

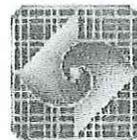


FACULTAD DE CIENCIAS

“ AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LEVADURAS DE LA VID
Vitis vinifera: (var. Carignane), CULTIVADA EN EL VALLE DE
GUADALUPE, B.C., MEXICO.

Tesis que como requisito parcial
para obtener el Título Profesional de Biólogo,
presenta:

LUIS EMMANUEL SÁNCHEZ CARREÑO



Mayo de 2008

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS

Votos Aprobatorios del Examen profesional de
BIOLOGIA

Aislamiento e identificación de levaduras de la vid
Vitis vinifera (var. Carignane), cultivada en el
Valle de Guadalupe, B. C. Mexico.

Presenta:

Luis Emmanuel Sánchez Carreño

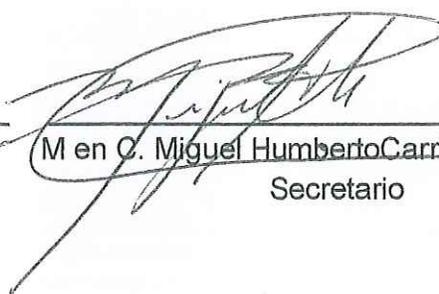
Jurado calificador:



Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Primer vocal



Dra. Amelia Portillo López
Presidente



M en C. Miguel Humberto Carrillo Mendivil
Secretario

En memoria de mi hermana

Paola Amalia q.e.p.d y a Santa Sánchez

que sigue luchando contra el cáncer.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Amelia Portillo por su atención, tiempo y asesoría en todo momento, al Dr. Marcial Leonardo Lizárraga por hacerme parte de este proyecto así como su comprensión y patrocinio.
- A mi familia.
- Mi abuela Matilde.
- Mis tía Rocío y Diana.
- A mis amigos Flaka, Rabano, Pato, Chaparra, Wacaron, Chupes y Ponsoho que hicieron siempre lo posible por salir adelante juntos.

RESUMEN

En este trabajo se analizó la estructura de las levaduras silvestres de la uva *Vitis vinifera* variedad Carignane, cultivada en el Valle de Guadalupe, B.C. México, durante tres etapas de una fermentación espontánea.

La población de levaduras fue cuantificada durante el inicio de la fermentación y se encontró que esta osciló entre $10^5 - 10^6$ ufc/ml para los dos campos analizados, posteriormente se incremento dos ordenes de magnitud al tercer día de la fermentación (a mitad de fermentación) y decreció hacia el sexto día (final de a fermentación).

Los aislamientos de levaduras se realizaron por dilución seriada en agar YEPD con ampicilina. Se aislaron un total de 108 levaduras, las cuales fueron identificadas mediante la técnica de PCR-RFLP. Se utilizó la amplificación del gen que codifica para ARNr 5.8S y los segmentos no codificantes ITS. El producto de PCR fue digerido enzimáticamente con *HhaI*, *HaeIII* e *Hinfl*.

La amplificación por PCR mostró dos tipos de productos de PCR, uno de 850 pb y otro de 380-390 pb. El patrón de digestión del producto de 850 pb correspondió a la especie: *Saccharomyces cerevisiae*, el cual fue corroborado con el control y la literatura. El otro producto obtenido no presentó ningún patrón reportado en la literatura sin embargo, la secuencia de ADN del producto de PCR tuvo un 99% de similitud con el género *Metschnikowia spp.* Se aislaron dos cepas de *S. cerevisiae* con fenotipos diferentes uno con colonias lisas y otro con colonias rugosas. La primera de ellas predominó en cada una de las tres etapas de la fermentación (67, 51 y 78%, respectivamente), mientras que la segunda tuvo presencia en un 8, 19 y 22%, respectivamente. *Metschnikowia spp.* estuvo representada solamente en las dos primeras etapas de la fermentación (17% y 22%, respectivamente).



Vo.Bo. Dra. Amelia Portillo López
Director de tesis

CONTENIDO

I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES	5
III OBJETIVOS	8
IV HIPOTESIS.....	9
V. METODOLOGIA	10
V.1. MUESTREO	10
V.2. MEDICION DE FACTORES FISICOQUIMICOS	12
V.3. AISLAMIENTO DE LEVADURAS.....	12
V.4. IDENTIFICACION DE LEVADURAS	14
V.4.1. Identificación morfológica.....	14
V.4.2. Identificación molecular de levaduras	14
V.4.3. Colección de levaduras.....	20
VI. RESULTADOS.....	22
VI.1. Crecimiento poblacional de levaduras.....	22
VI.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MORFOLOGICA DE LAS LEVADURAS DEL CAMPO A.....	25
VI.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS POR PCR.....	26
VI.4. ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS PRODUCTOS DE PCR	28
VI.5. ANALISIS DE LOS DATOS DE RESTRICCION DE ACUERDO A LA LITERATURA.....	34
VII. DISCUSION:.....	39
VIII. CONCLUSIONES	43
IX. LITERATURA CITADA.....	44

CONTENIDO DE FIGURAS

No de figura	Figura	Página
1	Localización del área de estudio	11
2	Diagrama de flujo del muestreo y aislamiento de las levaduras del estudio.	13
3	Curva de crecimiento de levaduras del campo A	23
4	Curva de crecimiento de levaduras del campo B	24
5	Colección de levaduras del campo A.	25
6	Fotografías de diferentes morfologías de colonia.	26
7	Electroforesis en agarosa de los productos de PCR de las levaduras aisladas del campo A.	27
8	Electroforesis de poliacrilamida del producto de PCR de 850 – 880 pb con la enzima <i>HaeIII</i>	29
9	Electroforesis de poliacrilamida del producto de PCR de 850 – 880 pb con la enzima <i>Hinfl</i>	30
10	Electroforesis de poliacrilamida del producto de PCR de 850 – 880 pb con la enzima <i>HhaI</i>	31
11	Producto del PCR del producto de 380-390 pb.	32
12	Electroforesis de acrilamida de la digestión de producto de PCR de 380-390 pb.	33

CONTENIDO DE TABLAS

No de tabla	Tabla	Página
I	Productos de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 y patrones de restricción para fragmentos de 800-880 pb de acuerdo a Esteve-Zarzoso <i>et al</i> y Fernández-Espinar <i>et al</i> .	35
II	Productos de PCR y patrones de restricción para fragmentos de 380-400 pb de acuerdo a Esteve-Zarzoso <i>et al</i> y Llanos-Frutos <i>et al</i> .	36

I INTRODUCCIÓN

La fermentación espontánea de la uva (es decir aquella en la que no se introducen levaduras comerciales), es un proceso bioquímico y ecológico complejo, que incluye el desarrollo secuencial de diferentes especies de levaduras nativas. Las levaduras apiculadas como *Hanseniospora uvarum*, *Kloeckera apiculata* (la contraparte asexual de la primera) y las levaduras oxidativas *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula* y *Kluyveromyces*, son las especies predominantes. Estas levaduras crecen bien durante los primeros días de la fermentación, pero son progresivamente reemplazadas cuando los niveles de etanol alcanzan un 2 a 3% de concentración por las especies tolerantes al etanol, como lo son *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum* (Fleet y Heard, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Fay y Benavides, 2005). Aunque muchos géneros y especies de levaduras se han encontrado en los mostos, el género *Saccharomyces*, principalmente *S. cerevisiae* es el responsable de la fermentación alcohólica (Vivier y Pretorius, 2002). El origen de *S. cerevisiae* está aún en debate. Algunos autores mencionan que esta especie es un organismo que habita naturalmente las frutas (Mortimer y Polsinelli, 1999; Sniegowski *et al.*, 2002), mientras que Martini y Vaughan-Martini, (1990), señalan que esta especie está ausente de las uvas y suelos de los viñedos. Naumov, (1996) señala que *S. cerevisiae* es una especie cercana a *S. paradoxus*, una especie de levadura silvestre cosmopolita que se encuentra asociada a exudados de árboles y extractos de plantas en proceso de

fermentación y que la ocurrencia de *S. cerevisiae* en los viñedos obedece al transporte ocasionado por los insectos. De acuerdo a diversos estudios, *S. cerevisiae* es raramente aislada de uvas intactas o de la tierra de un viñedo, pero con frecuencia se aísla en el equipo de la vinícola y en abundancia en uvas dañadas (Demuyter *et al.* 2004).

S. cerevisiae ha sido una especie altamente seleccionada, de acuerdo a las necesidades del tipo de fermentación; esto es, se utiliza para la fermentación del pan, vino y cerveza, así como también para la producción de otras bebidas alcohólicas fermentadas. El proceso selectivo de cepas se lleva a cabo de acuerdo a su adaptación a diferentes factores estresantes como son la tolerancia a la presión osmótica, a los niveles de etanol y la resistencia a antimicrobianos (ejemplo: dióxido de azufre), así como también a la tolerancia al estrés oxidativa, iónico, cambios de temperatura, limitación de nutrientes e inanición, entre otros (Querol *et al.*, 2003; Fay y Benavides, 2005). También se han seleccionado las cepas de acuerdo a la producción de compuestos orgánicos (carbonilos, ácidos orgánicos, ésteres, compuestos azufrados y alcoholes) durante la fermentación, estos compuestos son los responsables de darle ciertos atributos y contribuir a las características distintivas entre las diferentes bebidas alcohólicas (García y López *et al.*, 2002).

En el proceso de hacer vino, el tipo y cantidad de aroma depende en mayor parte de la cepa de levadura, los factores ambientales (clima, suelo), las técnicas en el cultivo de la vid, condición de la fruta, la variedad de vid

empleada, el proceso de vinificación, pH del mosto, cantidad de dióxido de azufre, aminoácidos presentes en el mosto y la fermentación maloláctica (Lily *et al.*, 2000).

Han sido descritas varias cepas de levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* que contribuyen grandemente en mejorar el sabor del vino, pero estas especies no completan la fermentación debido a su baja tolerancia al etanol; por esta razón se ha estado estudiando en diversas partes del mundo cuáles especies contribuyen a darle estas características al vino, para después poder suplementar la combinación adecuada de cepas en el tipo de vino que se quiera obtener. Además las levaduras nativas tienden también a producir sabores indeseables en los vinos y por su carencia de floculación tienden hacer más difícil el proceso de purificación. Del mismo modo, cuando la fermentación alcohólica inicia con lentitud, otros microorganismos como las bacterias empiezan a dominar produciendo metabolitos indeseables tales como el ácido acético, acetaldehído o acetato de etilo. A pesar de estas desventajas existen diferentes tendencias en la elaboración del vino, algunas industrias utilizan sólo cultivos puros de levaduras seleccionadas, mientras que otras empresas utilizan la flora asociada a la uva de tal manera que dejan que participe en un inicio en la fermentación las levaduras nativas, para posteriormente añadir la cepa seleccionada, esto lo hacen con la finalidad de producir distintos tipos de vinos que reflejen la diversidad de levaduras específicas de una región (García y López *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se creó un cepario con levaduras aisladas e identificadas de la vid de esta región (Valle de Guadalupe B.C. México), principalmente de cepas con tolerancia al etanol y que tienen potencial industrial.

II ANTECEDENTES

El conocimiento del proceso de fermentación es muy antiguo, data de hace más de 7000 años a.C., aproximadamente. Los registros mencionan que en la época de los babilonios se producía cerveza, así como también que los egipcios producían cerveza y elaboraban pan fermentado desde hace 4000 años a.C. La elaboración del vino es aún más antigua, su consumo es mencionado en las escrituras del Génesis (538 a.C.), (García y López *et al.*, 2002; Scragg, 2002). De acuerdo a los análisis de extracción de ADN en contenedores antiguos y de recientes evidencias moleculares en recipientes chinos, se confirma que el vino se producía hace 7000 años a.C. (Cavaliere *et al.*, 2003; McGovern *et al.*, 2004). Se piensa que la producción de vino tuvo que ser más antigua que la del pan y cerveza, ya que la fermentación de la uva no requiere de un inóculo de levadura (Fay y Benavides, 2005).

En el siglo XIX, Pasteur señaló a las levaduras como los microorganismos responsables de la fermentación y producción de alcohol a partir de glucosa. El proceso de aislamiento y selección de las levaduras se empezó a realizar a partir de entonces y fue a finales de ese mismo siglo que se distribuye la primera levadura vínica, denominada "STEINBERG 92". Así mismo Emil Christian Hansen aisló la levadura para la producción de cerveza, *Saccharomyces carlsbergensis* (Scragg, 2002).

Los análisis de diversidad de especies en los vinos se han hecho en diferentes partes del mundo donde se procesa el vino, entre ellos podemos señalar los

trabajos hechos por: Frezier y Dubourdieu, (1992), Querol *et al.*, (1992, 1994), Schutz y Gafner, (1993) y Versavaud *et al.*, (1995), quienes encontraron que una o dos especies representan el 50% del total de la biomasa y que una diversidad amplia de otras especies nativas representan un porcentaje muy bajo. Por otro lado Querol *et al.*, (1994) muestran claramente una sucesión de especies cuando la población es analizada por cariotipos electroforéticos.

Se ha señalado que las levaduras silvestres de una región se conservan año tras año y son características de cada lugar, esto lo demuestra los trabajos de Sabate *et al.* (1998), quienes encontraron patrones de ADN mitocondrial de levaduras similares en dos años consecutivos de estudio en fermentaciones espontáneas, esto mismo fue observado por Vezinhet *et al.*, (1992). Por lo tanto ellos afirman que la flora de una región se conserva año tras año por lo que deberán aparecer estas mismas especies, haciendo los vinos de cada región tener ciertas particularidades organolépticas.

Asimismo, otros estudios más recientes como el de Capello *et al.*, (2004) caracterizaron a las levaduras de 12 variedades de uva de la principal zona vinícola de Italia, y encontraron que la flora autóctona es básicamente la misma en una región determinada y que no varía en las diferentes variedades de uva. Concluyendo que las cepas nativas están restringidas a una determinada área, principalmente por su adaptación al microclima. También estos investigadores encontraron cepas nativas de *S. cerevisiae* altamente tolerantes a etanol y a

sulfitos, haciendo posible que estas cepas en un futuro sean utilizadas en esta región en la Industria vinícola, sin depender de la compra comercial extranjera.

Fay y Benavides, (2005), analizaron las similitudes existentes en 81 cepas de la levadura *S. cerevisiae* obtenida de diferentes fuentes naturales como exudados de árboles, vino, sake, o frutas, basados en secuencias de ADN de 5 genes. Encontraron, que las cepas de sake no estaban tan relacionadas con las del vino; no obstante concluyen que las cepas comerciales de *S. cerevisiae*, están más relacionadas con las cepas silvestres no domesticadas (no seleccionadas).

Básicamente los aislamientos de levaduras vínicas han sido principalmente de lugares donde se producen bebidas alcohólicas pero, originalmente estas cepas descendieron de poblaciones silvestres que la misma uva traía consigo. Actualmente se tienen cepas altamente productivas con características muy particulares de acuerdo al proceso de fermentación y producto que se requiera. Por otro lado con las innovaciones de la biología molecular se ha logrado hacer Ingeniería metabólica (Ostergaard *et al.*, 2000) y levaduras transgénicas (Schuller y Casal, 2005), ampliando el mercado de cepas, no obstante, las cepas transgénicas aún no se comercializan.

III OBJETIVOS

Objetivo general

1. Aislamiento de cepas silvestres de levaduras a partir de una fermentación espontánea de la uva, variedad Carignane, del Valle de Guadalupe, B.C.
2. Identificación de las cepas de levaduras por métodos moleculares (PCR-RFLP) durante tres etapas del proceso de fermentación

Objetivos complementarios

3. Conformación de un cepario de las levaduras aisladas

IV HIPOTESIS

Cada área donde se cultiva la vid tiene un microclima determinado lo cual hace posible que la uva posea una flora microbiana propia y la variedad de uva Carignane por ser una de las más antiguas cultivadas en la región de estudio, permita encontrar cepas tales, que haga posible establecer una colección de levaduras potencialmente útiles en la fermentación de mostos de esta región.

V. METODOLOGIA

V.1. MUESTREO

Para el aislamiento de cepas de levaduras silvestres se tomaron muestras de mosto de la variedad de uva Carignane. Las uvas utilizadas para el mosto fueron obtenidas gracias a la colaboración del Ing. Hugo D'Acosta, de dos viñedos propiedad de Pedro Portillo y Juan Carlos Bravo, ambos localizados en el ejido el Porvenir en el Valle de Guadalupe, B.C. México, (Fig.1).

Las uvas fueron molidas y separadas del racimo mediante máquinas despalladoras y el resultante fue vertido sobre cubetas de plástico nuevas, previamente limpias, con capacidad de 25 L.

El mosto de ambos viñedos fue transportado al laboratorio en los recipientes antes mencionado; con un volumen aproximado del 90% de su capacidad. Los recipientes fueron colocados en una incubadora de temperatura controlada a 25°C. No se añadieron sulfitos al mosto.

Se realizaron muestreos independientes de cada recipiente en tres diferentes momentos durante el proceso de fermentación espontánea. La concentración de azúcares, se tomó como referencia para los muestreos, que se hicieron al inicio de la fermentación (23 Brix), a mitad de la fermentación (11-12 Brix) y al final de la fermentación (0 Brix). Los grados Brix miden el cociente total de azúcares disueltos en un líquido y una solución de 25 °Bx tiene

aproximadamente 25 gramos de azúcares en un volumen de 100 ml de líquido (25 % p/v).

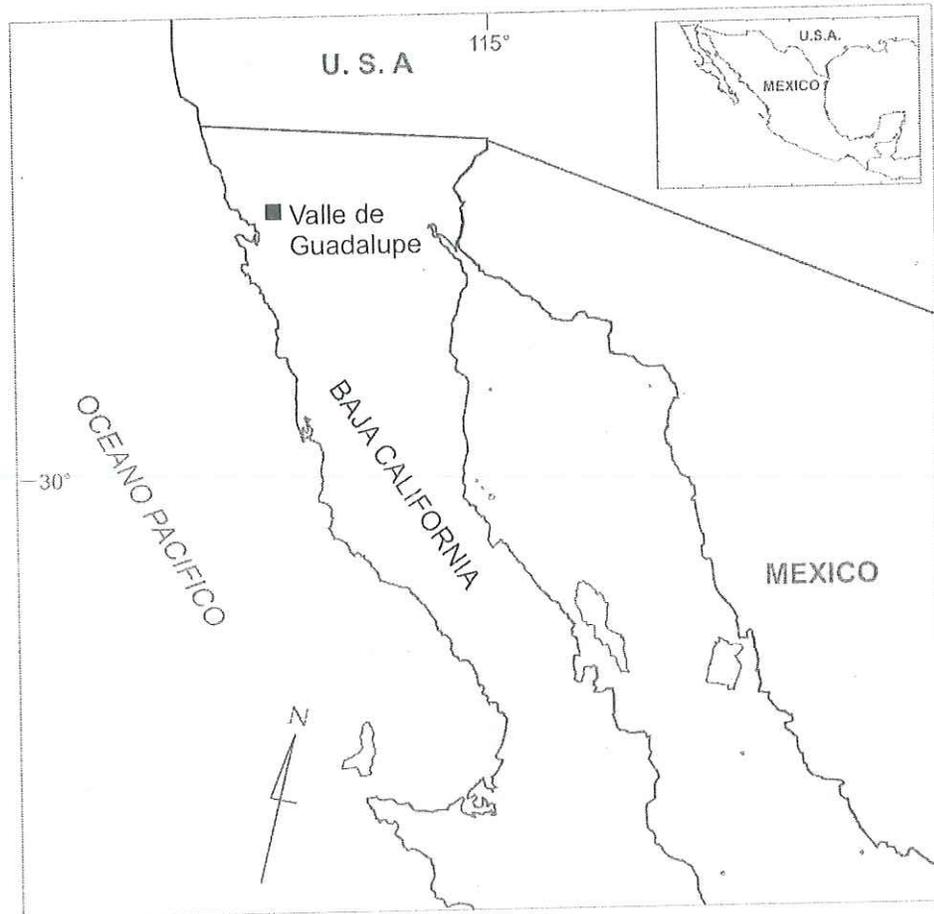


Figura 1. El Valle de Guadalupe se encuentra dentro del municipio de Ensenada Baja, California, México a una distancia de 20 km de la zona urbana a una latitud de 32°4' Norte y a una Longitud de 116°35' Oeste.

V.2. MEDICION DE FACTORES FISICOQUIMICOS

Se tomó una muestra con un recipiente estéril para utilizarse en la medición de pH, azúcares (glucosa, sacarosa y fructosa) y temperatura, evitando de esta forma la introducción de contaminación (microorganismos y agentes químicos).

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro marca Orión modelo 720A (rango de error de 0.001 y calibrado previamente con estándares de pH 4.0, 7.0 y 10.0). La temperatura se midió con un termómetro certificado, con graduaciones de 0.1 grados. La concentración de azúcares fue registrada con un densímetro (Home Brew Mart) con capacidad de registrar hasta 40 grados Baumé (Bmé) o 24 grados Brix.

V.3. AISLAMIENTO DE LEVADURAS

Se tomó una muestra de 10 mL, con una pipeta estéril de cada cubeta y se depositó en un tubo estéril independiente. Cada muestra fue diluida utilizando solución salina (NaCl, 0.9% p/v), estéril. Un volumen de 0.1 ml de cada dilución correspondiente se sembró en cajas de Petri en medio YEPD (2% Agar, 0.5% extracto de levadura, 0.5% peptona, 4% dextrosa y 50 µg/ml de ampicilina), por duplicado.

Las cajas una vez sembradas, fueron incubadas a 25°C, en un incubador de temperatura controlada. Después de haber transcurrido 48 h, se realizaron conteos de colonias y se aislaron 36 colonias de cada muestreo, teniendo un total final de 216 colonias aisladas por los dos campos (Fig.2).

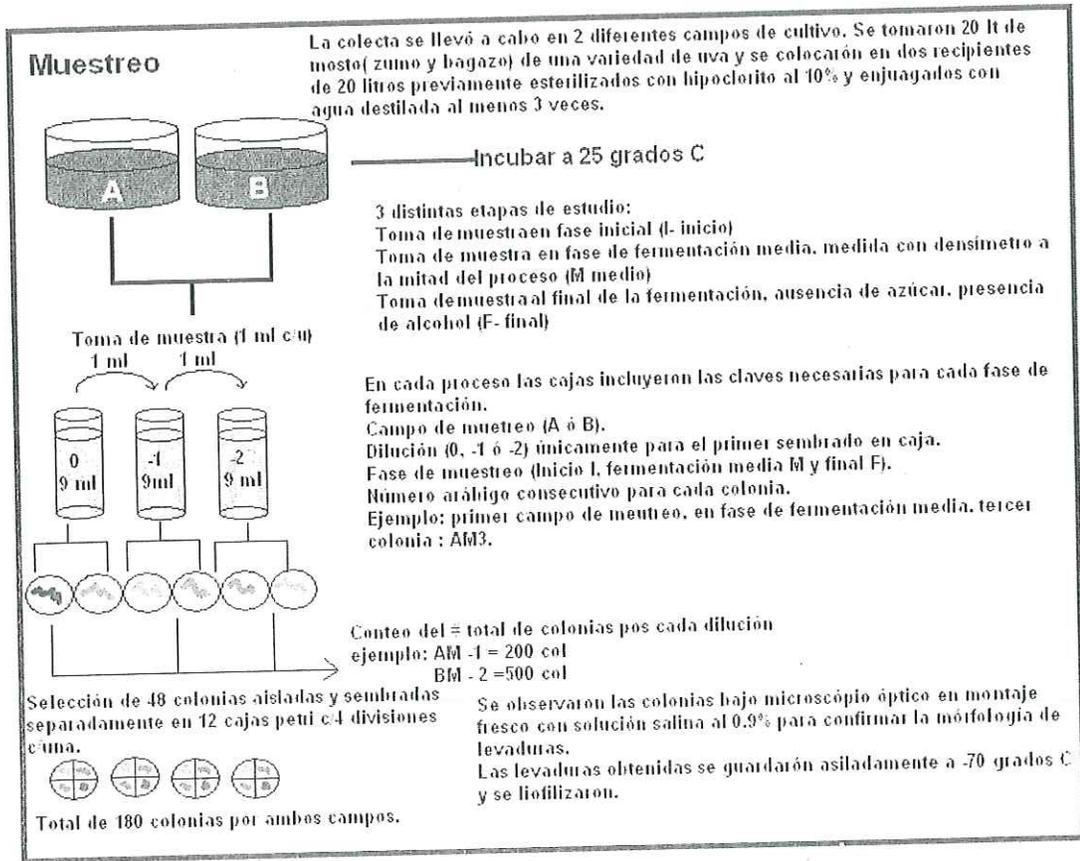


Figura 2. Diagrama de flujo del muestreo y aislamiento de levaduras silvestres de una fermentación espontánea de la vid: *Vitis vinifera*.

V.4. IDENTIFICACION DE LEVADURAS

V.4.1. Identificación morfológica

En primer lugar se realizó una identificación de levaduras de acuerdo a su morfología unicelular y fases de gemación, apoyado con el manual de taxonomía de levaduras de Kreger-Van Rij (1984), bajo microscopio óptico (microscopio óptico y de epiluminisencia Carl Zeiss, Vision Inc. San Diego CA, USA), las células se crecieron en el medio YEPD (antes descrito) y posteriormente se realizaron tinciones Gram. Una vez que se identificó como levadura se procedió a la identificación molecular.

V.4.2. Identificación molecular de levaduras

La identificación de levaduras se llevó a cabo mediante la amplificación de parte del gen que codifica para ARNr 5.8 S y los segmentos no codificantes denominados espacios transcritos internos (en inglés: Internal transcribed spacers; ITS). Posteriormente el producto de PCR fue sujeto a un análisis de restricción.

Extracción de ADN de levaduras

Se llevó a cabo la extracción de ADN cromosomal de acuerdo a la técnica descrita por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999), cuyo procedimiento de manera resumida es el siguiente:

- 1.- Sembrar y crecer una colonia en 5 mL de medio YPD por 18 hrs.
- 2.- Centrifugar el cultivo a 6000 X g durante 5 minutos y decantar.

- 3.- Suspender en 0.5 mL de sorbitol 1M con 0.1 M EDTA, pH 7.5
 - 4.- Transferir a un tubo eppendorf de 1.5 mL con 20 μ l de Liticasa (5U/ μ l)
 - 5.- Incubar durante 60 min a 37°C
 - 6.- Centrifugar 6000 X g durante 5 minutos y decantar.
 - 7.- Suspender en 0.5 mL de 50 mM de Tris- HCl, 20 mM EDTA pH 7.4.
 - 8.- Añadir 50 μ L de SDS 10%
 - 9.- Incubar durante 30 minutos a 65°C
 - 10.- Inmediatamente después añadir 0.2 ml de acetato de potasio 5 M
 - 11.- Colocar en hielo durante 30 minutos
 - 12.- Centrifugar a 10000 X g durante 10 minutos
 - 13.- Pasar el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo
 - 14.- Precipitar el ADN con 700 μ L de isopropanol.
 - 15.- Centrifugar a 10000 X g durante 10 minutos.
 - 16.- Lavar el ADN con etanol al 70% (v/v)
 - 17.- Centrifugar de nuevo a 10000 X g durante 10 minutos.
 - 18.- Decantar y poner a secar el botón de ADN
 - 19.- Disolver en 30 μ L del amortiguador TE o H₂O destilada libre de ADNasas.
- Como un método alternativo se extrajo ADN genómico mediante el uso del reactivo ADNzol ES (INVITROGEN®) y el protocolo se realizó de acuerdo al indicado por la casa comercial.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificó parte del gen que codifica para ARNr 5.8S y los segmentos no codificantes denominados espacios transcritos internos. Se utilizó como molde de ADN en el PCR el ADN cromosomal (genómico) purificado por la técnica de Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999) y/o ADNzol ES, así como la técnica de colonia directa hecha por Steve-Zarzoso *et al.*, (1999). Se utilizó como control la cepa de: *S. cerevisiae* (cepa: BRL97, BAROLO).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes, descritos por White *et al.*, (1990):

ITS1: 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'

ITS4: 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

El protocolo de PCR para ADN total fue el siguiente:

36 μ l agua libre de ADNasas y RNAasas

5 μ L amortiguador de PCR (10X) (Qiagen CORE KIT: 15 mM MgCl)

5 μ L ADN

1 μ L cebador 1 (25 pmol/ μ l) (ITS1), iniciador

1 μ L cebador 2 (25 pmol/ μ l) (ITS4), reverso

1 μ L dNTPs (10 mM, c/u)

1 μ L Taq

50 μ L volumen total

PCR de ADN

95°C 5 min

30 ciclos de:

95 °C 1 min

56 °C 1 min

72°C 1 min

Ext. Final

72°C 10 min

PCR con colonia directa:

Se Tomó con la punta de una puntilla la colonia a analizar y se resuspendió en la mezcla de PCR.

Mezcla del PCR:

39.5 µL agua libre de ADNasas y ARNasas

5 µL amortiguador de PCR (10X)

1.5 µL solución de MgCl (50 mM)

1 µL cebador 1 (25 pmol/µl) (ITS1), iniciador

1 µL cebador 2 (25 pmol/µl) (ITS4), reverso

1 µL solución de dNTP's (10 mM, c/u)

1 µL Taq

50 µL volumen total

El protocolo a seguir con el termociclador fue el siguiente

95°C 15 min

35 ciclos de:

95 °C 1 min

56 °C 2 min

72 °C 2 min

Ext. Final

72°C 10 min

Electroforesis de ADN

Para determinar el tamaño del producto de PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador TAE 1X (4.84 gr Tris; 1.14 mL de Acido acético glacial; 2.0 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0). El gel fue fotografiado y el tamaño del fragmento de PCR fue comparado con el corrido obtenido con el marcador de peso molecular de ADN (Low mass y/o la escalera de 100 pb INVITROGEN® y/o PROMEGA®).

Análisis de restricción

La identificación molecular por análisis de restricción PCR-RFLP se llevo a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción: *CfoI*, *HaeIII* e *HinI* y el patrón fue comparado a las clasificaciones de Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999), Fernández Espinar *et al.*, (2000), Llanos Frutos *et al.*, (2004) y Villa Carbajal *et al.*, (2006) de cepas de levaduras, en las cuales, las endonucleasas presentan un perfil único para cada especie.

Para determinar el patrón de digestión por las enzimas de restricción se utilizó el siguiente protocolo:

Enzimas de restricción:

HaeIII (Buffer 2) (TAKARA BIO INC ®)

HinI (Buffer 2)) (TAKARA BIO INC ®)

HhaI (*CfoI*) (Buffer 2, 3, 4)) (TAKARA BIO INC ®)

Se preparó la siguiente reacción, un tubo por cada ADN a digerir:

6 μ l agua libre de ADNasas y ARNasas

2 μ l amortiguador 10 X (según el indicado para la enzima)

10 μ l Producto de PCR

1 μ L Enzima de restricción

20 μ l Volumen total

La incubación de cada una de las reacciones enzimáticas se llevo a cabo a 37°C por una hora.

La reacción se detuvo añadiendo 5 μ l de amortiguador de muestra (Azul de Bromofenol, 0.001% (p/v); 50% glicerol (v/v) y 50% (v/v) agua destilada). El patrón de digestión fue observado en geles de poliacrilamida al 6.5% (p/v), teñido con Nitrato de plata.

PREPARACION DEL GEL DE POLIACRILAMIDA:

Amortiguador TAE 10X	1 ml
Acrilamida (29%)/bisacrilamida (1%, p/v)	2.33 ml
Agua destilada	6.57 ml
TEMED (concentrado)	7 μ L
Persulfato de amonio al 10% (p/v)	70 μ L (añadir a lo último)
	(Vol. Final ~10 ml)

TÉCNICA DE TINCIÓN:

Soluciones:

1. Solución fijadora (A): 5 ml de etanol, 250 μ L de ácido acético concentrado, aforar a 50 ml con agua destilada.

2. Solución de tinte (B): 5 ml de nitrato de plata al 1% (peso/volumen) ,
aforar a 50 ml con agua destilada
3. Solución reveladora (C): 25 ml de hidróxido de sodio al 3%
(peso/volumen) y 25 ml de formaldehído al 0.3% (volumen/volumen)
(recién hecha)
4. Solución de almacenamiento (D): 5 ml de carbonato de sodio al 7.5 %
(peso/volumen), aforar a 50 ml con agua destilada.

Procedimiento de Tinción

1. Agregar la solución A, agitar suavemente 4 min, decantar la solución y
añadir poca agua destilada y agitar suavemente 1 min, decantar.
2. Adicionar la solución B, dejar 10 min con suave agitación. Decantar la
sol. B en un recipiente para desechos de plata. Enjuagar con poca agua
destilada, 10 segundos y decantar.
3. Adicionar la solución C, mezclar los dos reactivos y añadir un poco, este
se tornara oscuro, tirar rápidamente y después añadir el resto por un
extremo del gel, se revela en 6 min. Decantar la solución.
4. Adicionar la solución D, para almacenar el gel.

V.4.3. Colección de levaduras

Una vez aisladas e identificadas las diferentes especies de levaduras de la vid,
se conservaron en frascos de vidrio de una capacidad de 7 ml con el medio

inclinado de YEPD, estos se guardaron en un refrigerador a una temperatura de 4 – 6 °C.

Las levaduras fueron nombradas de acuerdo al campo dónde fueron colectadas (A ó B), al tiempo de fermentación en que fueron obtenidas (inicial: I, media fermentación: M y fermentación final: F) y el número arábigo de acuerdo al orden en que fueron sembradas (del 1 al 36), por lo que fueron 6 series, nombradas así: la cepa número 1 del campo A de la fase inicial de la fermentación fue AI1, y así sucesivamente hasta terminar con el AI36, para la segunda mitad de la fermentación cambio a la letra M, etc. y término con el AM36, así sucesivamente para los campos AF, BI, BM y BF (la serie analizada para este trabajo solo correspondió al campo A).

VI. RESULTADOS

VI.1. Crecimiento poblacional de levaduras.

Se obtuvieron dos mostos de la uva Carignane cultivada en dos parcelas, denominadas: campo A (Bravo) y campo B (Portillo). Al inicio de la fermentación el mosto del campo A presentó una concentración de levaduras de 6.8×10^4 ufc/ml y para el tercer día (mitad de la fermentación), alcanzó un máximo de crecimiento con una concentración de 3.73×10^8 ufc/ml, para posteriormente decrecer. En cuanto a los grados Brix podemos observar que inicia su declinación conforme avanza el tiempo hasta llegar a cero. El pH en el mosto se incrementó ligeramente de 3.0 al inicio a 3.3 al final. (Fig. 3).

El crecimiento poblacional para el campo B podemos observar un patrón similar al campo A solo que al inicio de la fermentación se obtuvo una concentración de 2.6×10^5 ufc/ml y fue hasta el séptimo día (mitad de la fermentación), cuando se obtuvo el máximo de crecimiento con 1.05×10^8 , para después decrecer. El pH aumentó de 3.1 inicial a 3.6 en el tiempo final (Fig. 4).

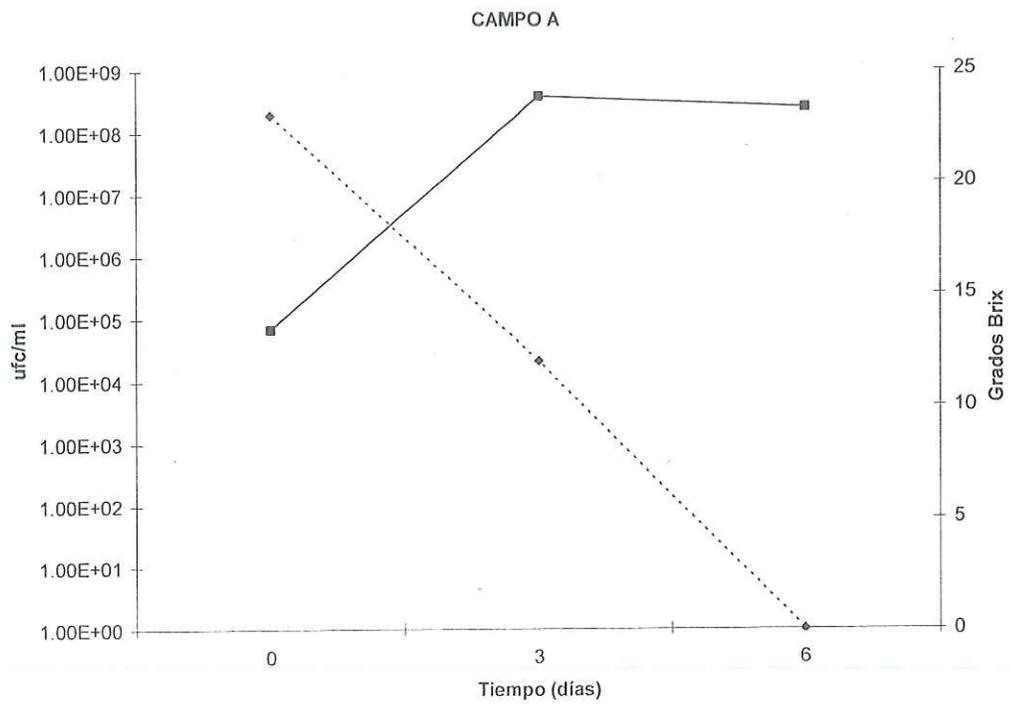


Figura 3. Curva de crecimiento en agar YEPD/ampicilina y grados Brix, durante las tres etapas de la fermentación natural de la uva Carignane en el campo A.

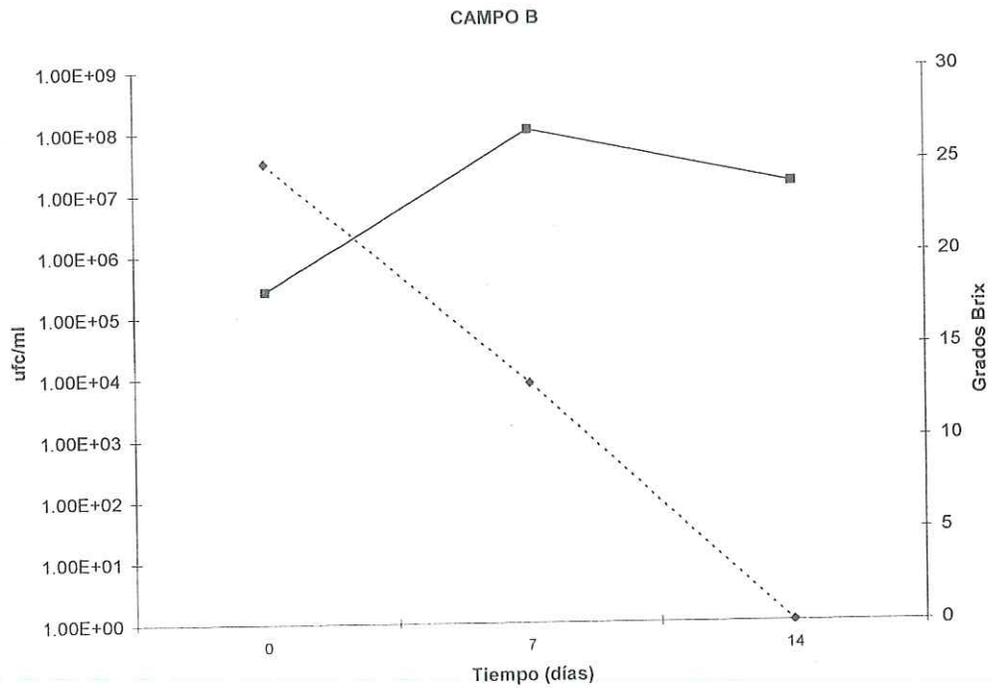


Figura 4. Curva de crecimiento en agar YEPD/ampicilina y grados Brix, durante las tres etapas de la fermentación natural de la uva Carignane en el campo B.

VI.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION MORFOLOGICA DE LAS LEVADURAS DEL CAMPO A.

Se aislaron un total de 108 colonias del mosto de la uva Carignane del campo A, en tres etapas de la fermentación espontánea. Las levaduras aisladas se mantuvieron en frascos a 4°C (Fig. 5). Cada una de estas colonias fue analizada por microscopía óptica y por tinción Gram, corroborando que estas fueran levaduras, Se observaron en el agar YEPD diferentes morfologías de las colonias que variaban en textura de lisa a rugosa, así como también su consistencia áspera a cremosa, además el brillo de la colonia variaba de opaco a brillante o nacarado (Fig. 6).

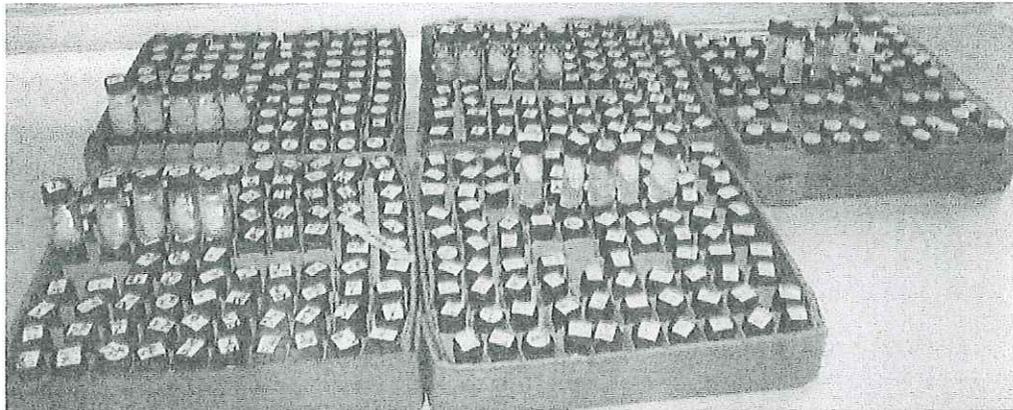


Figura 5. Colección de levaduras del campo A, mantenidas en agar YEPD a 4°C.

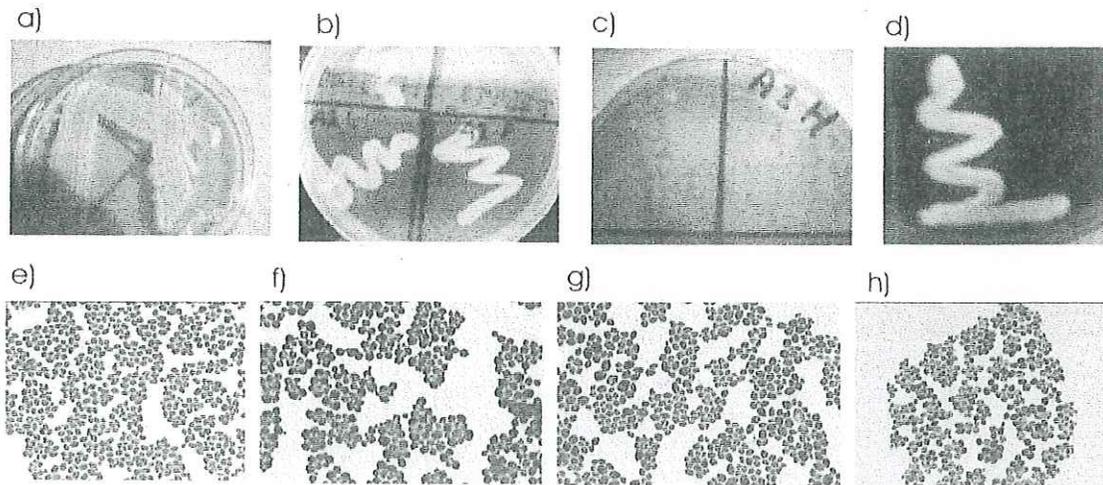


Figura 6. Diferentes morfologías de colonia: a) forma rugosa, b) forma lisa y cremosa, c) forma lisa con pigmento café y d) control de *S. cerevisiae*. En los incisos e-h podemos observar su correspondiente morfología bajo la tinción Gram.

VI.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS POR PCR

Se realizó un PCR con colonia directa de cada una de las diferentes colonias de levaduras aisladas. Esta prueba no arrojó buenos resultados ya que la mayoría de las veces no se obtuvieron productos de PCR, por lo que se procedió a extraer ADN de cada cepa de levadura de acuerdo a la técnica de Esteve-Zarzoso *et al.* (1999) y realizar el PCR. En la Fig. 7, pudo observarse que el tamaño del producto de PCR para las levaduras del tiempo inicial fue muy similar en la mayoría de las colonias, aproximadamente de 850-880 pb y

en menor cantidad otro fragmento de 380-390 pb, como lo indican la figura citada, esta última corresponde a la colonia con pigmento café.

Para el segundo momento, es decir a la mitad de la fermentación, Fig. 7 b, se aprecian de igual forma los mismos tamaños de productos que al inicio.

Al final de la fermentación (tiempo final), se observó solamente la presencia del fragmento 850-880 pb., Fig. 7 c.

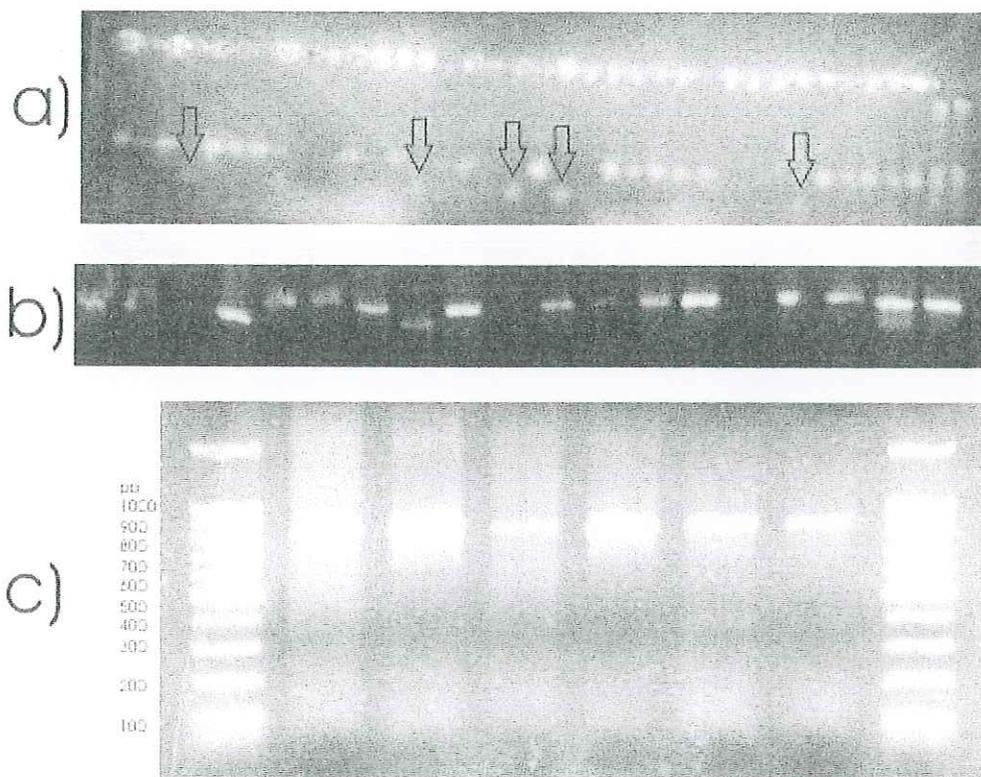


Figura 7. Electroforesis en agarosa 2.4% de los productos de PCR de las levaduras aisladas en el campo A: a) Tiempo inicial, b) Tiempo medio y c) Tiempo final.

VI.4. ANALISIS DE RESTRICCION DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Se analizaron los productos de PCR mediante las enzimas de restricción: *HaeIII*, *Hinfl*, *HhaI* (*CfoI*), posteriormente la digestión enzimática fue visualizada por electroforesis en geles de poliacrilamida. El fragmento de 850-880 pb tanto para la colonia rugosa y lisa fue igual con las 3 enzimas utilizadas. Para la enzima *HaeIII* se obtuvieron cuatro fragmentos (320, 230, 180, 150 pb) (Fig. 8), para la enzima *Hinfl* se encontraron tres fragmentos (375, 365, 110) (Fig. 9) y para *HhaI* tres fragmentos (385, 365, 150 pb) (Fig. 10).

El producto de PCR de la colonia con pigmentación café la podemos observar en la figura 11, donde se puede apreciar que es de alrededor de 380-390 pb. El análisis de restricción de este fragmento fue el siguiente: Para la enzima *Hinfl* se obtuvieron dos fragmentos (aproximadamente 200 y 270/280 pb), para la enzima *HaeIII* tres fragmentos (aprox. 90, 270/280, 350 pb) y para la enzima *HhaI* dos fragmentos (aprox. 180 y 200 pb) (Fig. 12).

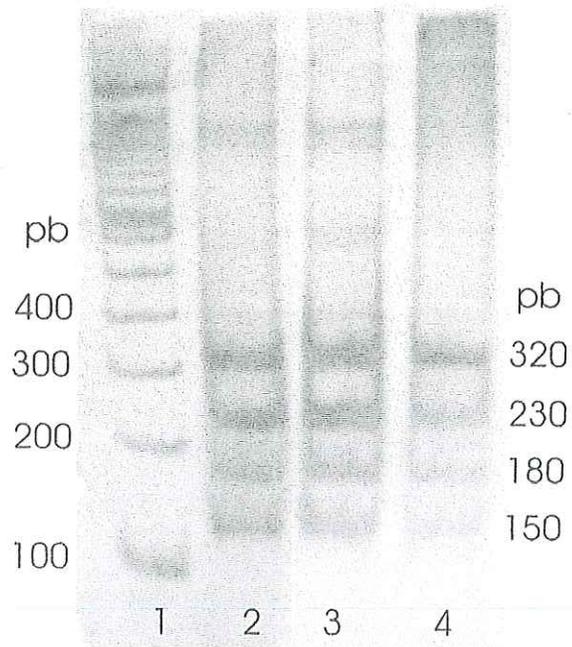


Figura 8. Electroforesis de poliacrilamida (6.5%) de la digestión enzimático del producto de PCR de 850-880 pb con la enzima *HaeIII*: carriles: 1, estándar de ADN de 100 pb; 2 cepa rugosa; 3 cepa lisa; 4 control de *S. cerevisiae*.

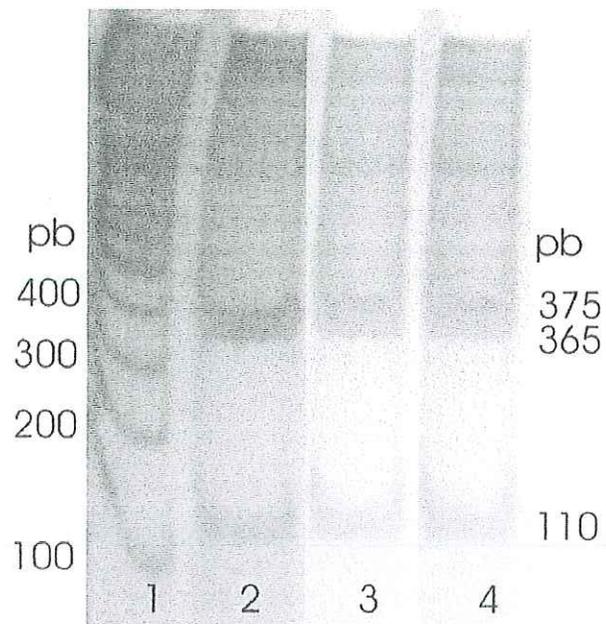


Figura 9. Electroforesis de poliacrilamida (6.5%) de la digestión enzimático del producto de PCR de 850-880 pb con la enzima *HinfI*: carriles: 1, estándar de ADN de 100 pb; 2 cepa rugosa; 3 cepa lisa; 4 control de *S. cerevisiae*.

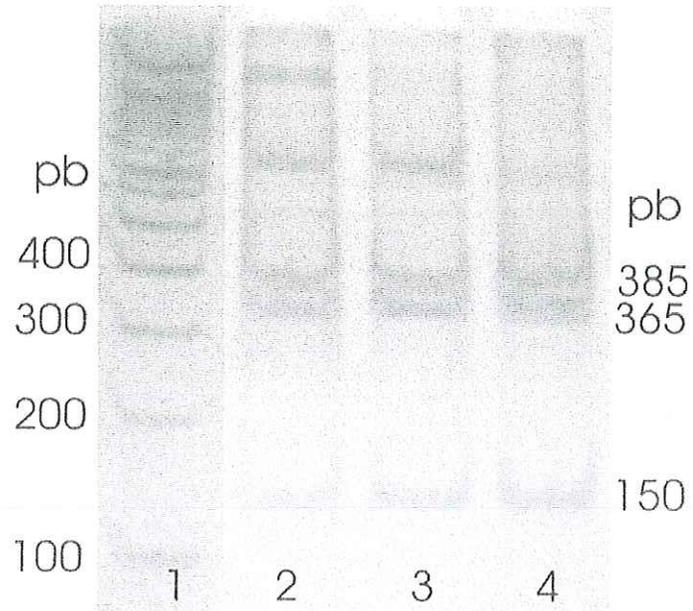


Figura 10. Electroforesis de poliacrilamida (6.5%) de la digestión enzimático del producto de PCR de 850-880 pb con la enzima *HhaI*: carriles: 1, estándar de ADN de 100 pb; 2 cepa rugosa; 3 cepa lisa; 4 control de *S. cerevisiae*.



Figura 11. Producto del PCR de la levadura con pigmentación café donde se observa el producto de alrededor de 380-390 pb. Carril 1; estándar de ADN, carriles del 2- 8 diferentes colonias aisladas, carril 9 estándar de ADN.

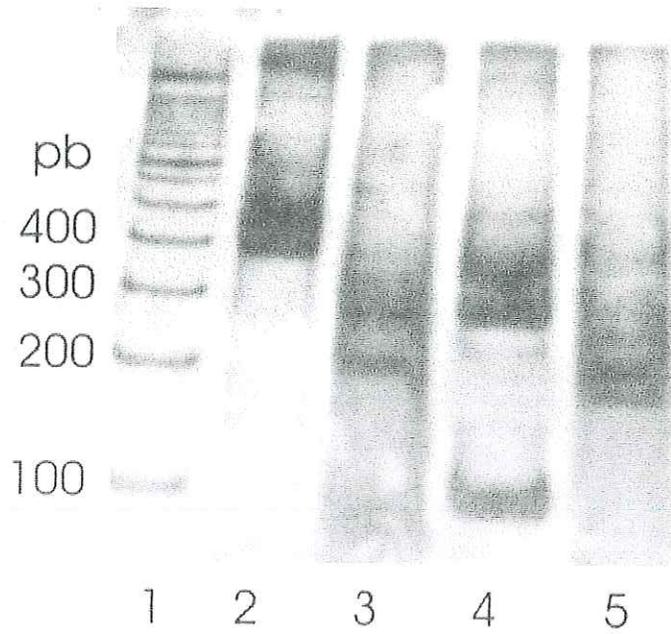


Figura 12. Electroforesis en acrilamida de la digestión del producto de PCR de 380-390 pb. carriles: 1, estándar de ADN; 2 sin digerir; 3, digestión con *HinfI*; 4, digestión con *HaeIII*; 5, digestión con *HhaI*.

VI.5. ANALISIS DE LOS DATOS DE RESTRICCIÓN DE ACUERDO A LA LITERATURA.

El tamaño del producto de PCR encontrado en la mayoría de las colonias aisladas en este trabajo corresponde a un tamaño que oscila entre 850-880 pb, de acuerdo a lo observado en los geles de agarosa, lo cual nos indica que alguno de los géneros de la Tabla I, según el análisis de restricción encontrado por Esteve-Zarzoso *et al.*(1999), con la enzima *HaeIII* y de acuerdo a la digestión de la cepa control de *S. cerevisiae*, las cepas aisladas tanto lisas como rugosas de este tamaño corresponden a la especie *S. cerevisiae*.

Para el producto pequeño de PCR de alrededor de 380-390 pb, el patrón de digestión no fue similar a ningunos de los reportados hasta la actualidad para las cepas de vinos y frutos (Tabla II).

Tabla I. Productos de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4 y patrones de restricción para fragmentos de 800-880 pb, tomado de Esteve-Zarzoso *et al* (1999) y Fernández-Espinar. *et al* (2000)

ESPECIE	PCR	PATRON DE RESTRICCION		
		<i>CfoI</i> (<i>HhaI</i>)	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
Según Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> (1999)				
<i>Candida glabrata</i>	800	395	675	360, 270
<i>Dekkera anomala</i>	800	340, 340, 120	800	360, 190, 160, 80
<i>Kluyveromyces bacillisporus</i>	820	330, 305, 105, 105	550, 280	310, 285, 115, 110
<i>Saccharomyces bayanus</i>	880	385, 365	500, 220, 145	365, 155
<i>S. cerevisiae</i>	880	385, 365	320, 230, 180, 150	365, 155
<i>S. paradoxus</i>	880	385, 365	320, 230, 180, 150	440, 440
<i>S. pastorianus</i>	880	385, 365	500, 220, 145	365, 155
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	800	330, 220, 150, 100	800	410, 380
<i>Torulaspora petroriensis</i>	825	375, 330, 110	800	380, 290, 125
<i>Wickerhamiella domerquiaae</i>	825	300, 250	525	275, 275
<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	850	350, 250, 210	560, 200, 90	400, 270, 180
<i>Z. microellipsoides</i>	825	350, 285, 100, 90	725, 100	425, 400
Según Fernández-Espinar <i>et al.</i> (2000)				
<i>S. bayanus</i>	850	375, 325, 150	495, 230, 125	375, 365, 110
<i>S. cerevisiae</i>	850	375, 325, 150	325, 230, 170, 125	375, 365, 110
<i>S. paradoxus</i>	850	375, 325, 150	325, 230, 170, 125	375, 365, 110
<i>S. pastorianus</i>	850	375, 325, 150	495, 230, 125	375, 365, 110
<i>S. flor yeast</i>	850	345, 345, 150	325, 230, 155, 125,	375, 365, 110
<i>S. castellii</i>	800	350, 325, 100	800	345, 260, 130
<i>S. dairenensis</i>	800	330, 330, 125	800	350, 345, 90
<i>S. transvaalensis</i>	875	415, 310	525, 350	400, 350, 125

Tabla II. Productos de PCR y patrones de restricción para fragmentos de 380-400 pb, tomado de Esteve-Zarzoso *et al* (1999) y Llanos – Frutos *et al* (2004).

ESPECIE	PCR	PATRON DE RESTRICCION		
		<i>CfoI</i> (<i>HhaI</i>)	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
Según Zarzoso <i>et al.</i> (1999)				
<i>Candida agrestis</i>	400	210, 190	290, 110	220, 180
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	205, 100, 95	280, 100	200, 190
<i>Pichia pastoris</i>	380	360	380	250, 130
<i>Yarrowia lipolytica</i>	380	210, 170	380	190, 190
Según Llanos-Frutos <i>et al.</i> (2004)				
<i>Candida haemulonii</i>	390	230, 170	380	190, 190
<i>C. mesenterica</i>	390	390, 160, 100,	390	195, 195
<i>C. diversa</i> (vid)	400	100	400	210, 190
<i>C. fructus</i>	400	220, 90, 90	280, 150	210, 130, 80
<i>C. intermedia</i> (vid)	400	220, 180, 220, 120,	400	210, 190
<i>C. melibiosa</i> (vino)	400	60	280, 120	190, 190, 20
<i>C. mogii</i>	400	220, 180	400	220, 130, 70
<i>C. musae</i>	400	220, 90, 90	280, 150, 260, 70,	210, 130, 80
<i>C. oregonensis</i>	400	220, 180	70	200, 190
<i>C. pseudointermedia</i>	400	220, 180	400	210, 190, 180, 150, 60,
<i>C. rugosa</i>	400	210, 190	400	30
<i>C. sequanensis</i>	400	220, 210	400	200, 160, 70

Por lo tanto una vez confirmado que el producto de PCR de 380-390 pb y su digestión enzimática no era similar a ningunos de los reportados se prosiguió a enviar el producto de PCR a secuenciar a la Universidad Estatal de San Diego (San Diego State University) como un servicio externo ya que no se cuenta con secuenciador, y como resultado de este análisis se obtuvo la siguiente secuencia (5' - 3'):

```
CAATAACACAATTCAAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCCCCTCC
ATGAAAAACGCCGCGAATTGCCATACCTAATATGACTTGCAAACGTGAATC
ATTGAATCTTTGAACGCACCTTGGGCCCCGGGGTTTTCCCCGGGCATGCGT
GGGTGAACGATATTTACTCCCAAACCTCCGGTTTGGTCCTGCTTCGGCCTAA
TATCCACGGGGCTAAAATAAGTTTTAACCCCTTCTTTTTCTCCCCCTCGTA
AGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAAGAAA
```

Según a la comparación de esta secuencia en el Banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) representa el 99% de similitud con respecto al género *Metschnikowia* como se puede ver en la siguiente alineación de bases:

gi|86450224|gb|DQ367881.1| Metschnikowia sp. XY103 18S ribosomal RNA gene,

partial sequence;

internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 26S
ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=871

Score = 577 bits (291), Expect = 9e-162
Identities = 297/299 (99%), Gaps = 0/299 (0%)
Strand=Plus/Minus

```
Query 6
GTCTTACGAGGGTGAGGAAGAAGAATGGGGCTAAAACCTATTCTAGCGCCGTTGATATTA 65
|||||
Sbjct 332
GTCTTACGAGGGTGAGGAAAAAGAATGGGGCTAAAACCTATTCTAGCGCCGTTGATATTA 273

Query 66
GGCCGAAGCAGGACCAAACCGGAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCACCCACGCATGCCCT 125
|||||
Sbjct 272
GGCCGAAGCAGGACCAAACCGGAGGTTTGAGAGTAAATATCGCTCACCCACGCATGCCCT 213

Query 126
GGGGAATACCCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACGTCTGCAAGTCA 185
|||||
Sbjct 212
GGGGAATACCCCGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCAATGATTCACGTCTGCAAGTCA 153

Query 186
TATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT 245
|||||
Sbjct 152
TATTACGTATCGCAATTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGGAGAACCAAGAGATCCGTTGTT 93

Query 246
GAAAGTTTTTGAATTGTGTTATTGAAAAAAAAGGTTTCAGTTGTTTTTTCCTAAAAGTGT 304
|||||
Sbjct 92
GAAAGTTTTTGAATTGTGTTATTGAAAAAAAAGGTTTCAGTTGTTTTTTCCTAAAAGTGT 34
```

VII. DISCUSION:

Las levaduras responsables de la fermentación del vino han sido objeto de diversos estudios y su manejo ha sido uno de los grandes avances en el proceso de vinificación. La concentración de levaduras registrada en los procesos de fermentación espontánea que se estudiaron, presentan valores similares a los reportados por otros autores, esto es entre 10^4 - 10^5 y 10^8 ufc/ml al inicio y al final de la fermentación respectivamente. Esta población de levaduras está integrada por diversos géneros de levaduras silvestres que participan en la fermentación del mosto; sin embargo no todas estas levaduras están presentes en última etapa de fermentación del vino debido a su baja tolerancia al etanol e invariablemente *S. cerevisiae* domina la última etapa debido a su mayor tolerancia al alcohol tal como ha sido expuesto por diferentes autores, (Cappello *et al.*, 2004; Clemente-Jiménez *et al.*, 2005; Fugelsang, 1996; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001) así como a los resultados del presente trabajo. De acuerdo a Cappello *et al.*, (2004), cada región vitivinícola presenta una variedad de *S. cerevisiae* particular, que pudiera ser el resultado de su adaptación a las características climáticas de la región. Con el presente trabajo se dio inicio a la formación de una colección de levaduras propias a la región del Valle de Guadalupe, B.C., para poder, posteriormente, investigar su potencial enológico. Durante esta primera parte del trabajo, se llegó a la identificación presuntiva de dos géneros de levaduras, *Metschnikowia spp.* y *Saccharomyces spp.* El género *Metschnikowia*, ha sido reportado previamente

en fermentaciones de vid (Arias *et al.*, 2002; Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Fugelsang, 1996). De acuerdo a la literatura este género está considerado entre los comúnmente aislados en frutos pero en baja frecuencia de aislamiento. Fugelsang, (1996) y Zarzoso *et al.*, (1999), mencionan que se han reconocido 10 especies de este género de los cuales cuatro han sido aislados de ambientes acuáticos y el resto en ambientes terrestres. Además señalan que del análisis de restricción de 8 especies del género *Metchnikowia*, todos mostraron el mismo patrón con las enzimas utilizadas, incluyendo las de este estudio. El patrón de restricción obtenido en este trabajo no coincide con los presentados por otros autores; sin embargo la alineación de la secuencia de ADN de la cepa aislada nos indica que tiene una similitud del 99%, con respecto a *Metchnikowia spp.* Otra indicación con respecto a la identificación de esta levadura la encontramos en el manual taxonómico de levaduras de Kreger-van Rij (1984), en donde se señala que *M. pulcherrima* produce un pigmento café-rojizo después de un mes de estar en agar a 25°C, color que también se presentó en la cepa aislada en este estudio. Este género estuvo presente en la primera (inicio) y segunda (media fermentación) etapas de la fermentación con porcentajes relativos de 17 y 22%, respectivamente, sugiriendo su baja tolerancia al etanol en la última etapa donde ya no se le registró. Esta frecuencia de aislamiento es alta con respecto al 0.8% encontrado por Esteve-Zarzoso *et al.*, (2001).

El género *S. cerevisiae*, fue aislado en este trabajo al final de la fermentación como único género, con dos biotipos caracterizados por presentar una colonia lisa y el otro rugosa. A pesar que las fermentaciones se llevaron a cabo en el laboratorio donde no había posibilidades de contaminación por insectos o manipulación, no se descarta que el origen de la *S. cerevisiae* aislada en este trabajo, provenga de las levaduras comerciales que son utilizadas en la vinícola "Escuela de El Porvenir", de donde se efectuó la molienda de las uvas ya que el jugo se obtuvo de la despalladora usada en dicha vinícola. Ya que Naumov (1996) señala que *S. cerevisiae* es una especie cercana a *S. paradoxus*, quizá la especie de *Saccharomyces* aislada en este trabajo pudiera simularse a esta especie, ya que el patrón de digestión con las enzimas utilizadas muestra un mismo patrón en ambas especies. Para esto, se debe profundizar en su estudio para diferenciarlas y en caso de ratificar su identificación como *S. cerevisiae* poder diferenciar sus genotipos.

Como se ha señalado, siendo este el primer trabajo sobre las levaduras vínicas de la región, no fue posible efectuar aislamientos en otros viñedos del Valle de Guadalupe así como determinar cuáles cepas presentan propiedades enológicas que confieran características particulares en la fermentación de las variedades de uva cultivadas en la zona.

La identificación molecular de cepas de levaduras utilizando PCR y los cebadores ITS1 e ITS4 es un método muy recurrido, así como el patrón de digestión enzimático. Debemos señalar sin embargo, que se constató que los

patrones de digestión reportados con la enzima *CfoI* para *S. cerevisiae* de la marca Boehringer Mannheim® utilizada por Zarzoso *et al.*, (2002) y la reportada por Fernández-Espinar y López *et al.*, (2002) de la marca Roche Molecular Biochemicals®, así como la utilizada en este estudio de TAKARA BIO INC ®, diferían un poco. A pesar de estas diferencias el utilizar la cepa control de *S. cerevisiae* nos permitió visualizar claramente que se trataba de la misma especie.

VIII. CONCLUSIONES

1. La identificación molecular de levaduras mediante el uso del producto de PCR y los cebadores ITS1 e ITS4, es un método confiable y rápido siempre y cuando se obtenga la secuencia de este producto.
2. El método de identificación con análisis de restricción del producto de PCR (RFLP) es un método muy confiable sin embargo faltan mas análisis enzimáticos de restricción del producto obtenido con estos cebadores para todas las especies de levaduras, lo cual es una herramienta útil pero con sus limitaciones.
3. El predominio de *S. cerevisiae* en el aislamiento hace ver que esta especie es dominante en los procesos de fermentación y se encuentra presente en el Valle de Guadalupe.
4. El género *Metschnikowia* fue detectado en nuestro estudio y esta reportado como uno de los géneros cosmopolitas en los campos de vid y en los procesos iniciales de fermentación.
5. El cepario obtenido será utilizado para posteriores análisis de caracterización enológica para una posible explotación comercial.

IX. LITERATURA CITADA

- Arias, C. R., Burns, J. K., Friederich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. 2002. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Appl. Microbiol.* 68: 1955 – 1956.
- Capello, M., Bleve, G., Dellaglio, F., Zacheo, G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1274 – 1280.
- Cavaliere, D., McGovern, P.E., Hartl, D.L., Mortimer, R., Polsinelli, M. 2003. Evidence for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* 57 (1): 226 – 232.
- Clemente-Jimenez, J.M., Mignorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F.J., Rodríguez-Vico, F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Inter. J. Food Microbiol.* 98: 301 – 308.
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J.L., Le Jeune, C. 2004. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1140 – 1148.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329 – 337.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Microbiol.* 67:2056 - 2057.

Fay, J.C. and Benavides, J.A. 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos Gen.* 1: 66 – 71.

Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV. Ed. Madrid España, pp. 275-276.

Fernández-Espinar, T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek.* 78: 87–97.

Fleet, H. and Heard, G.H. 1992. Yeast growth during fermentation. In: Fleet, H. (Ed), Wine Microbiology and Biotechnology. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. 27-54.

Frezier, V. and Dubordieu, D. 1992. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. Amer. J. Enol. Vit. 43: 375 – 380.

Fugelsang, K.C. 1996. Wine microbiology. Editorial: Chapman & Hall. 68 - 116.

García-Garibay, M. y López-Munguía, A. 2002. Bebidas Alcohólicas no destilables. En: Biotecnología Alimentaria, García-Garibay, M., Quintero, R., López-Munguía, A. (Eds). Editorial Limusa Noriega, México. 313 - 349.

Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The yeast a taxonomic study. Elsevier Sci. Pub. 1083 pp.

Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I. S., 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. Appl. Environ. Microbiol. 66: 744 – 753.

Llanos-Frutos, R., Fernández-Espinar, M.T., Querol A. 2004. Identification of species of the genus *Candida* by análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*. 85: 175-185.

Lopes, C. A., van Broock, M., Querol, A. and Caballero, A.C. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean patagonia. A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 35: 638 -642.

López, V., Fernández, M., Barrio, E., Ramón, D., Querol, A. 2003. A new PCR - based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Inter. J. Food Microbiol.* 81: 63– 71

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R. 2004. Fermented beverages of pre – and proto – historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 17593 – 17598.

Martini, A. y Vaughan-Martini, A. 1990. Grape must fermentation: past and present. In Spencer, J.F.T.D., Spencer, M. (Eds), *Yeast Technology*. Springer Verlag, Berlin Germany. 105-123.

Mortimer, R.K. and Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150: 199-204.

Naumov, G.I., 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J. Ind. Microbiol.* 17: 285 – 302.

Ostergaard, S., Olsson, L., Nielsen, J. 2000. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* 64: 34 – 50.

Querol, A. and Barrio, E. 1990. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial ADN. *Nucleic Ac. Res.* 18: 1657.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ. Microbiol.* 58: 2984 – 2953.

Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. 1994. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Inter. J. Food Microbiol.* 21: 315 – 323.

Querol, A., Barrio, E., del Olmo, M., Fernández, M. 2003. Adaptative evolution of wine yeast. *Inter. J. Food Microbiol.* 86: 3–10.

Sabate, J., Cano, J., Querol, A. and Guillamón, J.M. 1998. Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl Microbiol.* 26: 452–455.

Schuller, D., Casal, M. 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol Biotech.* 68 (3): 292-304

Schutz, M. and Gafner, J. 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 551–558.

Scragg, A. 1996. *Biología para Ingenieros*. Ed: Limusa. México. 177 - 192.

Sniegowski, P.D, Dombrowski, P.G., Fingerman, E., 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1: 306.

Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J. 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.

Veziñhet, F., Hallet, J., Valade, M. and Poulard, A. 1992. Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Amer. J. Enol. Vit.* 43: 83–86.

Villa-Carbajal M., Querol A., Belloch c. 2006. Identification of species in the genus *Pichia* by restriction of the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) and the 5.8 S ribosomal DNA gene. *Antoine Van Leeuwenhoek* 90(2): 171 – 81.

Vivier, M.A. and Pretorius, I.S. 2002. Genetically Tailored grapevines for the wine industry. *Trends Biotech.* 20(11): 472-478.

White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. In: *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. With, T.J. (Eds). San Diego: Academic Press. 315–33