torulaspora</i> <i>Zygosaccharomyces</i>
Levaduras NO esporógenas			
Subdivisión	<i>DEUTEROMYCOTINA</i>		
Clase	<i>BLASTOMYCETES</i>		
Familia	<i>CRYPTOCOCCACEAE</i>		
Subfamilia	<i>SCHIZOSACCHAROMYCETOIDAE</i>	<i>NADSONIOIDEAE</i>	<i>SACCHAROMYCETOIDEAE</i>
Géneros	<i>Brettanomyces</i>	<i>Candida</i>	<i>Kloeckera</i>

La taxonomía de las levaduras (del griego *taxis*: ordenación) como la de otros microorganismos, comprende la clasificación y la identificación. La clasificación permite agrupar a los organismos en taxones, en función de sus similitudes y/o de sus lazos con un ancestro común. El taxón de base es la especie, la que puede ser definida como una colección de cepas que presentan en común un cierto número de caracteres

morfológicos, fisiológicos y genéticos; este conjunto de caracteres constituye la descripción estándar de la especie. La identificación consiste en comparar a un organismo desconocido con individuos ya clasificados y nombrados, que presentan caracteres similares (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

Los primeros criterios de delimitación de las especies de levaduras utilizados por los taxonomistas fueron morfológicos y fisiológicos. La forma y la dimensión de las células, la formación de esporas, los caracteres culturales, la fermentación y asimilación de los diferentes azúcares, la asimilación de compuestos nitrogenados, las necesidades en factores de crecimiento, la resistencia a la cicloheximida, son atributos que han permitido establecer las primeras clasificaciones basadas en diferencias fenotípicas entre las levaduras (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

Debido al número relativamente limitado de las especies de levaduras que se encuentran significativamente sobre la uva y el vino, la realización de pruebas fenotípicas como las previamente mencionadas, permite identificar sin dificultad en ciertos géneros las especies de levaduras enológicas. De esta forma, la sola observación al microscopio de las células en crecimiento permite reconocer ciertas especies como por ejemplo las células apiculadas pequeñas con, forma de limón, que designan a la especie *Hanseniaspora uvarum* y a su forma imperfecta *Kloeckera apiculata* (Ribéreau-Gayon y col., 2003). Pero debido a la variabilidad intraespecífica de alguno de esos caracteres (por ejemplo los perfiles de fermentación de los azúcares) e incluso a su inestabilidad por una cepa dada durante la multiplicación vegetativa, resulta cada vez más evidente para los taxonomistas que la diferenciación de las especies no puede apoyarse solamente en los criterios fenotípicos e incluso no basta ni siquiera para delimitar el bajo número de especies fermentativas del género *Saccharomyces* encontradas durante la vinificación. Progresivamente se impone una delimitación basada en la significación biológica y genética de la noción de especie.

La clasificación de levaduras (Barnett y col., 2000) basada en conocimientos de genética y taxonomía molecular considera que las especies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*, resultan imposible de ser diferenciadas entre sí solo mediante pruebas fisiológicas, pero pueden ser delimitadas por medio de la tasa de reasociación de su ADN y forman el grupo de las *Saccharomyces* en sentido estricto (o *sensu stricto*). Posteriormente a esto, 4 especies más fueron incorporadas a este grupo; *S. cariocanus*, *S. kudriazevii*, *S. mikatae* y *S. arboricolus* (Naumov y col., 2000; Wang y Bai, 2008). Un segundo grupo llamado *Saccharomyces* en sentido amplio (*sensu lato*), estaría formado por las especies *exiguus*, *castelli*, *servazzii* y *unisporus*. Por último un tercer grupo constituido por la especie *kluuyveri*. Sólo el primer grupo (*sensu stricto*) incluye especies que presentan interés enológico (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

La inestabilidad de las propiedades fisiológicas de las cepas *Saccharomyces* es conocida desde hace mucho tiempo por los especialistas. Según Rossini y col. (1982) esa inestabilidad fisiológica sería una propiedad específica de las cepas del grupo de las *Saccharomyces* en sentido estricto.

La utilización de métodos genéticos es inevitable para identificar las levaduras de vinificación. Sin embargo la medición del porcentaje de reasociación del ADN o las pruebas de infertilidad entre cepas homotáticas, técnicas largas y complejas, no son posibles de encarar en un control microbiológico de rutina. Más práctico resulta la amplificación del fragmento de un genoma mediante la reacción de polimerización en cadena (PCR), método que ha ofrecido recientemente una excelente herramienta de discriminación de las especies de levaduras de vinificación (Ribéreau-Gayon y col., 2003; Fernández Espinar y col., 2011).

7. Características del genoma de las levaduras vínicas

Las levaduras vínicas son usualmente diploides, poliploides o incluso aneuploides (Bakalinsky y Snow, 1990; Codón y col., 1995). La longitud de los cromosomas en estas levaduras es altamente polimórfica (Bidenne y col., 1992; Rachidi y col., 1999) y esto resulta en una extensa variabilidad en capacidad de esporulación y viabilidad de las esporas. La ploidía de las levaduras vínicas puede proveerlas con ventajas adaptativas a ambientes cambiantes o, tal vez representa una forma de incrementar la dosis de genes que son importantes para la fermentación (Bakalinsky y Snow, 1990; Salmon, 1997). Por otro lado, las levaduras vínicas son predominantemente homotáticas (HO), lo cual significa que luego de la esporulación la célula hija puede cambiar su "mating type", conjugarse con una célula de tipo opuesto y luego formar una nueva célula con contenido de ADN $2n$ que es homocigota para todos los genes excepto para el locus MAT, que son los que codifican para el tipo sexual. Las cepas vínicas también exhiben un alto grado de heterocigocidad (Barre y col., 1993; Codón y col., 1995), incluso para el locus HO (Guijo y col., 1997; Mortimer y col., 1994), y pueden realizar recombinaciones mitóticas (Longo y Vézinhet, 1993; Puig y col., 2000), una característica que no es observada en cepas haploides de laboratorio. Esta capacidad para realizar extensos cambios genómicos significa que las levaduras vínicas no poseen estabilidad genética (Pretorius, 2000; Snow, 1983).

Como en todos los eucariotas, las mitocondrias de *S. cerevisiae* tienen un ADN mitocondrial (ADNmit) circular (Christiansen y Christiansen, 1976; Hollenberg y col., 1970). Éste usualmente se localiza en la matriz mitocondrial pero ocasionalmente puede estar localizado en la membrana mitocondrial interna. El ADNmit contiene genes que codifican proteínas esenciales para la función mitocondrial y exhibe un alto grado de polimorfismo debido a la variabilidad en la presencia de ciertos intrones y diferencias en el

tamaño de las regiones intergénicas (Clark-Walker y col., 1981). Esta variabilidad ha sido utilizada en estudios taxonómicos. (Perez Ortín y col., 2011).

8. Diferenciación entre cepas de levaduras enológicas

S. cerevisiae es la principal especie durante la vinificación y dentro de ésta hay una importante variabilidad que determina la existencia de diferentes cepas que pueden tener características muy diferentes. Poder diferenciar a un nivel intraespecífico, es decir, diferenciar entre cepas de levaduras *S. cerevisiae* resulta fundamental en diversos aspectos de la microbiología enológica como: el estudio ecológico de las levaduras salvajes responsables de la fermentación espontánea, la selección de aquellas cepas que presentan las mejores aptitudes enológicas, los controles de producción, de comercialización y de implantación de las levaduras seleccionadas utilizadas como fermento, la constitución y el mantenimiento de las colecciones de levaduras salvajes o seleccionadas. Tal como es el caso que se desarrollará en el presente trabajo.

Los primeros trabajos de diferenciación intraespecífica en *S. cerevisiae* intentaron discriminar las cepas mediante análisis electroforético de sus proteínas o glicoproteínas extracelulares o intracelulares. Otros investigadores propusieron identificar a las cepas por cromatografía en fase gaseosa de los ácidos grasos de cadena larga. Aunque esas distintas técnicas permiten diferenciar a nivel de cepas, son indiscutiblemente menos discriminantes que los métodos de diferenciación genética; además, presentan otros inconvenientes como el depender del estado fisiológico de las levaduras y de las condiciones de cultivo, que deben ser siempre idénticas (Ribéreau-Gayon y col., 2003). Como la mayoría de las cepas industriales de levadura pertenecen al grupo de *S. cerevisiae* y no se pueden distinguir fácilmente e identificar por métodos bioquímicos clásicos, los métodos moleculares (ampliamente utilizados en la taxonomía microbiológica) comenzaron a ser desarrollados para la caracterización intraespecífica de levaduras (Querol y col., 1992; Ness y col. 1993). A fines de la década de 1980, gracias al desarrollo de la genética, ciertas técnicas de la biología molecular se aplicaron con éxito a la caracterización de levaduras de vinificación las cuales están basadas en el polimorfismo clonal del ADN mitocondrial y del ADN genómico de *S. cerevisiae*. Contrariamente a las técnicas precedentes basadas en el análisis de los productos del metabolismo, esos métodos genéticos son independientes del estado fisiológico de las levaduras (Ribéreau-Gayon y col., 2003; Querol y col., 1992; Schüller y col., 2004; Mercado y col., 2010).

8.1. Técnicas moleculares de diferenciación entre cepas de levaduras

El origen, el desarrollo y la sucesión de varias especies y/o cepas de levadura puede evaluarse utilizando técnicas moleculares específicas que permiten la diferenciación y tipificación entre éstas. En los últimos años se han empleado diferentes técnicas en el estudio de la microbiología enológica. La OIV (Organización internacional de la viña y el vino) recomienda adoptar las siguientes herramientas de biología molecular (Resolución OIV-OENO 408-2011, Tabla 2) para identificar tanto la levadura de vinificación *Saccharomyces cerevisiae* como otras especies de levadura relacionadas con la vinificación (OIV, 2011).

Tabla 2: Herramientas de biología molecular para diferenciación de *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies de levadura relacionadas con la vinificación. OIV-OENO 2011

Métodos dependientes del cultivo	Identificación de cepas de levadura a nivel de especie	<ul style="list-style-type: none"> Reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) del ADN ribosómico (ADNr) Secuenciación de la región D1/D2 tras la amplificación del PCR
	Identificación de levaduras de vinificación a nivel de cepa	<ul style="list-style-type: none"> Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (ADNmit)
		<ul style="list-style-type: none"> Amplificación de secuencias Delta (δ)
		<ul style="list-style-type: none"> Genotipado por microsatélites
Métodos independientes del cultivo	Detección y cuantificación rápida de levaduras a nivel de especie en mosto o vino	<ul style="list-style-type: none"> PCR cuantitativa (qPCR)
	Identificación de levaduras a nivel de especie en mosto o vino	<ul style="list-style-type: none"> Electroforesis en geles de gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE)

Para el presente estudio se decidió utilizar la técnica de Amplificación de secuencias Delta (δ) y Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (ADNmit) ya que nos permiten obtener marcadores ampliamente polimórficos para *S. cerevisiae* además de ser metodologías sencillas y robustas. Por otro lado cabe mencionar que son herramientas ampliamente utilizadas en la caracterización de cepas de origen vínico (Querol y col., 1992; Schüller y col., 2004; Mercado y col., 2010).

8.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Desde su descubrimiento por Saiki y col., (1985) la PCR ha conocido numerosas aplicaciones para la identificación de diferentes especies de plantas y bacterias; esta técnica consiste en amplificar enzimáticamente *in vitro* uno o varios fragmentos de genes (Fig. 1). La reacción está basada en la hibridación de dos oligonucleótidos que encuadran una región central sobre una doble cadena de ADN o matriz.

Estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes y son complementarios de las secuencias que se encuadran en el fragmento a amplificar. Las diferentes etapas del proceso de amplificación son: El ADN primero es desnaturalizado a alta temperatura (95°C). La mezcla que ha reaccionado es enfriada de inmediato a una temperatura entre 37° a 55° C, permitiendo la hibridación de los oligonucleótidos sobre los filamentos desnaturalizados; éstos sirven también de cebador a partir del cual una ADN polimerasa permite la adición, etapa por etapa, de unidades desoxirribonucleotídicas en el sentido 5'-3'. La ADN polimerasa necesita 4 desoxirribonucleósidos 5'-trifosfatos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP). Se forma una unión fosfodiéster entre el extremo 3'-OH del cebador y el fósforo más interno del desoxirribonucleósido activado; de esta forma se libera el pirofosfato. El alargamiento de la cadena neosintetizada se hace sobre el modelo de

la matriz. La utilización de esta enzima termorresistente (ADN polimerasa), permite efectuar *in vitro* un gran número de ciclos de amplificación (25 a 40) sin estar obligado a agregar la polimerasa después de cada desnaturalización. Así el fragmento de ADN amplificado en el curso del primer ciclo sirve de matriz para los siguientes; en consecuencia cada ciclo sucesivo duplica de manera específica al fragmento de ADN central, que es así amplificado a un factor 10^5 a 10^6 , por 25 a 30 ciclos de amplificación (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

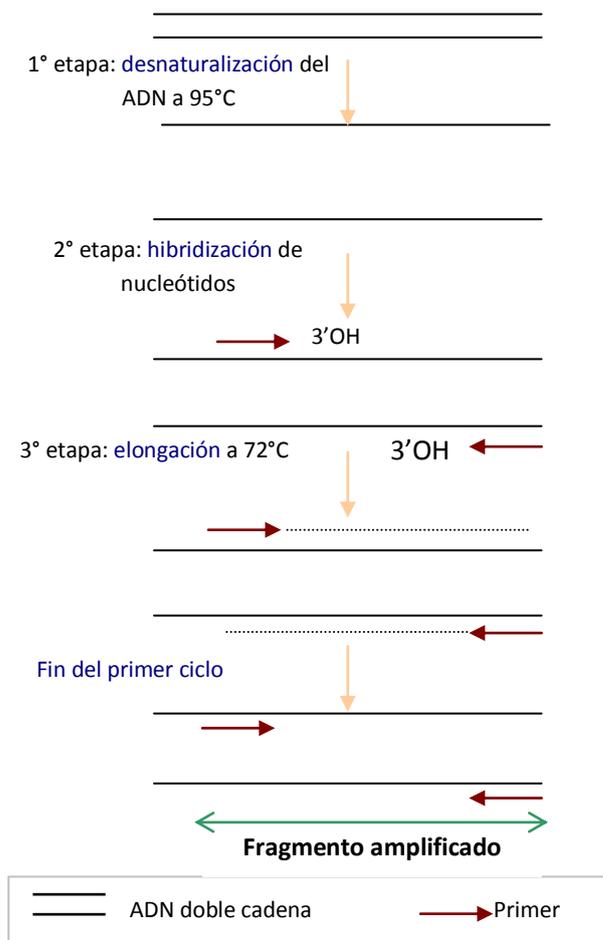


Fig. 1. Principio de la PCR (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

8.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a las secuencias δ .

El método PCR asociado a secuencias δ consiste en amplificar por PCR, ciertas secuencias del genoma de la levadura comprendida entre los elementos repetidos δ cuyo alejamiento no excede de cierta distancia (1 Kb); el mismo fue desarrollado para caracterizar a las cepas de *S. cerevisiae* (Ness y col., 1993).

Las secuencias δ son elementos de aproximadamente 0,25 kb que flanquean los retrotransposones Ty1 (Cameron y col., 1979) (Fig. 2). Cerca de 100 copias de estas secuencias delta están presentes en el genoma de las levaduras *Saccharomyces* como parte de retrotransposones Ty1 o como elementos aislados. El número y la localización de estos elementos poseen una cierta variabilidad intraespecífica que fue aprovechada por Ness y col. (1993) para desarrollar cebadores específicos (δ_1 y δ_2) útiles para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*. Estos autores muestran que la estabilidad de los elementos δ es suficiente como para usar esta técnica como método de identificación de cepas de *S. cerevisiae* a nivel industrial.

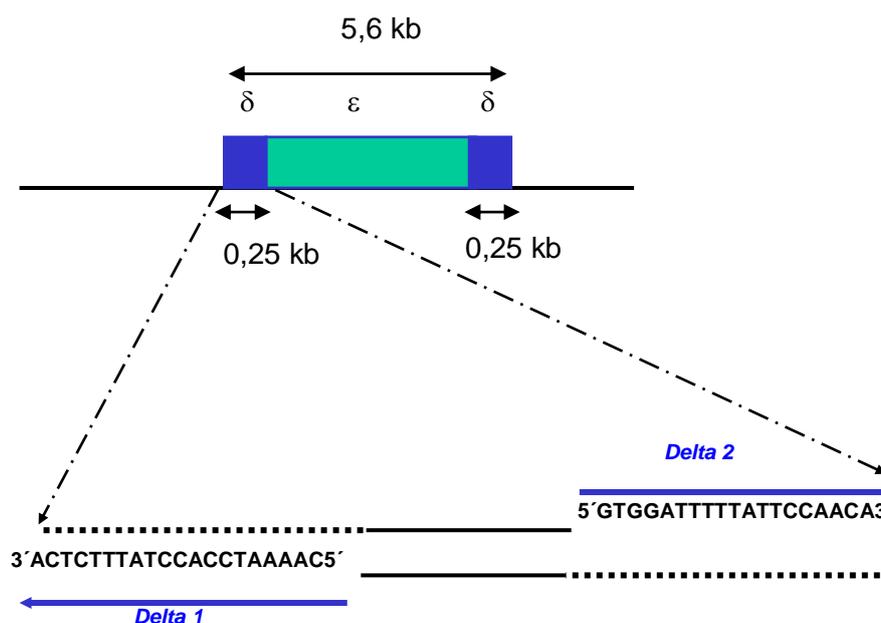


Fig.2 Estructura de un elemento Ty
(Mercado, 2001)

Los elementos Ty están repetidos alrededor de 35 veces en el genoma de la levadura, mientras que las secuencias δ solas o asociadas a éstos se encuentran unas 100 veces por genoma. Cuando se encuentran separados por una corta distancia, 1 Kb, esa distancia es amplificable mediante una reacción de PCR que utilice las secuencias de estos elementos δ como primers o iniciadores. Cada cepa de *S. cerevisiae* posee distinto número y distribución de las secuencias δ de acuerdo a su historia evolutiva, de modo que la

amplificación de los segmentos de ADN entre ellas, variará de una cepa a otra en número y en longitud (Fig. 3). Este es el principio aplicado para diferenciar las cepas (Masneuf, 1996).

Los fragmentos que resultan de la amplificación, son separados en función del tamaño, mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados por fluorescencia UV (Figura 3). Lavallée y col., (1994) al analizar cepas industriales y comerciales pudieron observar el excelente poder discriminante de este método.

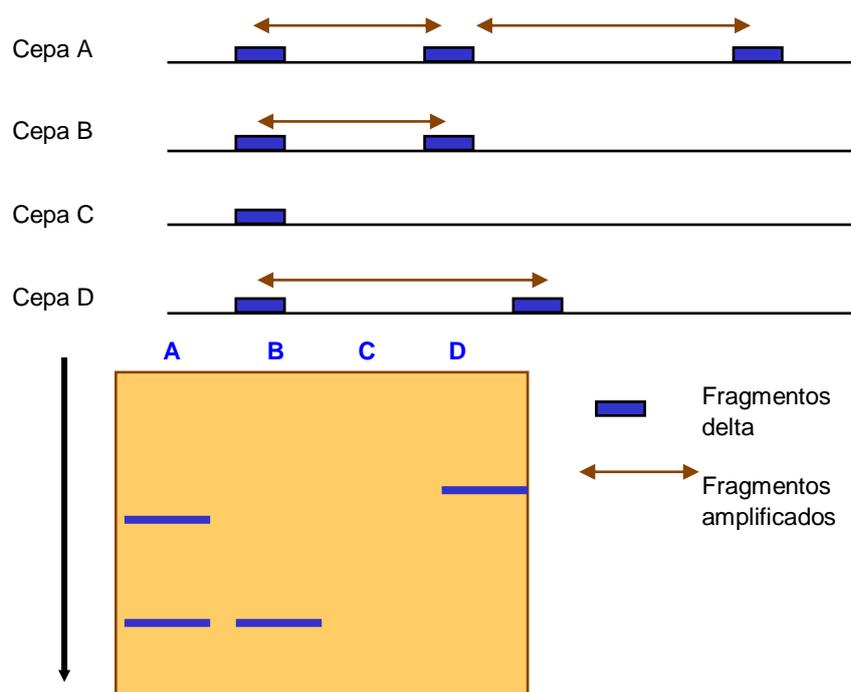


Fig. 3: Principio de identificación de cepas de *S. cerevisiae* por la técnica de PCR utilizando secuencias delta (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

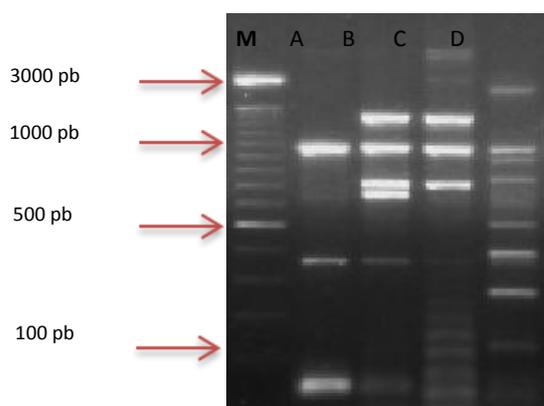


Figura 4: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de las cepas de *S. cerevisiae* denominadas A, B, C y D. M: marcador molecular 100 pb.

En la figura 4 se muestra un gel de agarosa donde se visualizan los productos de la reacción PCR asociada a las secuencias δ . Se observan 5 calles diferentes, la primera corresponde a un marcador donde el peso molecular (100 bp, Invitrogen) de cada una de sus bandas es conocido y sirve para comparación de los fragmentos de ADN amplificados de cada cepa a analizar. En las calles 2 a 5 se muestra el producto de reacción de las cepas denominadas A, B, C y D. Se concluye entonces que todas estas cepas son distintas entre sí ya que difieren en la cantidad y

ubicación de fragmentos amplificados o bandas reveladas; cada una de ellas presenta un perfil de bandas único denominado patrón.

Legras y Karst (2003) optimizaron la técnica mediante el diseño de dos nuevos cebadores δ_{12} y δ_{21} que se localizan muy próximos a δ_1 y δ_2 . Estos autores verificaron que la utilización de δ_{12} y δ_{21} o de δ_{12} con δ_2 reveló un mayor polimorfismo que se reflejó con la aparición de un mayor número de bandas. Como consecuencia los nuevos cebadores consiguieron diferenciar un mayor número de cepas, lo cual ha permitido su utilización en estudios de diversidad de *Saccharomyces* aisladas del mismo ambiente y por lo tanto, muy estrechamente relacionadas (Le Jeune y col., 2006; Mercado y col., 2010).

8.1.3. Análisis del ADN mitocondrial - RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) de ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial (ADNmit) de *S. cerevisiae* es una pequeña molécula de 65 a 80 kb y posee dos propiedades notables: es estable (baja tasa de mutación) durante la multiplicación vegetativa y es muy polimorfo según la cepa; de aquí que puede utilizarse como otro marcador molecular. Un tipo particular de enzimas, las endonucleasas de restricción cortan el ADN en lugares específicos, generando fragmentos de tamaños variables, en un número no muy importante, que pueden ser separados por electroforesis en gel de agarosa (Ribéreau-Gayon y col., 2003). El alto grado de polimorfismo que revela el perfil de restricción de la molécula de ADNmit entre cepas vínicas de *S. cerevisiae* hace que el análisis de esta variabilidad sea uno de los más aplicados para la caracterización de este tipo de aislados (Querol y col., 2005).

Esta técnica fue aplicada primero por Aiglé y col., (1984) a las levaduras de cerveza. A partir de 1987, fue utilizada para caracterizar las cepas enológicas de *S. cerevisiae* (Dubourdieu y col., 1987; Hallet y col., 1988). Contrariamente a las cepas industriales de cerveza analizadas por Aiglé y col., (1984) las cuales presentaron el mismo perfil de restricción de su ADNmit, las cepas de levaduras enológicas se caracterizan por una gran diversidad en este nivel. Mediante el estudio del polimorfismo del ADNmit se pueden diferenciar sencillamente cepas seleccionadas empleadas en vinificaciones, así como cepas de *S. cerevisiae* nativas encontradas en fermentaciones espontáneas (Ribéreau-Gayon y col., 2003).

Varios métodos se han utilizado para el aislamiento de ADNmit de levadura (Querol y Barrio, 1990; Gargouri, 1989; Aiglé y col. 1984); Querol y col. (1992) desarrollaron un método basado en el hecho de que el ADNmit de levaduras es una molécula con 75 % de adenina (A) y timina (T) y aun siendo rica en AT, se han encontrado unas 200 regiones ricas en guanina y citosina (GC). Por tanto digestiones del ADN total con enzimas del tipo GCAT no reconocen las secuencias ricas en GC ni ricas en AT. Dado el bajo número de sitios de restricción en el ADNmit y el alto número de puntos de corte en el ADN nuclear, este último se rompe en fragmentos de pequeño tamaño, lo que permite visualizar claramente las bandas

correspondientes al ADNmit como bandas definidas, superpuestas a la sombra de degradación del ADN nuclear (Fernandez-Espinar y col., 2005).

No todas las enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso concreto de *S. cerevisiae* las enzimas más apropiadas para poder diferenciar a nivel de cepa son *HinfI* y *HaeIII* (Guillamón y col., 1994).

A continuación en la Figura 5 se observa un ejemplo de cómo se visualiza un gel de agarosa con los fragmentos separados por electroforesis luego de utilizar esta técnica. En este ejemplo la calle 1 corresponde al marcador molecular 1 kb (Invitrogen), donde el peso molecular de cada una de sus bandas es conocido y sirve para comparación de los fragmentos de ADNmit de cada cepa a analizar y las siguientes cuatro calles al producto de la reacción de cuatro cepas diferentes.

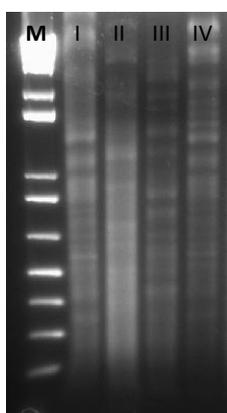


Figura 5: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por RFLP de ADNmit. de las cepas de *S. cerevisiae* denominadas I, II, III y IV. M: marcador molecular 1 Kb.

Los métodos moleculares elegidos en este estudio representan las técnicas más sencillas y ampliamente usadas para el estudio de la biodiversidad de *Saccharomyces*. Además de un amplio poder discriminatorio, brindan cierta información respecto de las relaciones a nivel genético entre las cepas estudiadas (Mercado y col., 2010).

9. Colecciones de cultivos microbianos

Desde tiempos remotos los microorganismos han sido empleados como materiales esenciales de trabajo en la obtención de medicamentos (antibióticos, vitaminas y aminoácidos), elaboración de alimentos (pan, queso, leche, bebidas y licores) y fabricación de solventes y reactivos, entre otras aplicaciones. El creciente uso de estos materiales biológicos en la biotecnología y la protección medioambiental han fortalecido la necesidad de mantener los cultivos microbianos de manera que las propiedades que los hacen importantes permanezcan estables. La preservación de cepas microbianas no es tarea fácil y debe

garantizar la viabilidad, pureza y estabilidad genética de los cultivos, características que coinciden con los objetivos de un buen método de conservación (Aleman y col., 2005).

Las colecciones de cultivos microbianos tienen funciones básicas como son: la conservación *ex situ* de organismos, la custodia de recursos nacionales, el suministro de recursos viables como base para el desarrollo de la ciencia y ofrecer servicios de depósito seguros y confidenciales. Además, pueden prestar trabajos de identificación, de referencia taxonómica, de información y consultas profesionales, de entrenamientos e instrucción y apoyo especializado en innumerables áreas y contribuir a bases de datos y redes de información (Smith, 2012).

Las colecciones de microorganismos son esenciales para el desarrollo de tecnologías con aplicación en la producción agropecuaria y agroindustrial. La Convención sobre Diversidad Biológica (1992), ha reconocido la importancia de las especies microbianas en la sustentabilidad de la vida en la Tierra y considerado aspectos relacionados con su valor genético, transferencia de tecnología, intercambio de información, manejo de biotecnología y distribución de beneficios.

La continua investigación sobre el conocimiento de la biodiversidad microbiana y su potencial genético que resulte de interés en nuevas aplicaciones para el desarrollo de la agricultura, la medicina o la industria, permitió el reconocimiento del valor que tienen las Colecciones de Cultivos Microbianos que garantizan la preservación *ex-situ* de estos recursos genéticos en forma inalterada. Este reconocimiento renueva la conciencia de la responsabilidad que significa para las colecciones microbianas el mantenimiento de este servicio para el futuro de la humanidad, en condiciones eficientes y acordes a regulaciones internacionales. Establecer, administrar y operar una Colección es una tarea muy laboriosa, requiere personal técnico y científico con habilidades específicas que aseguren adecuados procedimientos de preservación y monitoreo de viabilidad y estabilidad del cultivo preservado, aplicando Buenas Prácticas de Laboratorios y normas de seguridad biológica. Otra importante tarea es incentivar la investigación para mantener actualizado al personal y aumentar la calidad de la Colección (Floccari, 2005).

La Argentina posee un vasto territorio con una riqueza microbiológica muy amplia y poco estudiada, por lo que la conservación de los recursos genéticos propios de nuestros ecosistemas resulta esencial para evitar la pérdida de biodiversidad y el acceso a genomas diferentes de otras regiones geográficas. Como desventaja, nuestro país aún no posee una ley de acceso a sus recursos genéticos ni tiene sistematizados a nivel nacional los lugares donde estos recursos se conservan. Tampoco se dispone de un banco de recursos genéticos microbiológicos que sirva como depósito nacional con reconocimiento internacional, para la duplicación de cepas de referencia, en estudio o bajo patentamiento, por lo cual en el último caso se debe recurrir a organismos del exterior con el costo que ello demanda. Desde setiembre de 2010 se cuenta con la Norma IRAM 14950 creada con el fin de asegurar la calidad de los cultivos

microbianos de referencia que se comercializan en el país, impulsar la producción nacional y generar una herramienta que permita la aceptación de su utilización por el Organismo Argentino de Acreditación (OAA). Por otro lado, responsables de Colecciones de Cultivos Microbianos de varios países de América Latina y El Caribe, respondiendo a la necesidad de un intercambio de conocimientos y colaboración para alcanzar un desenvolvimiento eficiente de las mismas, crearon la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos, FELACC. El objetivo de esta es proveer un espacio de acción conjunta entre las colecciones, sus usuarios y/o organismos relacionados. Con la información del tipo de microorganismo que preserva cada colección integrante, se dispone de una Base de Datos vía Internet.

Actualmente en nuestro país algunas colecciones son mantenidas a través del esfuerzo individual de los investigadores y, en general, mediante metodologías de conservación de corto o mediano plazo. Esto dificulta la valorización, preservación e integridad genética de los microorganismos para su disponibilidad actual y de futuras generaciones (Combina y col., 2010).

La conservación *ex situ* de todos los microorganismos aislados, estudiados y reportados en la literatura científica, es fundamental para el progreso de la ciencia. En tal contexto, las colecciones de microorganismos requieren acciones coordinadas y multidisciplinarias, que fijen pautas para su preservación a largo plazo, su protección legal e intercambio, tanto a nivel institucional como interinstitucional.

10. Importancia enológica de una colección de microorganismos.

Las levaduras juegan un papel importante en la producción de alimentos. Numerosas cepas de levadura se utilizan para la fermentación de vino, la elaboración de cerveza y productos de panadería. La importancia de utilizar una cepa adecuada para la producción de una bebida alcohólica o un producto exclusivo de panadería con características específicas ha llevado a la selección y conservación de estos microorganismos.

Es innegable la importancia que poseen las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* en el proceso de la fermentación vínica. Diversos estudios han demostrado su protagonismo en dicho proceso (Aranda y col., 2005; Carrascosa y col., 2005; Vazquez y col., 2005; Ribéreau-Gayon, 2003; Suarez Lepe e Iñigo Leal, 2003; Pretorius, 2000; Fleet, 1993). Durante mucho tiempo, tanto investigadores como industriales relacionados a la producción del vino y cervezas, han procurado seleccionar cepas de levaduras asociadas con buenos perfiles y características fermentativas (Gonzalez y col., 2005; Lopes y col., 2004; Suarez Lepe e Iñigo Leal, 2003; Torija y col., 2002; Pretorius, 2000).

La utilización de levaduras vínicas seleccionadas con características tecnológicas deseadas permite ejercer un control relativo sobre la fermentación y dirigirla en un determinado sentido, evitando paradas fermentativas, fermentaciones incompletas o languidecentes. Además estos individuos pre-adaptados a las características de los mostos del lugar y a las condiciones climáticas de dicha zona desarrollan capacidad de competencia en el medio debido a que las levaduras locales pueden presentar adaptaciones a distintas condiciones ambientales características de una zona. También asegura la conservación de las propiedades sensoriales de los vinos producidos en una región determinada, contribuyendo al concepto de *terroir* de una zona en particular.

11. Importancia económica de la vitivinicultura en Mendoza

Argentina posee la mayor cantidad de viñedos de América del sur, 25.372 viñedos con una superficie de 223.580 hectáreas, de acuerdo al censo 2.013 (INV, 2013). La región apta para el cultivo de la vid se extiende a lo largo de la Cordillera de los Andes, desde los 22° hasta los 42° de latitud sur. La gran amplitud latitudinal combinada con la topografía de los valles andinos, condicionan grandes variaciones ecológicas que permiten el cultivo de una amplia gama de variedades de vid. En general se trata de zonas con inviernos bien marcados, veranos calurosos y buena insolación. La baja precipitación obliga al riego artificial a partir de los ríos o agua subterránea, configurando así verdaderos oasis perfectamente delimitados y separados (Manzano y Mangione, 2009).

Argentina ocupa a nivel mundial el 5° lugar en el ranking de elaboración de vinos con 15.473.000 hectólitros (OIV, 2011). Mientras que en cuanto al consumo *per capita* anual, nuestro país se ubica a nivel mundial en el puesto número once, con 25 litros anuales (OIV, 2013). Para el oeste argentino, la vitivinicultura representa la principal industria de base agraria, y ocupa un lugar preponderante en el desarrollo de las economías regionales. Por su historia, tradición y escala, la industria vitivinícola argentina se ubica entre las diez principales a nivel mundial (OIV, 2009).

Mendoza es el centro vitivinícola más importante del país, concentra el 71% de la producción de uvas y vinos de Argentina, con más de 156.000 hectáreas y la mayor cantidad de bodegas del país. La elaboración de vinos y mosto es el principal destino de las uvas que se cultivan en la provincia. El 98,34% de la superficie es ocupado por variedades para vinificar, mientras que un 1,08% es destinado para la producción de uvas de mesa, el 0,34% para pasas y el resto para otros usos (INV, 2013).

Aunque la tendencia mundial refleja una caída del consumo de vinos, Argentina conserva un importante mercado interno, superando los mil millones de litros anuales. El impacto positivo en la industria local del vino se debe en parte a las escuelas de sommeliers, clubes de vino y wine tours entre

los viñedos además de la ley 26870 que el gobierno oficializó durante 2013, publicada en el Boletín Oficial, que declaran al vino argentino como "bebida nacional". Se observa además, que los consumidores actuales prefieren tomar menor cantidad de vino pero de mayor calidad (Los Andes, marzo 2015).

Teniendo en cuenta la importancia económica, social y cultural de la vitivinicultura para Mendoza y la necesidad de obtener vinos de calidad para el consumidor, es de importancia contar con la mayor cantidad posible de información de las levaduras vínicas encargadas de llevar adelante el proceso de fermentación para la obtención de un producto de calidad deseada y con la identidad propia de nuestras regiones productoras de vinos. La Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo dispone de material biológico para el proceso tecnológico de la vinificación integrando una colección o cepario, por ello se propone en el presente trabajo caracterizar las levaduras pertenecientes a este cepario para proveer información necesaria para un correcto uso de esta colección de microorganismos.

12. Hipótesis

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* pertenecientes a la colección de microorganismos de la Facultad de Ciencias Agrarias-UNCUYO, representativas de diferentes departamentos productivos de Mendoza, pueden ser diferenciadas por herramientas sencillas de Biología Molecular.

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Caracterizar mediante técnicas moleculares las levaduras enológicas que forman parte de la Colección de microorganismos autóctonos de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo.

2. Objetivos particulares

Trabajando con las levaduras *S.cerevisiae* representantes de diferentes grupos en los que se encuentra organizado el cepario:

- Obtener patrones moleculares intraespecíficos mediante PCR Interdelta.
- Confirmar las identidades Interdelta mediante RFLP del ADN mitocondrial.
- Evaluar la diversidad genética existente en los diferentes grupos.
- Completar la información disponible en la base de datos correspondiente a la colección de levaduras vínicas de la FCA UNCUYO.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos del trabajo

Para el presente estudio se utilizaron levaduras pertenecientes al cepario de la cátedra de Enología y de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo, conformada durante estudios anteriores (Formento y col., 2011; Sánchez, 2010; Formento y col., 2009; Díaz Peralta y col., 2007; Formento y col., 2006; Díaz Peralta, 2002). Dicha colección está conformada por 445 levaduras vínicas provenientes de departamentos de importancia vitivinícola de la provincia de Mendoza como: Luján de Cuyo, Tupungato, Maipú, San Martín, Junín y Rivadavia. Las mismas fueron aisladas al final de fermentaciones espontáneas y se encuentran ya descriptas según:

❖ *Características fenotípicas generales*: formación de esporas y crecimiento en agar lisina.

❖ *Características fenotípicas de importancia tecnológica*: formación de película, anillo o sedimento, resistencia al alcohol, resistencia al SO₂, cinéticas de fermentación, formación de espuma, formación de ácido a partir de la glucosa, producción de H₂S, actividad β-glucosidasa (Bernardi, 2013).

Del total de cepas se seleccionaron 56 representantes de las cuales 8 pertenecían al departamento de Luján de Cuyo, 17 a Maipú, 7 a Rivadavia, 7 a San Martín, 8 a Junín y 10 a Tupungato. La denominación de éstas se encuentra detallada en la siguiente tabla:

Tabla 4: Cepas de levaduras vínicas representantes de seis departamentos de importancia vitivinícola de la provincia de Mendoza

Departamento	Nombre de la cepa
Lujan de Cuyo	5, 32, 61, AAP, CPTP, AALA, PGP, 20
Maipú	216.5, 226.2, 204.3, 202.2, 218.1, 203.3, 206.5, 225.3, 205.5, 203.4, 204.2, 207.5, 209.5, 214.3, 216.4, 215.1, 222.5
Rivadavia	811.5, 818.3, 819.5, 812.2, 814.3, 805.3, 816.1
San Martin	115.5, 130.3, 113.4, 102.2, 107.1, 116.5, Y107
Junín	510.5, 504.5, 501.6, 518.3, 524.5, 530.5, 512.4, 527.4
Tupungato	1.1, 14.2, 10.2, 17.1, 17.2, 17.3, 17.4, 15.2, 11.1, 12.2

Además se incluyeron como microorganismos de referencia 12 cepas de levaduras comerciales identificadas como: A, B, C, D, E, F, G, J, K, L, N, O.

Todos los individuos en estudio se encontraban bajo condiciones de mantenimiento en glicerol al 20% (v/v) a una temperatura de -18°C.

2. Diferenciación intraespecífica de *Saccharomyces cerevisiae*

De acuerdo a la caracterización fenotípica previamente realizada (Bernardi, 2013), los individuos fueron identificados presuntivamente como *Saccharomyces spp.* Para la confirmación del género se siguieron los criterios propuestos por Legrás y Karst (2003), considerándose que las levaduras que presentaron amplificación por PCR Interdelta pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se procedió según se detalla a continuación.

2.1 Extracción de ADN genómico total

Para la extracción de ADN se utilizó la técnica de Hoffman y Winston, (1987) modificada que se describe a continuación:

La activación de células de *Saccharomyces* se realizó cultivando a éstas en 10 ml de medio de cultivo YPD líquido (extracto de levadura 1 % P/v, peptona 2 % P/v, glucosa 2% P/v) e incubando a 28° C durante 24 h. Las células recolectadas por centrifugación (2500-3000 rpm durante 5 minutos) se sometieron a lisis celular con el agregado de 200 µl de solución 1 (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl pH 8 10 mM, EDTA Na pH 8 1 mM) y de perlas de vidrio (diámetro 0,45 – 0,52 mm) para la ruptura mecánica de las células. A continuación el ADN genómico fue extraído y purificado con el agregado de 200 µl fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) para precipitar proteínas e impurezas celulares y 200 µl de solución TE (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA Na 1 mM pH 8) para mantener en solución los ácidos nucleicos. A continuación se centrifugó, se recuperó la fase acuosa y se agregó 1 ml de etanol 100% (-20°C) para precipitar los ácidos nucleicos. Luego se mezcló por inversión y centrifugó (13000 rpm durante 2 minutos) eliminándose el sobrenadante. En el siguiente paso se resuspendieron los ácidos nucleicos en 100 µl TE y se agregó 2 µl RNasa para digerir el ARN, incubándose a 37° C 1 - 4 h. Posteriormente se agregó 4 µl NH₄CH₃COO y 1 ml etanol 100% (-20°C) para precipitar el ADN que luego se lavó con etanol al 70% (-20°C). Por último se centrifugó (13000 rpm durante 2 minutos) se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. Los ácidos nucleicos fueron resuspendidos en 50 µl de TE y conservados a -20°C.

La calidad del ADN obtenido se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% en TBE 0.5 X (Ac. Bórico 0.9 Mm, Tris HCl 0.9 mM, EDTA Na pH 8 2 mM) con Bromuro de etidio sometidos durante 60 minutos a 90 V. Las imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en

fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK).

2.2 Reacción PCR Interdelta

Se utilizó para la diferenciación intraespecífica de las cepas previamente identificadas como *Saccharomyces spp* la metodología PCR Interdelta (Legras y Karst, 2003). Cada reacción de amplificación PCR se llevó a cabo en un volumen final de 30 μ l con los siguientes componentes: 3 μ l del primer δ 12 (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3') 15 μ M, 3 μ l del primer δ 21 (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3') 15 μ M, 3 μ l dNTP's 2 mM, 3 μ l buffer 10x con $MgCl_2$, 1.5 μ l de $MgCl_2$ 50Mm, 0.5 μ l Taq Polimerasa 5U/ μ l, 5 μ l de ADN (250 ng) y 11 μ l de agua bidestilada para completar el volumen final. Para esto se utilizó el termociclador Ependorf AG 22331 , cuyos pasos programados de PCR (Interdelta) Incluyen:

- 1) Desnaturalización inicial: 95°C durante 4 minutos;
- 2) Desnaturalización: 95°C durante 0,3 minutos;
- 3) Hibridación: 46°C durante 0,3 minutos;
- 4) Extensión: 72°C durante 1,3 minutos;
- 5) Repetición de los pasos 2, 3 y 4: 35 ciclos;
- 6) Extensión final: 72°C durante 10 minutos.

Los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2% en TBE 0.5 X (Ac. Bórico 0.9 Mm, Tris HCl 0.9 mM, EDTA Na pH 8 2 mM) con Bromuro de etidio sometidos durante una hora a 90 V. Las imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK).

2.3 Extracción enzimática de ADN total de levaduras

Para la detección de polimorfismos de ADNmit se utilizó la técnica descrita por Sherman y col. (1986) y adaptada por Querol y col., (1992) que incluye los siguientes pasos:

La activación de levaduras se realizó en medio YPD líquido (extracto de levadura 1 % P/v , peptona 2% P/v , glucosa 2 % P/v) a 28° C durante 24 h. Las células se lavaron y centrifugaron. Para la ruptura de la

pared se adicionó solución Buffer 1Q (sorbitol 1 M, EDTA Na 0,1 M a pH 8) y enzima zymoliasa y se incubó a 37° C. Los esferoplastos obtenidos se resuspendieron en solución buffer 2Q (0,5 ml de 50 mM de Tris-HCl, 20 mM de EDTA a pH 7,4). Se añadieron 0,05 ml de 10% SDS, y la mezcla se incubó a 65°C durante 30 min para lograr la ruptura de la membrana celular. El siguiente paso fue la adición de acetato de potasio 5M en frio para ayudar a la precipitación de proteínas e impurezas celulares. A continuación luego de centrifugación a baja temperatura, se recolectó el sobrenadante para eliminar las impurezas y se agregó un volumen de isopropanol para ayudar a la precipitación del ADN. Luego para lograr el lavado del ADN se adicionó etanol al 70% para eliminar impurezas de reactivos o restos celulares que son solubles en alcohol a diferencia del ADN que no lo es. Como etapa final se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en agua miliQ estéril para conservarse a -20° C.

2.4 Diferenciación intraespecífica de *S. cerevisiae* por RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial

Se procedió según Querol y col., (1992) a partir del ADN extraído enzimáticamente, se realizó la digestión con la enzima *Hinf* I a 37° C durante 20 h. Los productos de la digestión fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % en TBE 0.5 X (Ac. Bórico 0.9 Mm, Tris HCl 0.9 mM, EDTA Na pH 8 2 mM) con Bromuro de etidio sometidos durante 2,5 h a 60 V. Las imágenes fueron captadas al exponer los geles a transiluminador de UV en fotodocumentador con cámara CCD acoplada y analizadas con el software Gel Doc XR (Bio Rad Laboratorios Limited, Hemel Hempstead, UK).

2.5 Análisis de datos

Los perfiles de bandas obtenidos se analizaron visualmente y según las similitudes entre éstas se determinaron los diferentes patrones tanto para la diferenciación intraespecífica PCR Interdelta como para RFLP del ADN mitocondrial. Para llevar a cabo esta comparación se utilizó un patrón de peso molecular 100 pb. (Fig. 6)

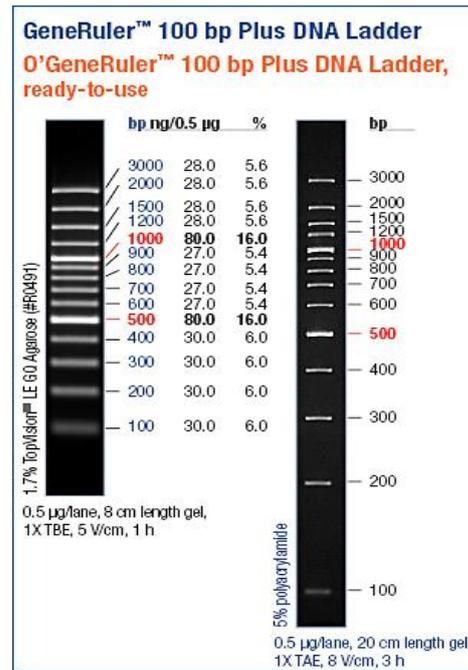


Figura 6: Patrón de peso molecular 100 pb Invitrogen.

Para los patrones obtenidos por PCR interdelta se elaboró una matriz de perfiles integrando en la misma la totalidad de bandas encontradas para todos los individuos analizados de modo de poder compararlos entre sí y determinar qué aislados produjeron el mismo patrón. A continuación se estimaron visualmente los tamaños de banda mediante comparación con el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). Luego de lo cual se obtuvieron matrices de presencia/ausencia para cada patrón molecular considerando el total de bandas encontradas, indicando con código 1 la presencia de banda y con 0 la ausencia. La similitud entre patrones de amplificación se calculó aplicando el coeficiente de Dice y los agrupamientos se realizaron utilizando el método UPGMA (Sokal y Michener, 1958), mediante el uso del paquete informático NTSYS 2.10t (Applied Biostatistics Inc.).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contar con información sobre las levaduras nativas que conforman una colección de microorganismos, es de suma importancia ya que éstas podrían seleccionarse como iniciadoras de las fermentaciones vínicas para obtener un producto diferenciado. Fermentar con levaduras autóctonas, adaptadas a su medio ambiente y a las características de los mostos locales, permite aunar los conceptos de fermentación natural y control de proceso, aumentando la posibilidad de obtener un producto netamente personalizado (Vazquez y col., 2005). Por otro lado, es posible destacar características típicas de una zona vitivinícola, y resaltar lo que en el mundo del vino se conoce con el término de Terroir, que engloba dentro de otras cosas, la presencia de ecosistemas microbianos específicos en los distintos viñedos de las diferentes zonas vitícolas del mundo (Díaz Quirós, 2014).

Con el fin de completar la información disponible en la base de datos de la colección de levaduras vínicas de la FCA UNCuyo, en el presente trabajo se caracterizó molecularmente los representantes de los diferentes grupos de cepas *S. cerevisiae* que integran la misma. Estos individuos estaban previamente descritos por un conjunto de caracteres fenotípicos y tecnológicos (Bernardi, 2013).



Colonias de *S. Cerevisiae* en agar WL

En primer lugar se presentan los perfiles obtenidos del análisis intraespecífico interdelta utilizado para lograr la diferenciación entre cepas. A continuación se agrupan los mencionados patrones de bandas interdelta según las similitudes que estos presentan mediante la construcción de un dendrograma. Como siguiente paso se realiza un análisis de los principales patrones interdelta obtenidos según sus características fenotípicas y tecnológicas para corroborar si esta similitud también se corresponde en su comportamiento al momento de ser utilizadas en fermentaciones. Luego, se exponen los resultados de un estudio comparativo entre los principales patrones interdelta encontrados y patrones de cepas comerciales de levaduras. Se continúa con la presentación de resultados del marcador mitocondrial para confirmar semejanzas entre cepas que presentaron idéntico patrón interdelta, ya sea dentro o entre las diferentes

zonas analizadas. Finalmente se concluye con respecto a la totalidad de la colección con un análisis sobre la biodiversidad que ésta presenta.

1. Diferenciación intraespecífica de *Saccharomyces cerevisiae* por PCR Interdelta.

El resultado del análisis está basado en la comparación visual del perfil de bandas que presenta cada cepa de levadura analizada al que se denomina patrón interdelta. Mientras mayor sea la coincidencia en cantidad de bandas y tamaño que éstas presenten, mayor similitud habrá entre individuos. Perfiles iguales nos indicaría presuntivamente que estamos frente a una misma cepa. La cantidad de bandas expresadas nos indica el polimorfismo en cada individuo analizado, mientras más polimórfico este se presente, mayores puntos de comparación tendremos.

Para un total de 56 cepas analizadas se encontraron 39 patrones diferentes según esta técnica. La identificación asignada a cada cepa se muestra en la Tabla 5. Se detectaron similitudes entre algunas cepas, es decir, individuos que presentaron idéntico perfil de bandas (Tabla 5), aun cuando fenotípicamente habían sido previamente considerados como diferentes (Bernardi, 2013). Los patrones se fueron numerando correlativamente en función de diferencias detectadas, como se indicó previamente, en el número y tamaño de bandas. Los patrones que agruparon diferentes aislados fueron, el patrón N° 1 correspondiente a 5 cepas del departamento de Tupungato, el patrón N°6 correspondiente a 11 cepas pertenecientes a los departamentos de Lujan, Maipú, Junín, Rivadavia y San Martín; el patrón N° 11 que reunió una cepa del departamento de Junín y a otra de Luján; el patrón N° 31 que correspondió a 2 cepas del departamento de Rivadavia, y finalmente el patrón N°35 asignado a dos cepas de San Martín. Para las demás levaduras analizadas se obtuvieron patrones únicos.

Tabla 5: Cepas pertenecientes a la colección de levaduras vínicas de la FCA UNCuyo aisladas de diferentes departamentos de Mendoza y analizadas por PCR interdelta

Zona	Total de cepas	N° de patrones	Patrón Interdelta	Código de cepas que corresponde a cada patrón
Tupungato	9	5	1	17.2; 17.3; 17.4; 15.2; 11.1
			2	1.1
			3	10.1
			4	14.2
			5	17.1
Luján	8	8	6	AALA
			7	5
			8	32
			9	61
			10	AAP
			11	CPTP
			12	PGP
			13	20
Maipú	17	13	6	202.2; 204.2; 204.3; 206.5; 207.5
			14	216.5
			15	226.2
			16	218.1
			17	203.3
			18	225.3
			19	205.5
			20	203.4
			21	209.5
			22	214.3
			23	216.4
			24	215.1
			25	222.5
Junín	8	6	6	501.6; 518.3; 530.5
			26	504.5
			27	510.5
			28	512.4
			11	524.5
			29	527.4
Rivadavia	7	6	6	805.3
			30	811.5
			31	818.3; 814.3
			32	819.5
			33	812.2
			31	814.3
			34	816.1
San Martín	7	6	6	102.2
			35	115.5; 103.3
			36	116.5
			37	107.1
			38	113.4
			39	Y 107

1.1. Patrones interdelta obtenidos por departamento

A continuación se muestran algunos de los geles de agarosa revelados con luz UV para visualizar el patrón de bandas de cepas originarias de diferentes departamentos de Mendoza.

En la figura 7 se observan los patrones obtenidos para las cepas 17.4, 11.1, y 17.1 del departamento de Tupungato. Para este grupo se observó un total de 5 patrones diferentes (sólo dos se muestran en la figura). Como podemos ver dos de estos individuos presentan idéntico perfil de bandas, por ello responden a un mismo patrón.

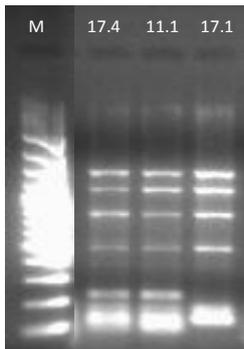
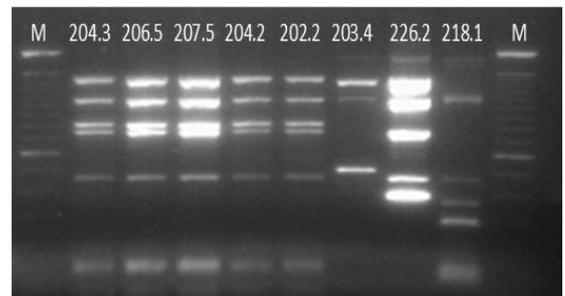


Figura 7: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona Tupungato. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).

En la figura 8 se visualizan algunos de los 13 patrones obtenidos para el departamento de Maipú. Al igual que en el caso anterior vemos que algunas cepas responden a un idéntico perfil de bandas (204.3, 206.5, 207.5, 204.2, 202.2) y otras que son totalmente diferentes a este y entre sí, como por ejemplo la cepa identificada 203.4, 226.2 y 218.1.

Figura 8: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona Maipú. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).



Para el departamento de Junín se encontraron 6 patrones diferentes. A uno de ellos se correspondieron tres individuos denominados 501.6, 518.3 y 530.5, los cuales pueden observarse en la figura 9.

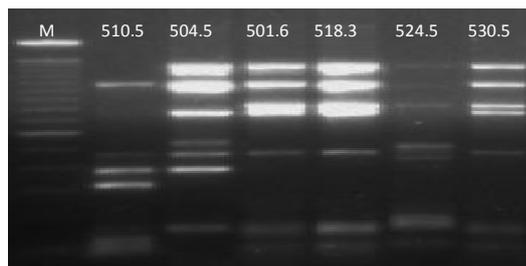


Figura 9: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona Junín. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).

En el caso del departamento de Luján todos los individuos analizados presentaron diferencias en su perfil de bandas. Se observaron un total de 8 patrones. Además una levadura aislada en esta zona, la cepa denominada 20, fue la menos polimórfica entre las 56 analizadas mostrando sólo dos bandas bien definidas (Figura 10).

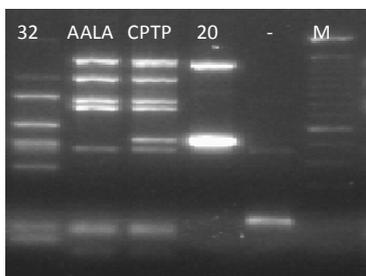


Figura 10: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona Luján. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5). Control negativo: -

En las figuras 11 y 12 se observan algunos de los patrones obtenidos para los departamentos de Rivadavia y San Martín, respectivamente. En ambos casos se obtuvo un par de cepas idénticas en su perfil de bandas, la denominada 813.3 y 814.3 del departamento de Rivadavia (Figura 11), asignadas al patrón N° 31 y la 115.1 y 103.3 del departamento de San Martín (Figura 12) al cual se le asignó el patrón N° 35 interdelta. Los restantes individuos presentaron perfiles distintos a estos mencionados y distintos entre sí resultando un total de 6 patrones para cada una de estas zonas.

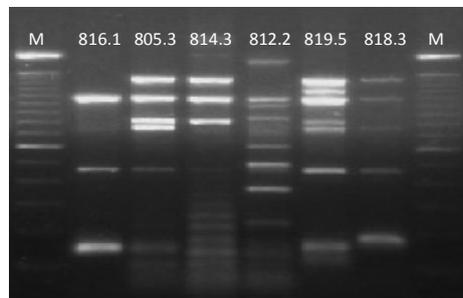


Figura 11: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona de Rivadavia. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).

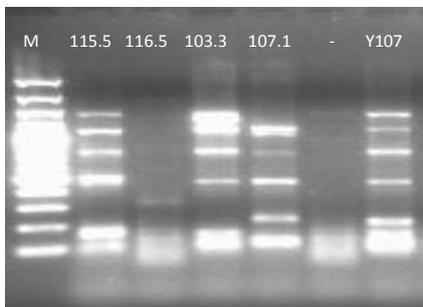


Figura 12: Gel de agarosa correspondiente a perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* de la zona de San Martín. M: marcador molecular 100 pb. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5). Control negativo: -

1.2. Agrupamiento de patrones interdelta - Dendrograma

Se realizó el agrupamiento de los patrones PCR interdelta obtenidos para todas las cepas analizadas mediante la construcción de un dendrograma utilizando la metodología UPGMA (Figura 13). La finalidad de este análisis fue visualizar cómo se relacionan y/o agrupan la totalidad de los individuos analizados en base a las semejanzas en sus perfiles de bandas obtenidos con esta herramienta molecular.

Se observó el agrupamiento de todas las cepas en dos grandes grupos con una similitud baja entre ellos, inferior al 30%. Dentro de esta división además se observaron 5 patrones principales, de éstos los que agrupan mayor cantidad de individuos, por tanto los más destacados, respondieron al patrón N°1 interdelta el cual presenta un porcentaje de similitud del 100 % entre las cepas que lo conforman, y al patrón N°6 interdelta el cual también presenta un porcentaje de similitud del 100 % entre ellas. Además estos dos patrones se mostraron muy diferentes entre sí integrando cada uno un grupo distinto de los previamente mencionados.

Los 3 restantes patrones que agruparon más de un individuo también presentaron 100 % de correspondencia entre los pares de cepas que los conforman. Un par de estas cepas provienen de distinta zona, como Junín y Lujan y se agruparon con el nombre patrón interdelta N° 11. Otro par de cepas de la misma zona, Rivadavia, se le asignó la identificación patrón N°31 interdelta y el último par también de una misma zona, San Martín, recibe el nombre de patrón interdelta N° 35.

Tanto el patrón interdelta N°1 como el N° 31 y el N°35 comparten la característica de estar conformados por levaduras aisladas de una misma zona respectivamente (Tupungato, Rivadavia y San Martín). Es importante destacar que en cada caso las cepas fueron tomadas en momentos diferentes, lo que podría indicar que parte de la población de levaduras presente en estos viñedos perdura en el tiempo. Varios estudios científicos en distintas regiones enológicas del mundo, confirman que si bien hay una parte de la microbiota autóctona de levaduras que varía año tras año, de acuerdo con distintos factores climáticos, existe una parte de la población, incluso a nivel de cepas, que permanece asentada en dichas regiones (Versavaud y col., 1995; Nadal y col., 1996; Torija y col., 2001). Estas especies y cepas están evidentemente adaptadas, desde el punto de vista ecológico, a un micro-hábitat determinado tanto por los factores físicos como biológicos (Vazquez y col., 2005)

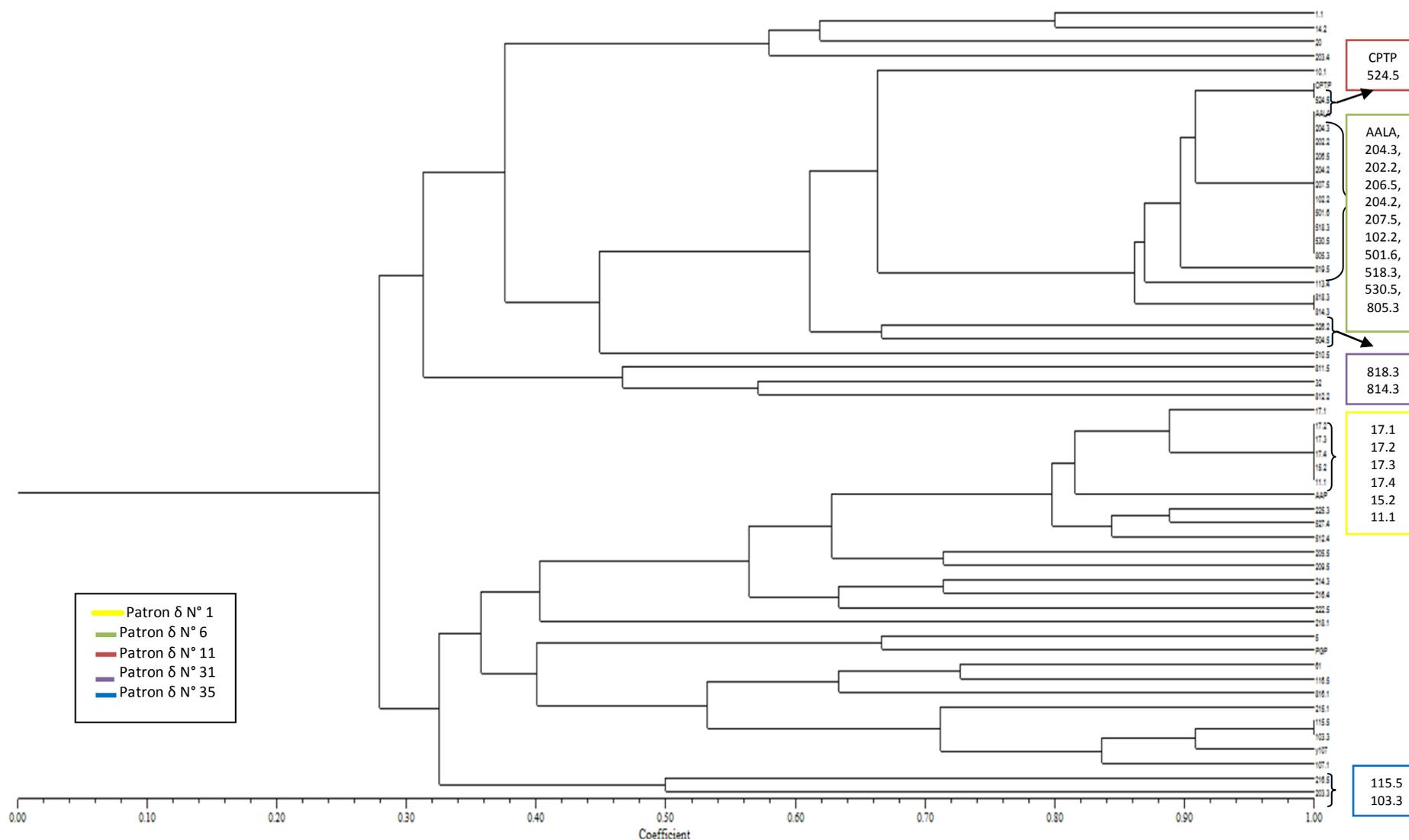


Figura 13: Dendrograma que muestra los agrupamientos por similitud (coeficiente de DICE) de los perfiles obtenidos mediante la técnica de diferenciación intraespecífica para *S. cerevisiae* PCR Interdelta para las 56 cepas analizadas.

1.3. Análisis de los principales patrones obtenidos

A continuación se presenta un análisis de cada uno de los cinco principales patrones interdelta encontrados. Se muestran los geles de agarosa revelados con luz UV para visualizar los perfiles de bandas obtenidos. También se analiza esta similitud encontrada a nivel molecular entre cepas con respecto a las características fenotípicas generales y de importancia tecnológica que presentó cada individuo para poder comparar si su comportamiento también es similar a este nivel.

En la figura 14 observamos el perfil de bandas obtenido para el patrón interdelta N°1. Vemos que son 5 los individuos identificados como 11.1, 15.2, 17.2, 17.3 y 17.4 los que responden a este patrón molecular. Por otro lado en la tabla 6 se muestra el resultado de las características fenotípicas de estas cepas (Bernardi, 2013).

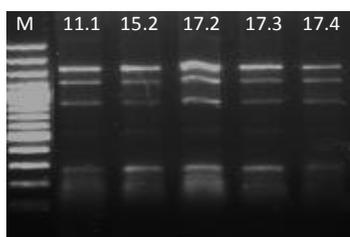


Figura 14: Gel de agarosa correspondiente a patrones de amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* pertenecientes al cepario de FCA-UNCuyo que presentaron Patrón 1. M: marcador molecular 100 pb.

Tabla 6: Características fenotípicas generales y de importancia tecnológica que presentaron las cepas correspondientes al patrón N° 1 PCR interdelta.

Código Cepa	Formación			Resistencia		Factor Killer	Formación de ácido	Producción de SH ₂	Actividad βglucosidasa
	sedimento	película y/o anillo	Espuma (mm)	etanol (v/v)	SO ₂ (ppm)				
11.1	SI	NO	> 4	15%	300	Neutra	Trazas	Trazas	+
15.2	SI	NO	2 – 4	15%	300	Killer	Trazas	Trazas	+
17.2	SI	NO	> 4	10%	200	Killer	Trazas	Trazas	+
17.3	SI	NO	2 – 4	15%	100	Killer	Trazas	Trazas	+
17.4	SI	NO	2 – 4	10%	300	Killer	Trazas	Trazas	+

Origen: Tupungato. Fecha de extracción: Año 2000

De acuerdo a lo indicado en la Tabla 6, las levaduras que presentaron patrón N° 1 tuvieron un origen común; es decir que todas ellas fueron extraídas de la zona de Tupungato, coincidiendo además la fecha de extracción de las muestras en todos los casos. Según el análisis de sus características cualitativas, estas cepas no presentaron diferencias muy marcadas entre sí, todas exhibieron formación de sedimento y ninguna fue positiva para la formación de película o anillo; solo las cepas 11.1 y 17.2 presentaron la característica de formar espuma mayor a 4 mm mientras que en las demás la formación de ésta fue de 2-4 mm; todas presentaron resistencia hasta 15 % de alcohol excepto 17.2 y 17.4 las que sólo resistieron hasta 10%. Con respecto a la resistencia al SO₂ solo 17.3 resistió 100 ppm y las demás presentan una resistencia de hasta 300 ppm. Según el análisis del resto de sus características cualitativas, formación de ácido a partir de la glucosa, producción de H₂S y actividad β-glucosidasa no se observaron diferencias entre las cepas que

responden al patrón N°1. Por lo tanto, las similitudes puestas de manifiesto con el perfil de bandas según la técnica de análisis interdelta, en general concuerdan con aquellas observadas en sus características tecnológicas y cualitativas.

En la figura N°15 se observan cepas provenientes de diferentes departamentos (Maipú, Junin y Rivadavia) pero que presentaron idéntico patrón interdelta. Por tanto son 11 individuos, identificados como: AALA, 204.3, 202.2, 206.5, 204.2, 207.5, 805.3, 102.2, 501.6, 518.3, 530.5, que responden a un mismo perfil de bandas el cual fue designado como patrón 6 interdelta.

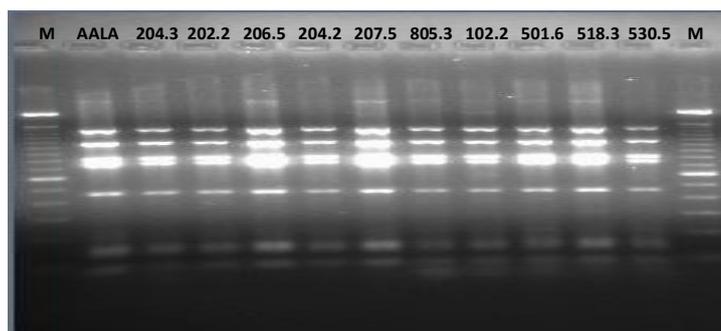


Figura 15: Gel de agarosa correspondiente a patrones de amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* pertenecientes al cepario de FCA-UNCuyo que presentaron Patrón 6. M: marcador molecular 100 pb.

En la siguiente tabla se presentan los resultados de los estudios fenotípicos de los individuos agrupados dentro del patrón interdelta 6.

Tabla 7: Características fenotípicas generales y de importancia tecnológica de los aislados que responden al patrón N° 6 PCR interdelta.

Código Cepa	Origen	Fecha de extracción	Formación		Resistencia		Factor Killer	Formación de ácido	Producción de SH ₂	Actividad β glucosidasa
			Película y/o anillo	Espuma (mm)	etanol (v/v)	SO ₂ (ppm)				
AALA	L	1999	no	≤ 2	15%	100	Sensible	Trazas	Baja	-
202.2	M	2002	no	≤ 2	15%	300	Neutra	Trazas	Media	+
204.2	M	2002	no	≤ 2	5%	100	Neutra	Media	Media	-
204.3	M	2002	no	≤ 2	15%	100	Neutra	Media	Media	-
206.5	M	2002	no	≤ 2	10%	200	Neutra	Trazas	Media	+
207.5	M	2002	no	2-4	15%	200	Sensible	Trazas	Baja	+
805-3	R	2010	si	≤ 2	5%	200	Killer	Trazas	Alta	-
102-2	J	2010	si	≤ 2	5%	200	Neutra	Baja	Alta	-
501-6	J	2005	si	≤ 2	15%	200	Neutra	Trazas	Media	-
518-3	J	2005	si	≤ 2	5%	100	Neutra	Trazas	Baja	-
530-5	J	2005	no	≤ 2	15%	200	Neutra	Baja	Alta	-

Luján de Cuyo: L; Maipú: M; Rivadavia: R; Junín: J.; Todas las cepas formaron sedimento.

Con respecto a estas cepas que presentaron el patrón 6, podemos decir que provienen de diferentes zonas geográficas, se extrajeron en distintos momentos y a partir de diferentes variedades de uvas. Según el análisis de sus características tecnológicas ninguna de estas once cepas formó espuma, a excepción de la 207.5, pero si sedimento y presentaron variable resistencia al etanol. La resistencia a SO₂ fue en su mayoría no mayor a 200 ppm. Por otro lado la producción de sulfhídrico fue muy variable entre las distintas cepas analizadas. Con respecto al carácter killer predominaron las cepas neutras. Según el análisis de los individuos mostrados en la Tabla 7 se encontraron muchas variantes pero algunas como la cepa 202.2 resultan interesantes por reunir buenas características para ser utilizada enológica.

A continuación en la figura 16 se muestran las coincidencias entre los perfiles de bandas de una cepa del departamento de Lujan denominada, CPTP, y otra de Junín denominada 524.5; estos dos individuos se corresponden con el patrón interdelta N°11. Es decir, que cepas aisladas o provenientes de diferentes lugares presentaron idénticos perfiles de bandas; por tanto podemos decir que es posible detectar levaduras iguales en distintos lugares de importancia vitivinícola de la provincia de Mendoza.

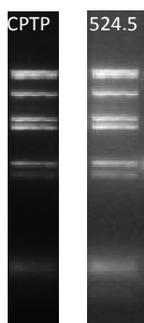


Figura 16: Perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* que responden al patrón 11 interdelta. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 1).

Los perfiles mostrados provienen de distintos geles de agarosa pero comparados con un mismo marcador molecular 100 pb.

Tabla 8: Características fenotípicas generales y de importancia tecnológica de los aislados que responden al patrón N° 11 PCR interdelta.

Código Cepa	Origen	Fecha de extracción	Formación			Resistencia		Factor Killer	Formación de ácido	Producción de SH ₂	Actividad β glucosidasa
			sedimento	Película y/o anillo	Espuma (mm)	etanol (v/v)	SO ₂ (ppm)				
CPTP	L	1999	si	no	≤ 2	5%	300	Neutra	Trazas	Trazas	-
524.5	J	2005	si	no	≤ 2	15%	200	Neutra	Trazas	Baja	+

Contrariamente, y al analizar los datos fenotípicos entre estas levaduras (tabla 8), se observan algunas discrepancias entre estos individuos. En principio ambas fueron extraídas en diferentes momentos y lugares; la cepa del departamento de Junín presentó mayor resistencia al etanol pero menor resistencia al SO₂. Por otro lado la cepa denominada 524.5 si presenta actividad β-glucosidasa y CPTP no desarrolla esta característica. Por lo tanto, las similitudes puestas de manifiesto a nivel molecular no concuerdan con aquellas observadas en sus características tecnológicas y cualitativas.

La figura 17 nos muestra el perfil de banda obtenido para las cepas 818.3 y 814.3, ambas responden al patrón 31 interdelta.

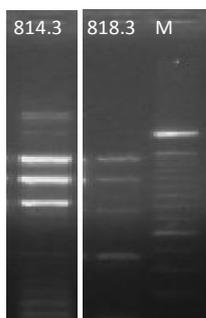


Figura 17: Perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* que responden al patrón 31 interdelta. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).

Tabla 9: Características fenotípicas generales y de importancia tecnológica de los aislados que responden al patrón N° 31 PCR interdelta.

Código Cepa	Origen	Fecha de extracción	Formación			Resistencia		Factor Killer	Formación de ácido	Producción de SH ₂	Actividad β glucosidasa
			sedimento	Película y/o anillo	Espuma (mm)	etanol (v/v)	SO ₂ (ppm)				
818.3	R	2010	si	no	≤ 2	10%	300	Neutra	Trazas	Baja	+
814.3	R	2010	si	no	2-4	10%	300	Neutra	Trazas	Baja	+

Según lo observado en la tabla anterior, podemos concluir que no hay diferencias sustanciales entre estos individuos con respecto a las características tecnológicas y cualitativas que estos presentaron. Además, y debido a que estas levaduras provienen de la misma zona y extraídas en momentos similares podemos afirmar que estamos frente a un mismo individuo coincidiendo con lo analizado con la técnica de PCR interdelta.

La Figura 18 nos muestra dos cepas de levaduras (115.5 y 103.3) que se corresponden con el patrón 35 interdelta por el perfil de bandas que presentaron. Ambos individuos fueron aislados de la zona de Rivadavia

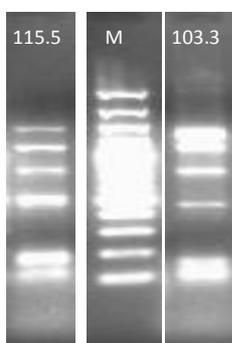


Figura 18: Perfiles obtenidos por amplificación PCR interdelta de *S. cerevisiae* que responden al patrón 35 interdelta. Los números de las calles corresponden a los códigos de cepas (Tabla 5).

Los perfiles mostrados provienen de un mismo gel de agarosa y comparados con un mismo marcador molecular 100 pb.

Tabla 10: Características fenotípicas generales y de importancia tecnológica de los aislados que responden al patrón N° 35 PCR interdelta.

Código Cepa	Origen	Fecha de extracción	Formación			Resistencia		Factor Killer	Formación de ácido	Producción de SH ₂	Actividad β glucosidasa
			sedimento	Película y/o anillo	Espuma (mm)	etanol (v/v)	SO ₂ (ppm)				
103.3	SM	2010	si	no	≤ 2	10%	100	Neutra	Trazas	Media	+
115.5	SM	2010	si	no	≤ 2	10%	100	Neutra	Trazas	Baja	+

Entre estas cepas se observa una mínima diferencia fenotípica en cuanto a la producción de SH₂ aunque coinciden en el resto de los descriptores (Tabla 10). Esto nos indica, como en los casos anteriores, que hay similitud tanto nivel fenotípico como molecular. Cabe destacar que es probable que nos estemos refiriendo a un mismo individuo ya que fueron aislados de una misma zona y en un mismo momento de muestreo.

Según los resultados derivados del análisis de los principales patrones interdelta obtenidos se observó que tanto para el patrón 6 como para el patrón 11 interdelta, se encontraron algunas diferencias en sus características fenotípicas y tecnológicas a pesar de que a nivel molecular estas cepas se presentan como un mismo individuo. Esto podría explicarse por la dependencia que existe con las condiciones de cultivo y la propiedad específica de inestabilidad fisiológica que presentan las cepas del grupo de *Saccharomyces* en sentido estricto (Ribéreau-Gayon, 2003; Rossini y col., 1982).

De aquí lo relevante de la aplicación de técnicas moleculares en el estudio de identificación de microorganismos. El mantenimiento de las colecciones de cultivos microbianos es costoso tanto en recursos materiales como humanos, por ello la importancia de preservar los recursos genéticos sin duplicar información.

Con respecto a los restantes patrones (1, 31 y 35) según este análisis podemos concluir que estamos en presencia de un mismo individuo por departamento.

1.4. Comparación con cepas comerciales

Teniendo en cuenta que las cepas utilizadas en este estudio fueron tomadas de fermentaciones espontáneas provenientes de distintas zonas vitivinícolas donde hay presencia de bodegas con fines comerciales es probable que puedan encontrarse en estos ambientes cepas seleccionadas comerciales previamente utilizadas por las bodegas de la zona (Valero y col., 2005; Mercado y col., 2011). Por ello se realizó una comparación visual de diferentes patrones obtenidos, con la misma técnica de diferenciación

intraespecífica para *S. cerevisiae* PCR Interdelta (Legras y Karst, 2003), de cepas comerciales como se muestra en la figura 19.

Visualmente pudo verificarse que el patrón N°6 interdelta se correspondió con una cepa comercial denominada D en este trabajo. Lo mismo pudo observarse para el patrón interdelta N°11 que presenta similitud en su perfil de bandas con otra cepa comercial denominada G (figura 19). Esto indica que a pesar que los individuos fueron aislados de mostos en fermentación espontánea podrían formar parte de aquellas levaduras que se reintrodujeron nuevamente a la microbiota del viñedo a partir de su uso en bodega. Estudios anteriores realizados en la ZARM (Zona Alta del Río Mendoza) mostraron la presencia de cepas comerciales en diferentes viñedos de esta región (Mercado y col. 2009) lo cual plantea la posibilidad de re-aislar este tipo de levaduras a partir de uvas tal como se hizo para la construcción de este cepario.

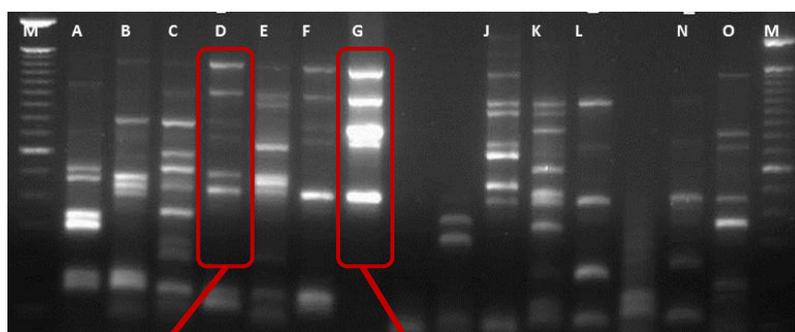


Figura 19: Gel de agarosa correspondiente a patrones de amplificación PCR interdelta pertenecientes a cepas comerciales de *S. cerevisiae*. M: marcador molecular 100 pb. Las letras de las calles corresponden a los códigos de cepas comerciales.

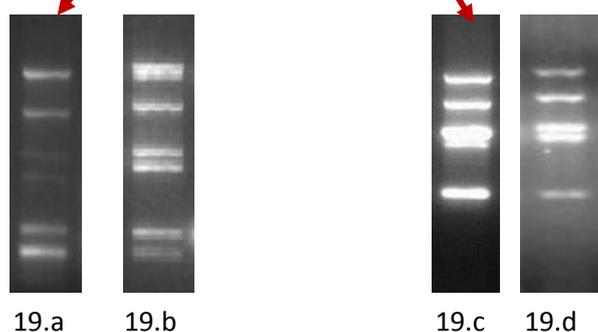


Figura 19.a y 19.c: Perfiles de patrones comerciales
Figura 19.b: Patrón N°6 interdelta
Figura 19.d: Patrón N° 11 interdelta

Frente a esta situación surge la imperiosa necesidad de proseguir con una identificación de todos los individuos del cepario ya que es posible estar manteniendo cepas comerciales que son consideradas como nativas en esta colección de microorganismos.

Es interesante destacar que en cinco de las seis zonas estudiadas se encontraron cepas que coinciden con patrones comerciales, posiblemente por encontrarse en zonas con bodegas que utilizan fermentaciones inoculadas. Resulta evidente a partir de este resultado y otros estudios realizados en

viñedos de Mendoza, que las bodegas locales no realizarían un manejo adecuado de sus efluentes y desechos posibilitando que levaduras usadas masivamente en las bodegas en la etapa de vendimia lleguen a los viñedos con diferentes impactos (Díaz Quiros, 2014, Mercado y col., 2011).

2. Diferenciación intraespecífica de *S. cerevisiae* por RFLP (polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) del ADN mitocondrial

Los patrones interdelta N°1 y N°6 agruparon un mayor número de individuos y por ello se los consideró los más importantes dentro de los 39 patrones encontrados en este estudio. Con el propósito de confirmar si efectivamente las levaduras que presentan esta similitud corresponden a una misma cepa, se realizó un nuevo análisis intraespecífico aplicando otro marcador molecular: se estudió el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP del ADN mitocondrial) según los protocolos propuestos por Querol y col. (1992). Esta técnica además de ser sumamente sencilla ha sido utilizada por numerosos autores quienes han demostrado que es un método eficiente para la diferenciación a nivel de cepa (Querol y col., 1992; Schüller y col. 2004; Fernandez Espinar y col., 2001; Guillamón y col., 1996, Blanco y col., 2012, Mercado y col., 2010). En la figura 20 se muestran los resultados de los perfiles mitocondriales obtenidos para las cepas que formaban parte de los patrones 6 y 11 interdelta.

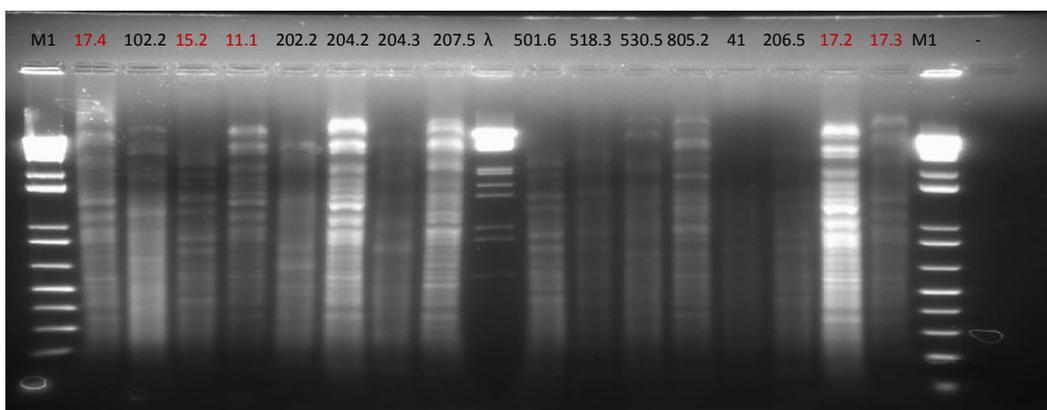


Figura 20: Patrones de restricción por RFLP ADN mitocondrial de cepas con idéntico perfil PCR interdelta (en rojo patrón 1, en negro patrón 6). M1: marcador molecular 1Kb. M2: λ marcador molecular 100 pb.

Según la comparación visual de los patrones de bandas obtenidos se encontraron diferencias dentro de las cepas que respondían al patrón 1 y patrón 6 con el análisis interdelta. Con esta nueva técnica se diferenciaron 10 nuevos patrones identificados desde I a X (Tabla 11).

Tabla 11: Cepas analizadas con dos marcadores moleculares utilizando PCR interdelta y RFLP del ADN mitocondrial.

Patrón Mitocondrial	Patrón Interδ 1	Patrón Interδ 6
I	15.2	501.6
II	11.1	204.2
	17.2	207.5
III	17.3	
	17.4	
IV		102.2
V		202.2
VI		204.3
VII		518.3
VIII		530.5
IX		805.2
X		206.5

Las cepas 17.3 y 17.4, pertenecientes al departamento de Tupungato mostraron el mismo perfil de bandas por ambas técnicas al igual que las cepas 11.1 y 17.2 del mismo departamento. Idéntica situación se observa en los individuos 204.2 y 207.5 provenientes del departamento de Maipú. En estos tres casos cada par de cepas arrojó una similitud completa en sus perfiles moleculares por lo cual deberían ser considerados como un solo individuo. Estudios previos han demostrado la importancia de combinar distintos marcadores moleculares para la diferenciación de *Saccharomyces cerevisiae* aislados de un mismo ambiente (Schüller y col., 2004; Mercado y col., 2010).

Cabe mencionar que las cepas que fueron analizadas por RFLP del ADNmit correspondían a dos grupos que presentaban perfiles interdelta distintos, resultando luego en esta segunda etapa de análisis la diferenciación de 10 perfiles distintos. De esta manera se corrobora el alto nivel de polimorfismo del ADN mitocondrial tal como se mencionó en estudios previos (Querol y col., 1992; Schuller y col., 2004; Mercado y col., 2010).

Por otro lado se verificó que tanto en el patrón I como en el II mitocondrial se corresponden cepas previamente clasificadas con distintos patrones interdelta, lo que indicaría que estas cepas son similares pero no idénticas, y probablemente comparten un parentesco cercano. Lo mismo sucede con aquellas cepas que presentaron diferentes patrones de restricción mitocondrial (IV a X) las cuales originalmente exhibieron el mismo perfil interdelta.

Según este estudio solo tres pares de cepas responden a similares perfiles de bandas por ambas técnicas indicando una identidad a nivel genético. Esto nos indica que de 56 cepas analizadas solo tres se repiten una vez y las restantes 50 cepas son diferentes entre sí según las técnicas moleculares utilizadas. Además podemos agregar que 11 de 56 individuos analizados no son idénticos pero probablemente comparten un parentesco cercano. Es necesario contar con la mayor cantidad de información posible sobre

esta colección de microorganismos por la importancia tecnológica y económica que ello representa. Es importante seleccionar levaduras ecológicamente pre-adaptadas tanto a las características de una región (por ejemplo clima), como a las peculiaridades de los mostos y el tipo de población natural de levaduras que lo habita.

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

Las técnicas moleculares propuestas en este estudio para la diferenciación intraespecífica de aislados *Saccharomyces cerevisiae*, PCR Interdelta y Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLP del ADNmit), fueron adecuadas para la diferenciación de los integrantes de la colección de levaduras vínicas de la FCA UNCUYO, además demostraron ser técnicas robustas y sencillas, accesibles para un laboratorio básico de microbiología molecular y factibles de ser incorporado en un laboratorio de bodega.

La mayoría de las cepas estudiadas, representativas de los grupos que integran la colección, mostraron ser diferentes entre sí aunque un alto nivel de semejanza se verificó entre aislados que provienen de una misma zona, lo que demuestran estrechos vínculos entre ellas.

Se observó variabilidad entre individuos dentro de cada zona lo que demuestra una amplia biodiversidad de la colección de microorganismos en estudio.

En el presente trabajo se corroboraron discrepancias entre los caracteres fenotípicos y moleculares, lo que incentiva a continuar con la línea de estudio analizando las cepas mediante técnicas más específicas.

Dentro del cepario de levaduras vínicas de la FCA se encuentran individuos que, si bien fueron aislados de fermentaciones espontáneas, responden a perfiles moleculares de levaduras comerciales, las que deberían ser descartadas como autóctonas; en consecuencia es necesario aplicar este tipo de análisis a todos los individuos del cepario para descartar que se estén incluyendo en esta colección individuos que no sean nativos.

La escasa similitud a nivel molecular de algunos individuos *Saccharomyces* integrantes de la colección de levaduras de la FCA UNCUYO respecto a cepas comerciales originarias de otros lugares del mundo permiten postular el carácter nativo de las mismas.

La completa y correcta caracterización de los cultivos microbianos en general y de esta colección de levaduras con fines enológicos en particular, 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 iguales por falta de información.

BIBLIOGRAFÍA

- ALEMÁN, Z.; DÍA, Z.; OLVIDO, E. y ÁLVAREZ, M. 2005. Conservación de microorganismos. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. Vol. 43 N º3.
- ARANDA, A.; MATA LLANA, E.; OLMO, M; 2005. Levaduras *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. En: CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R. y GONZÁLEZ, R. Microbiología del vino. Ed. AMV. Madrid España. p 19-56.
- BAKALINSKY, A. T., y SNOW, R. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 6, 367-382.
- BARNETT, J.A. 2000. Yeast, Characteristics and Identification. Cambridge: Cambridge University Press.
- BARRE, P., VEZINHET, F., DEQUIN, S., y BLONDIN, B.; 1993. Genetic improvement of wine yeast. En G. H. Fleet (Ed.), Wine Microbiology and Biotechnology (pp. 421e447). UK: Harwood Academic, Reading.
- BELTRAN, G.; TORIJA, M.J.; NOVO, M.; FERRER, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J.M.; ROZES, N.; MAS, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. System Appl Microbiol 25,287-293.
- BERNARDI, A.; SÁNCHEZ, M.L. 2013. Selección de levaduras vínicas provenientes de la provincia de Mendoza. Ed. Academica española (EAE). Alemania. 94 p.
- BIDENNE, C.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S. VEZINHET, F. 1992. Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 22, 1-7.
- BLANCO, P.; MIRA´S-AVALOS, J.M. y ORRIOLS, I. 2012. Effect of must characteristics on the diversity of *Saccharomyces* strains and their prevalence in spontaneous Fermentations. Journal of Applied Microbiology 112, 936–944.
- CAMERON JR, LOH EY, DAVIS R. W. 1979. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. Cell 16:739–751
- CARRASCOSA, A.; MARTINEZ RODRIGUEZ, A.; CEBOLLERO, E.; GONZALES, R. 2005. Levaduras *Saccharomyces* II. Levaduras de segunda fermentación. En: CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R. y GONZÁLEZ, R. Microbiología del vino. Ed. AMV. Madrid España. p 57-75.
- CHRISTIANSEN, G., y CHRISTIANSEN, C. 1976. Comparison of the fine structure in the mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. carlsbergensis*: Electron microscopy of partially denatured molecules. Nucleic Acids Research, 3, 465-476.
- CIANI, M.; MANAZZU, I.; MARINANGELI, P.; CLEMENTI, F.; MARTINI, A. 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie van Leeuwenhoek 85, 159-164.
- CLARK-WALKER, G. D., McARTHUR, C. R., y DALEY, D. J. 1981. Evolution of mitochondrial genomes in fungi. Current Genetics, 4, 7-12.

- COCOLIN, L; VINCENZO PEPE B, COMITINI F.; COMI, G.; CIANI M. 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. *FEMS Yeast Research* Nº5, p 237-245.
- CODÓN, A. C., GASENT-RAMÍREZ, J. M., y BENÍTEZ, T. 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* bakers yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 345-386.
- COMBINA M., MERCADO L.; 2010. Exploring the biodiversity of a wine region: *Saccharomyces* yeasts associated to winery and vineyard. Simposio "Levaduras nativas: evolución, biodiversidad y aplicaciones". XIV Congreso Latinoamericano de Genética (ALAG) XLIII Congreso de la sociedad genética de Chile, XXXIX Congreso de la Sociedad Argentina de Genética (SAG), Viña del Mar, Chile.
- COMBINA, M.; MERCADO, L.; BORGIO, P.; ELIA, A.; JOFRE, V.; GANGA, A.; MARTINEZ, C.; CATANIA, C. 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J Appl Microbiol* 98, p. 1055-1061
- COMBINA, M.; ELÍA, A.; MERCADO, L.; CATANIA, C.; GANGA, A.; MARTINEZ, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 99, 237-243.
- Convenio sobre la diversidad biológica naciones unidas. 1992. [en línea] <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>. [consulta: febrero 2015].
- DEGRE, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, K.; MORIN, A. y DUBORD, C. 1989. Wine yeast strain identification. *Am. J. Enol. Vitic* 40, 309-315.
- DÍAZ QUIRÓS, C. 2014. Uso de aguas residuales de bodega para riego y su impacto sobre la biodiversidad de *Saccharomyces* en viñedos. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Argentina. 52p.
- DÍAZ PERALTA, EDUARDO; ERCOLI, E.; FORMENTO, J.; NAZRALA, J.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E. PALADINO, S. ; SÁNCHEZ, M.L.; MAZA, M. Y BENVENUTTI, M. 2002. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 1º etapa: departamento Maipú. Proyecto de investigación evaluado, aprobado y subsidiado por SECYT- UNC. según consta en resolución 987/02-R(17/12/02).
- DÍAZ PERALTA, E.; FRIGERIO, H.; SFREDDO, E.; FLORES, E.; SÁNCHEZ, M.L.; PALADINO, S.; RIVEROS, R. Y GENOVART, J. Selección de levaduras autóctonas de Tupungato, Mendoza. Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Actas del XXIX Congreso Mundial de la Viña y el Vino. Organización Internacional del Vino. Sección 2.2 Enología. Logroño, España, 25 al 30 de junio de 2006.

- FEDERACIÓN MUNDIAL DE COLECCIONES DE CULTIVO. WFCC. Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos. 2010- 3ra. Edición.
- FERNANDEZ-ESPINAR, M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. 2005. Identificación y caracterización de levaduras vínicas. (cap. 6) En: Microbiología del vino. CARRASCOSA, A.; MUÑOZ R. y GONZÁLEZ R., Microbiología del vino. Ed AMV. Madrid España. P 148-184.
- FERNANDEZ-ESPINAR M.; LOPEZ, V.; RAMÓN, D. 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J. Food Microbiol* 70, 1–10.
- FLEET, G. H.; HEARD, G. 1993. Yeast growth during Fermentation. En: *Wine Microbiology*. Fleet G.H. (Ed.) Australia: Harwood Academic Publishers. p: 27-54.
- FLEET, G.H., 2008. Wine yeast for the future. *FEMS Yeast Research* 8, 979–995.
- FLOCCARI, M. E. 2005. Federación latinoamericana de colecciones de cultivos microbianos. *Agrociencia*. Vol. IX N° 1 y N° 2 p. 417 – 420.
- FORMENTO, J. C.; LÚQUEZ, C.; SÁNCHEZ, L.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E; NAZRALA, F.; BERNARDI, M.; GENOVART, J.; RIVEROS, R.; FIGUEROA, C. 2011. Selección de Levaduras Enológicas Autóctonas de las Regiones Vitivinícolas de Mendoza. Nuevo Procedimiento de Búsqueda y Selección en las Yemas de Vid. *III Jornadas Nacionales de Biología y Biotecnología de Levaduras*, Mendoza, 30 junio-1 julio de 2011 / compilado por Mariana Combina. - a ed. - Buenos Aires : Ediciones INTA. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - INTA Mendoza., 2011. CD-ROM. ISBN 978-987-679-024-6. 1. Biotecnología. 2. Vid. I. Combina, Mariana, comp. CDD 630
- FORMENTO, JUAN CARLOS; ERCOLI, E.; DIAZ PERALTA, E.; NAZRALA, J.; GALIOTTI, H.; SFREDDO, E. PALADINO, S. ; SÁNCHEZ, M.L.; MAZA, M. Y BENVENUTTI, M. 2009. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 3º etapa: departamento Rivadavia. Subsidio: Evaluado, aprobado y subsidiado por SECYT- UNC: 882/07-R 2007-2009
- FORMENTO, Juan Carlos; ERCOLI, E.; DIAZ-PERALTA, E. 2006. Aislamiento, selección y multiplicación comercial de levaduras vínicas autóctonas, de las regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza. 2ª Etapa: Departamento de Junín. Secretaría de Ciencia, Técnica y Posgrado. Resúmenes XX Jornadas de Investigación y II de Posgrado de la Universidad Nacional de Cuyo. Tomo I, p 62.
- GANGA, M.A.; MARTÍNEZ, C. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 76–83.
- Gonzalez M.S. 2015. En 40 años el consumo per cápita de vino bajó 70%. Los Andes. [en línea]. <http://www.losandes.com.ar/article/en-40-anos-el-consumo-per-capita-de-vino-bajo-70> [consulta: febrero 2015].

- GUIJO, S.; MAURIZIO, C.; SALOMON, J.; ORTEGA, J. 1997. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and “flor” film ageing of dry sherry-type wines. 13, 101-117.
- GUILLAMÓN, J.M.; BARRIO, E.; QUEROL, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. Syst Appl Microbiol 19; 122–132.
- GUILLAMÓN, J.M.; BARRIO, E.; HUERTA, T.; QUEROL, A. 1994. Rapid Characterization of Four Species of the *Saccharomyces Sensu Stricto* Complex According to Mitochondria1 DNA Patterns. 1994. International journal of systematic bacteriology, Vol 44, Nº4. p. 708-714
- HALLET J.N., CRANEGUY B., ZUCCA J. Y POULARD, A. 1988. Caractérisation de différentes souches industrielles de levures oenologiques par les profils de restriction de leur ADN mitochondrial. Prog. Agric. Vitic., 105 (13-14): 328-333.
- HOFFMAN S. H.; WINSTON F. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene* 57, 267-272.
- HOLLENBERG, C.; BORST, P. VAN BRUGGEN, E. 1970. Mitochondrial DNA. A 25 micron closed circular duplex DNA molecule in wild type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity. Biochim. Biophys. 209, 1-15
- INV, Instituto Nacional de Vitivinicultura. 2013. Registro de viñedos y superficies. [en línea] <http://www.inv.gov.ar/> [consulta: febrero 2015].
- LANZARINI, J. L. Y MANGIONE, J. Eds. 2009. La cultura de la vid y el vino: La vitivinicultura hace escuela. Fondo Vitivinícola Mendoza .1ª ed. 190 p.
- LAVALLÉE F., SALVAS Y., LAMY S., THOMAS D. Y., DEGRE R., y DULAU, L.; 1994. PCR and DNA fingerprinting used as quality control in the production of wine yeast strains. American Journal of. Enology and Viticulture, 45, 86-91.
- LE JEUNE, C.; ERNY, C.; DEMUYTER, C.; LOLLIER, M. 2006. Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in spontaneous fermentation. Food Microbiology 23, 709-716.
- LEGRAS, J.; KARST, F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. FEMS Microbiology Letters 221, 249–255.
- LONGO, E.; VÉZINHET, F. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 59, 322-326.
- LOPES C. A.; RODRÍGUEZ M. E.; SANGORRÍN M. 2004. Selección de cultivos de levaduras iniciadores de vinificación. Identificación y evaluación de la aptitud enológica de los aislamientos. El vino y su industria. Año 3, Nº 24, p 34-47.

- LOPES C. A.; RODRÍGUEZ M. E.; SANGORRÍN M.; QUEROL A.; CABALLERO A. C. 2007. Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34 (8): 539-546.
- MASNEUF, I.; 1996. Recherches sur l'identification genetique des levures de vinification. Applications oecologiques. These pour le Doctorat de L'Universite de Bordeaux II.
- MERCADO, L.; JUBANY S.; GAGGERO, C.; MASUELLI, R. W.; COMBINA, M. 2010. Molecular Relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Current Microbiology*, 61, 506-514.
- MERCADO, L.; MASUELLI, R. y COMBINA M. 2007 a. Biodiversidad de *Saccharomyces spp.* en los viñedos de la Zona Alta del Río Mendoza. *Revista Enologia*. v. 5, no. 6 2008.
- MERCADO, L.; DALCERO, A.; MASUELLI, R. y COMBINA M. 2007b. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol* 24, 403–412.
- MERCADO L.; 2009. Biodiversidad de *Saccharomyces* en viñedos y bodegas de la región vitícola Zona Alta del Río Mendoza Tesis doctoral, Carrera de Doctorado en Biología, Universidad Nacional de Cuyo.
- MESAS, J. M.; y ALEGRE, M. T. 1999. El rol de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. 2, 174-183.
- MORTIMER, R. K.; ROMANO, P.; SUZZI, G.; POLSINELLI, P. 1994. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10: 1543-1552.
- NADAL, D., COLOMER, B., y PIÑA, B.; 1996. Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1944-1950.
- NAUMOV, G. I., MASNEUF, I., NAUMOVA, E. S., AIGLE, M., y DUBOURDIEU, D.; 2000. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: Genetic analysis of yeast populations. *Research in Microbiology*, 151, 683-691.
- NESS, C.; LAVALLE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M. y DULAU, L. 1993. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric*. 62, 89-94.
- OIV. Organización Internacional de la Vid y el Vino. 2011. Resoluciones. [en línea]. <http://www.oiv.int/oiv/info/esresolution>. [consulta: febrero 2015].
- OIV. Organización Internacional de la Vid y el Vino. OIV Vine and Wine Outlook 2010- 2011. [en línea]. <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatistiquesecteurvitivinicole#secteur>. [consulta: febrero 2015].

- PÉREZ-ORTÍN, J. E.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J. 2011. Genomic and Proteomic Analysis of Wine Yeasts (Cap 6) En: *Molecular Wine Microbiology*, CARRASCOSA, A. V.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. (Eds) Academic Press. Pp. 143-168.
- PRAMATEFTAKI, P.V; LANARIDIS, P.; TYPAS, M.A. 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strains level a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Appl Microbiol* 89, 236–248.
- PRETORIUS I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millenium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16: 1–55
- PRETORIUS, I.S. y VAN DER WESTHUIZEN, T.J. 1991. The impact of yeast genetics recombinant DNA technology on the wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12, 3-31.
- PUIG, S.; QUEROL, A.; RAMÓN, D.; PEREZ ORTÍN, J. E. 2000a. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during winw fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2057-2061
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; FERNANDEZ-ESPINAR, M. 2005. Identificación y caracterización molecular de levaduras vínicas. En: *Microbiología del vino.* (cap. 5).CARRASCOSA, A.; MUÑOZ R. y GONZÁLEZ R., *Microbiología del vino.* Ed AMV. Madrid España. P 148-184.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMON, D. 1992. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 439–446.
- QUEROL, A., y BARRIO, E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 18, 1657.
- QUEROL A., BARRIO E. RAMON D.; 1992. A comparative study of different methods of yeast strains characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 439-446.
- QUEROL, A.; BARRIO, E.; HUERTA, T. y RAMON, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948 2953.
- RACHIDI, N., BARRE, P.; BLONDIN, B. 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 261, 841–850.
- RIBÉREAU GAYON, P.; DUBOURDIEU, D.; DONÉCHE, B.; LONVAUD, A. 2003. *Tratado de enología.* Tomo I. *Microbiología del vino. Vinificaciones.* Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España.
- ROSSINI, G. FEDERICI, F., MARTINI, A. 1982. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology*, 8, P. 83-89
- SALMON, J. M. 1997. Enological fermentetion kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* stain. *J. Ferment. Bioeng.* 83:253-260
- SÁNCHEZ, M. L.; SFREDDO, E.; PALADINO, S.; MAZA, M.; FORMENTO, J.C.; FARRANDO, S.; BERNARDI, M.; VARGAS, E. 2010. Creación de un cepario de levaduras vínicas. *Revista Argentina de Microbiología.* Supl. 1. Vol. 42, pág. 195

- SANGORRÍN, M.; ZAJONSKOVSKY, I.; van BROOCK, M. y CABALLERO, A.; 2002. The use of killer biotyping in an old patagonian winery yeast Ecological survey. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 115-120.
- SANGORRÍN, M.P.; LOPES, C.A.; GIRAUDO M.R. y CABALLERO, A.C. 2007. Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *International Journal of Food Microbiology*; 119(3):351-357.
- SANTAMARÍA, P.; GARIJO, P.; LÓPEZ, R.; TENORIO, C. y GUTIERREZ, R.; 2005. Analysis of yeast population during spontaneous alcoholic fermentation: Effect of the age of the cellar and the practice of inoculation. *International Journal of Food Microbiology* 103: 49-56.
- SCHÜLLER, D.; ALVES, H.; DEQUIN, S.; CASAL, M. 2005. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde region of Portugal. *FEMS Microbiol Ecol* 51:167-177
- SCHÜLLER, D.; VALERO, E.; DEQUIN, S.; CASAL, M. 2004. Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol Lett* 231:19–26.
- SCHÜTZ y GAFNER, 1999. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentation. *Journal of Applied Bacteriology*. 75, 551-558.
- SIPCZKI, M. 2011. Diversity, variability and fast adaptive evolution of the wine yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) genome a review. *Ann Microbiol* 61: 85-93.
- SMITH, D. Culture Collections. 2012. Elsevier Inc *Advances in Applied Microbiology*, Volume 79.
- SNOW, R. 1983. Genetic improvement of wine yeast. En Spencer, J.F.T., D.M. Smith, A. R. W., *Yeast Genetic. Fundamental and Applied Aspects*. Springer Verlag.
- SUAREZ LEPE, J. A.; IÑIGO LEAL, B. 2004. *Microbiología Enológica, Fundamentos de Vinificación* 3º Edición. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 716 p.
- TORIJA, M.J.; BELTRAN, G., NOVO, M., HIERRO, N.; POBLET, M.; ROZÉS, N.; GUILLAMÓN, J.M. y MAS, A. 2002. Selección de levaduras. *Tecnología del vino*. 2 (4): 39-44.
- TORIJA, M.J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLAMON, J.M.; MAS, A. 2001. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Ant Leeuwen* 79, 345-352.
- VALERO, E.; SCHÜLLER, D.; CAMBON, B.; CASAL, M.; DEQUIN, S. 2005. Dissemination and survival of commercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three years study. *FEMS Yeast Res* 5:959-969
- VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.H.P.; KAHN, W.; PRETORIUS I.S. 2000b. Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J Enol. Vitic.* 21,10-16

- VAN DER WESTHUIZEN T.J.; AUGUSTYN O.H.P.; PRETORIUS I.S. 2000a. Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21,3-9
- VAZQUEZ, F.; NALLY, M. C.; MATURANO, P.; TORO, M. E. 2005. Selección de cepas de levaduras autóctonas para vinificación: El Concepto de Levadura Plenamente Adaptada - 1ra Parte.
- VERSAUD, A; COURCOUX, P.; ROULLAND, C.; DULAU, L.; HALLET, J.N. 1995. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol* 61:3521-3529.
- WANG S.A y BAI F.Y., 2008 Wang; 2008. *Saccharomyces arboricolus sp. nov.*, a yeast species from tree bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 58, 510–514.