

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ETSIAMN

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



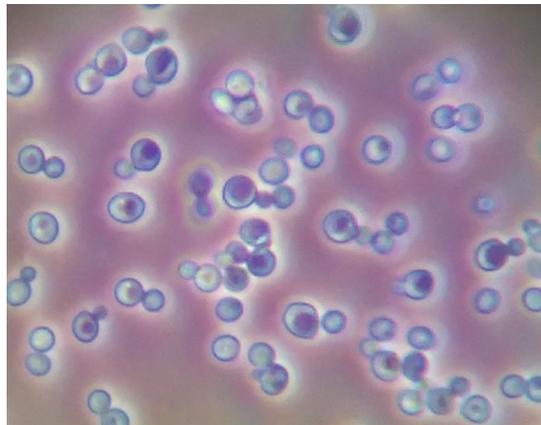
UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza.

2017-2018



Alumna: Mónica María Ferrer Piquer

Tutora: Lynne Yenush

Valencia, España. Septiembre 2018

Título: Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza.

Resumen: En los últimos años el mercado de la cerveza está experimentando nuevas tendencias de consumo. El consumidor demanda una mayor variedad de cervezas en cuanto a sabor y aroma. En la fabricación de cerveza es esencial la levadura empleada, puesto que, es la responsable de la mayor parte de los compuestos aromáticos presentes una vez finalizada la fermentación del mosto. Por esto, tratamos de aislar e identificar levaduras nativas del municipio de Alboraya, concretamente *Saccharomyces cerevisiae*, la más conocida en la elaboración de cerveza. Esto nos permitiría obtener un perfil aromático particular para producir cerveza. Para ello, se realizó un muestreo en el campo, más tarde, se aislaron las diferentes cepas y se seleccionaron mediante el fenotipo: ensayos de crecimiento en medio líquido y en placa, en medios restrictivos y no restrictivos para la especie en cuestión. Posteriormente, se procedió a la caracterización molecular de aquellas cepas putativas mediante análisis filogenéticos y de “Restriction fragment length polymorphism” (RFLP) de secuencias de regiones ribosómicas generadas por “Polymerase chain reaction” (PCR). Mediante esta metodología identificamos *S. cerevisiae* asociada a suelos de higuera.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, selección de levaduras, cerveza, PCR, RFLP.

Title: Isolation, selection and identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains native to Alboraya for beer brewing.

Abstract: In the past few years, the Spanish beer market has experienced new consumer trends. The consumer demands more beer variety in terms of flavor and aroma. The yeast used in the manufacturing of beer is essential as it is responsible for most of the aromatic compounds present after the fermentation of the must. The most widely-employed brewing yeast is *Saccharomyces cerevisiae*. In this project, we attempted to isolate and identify strains native to the municipality of Alboraya, searching specifically for strains of *Saccharomyces cerevisiae*. This will allow us to obtain a particular aromatic profile for beer brewing. For this, a sampling was carried out in the field and the different strains were then isolated and selected phenotypically using growth tests in liquid and solid medium in restrictive and non-restrictive conditions. Subsequently, we carried out a molecular characterization of the candidate strains employing restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of PCR-derived ribosomal sequences. Through this methodology, we identified a *S. cerevisiae* strain found in the soil of a fig tree.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, selection of yeasts, beer, PCR, RFLP.

Alumna: Dña. Mónica María Ferrer Piquer

Valencia, Julio de 2018

Prof. Dña Lynne Yenush

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Lynne, mi tutora y directora del proyecto, por su esfuerzo y dedicación.

A la Compañía Cervecera Zeta S.L.: Manuel, Carlos y Guillermo. Por hacer posible este proyecto, y por depositar su confianza en mí.

A Carlos, compañero y amigo, por su ayuda profesional.

A los compañeros del laboratorio 1.08 del IBMCP, en especial a Irene y Jorge, por sus ánimos y compañerismo, y a Bárbara y Antonella, por ayudarme en todo momento.

A mi familia, en especial a mis padres, por brindarme la oportunidad de estudiar.

Y a Juan Pablo, por su apoyo incondicional.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	I
ABREVIATURAS	II
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
1.1. CLASIFICACIÓN- TAXONOMÍA DE LAS LEVADURAS.....	- 1 -
1.2. IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN LA CERVEZA	- 1 -
1.3. HÁBITAT DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.	- 3 -
1.4. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	- 3 -
1.4.1. Métodos tradicionales para la identificación de levaduras.....	- 3 -
1.4.2. Métodos moleculares de identificación de levaduras.....	- 3 -
1.4.2.1. Métodos para la identificación de especies	- 3 -
1.4.2.1.1. Métodos basados en el análisis de regiones ribosomales.....	- 3 -
1.4.2.1.1.1. Secuenciación de regiones ribosomales.....	- 3 -
1.4.2.1.1.2. Análisis de perfiles de restricción de ADNr (RFLP).....	- 4 -
1.4.2.1.2. PCR–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis	- 4 -
1.4.2.1.3. La hibridación in situ fluorescente (FISH)	- 4 -
1.4.2.1.4. PCR en tiempo real	- 5 -
1.4.2.2. Métodos para diferenciar a nivel de cepa.....	- 5 -
1.4.2.2.1. Electroforesis en gel de campo pulsado de cromosomas (PFGE):	- 5 -
1.4.2.2.2. Análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt).....	- 5 -
1.4.2.2.3. Métodos basados en la técnica PCR:	- 5 -
1.4.2.2.3.1. Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD).....	- 5 -
1.4.2.2.3.2. PCR de regiones repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites)-	6 -
1.4.2.2.3.3. Amplificación de secuencias δ	- 6 -
1.4.2.2.4. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados.....	- 6 -
2. MATERIALES Y MÉTODOS	- 7 -
2.1. MUESTREO	- 7 -
2.2. FASE DE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	- 10 -
2.2.1. Cepas de levaduras utilizadas como controles	- 11 -
2.2.2. Aislamiento de candidatos	- 11 -
2.2.3. Análisis morfológico	- 11 -
2.2.4. Caracterización del crecimiento de cada candidato.....	- 11 -
2.2.5. Ensayos de crecimiento en placa.....	- 12 -
2.3. FASE DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	- 13 -

2.3.1.	Extracción de ADN	- 13 -
2.3.2.	Reacciones de PCR	- 14 -
2.3.3.	Electroforesis horizontal en gel de agarosa	- 16 -
2.3.4.	Análisis e identificación de las secuencias	- 16 -
2.3.5.	Análisis RFLPs	- 17 -
3.	RESULTADOS	- 19 -
4.	DISCUSIÓN	- 27 -
5.	CONCLUSIONES	- 32 -
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 33 -

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. FORMACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	2 -
FIGURA 2. ALGUNOS EJEMPLOS DE PLANTAS MUESTREADAS. DE IZQUIERDA A DERECHA: NARANJO, BANANERO, NISPERERO.	7 -
FIGURA 3. MAPA DEL MUNICIPIO DE ALBORAYA Y SUS MUNICIPIOS COLINDANTES DONDE SE REALIZARON LOS MUESTREOS.	8 -
FIGURA 4. PREPARACIÓN DE LOS ENSAYOS DE CRECIMIENTO EN PLACA A PARTIR DE UNA PLACA DE 96 POCILLOS. EN ROJO: CONTROLES; EN VERDE: CANDIDATOS. COLUMNA 1 Y 4: DILUCIÓN 1:10; COLUMNA 2 Y 5: DILUCIÓN 1:100; COLUMNA 3 Y 6: DILUCIÓN 1:1000.....	13 -
FIGURA 6. CRECIMIENTO DE LAS MUESTRAS EN MEDIO SELECTIVO. DE IZQUIERDA A DERECHA: 7, CONTROL NEGATIVO, WLP001 Y WLP830.	19 -
FIGURA 7. COMPARACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS MUESTRAS CON LAS CEPAS CONOCIDAS WLP001 Y WLP830.....	20 -
FIGURA 8. CURVA DE CRECIMIENTO EN MEDIO YPD CON UNA DENSIDAD ÓPTICA INICIAL DE 0.1.....	21 -
FIGURA 9. CURVA DE CRECIMIENTO EN MEDIO SELECTIVO CON UNA DENSIDAD ÓPTICA INICIAL DE 0.1..	21 -
FIGURA 10. ENSAYOS DE CRECIMIENTO CON DILUCIONES SERIADAS (1:10, 1:100 Y 1:1000) DE CADA CEPA EN MEDIO YPD, AGAR LISINA Y MEDIO E.S.A. TRAS 24, 48 Y 72H.	22 -
FIGURA 11. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%. AMPLIFICACIÓN DE PCR CON LOS CEBADORES NL1 Y NL4. M: MARCADOR MOLECULAR 100 BP DNA LADDER.....	22 -
FIGURA 12. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 1%. AMPLIFICACIÓN DE PCR CON LOS CEBADORES ITS1 E ITS4. M: MARCADOR MOLECULAR 100 BP DNA LADDER.....	23 -
FIGURA 13. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%. DIGESTIÓN CON HPAII Y HAEIII DE LA REGIÓN ITS. M: MARCADOR MOLECULAR 100 BP DNA LADDER.....	25 -
FIGURA 14. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%. DIGESTIÓN CON SCRFI DE LA REGIÓN ITS. M: MARCADOR MOLECULAR 100 BP DNA LADDER.	25 -
FIGURA 15. DIFERENCIACIÓN ENTRE <i>MEYEROZYMA CARIBBICA</i> Y <i>M. GUILLIERMONDII</i> . CARRIL 1: <i>MEYEROZYMA GUILLIERMONDII</i> Y CARRIL 2: <i>MEYEROZYMA CARIBBICA</i> (ROMI ET AL., 2014).	26 -
FIGURA 16. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA 2%. DIGESTIÓN CON TAQ I DE LA REGIÓN ITS. M: MARCADOR MOLECULAR 100 BP DNA LADDER	26 -
FIGURA 17. SECUENCIA DE LA REGIÓN ITS DEL CLON 73 OBSERVADO MEDIANTE EL PROGRAMA CHROMAS.- 30 -	

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. COORDENADAS DEL MUESTREO.....	8 -
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES MUESTRAS.	8 -
TABLA 3. DESCRIPCIÓN DE LAS DIFERENTES MUESTRAS.	9 -
TABLA 4. VOLUMEN DE Y-PER A AÑADIR EN BASE A LA MASA DE PELLETT OBTENIDA.	13 -
TABLA 5. CANTIDAD DE ADN POR MUESTRA.....	14 -
TABLA 6. CONCENTRACIONES DE LOS STOCKS UTILIZADOS, CONCENTRACIONES A EMPLEAR EN LA REACCIÓN Y VOLUMEN A AÑADIR DE LOS COMPONENTES DE LA PCR CONSIDERANDO UN VOLUMEN TOTAL DE 25 O 50 μ L (PARA NL E ITS RESPECTIVAMENTE).	15 -
TABLA 7. DATOS DE LA T_m DE CADA PRIMER.....	15 -
TABLA 8. CONDICIONES PCR TERMOCICLADOR.....	15 -
TABLA 9. COMPONENTES DE LAS REACCIONES RFLPS.....	17 -
TABLA 10. RESULTADOS OBTENIDOS EN BLASTN DE LOS DIFERENTES CANDIDATOS.	23 -

TABLA 11. LONGITUD EN PARES DE BASES DE LOS FRAGMENTOS TEÓRICOS OBTENIDOS DE LA DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN HPAII, HAEIII Y SCRf DE LA REGIÓN ITS AMPLIFICADA POR PCR.- 24 -

TABLA 12 . LONGITUD EN PARES DE BASES DE LOS FRAGMENTOS TEÓRICOS OBTENIDOS DE LA DIGESTIÓN CON TAQ I DE LA REGIÓN ITS AMPLIFICADA POR PCR.- 25 -

TABLA 13. INFORMACIÓN SOBRE LAS CEPAS AISLADAS E IDENTIFICADAS.- 32 -

ABREVIATURAS

- ADN	Ácido desoxirribonucleico
- ADNmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
- A.S.E.	Agar Sulfito Etanol
- A, G, C, T	Adenina, Guanina, Citosina, Timina
- BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
- BLASTN	Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide
- CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
- DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- D.O.	Densidad Óptica
- FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
- IBMCP	Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
- ITS	Internal Transcribed Spacer
- kb	Kilos de bases
- min	Minutos
- NCBI	National Center for Biotechnology Information
- ND	No Disponible
- pb	Pares de bases
- PBS	Phosphate Buffered Saline
- PCR	Polymerase Chain Reaction
- PCR- DGGE	Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
- PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
- RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
- RFLP	Restriction Fragment Length Polymorfysm
- rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
- T _m	Temperatura de melting
- UV	Ultravioleta
- YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
- Y-PER	Yeast- Protein Extraction Reagent

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CLASIFICACIÓN- TAXONOMÍA DE LAS LEVADURAS.

Las levaduras son hongos predominantemente unicelulares. Forman parte del reino Fungi, dentro del subreino Dikarya, que se divide en Ascomycota y Basidiomycota (Kurtzman *et al.*, 2011). Generalmente las levaduras, ya sean ascomicetos o basidiomicetos, se caracterizan por su crecimiento asexual que se produce predominantemente por gemación o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero.

Generalmente se relaciona la palabra levadura directamente con el proceso de fermentación, más concretamente con el del pan, la cerveza y el vino. Por lo que es común el considerar a las levaduras como hongos fermentativos. De hecho, muchas veces se ha tratado a las levaduras como sinónimo de *Saccharomyces*. Sin embargo, no todas las levaduras tienen capacidad fermentativa (Kurtzman *et al.*, 2011).

En total, se han descrito más de 1500 especies de levadura (Kurtzman *et al.*, 2011). El grupo *Saccharomyces sensu stricto* es un grupo de especies de levaduras estrechamente relacionadas. Lo conforman: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. jurei*, especie recientemente añadida, aislada de la corteza del roble y del suelo circundante (Naseeb *et al.*, 2017). La variación genética de este grupo es alta a nivel de cepa, tanto en términos fenotípicos como moleculares.

1.2. IMPORTANCIA DE LAS LEVADURAS EN LA CERVEZA

Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) fue un neerlandés comerciante de tejidos, que se dedicó al pulido de las lentes y fue la primera persona que observó y describió las levaduras al tomar muestras de cerveza, que examinó a través de su primitivo microscopio de lente simple. Aunque, fue más tarde, cuando Louis Pasteur (1822-1895) habiendo realizado estudios detallados sobre la fermentación en vinos y cerveza, concluyó que las levaduras eran las responsables de convertir el azúcar en etanol y dióxido de carbono, cuando eran obligados a vivir en condiciones anaerobias.

La importancia de las levaduras reside en su larga relación con la sociedad humana debida principalmente a la producción de pan, cerveza y vino. La cerveza, es la bebida resultante de la fermentación del mosto procedente de granos de cereal, normalmente cebada, y que es aromatizada con lúpulo. Se trata de un producto muy antiguo, se han hallado indicios de su fabricación que datan del 3500- 3400 a.C. en el Alto Egipto (Maksoud *et al.*, 1994).

Además, a nivel industrial, desempeñan un papel fundamental en la fabricación de diversos productos como son el pan, las bebidas alcohólicas (cerveza, sidra, sake, vino), saborizantes, pigmentos y antibióticos. Entre las especies de levaduras más importantes y conocidas destaca *Saccharomyces cerevisiae*, actualmente es la levadura mejor estudiada tanto en sus características fisiológicas como genéticas, incluso se ha secuenciado su genoma completo (Goffeau *et al.*, 1996).

El utilizar una cepa concreta por sus características, ha llevado a la selección y conservación de microorganismos. Los cerveceros adquieren las levaduras necesarias para producir cerveza a través de empresas que cuentan con bancos de levaduras, obteniendo la óptima para cada estilo de cerveza.

1.3. HÁBITAT DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE.

El hábitat de *S. cerevisiae* ha sido continuamente discutido por diversos autores, y a día de hoy, no nos consta que se haya resuelto esta incógnita.

Hasta hace unos años, se creía generalmente que esta especie habitaba en frutos con un alto contenido en azúcares, como son las uvas. Más recientemente, se ha encontrado de manera reiterada y consistente esta especie en la corteza de robles y suelos adyacentes (Sampaio y Gonçalves, 2008; Sniegowski *et al.*, 2002). Además de los ambientes descritos anteriormente, se ha encontrado también esta especie en hojas en estado de descomposición, en estiércol (Banno y Mikata 1985), y en árboles del género *Quercus* y árboles planifolios (Naumov *et al.*, 1998; Sniegowski *et al.*, 2002).

1.4. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Actualmente son diversos los métodos para la identificación de levaduras, los cuales varían en función del tiempo, especificidad, sensibilidad, costes, etc. De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad.

1.4.1. Métodos tradicionales para la identificación de levaduras

Para clasificar o nombrar una levadura desconocida, tradicionalmente se ha realizado mediante caracteres fenotípicos. Primero se establece el género al que pertenece, basándonos en características sexuales y morfológicas como la forma y tamaño de las células, la apariencia de la colonia y la producción de pigmentos. Una vez que se conoce el género, la especie generalmente puede determinarse mediante las características fisiológicas y bioquímicas como la fermentación o asimilación de glucosa y otros azúcares, la necesidad de vitaminas, desarrollo en presencia de ciertos inhibidores, etc. (Gilliland 1971; Kurtzman y Phaff 1987). No obstante, en la actualidad, estas técnicas se complementan y/o sustituyen con un análisis molecular de las cepas a identificar.

1.4.2. Métodos moleculares de identificación de levaduras.

Las técnicas moleculares se basan principalmente en el estudio de las moléculas de ADN y ARN. Los datos obtenidos del estudio del genoma han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de levaduras. Actualmente, las técnicas moleculares que se describen a continuación, son las más utilizadas:

1.4.2.1. Métodos para la identificación de especies

1.4.2.1.1. Métodos basados en el análisis de regiones ribosomales

Estas técnicas son las más empleadas en la actualidad debido a su eficacia y, por tanto, serán los métodos empleados en este trabajo.

1.4.2.1.1.1. Secuenciación de regiones ribosomales

Los genes ribosomales presentan una secuencia con un alto grado de conservación a nivel de género y especie en los organismos eucariotas. Estos métodos se basan en la determinación y comparación de las secuencias de nucleótidos en estas regiones. Las dos regiones más comúnmente utilizadas son

las correspondientes a los dominios D1 y D2 ubicados en el extremo 5' del gen 26S (Nwaiwu, 2016) y el gen 18S (Sorof Uddin y Cheng, 2015). La técnica consiste en amplificar del ADN genómico estas regiones por PCR y posteriormente secuenciar los fragmentos amplificados. En los sistemas de secuencia automática (Salazar Montes, *et al.*, 2016), cuatro tintes fluorescentes se utilizan para identificar cada una de las bases (A, G, C y T). Los colorantes se incorporan por medio de amplificación por PCR usando los mismos cebadores. Los fragmentos de ADN marcados de esta manera se separan en capilares finos en términos de su tamaño y son excitados simultáneamente por un láser, produciendo una emisión que es diferente para cada uno de los colorantes. Las señales generadas son luego transformadas por software en picos de color, cada uno de los cuales corresponde a un nucleótido. La separación es rápida y permite leer aproximadamente 600 nucleótidos en 2 o 3 h, según el modelo del secuenciador.

1.4.2.1.1.2. Análisis de perfiles de restricción de ADNr (RFLP)

Esta técnica (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) (Botstein *et al.*, 1980) se basa en la amplificación por PCR de estas regiones del ADN ribosómico y la posterior restricción del fragmento amplificado por endonucleasas. Los productos de amplificación se visualizan en geles de agarosa. Esta técnica, se caracteriza por su fácil ejecución y su reproducibilidad. Una región ribosómica que es muy útil para diferenciar a nivel de especie es la que incluye el gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2.

1.4.2.1.2. PCR–Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

La electroforesis en gel desnaturalizante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, DGGE) (Fischer y Lerman, 1983) es una técnica de huellas digitales genéticas basada en la amplificación por PCR (Muyzer *et al.*, 1993). En PCR-DGGE, se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud pero con secuencias de pares de bases diferentes.

Tras amplificar el fragmento de ADN de interés, una vez finalizada la electroforesis, las bandas resultantes se pueden identificar mediante comparación con bandas generadas por cepas patrón, o bien se puede recortar, aislar y purificar el ADN y someterlo a una reamplificación y secuenciarlo.

1.4.2.1.3. La hibridación in situ fluorescente (FISH)

La hibridación in situ fluorescente (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH) (Trask, 1991) es una tecnología que utiliza sondas de ADN marcadas con un fluoróforo. Cuando la muestra de ADN se desnaturaliza se le añade la sonda de interés, asociándose al ADN de la muestra en el sitio diana por hibridación, tras lo cual volverá a formar una doble hélice. Posteriormente, se observan las células en el microscopio de fluorescencia, y aquellas que emiten fluorescencia son las que presentan la secuencia diana en el ADN cromosómico. La FISH utiliza tres tipos de sonda: las sondas específicas de un locus, las alfoides o centroméricas y las de para cromosomas completos. Es una técnica que permite diferenciar especies dentro de una misma muestra, utilizando sondas específicas y diferentes fluorocromos.

1.4.2.1.4. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o cuantitativa (Higuchi *et al.*, 1992) permite amplificar y cuantificar la secuencia de ácidos nucleicos de forma simultánea, dentro del mismo vial. Mediante fluorescencia, es posible conocer al momento la cantidad de ADN que se está formando. La emisión de fluorescencia tras cada ciclo es proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

Esta técnica permite empleando un fluorocromo de unión inespecífica a la doble hebra de ADN, identificar fragmentos amplificados de DNA concretos a partir de la T_m que es específica para el fragmento amplificado que se está buscando; y cuyos resultados son obtenidos a partir de la observación de la curva de disociación de las muestras de DNA analizadas. Para la identificación de la especie, mediante un visor de genoma (por ejemplo www.ensembl.org), se busca el gen o la secuencia de interés e indica el número de repeticiones y en qué especies. Además, también se puede identificar la especie por secuenciación del fragmento amplificado o mediante el uso de marcadores moleculares (por ejemplo: RAPD, SSR, CAP).

1.4.2.2. Métodos para diferenciar a nivel de cepa

1.4.2.2.1. Electroforesis en gel de campo pulsado de cromosomas (PFGE):

La Electroforesis en gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) (Schwartz y Cantor 1984), es una técnica que permite diferenciar especies y también a nivel de cepas. Debido a que los fragmentos superiores a 20-40kb no pueden separarse empleando la electroforesis convencional en gel de agarosa, se altera periódicamente la orientación del campo eléctrico, permitiendo a las moléculas desplegarse y avanzar a través de los poros en conformación extendida (Nassonova, 2008).

Los pasos a seguir son los siguientes: se preparan las células, además de los tapones de agarosa, lisis celular, lavado, digestión enzimas de restricción, preparación y corrida del gel, coloración, documentación y análisis de los fragmentos de ADN obtenidos mediante BioNumerics software. Estos patrones sirven un código de barras virtual que "tipifica" las cepas y permite determinar si los aislamientos están estrechamente relacionados (Sharma-Kuinkel *et al.* 2014).

1.4.2.2.2. Análisis de restricción del ADN mitocondrial (ADNmt)

Esta técnica permite diferenciar cepas del género *Saccharomyces* puesto que el ADNmt de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta variabilidad dentro de la especie. Se realiza mediante digestión total del ADN y utilización de enzimas de restricción que cortan el ADNmt (Xuan *et al.*, 2017).

1.4.2.2.3. Métodos basados en la técnica PCR:

1.4.2.2.3.1. Polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD).

La técnica RAPD (*Random Amplified Polymorphic ADN-PCR*) (Williams *et. al.*, 1990) amplifica por PCR secuencias no específicas del genoma distribuidas aleatoriamente por el mismo. Se obtiene una amplificación de fragmentos polimórficos de ADN mediante oligonucleótidos cortos de secuencia arbitraria. Los fragmentos amplificados se observan por

electroforesis como un gran número de bandas, y pueden ser comparados usando el programa BLASTN de NCBI (National Center of Biotechnology Information).

1.4.2.2.3.2. PCR de regiones repetitivas del genoma (microsatélites y minisatélites)

Los microsatélites (Sjakste *et al.*, 2014) y minisatélites (Vergnaud y Denoeud, 2000) son secuencias cortas que se repiten a lo largo del genoma de manera abundante y al azar. Las secuencias de los microsatélites las forman no más de 10 pb, mientras que los minisatélites tienen entre 10 y 100 pb. Son buenos marcadores moleculares para la identificación intra e interespecífica, debido a que son altamente variables entre especies. La variabilidad de estas secuencias se detecta mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos. Los productos amplificados pueden visualizarse en geles de agarosa.

La identificación de microsatélites, se puede realizar a partir de genotecas, completas o enriquecidas en secuencias microsatélite. La identificación de estas repeticiones *in silico* se puede realizar a partir de bases de datos como: Repeat master, Sputnik, Tandem Repeat Finder. Base de datos de repeticiones en tándem <http://minisatellites.u-psud.fr/>.

1.4.2.2.3.3. Amplificación de secuencias δ

Las secuencias δ (Cameron *et al.*, 1979) son secuencias de 330 pares de base que están distribuidas de manera frecuente en el genoma de las levaduras. La técnica se basa en la utilización de cebadores específicos a estos elementos δ para amplificar las secuencias comprendidas entre estos elementos. Los perfiles de amplificación se visualizan en geles de agarosa. Los elementos δ no están presentes en levaduras no-*Saccharomyces*, por lo tanto esta técnica es limitada para *Saccharomyces*.

1.4.2.2.4. Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados

La técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*) (Zabeau y Vos, 1993) permite analizar al azar regiones del genoma sin tener conocimiento previo de este. El procedimiento es el siguiente: se digiere el ADN celular total con una o más enzimas de restricción y ligamiento de adaptadores específicos de restricción de medio sitio a todos los fragmentos de restricción. Amplificación selectiva de algunos de estos fragmentos con dos cebadores de PCR que tienen el adaptador correspondiente y las secuencias específicas del sitio de restricción. Separación electroforética de los amplicones en una matriz de gel, seguida de la visualización del patrón de la banda.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Hemos diferenciado este trabajo en tres etapas: muestreo, fase de caracterización fenotípica y fase de caracterización molecular. En el muestreo tomamos las muestras sobre las que trabajar. En la fase de caracterización fenotípica seleccionamos los posibles candidatos de *Saccharomyces cerevisiae* para luego en la fase de caracterización molecular confirmar estos posibles candidatos.

2.1. MUESTREO

Con el objetivo de obtener una levadura autóctona, concretamente *Saccharomyces cerevisiae*, se procedió a la toma de muestras en el municipio de Alboraya y sus municipios colindantes (ver Figura 2), donde se realizaron dos tandas de muestreo de 40 muestras aproximadamente cada una.



Figura 2. Algunos ejemplos de plantas muestreadas. De izquierda a derecha: naranjo, bananero, nisperero.

Se tomaron muestras del suelo, hojas (haz y envés), fruto y tronco de la planta.

Las muestras se tomaron con ayuda de una espátula, evitando no tomar demasiada materia para que más tarde, en la caracterización de las muestras, no nos impidiese observar el crecimiento en los tubos. Se depositaron en tubos eppendorf de 1,5 mL que contenían 200 μ L de medio PBS con 0,1% Tween 20 y se guardaron a 4°C.



Figura 3. Mapa del municipio de Alboraya y sus municipios colindantes donde se realizaron los muestreos.

Para tener controlada la ubicación exacta donde se tomaron las diferentes muestras, registramos las coordenadas (ver la Tabla 1).

Tabla 1. Coordenadas del muestreo

Nº Punto	Coordenadas
1	Huerto Camí de fondo, Alboraya Valencia
1 ^a (nisperero)	39.498178, -0.345195
1b (limonero)	39.498153, -0.345129
1c (berenjenas)	39.498220, -0.345079
1d (alcachofas)	39.498184, -0.345117
2	39.497940, -0.343159
3	39.510743, -0.346834
4	39.512314, -0.349079
5	39.512284, -0.349872
6	39.498361, -0.343217

A continuación, se describe en la Tabla 2 las muestras recogidas para su posterior análisis.

Tabla 2. Descripción de las diferentes muestras tomadas en el primer muestreo.

nº muestra	Lugar de recogida	Descripción de la muestra	Nombre científico
1	Punto nº 1 ^a	Nisperero tronco	<i>Eriobotrya japonica</i>
2	Punto nº 1 ^a	Nisperero suelo	<i>Eriobotrya japonica</i>
3	Punto nº 1 ^a	Nisperero hoja haz	<i>Eriobotrya japonica</i>
4	Punto nº 1 ^a	Nisperero hoja envés	<i>Eriobotrya japonica</i>
5	Punto nº 1 ^a	Nisperero fruto	<i>Eriobotrya japonica</i>
6	Punto nº 1b	Limonero tronco	<i>Citrus x limón</i>

7	Punto nº 1b	Limonero suelo	<i>Citrus x limón</i>
8	Punto nº 1b	Limonero hoja haz	<i>Citrus x limón</i>
9	Punto nº 1b	Limonero hoja envés	<i>Citrus x limón</i>
10	Punto nº 1b	Limonero fruto	<i>Citrus x limón</i>
11	Punto nº 1c	Berenjena fruto	<i>Solanum melongena</i>
12	Punto nº 1c	Berenjena tallo	<i>Solanum melongena</i>
13	Punto nº 1 c	Berenjena hoja	<i>Solanum melongena</i>
14	Punto nº 1d	Alcachofa hoja	<i>Cynara scolymus</i>
15	Punto nº 1d	Alcachofa fruto	<i>Cynara scolymus</i>
16	Punto nº 2	Naranja tronco	<i>Citrus x sinensis</i>
17	Punto nº 2	Naranja suelo	<i>Citrus x sinensis</i>
18	Punto nº 2	Naranja hoja haz	<i>Citrus x sinensis</i>
19	Punto nº 2	Naranja hoja envés	<i>Citrus x sinensis</i>
20	Punto nº 2	Naranja fruto	<i>Citrus x sinensis</i>
21	Punto nº 3	Olivo tronco	<i>Olea europea</i>
22	Punto nº 3	Olivo ramita	<i>Olea europea</i>
23	Punto nº 3	Olivo hojas haz	<i>Olea europea</i>
24	Punto nº 3	Olivo hoja envés	<i>Olea europea</i>
25	Punto nº 5	Nisperero tronco	<i>Eriobotrya japonica</i>
26	Punto nº 5	Nisperero hoja haz	<i>Eriobotrya japonica</i>
27	Punto nº 5	Nisperero hoja envés	<i>Eriobotrya japonica</i>
28	Punto nº 5	Nisperero fruto	<i>Eriobotrya japonica</i>
29	Punto nº 4	Platanero tronco	<i>Musa paradisiaca</i>
30	Punto nº 4	Platanero tronco	<i>Musa paradisiaca</i>
31	Punto nº 2	Higuera pequeña hoja haz	<i>Ficus carica</i>
32	Punto nº 2	Higuera pequeña hoja envés	<i>Ficus carica</i>
33	Punto nº 2	Higuera pequeña rama	<i>Ficus carica</i>
34	Punto nº 2	Higuera pequeña tronco	<i>Ficus carica</i>
35	Punto nº 4	Platanero fruto maduro	<i>Musa paradisiaca</i>
36	Punto nº 4	Platanero fruto verde (no maduro)	<i>Musa paradisiaca</i>
37	Punto nº 4	Platanero suelo	<i>Musa paradisiaca</i>
38	Punto nº 4	Platanero tronco cortado transversalmente	<i>Musa paradisiaca</i>
39	Punto nº 4	Platanero hoja haz	<i>Musa paradisiaca</i>
40	Punto nº 4	Platanero hoja envés	<i>Musa paradisiaca</i>

El segundo muestreo descrito en la Tabla 3, es una réplica del primero a excepción de la higuera (que se muestrea una diferente a la del primer muestreo) y los frutos de los plataneros (ya recolectados).

Tabla 3. Descripción de las diferentes muestras tomadas en el segundo muestreo.

nº	Lugar de recogida	Descripción de la muestra	Nombre científico
----	-------------------	---------------------------	-------------------

muestra			
41	Punto nº 1 ^a	Nisperero tronco	<i>Eriobotrya japonica</i>
42	Punto nº 1 ^a	Nisperero suelo	<i>Eriobotrya japonica</i>
43	Punto nº 1 ^a	Nisperero hoja haz	<i>Eriobotrya japonica</i>
44	Punto nº 1 ^a	Nisperero hoja envés	<i>Eriobotrya japonica</i>
45	Punto nº 1 ^a	Nisperero fruto	<i>Eriobotrya japonica</i>
46	Punto nº 1b	Limonero tronco	<i>Citrus x limón</i>
47	Punto nº 1b	Limonero suelo	<i>Citrus x limón</i>
48	Punto nº 1b	Limonero hoja haz	<i>Citrus x limón</i>
49	Punto nº 1b	Limonero hoja envés	<i>Citrus x limón</i>
50	Punto nº 1b	Limonero fruto	<i>Citrus x limón</i>
51	Punto nº 1c	Berenjena fruto	<i>Solanum melongena</i>
52	Punto nº 1c	Berenjena tallo	<i>Solanum melongena</i>
53	Punto nº 1 c	Berenjena hoja	<i>Solanum melongena</i>
54	Punto nº 1d	Alcachofa hoja	<i>Cynara scolymus</i>
55	Punto nº 1d	Alcachofa fruto	<i>Cynara scolymus</i>
56	Punto nº 2	Naranja tronco	<i>Citrus x sinensis</i>
57	Punto nº 2	Naranja suelo	<i>Citrus x sinensis</i>
58	Punto nº 2	Naranja hoja haz	<i>Citrus x sinensis</i>
59	Punto nº 2	Naranja hoja envés	<i>Citrus x sinensis</i>
60	Punto nº 2	Naranja fruto	<i>Citrus x sinensis</i>
61	Punto nº 3	Olivo tronco	<i>Olea europea</i>
62	Punto nº 3	Olivo ramita	<i>Olea europea</i>
63	Punto nº 3	Olivo hojas haz	<i>Olea europea</i>
64	Punto nº 3	Olivo hoja envés	<i>Olea europea</i>
65	Punto nº 5	Nisperero tronco	<i>Eriobotrya japonica</i>
66	Punto nº 5	Nisperero hoja haz	<i>Eriobotrya japonica</i>
67	Punto nº 5	Nisperero hoja envés	<i>Eriobotrya japonica</i>
68	Punto nº 5	Nisperero fruto	<i>Eriobotrya japonica</i>
69	Punto nº 4	Platanero tronto	<i>Musa paradisiaca</i>
70	Punto nº 4	Platanero hoja	<i>Musa paradisiaca</i>
71	Punto nº 6	Higuera negra yema axilar	<i>Ficus carica</i>
72	Punto nº 6	Higuera negra rama	<i>Ficus carica</i>
73	Punto nº 6	Higuera negra suelo	<i>Ficus carica</i>
74	Punto nº 6	Higuera negra tronco	<i>Ficus carica</i>
75	Punto nº 6	Higuera negra suelo	<i>Ficus carica</i>

2.2. FASE DE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

En esta primera fase tratamos de aislar las posibles *Saccharomyces cerevisiae* presentes en las muestras. Para ello nos basamos en el crecimiento selectivo apto para esta especie.

2.2.1. Cepas de levaduras utilizadas como controles

Las cepas controles utilizadas en este estudio nos van a permitir validar los diferentes experimentos, por ello, como control positivo utilizamos dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (WLP001, White Labs) y *carlsbergensis* (WLP830, White Labs). Como control negativo utilizamos *Candida tropicalis*.

Todas ellas se cultivaron a 28 °C durante 48 h en medio Yeast extract Peptone Dextrose (en adelante YPD) (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa y 2% agar) y se mantuvieron a 4 °C durante un mes como máximo, procedentes de stocks glicerinados que estaban almacenados a -80 °C.

2.2.2. Aislamiento de candidatos

Con el objetivo de cultivar posibles candidatos, inoculamos en tubos de 10 mL las muestras en medio selectivo 7.6% (v/v) etanol (Sniegowski *et al.*, 2002) que aísla preferentemente *Saccharomyces cerevisiae* e incubamos las muestras durante 21 días aproximadamente manteniendo una temperatura de 28 °C. Como control de la presencia de microorganismos en las muestras recogidas, en paralelo inoculamos en tubos de 10 mL que contenían medio YPD, que es un medio no restrictivo donde puede crecer una gran variedad de microorganismos. El medio selectivo está compuesto por: 3g extracto de levadura, 3g extracto de malta, 5g peptona, 10g sacarosa, 1 mL HCl 1M, 76 mL etanol y 10 mg cloranfenicol por litro (estos dos últimos componentes los añadimos tras el autoclave, para evitar su volatilización). El medio YPD está compuesto por: 10g extracto de levadura, 20g peptona y 20g glucosa por litro.

En 9,8 mL del medio selectivo e YPD sembramos 0,2 mL procedentes de las muestras contenidas en PBS + 0,1% Tween 20, habiéndolas homogeneizado previamente. Como controles positivos empleamos WLP001 y WLP830 y como control negativo *Candida tropicalis*, además de un tubo sin inocular.

De aquellas muestras que presentaban crecimiento en el medio selectivo realizamos diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) para obtener colonias individuales. Sembramos 0,2 mL de cada dilución en el medio no restrictivo (YPD) para asegurar su crecimiento, repartiendo uniformemente el líquido por la placa con ayuda de canicas de vidrio. Seleccionamos dos colonias individuales de cada muestra y lo llevamos a 1 mL de YPD líquido, donde lo dejamos crecer durante 24h a 28°C en constante agitación. De estos cultivos tomamos 750 µL y los llevamos a crioviales junto con 250 µL de glicerol al 80%, para la conservación de las muestras. Homogeneizamos con ayuda de la pipeta, los tapamos y los llevamos a -80 °C.

2.2.3. Análisis morfológico

El análisis morfológico lo realizamos con el propósito de descartar aquellos candidatos que no tuviesen la misma morfología que *S. cerevisiae*, independientemente de si presentaban crecimiento o no, para evitar descartar falsos negativos. Pasados 21 días desde su inoculación, centrifugamos los tubos del medio selectivo durante 6 min a 4400 rpm para concentrar la muestra. Tras esto, retiramos el sobrenadante y tomamos 4 µL del pellet y lo posamos sobre un portaobjetos para observarlo en el microscopio a 40x.

2.2.4. Caracterización del crecimiento de cada candidato

Tras obtener los presuntos candidatos iniciales, que son aquellos que han crecido en el medio selectivo y han presentado una morfología similar a *S. cerevisiae*, realizamos una comparación de las características de crecimiento de cada levadura en dos medios diferentes: medio selectivo para *Saccharomyces cerevisiae* 7.6% (v/v) etanol y el medio no selectivo (YPD). Ver el apartado “Aislamiento de candidatos” para consultar la receta de cada medio. Determinamos el

crecimiento de cada candidato midiendo la turbidez a través de la densidad óptica (D.O.), a 600nm en cubeta de plástico, con un espectrofotómetro.

Inoculamos cultivos líquidos en medio YPD partiendo de colonias aisladas de cada cepa a estudiar. Tras incubar durante 24 horas en constante agitación a 28°C hasta saturar el crecimiento de cada cepa, sembramos 3 mL en medio selectivo y también de forma paralela 3 mL en YPD en tubos de 10 mL. Ajustamos la densidad óptica inicial de cada candidato, realizando diluciones hasta obtener una $D.O._{600\text{ nm}} = 0,1$. Los cultivos se mantuvieron creciendo a 28 °C y medimos la densidad óptica de cada cepa en cada uno de los dos medios en intervalos de 12 horas hasta transcurridas las 72 horas desde la inoculación.

2.2.5. Ensayos de crecimiento en placa

Para obtener más datos sobre las características del crecimiento de los candidatos, realizamos ensayos adicionales de crecimiento selectivo en medios sólidos.

Los medios que empleamos fueron los siguientes: medio Agar Lisina (Walters y Thiselton 1953), el cual es selectivo para especies no-*Saccharomyces*; medio Agar Sulfito Etanol (en adelante A.S.E.), el cual es selectivo para *Saccharomyces*; medio YPD. El medio Agar Lisina está compuesto por: 20g agar, 2,5g L-lisina-HCl y 11,75g Yeast Carbon Base por cada litro (este último componente lo añadimos tras el autoclave, poniéndolo previamente en tubo Falcon de 15 mL, enrasándolo a 10 mL con agua destilada y filtrándolo mediante jeringa con membrana de 0,45 μm). El medio A.S.E. está compuesto por: 20g glucosa, 5g peptona, 5g extracto de levadura, 20g agar, 0,15 g metabisulfito sódico y 120 mL de etanol 12% (v/v) por litro (este último componente lo añadimos tras el autoclave para evitar su volatilización). El medio YPD contiene 20g peptona, 20g agar, 20g dextrosa y 10g extracto de levadura por litro. Preparamos los medios con un volumen final por placa de 25 mL.

Las cepas de los posibles candidatos y controles que empleamos para realizar estos ensayos, las tomamos de cultivos líquidos YPD, que han estado en constante agitación durante 24h a 28°C.

En una placa de 96 pocillos preparamos las diferentes cepas realizando dilución seriada (1:10, 1:100 y 1:1000) sobre 200 μL utilizando agua estéril. Inoculamos en los diferentes medios con ayuda de un replicador, el cual deposita 2-3 μL de cultivo sobre el medio sólido. Mantuvimos las placas en incubación a 28°C durante 72h.

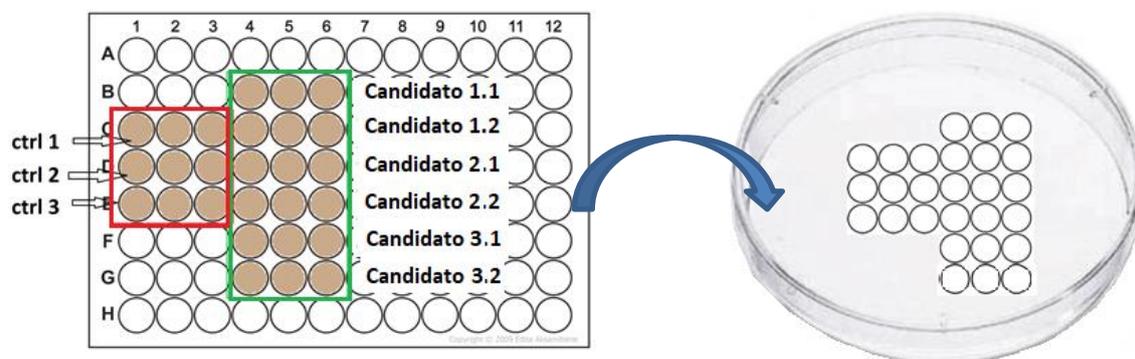


Figura 4. Preparación de los ensayos de crecimiento en placa a partir de una placa de 96 pocillos. En rojo: controles; en verde: candidatos. Columna 1 y 4: dilución 1:10; columna 2 y 5: dilución 1:100; columna 3 y 6: dilución 1:1000.

Controlamos el crecimiento de cada cepa visualizando las placas tras las 24, 48 y 72h de la inoculación.

2.3. FASE DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En esta segunda fase se procede a la identificación de los posibles candidatos obtenidos de la fase de caracterización fenotípica mediante métodos moleculares.

2.3.1. Extracción de ADN

Con el propósito de identificar la especie de cada una de nuestras cepas, hemos de analizar el ADN de estas, y para ello hemos de realizar primero una extracción del ADN genómico. El kit empleado es el “Yeast DNA Extraction Kit” de ThermoFisher Scientific (<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78870> último acceso: 20 junio 2018).

Para obtener la biomasa a la que realizamos el proceso de extracción de ADN, inoculamos en placa YPD los candidatos, además de los controles WLP001, WLP830 y *C. tropicalis*. Llevamos las placas inoculadas a incubar a 28°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, sembramos en 10 mL de YPD líquido durante 24h.

Seguimos el protocolo de extracción de ADN del kit: Centrifugamos los cultivos YPD. Retiramos el sobrenadante por decantación, y añadimos 0,5 mL de agua estéril para facilitar su transferencia a tubos eppendorf de 1,5 mL. Centrifugamos para quitarle el agua añadida y retiramos el sobrenadante por aspiración a vacío. Pesamos los eppendorf para calcular la masa del pellet de cada uno, habiéndolos pesado previamente vacíos. En base a la masa del pellet calculamos el volumen de *Yeast Protein Extraction Reagent* (en adelante Y-PER) requerido, con una relación de 8 µL Y-PER/ 1 mg pellet.

Tabla 4. Volumen de Y-PER a añadir en base a la masa de pellet obtenida.

Tubo n°	Eppendorf + pellet (g)	Eppendorf vacío (g)	Masa pellet (g)	µL a añadir de Y-PER
2.1	1,05	0,87	0,18	1440
2.2	1,07	0,90	0,17	1360
7.1	1,01	0,86	0,15	1200
7.2	1,01	0,85	0,16	1280
73.1	1,01	0,86	0,15	1200
73.2	1,06	0,91	0,15	1200
WLP001	0,99	0,86	0,13	1040
WLP830	0,99	0,86	0,13	1040
<i>C. tropicalis</i>	1,09	0,87	0,22	1760

Llevamos a incubar durante 10 min a 65°C. Centrifugamos a 13000 x g durante 5 min. Descartamos el sobrenadante aspirando a vacío. Añadimos 400 µL de *DNA Releasing Reagent A* y 400 µL *DNA Releasing Reagent B*. Homogeneizamos. Llevamos a incubar durante 10 min a 65 °C. Añadimos 200 µL de *Protein Renoval Reagent*. Centrifugamos a 20000 x g durante 5 min. Transferimos el sobrenadante a nuevos tubos de 1,5mL.

Añadimos 600 μL de alcohol isopropílico. Homogeneizamos por inversión. Centrifugamos durante 10 min a 13000 x g. Eliminamos el sobrenadante por aspiración. Añadimos 1,5 mL de etanol 70%. Homogeneizamos invirtiendo. Centrifugamos 1min a 13000 x g para lavar posibles restos. Secamos por centrífuga conectada a vacío. Añadimos 50 μL Tris buffer. Esperamos 5 minutos y homogeneizamos.

Tras concluir la extracción del ADN, conservamos los productos obtenidos a -20°C . (www.thermofisher.com/order/catalog/product/78870 último acceso: 3 mayo 2018).

La extracción del ADN es muy importante, ya que si no se realiza adecuadamente puede influir negativamente en el resultado de los experimentos posteriores.

Para mejorar la pureza del ADN genómico obtenido, realizamos una extracción fenol-cloroformo sobre el ADN conservado a -20°C . Para ello, añadimos 200 μL de agua miliQ, y 300 μL de fenol- cloroformo. Homogeneizamos en vórtex. Llevamos a centrífuga durante 5 min a 13000 rpm, tras lo cual se separaron las fases quedando el ADN en la fase acuosa y las proteínas coaguladas en la interfase. Traspasamos el sobrenadante, que contiene el ADN, a nuevos tubos eppendorf. Repetimos la extracción fenol-cloroformo para asegurar una óptima purificación del ADN.

Precipitamos los ácidos nucleicos del sobrenadante con acetato sódico (1/10 partes del volumen) y etanol absoluto (2 volúmenes). Homogeneizamos volteando los eppendorf. Centrifugamos durante 10 min a 13000 rpm. Retiramos el sobrenadante aspirando a vacío. Añadimos 500 μL etanol 70% para lavar y centrifugamos durante 5 min a 13000 rpm. Retiramos el sobrenadante por aspiración a vacío. Por último, centrifugamos a vacío para asegurarnos de haber retirado todo el líquido posible.

Añadimos 50 μL de 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 para resuspender el pellet. Medimos la cantidad de ADN (ver Tabla 5) que habíamos extraído de cada muestra mediante un espectrofotómetro NanoDrop .

Tabla 5. Cantidad de ADN por muestra.

Nº	ng/ μL
2.1	4660
2.2	3894
7.1	5000
7.2	4515
73.1	3057
73.2	3304
WLP001	772
WLP830	975
<i>Candida tropicalis</i>	4613

Realizamos la dilución correspondiente con agua miliQ del ADN extraído de cada muestra para obtener stocks con una concentración final de 50 ng / μL .

2.3.2.Reacciones de PCR

La técnica de la *Polymerase Chain Reaction* (PCR en adelante) es una técnica *in vitro* que nos proporciona un gran número de copias de un fragmento de ADN particular partiendo de una cantidad mínima, lo que nos permite secuenciar los fragmentos de interés.

Realizamos dos reacciones de PCR: una para la identificación del grupo *Saccharomyces* mediante la secuenciación de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen 28S rRNA con los cebadores NL1 y NL4 (O'Donnell *et al.*, 1998) obteniendo un amplicón de 600pb y otra PCR para secuenciar la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990; Schoch *et al.* 2012) obteniendo un amplicón de longitud variable según la cepa, que posteriormente secuenciamos y además realizamos una digestión con enzimas de restricción (Análisis RFLP, ver más adelante).

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

NL 1: (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)

NL 4: (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)

ITS 1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)

ITS 4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)

En la tabla siguiente se describen los componentes de las reacciones de la PCR:

Tabla 6. Concentraciones de los stocks utilizados, concentraciones a emplear en la reacción y volumen a añadir de los componentes de la PCR considerando un volumen total de 25 o 50 μL (para NL e ITS respectivamente).

Reactivo	$\mu\text{L}/\text{reacción (NL)}$	$\mu\text{L}/\text{reacción (ITS)}$	[] final
Tampón 10x	2,5	5	1x
dNTPs (10 mM)	0,5	1	0,2 μM
Primer 1 (10 μM)	1,25	2,5	0,5 μM
Primer 2 (10 μM)	1,25	2,5	0,5 μM
Taq polimerasa (5U/ μL)	0,5	1	0,5 U/ μL
H ₂ O miliQ estéril	18	36	-
Volumen final	24	48	

Para la reacción con volumen final de 25 μL añadimos 1 μL de ADN (50ng/ μL), y para la de 50 μL , 2 μL . Para el control negativo añadiremos 1 ó 2 μL H₂O miliQ estéril, según el volumen final de la reacción.

Cada una de las dos reacciones está compuesta por dos primers: NL1 y NL4; ITS1 e ITS4.

En la reacción de ITS, preparamos un volumen mayor que para NL para realizar con el volumen restante las digestiones.

La temperatura de *melting* o fusión (T_m) de los primers es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas del ADN de la muestra se ha desnaturalizado. Cada fragmento a amplificar tiene una T_m característica, que depende principalmente de la longitud de este y de su composición de nucleótidos. Las T_m de cada primer pueden verse en la Tabla 7. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla 8.

Tabla 7. Datos de la T_m de cada primer.

Primer	T_m
NL1	62
NL4	59
ITS1	59
ITS4	52

Tabla 8. Condiciones PCR termociclador.

1 ciclo	5 min	95°C
35 ciclos	30 seg	94°C
	30 seg	52°C
	1 min	72°C
1 ciclo	8 min	72°C
HOLD		4°C

2.3.3. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica fácil y sencilla que nos permite separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Esta técnica nos va a permitir evaluar el éxito de la amplificación del fragmento de interés tras la PCR.

Para observar los productos de la PCR, tanto de la reacción NL como ITS, se prepararon 30 mL de gel de agarosa al 1%, añadiendo 1,5 µL bromuro de etidio, que es un compuesto que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN, el cual se excita con luz ultravioleta de onda corta, y emite su fluorescencia como luz visible, de color rosado-anaranjado. De esta forma permite la visualización de los ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida.

Para cada producto de PCR de cada reacción se tomaron 5 µL y se le añadió 1 µL tampón de carga, el cual facilita la sedimentación de las muestras en los pocillos evitando su dispersión y permite visualizar el frente de corrida de las muestras. Se utilizaron 4 µL del marcador molecular 100 bp DNA Ladder. Se conectó a 60 V durante 1,5 horas aproximadamente.

Tras la corrida de las muestras, se observó el gel aplicando luz ultravioleta. Observamos los fragmentos de cada muestra, y en base al marcador del peso molecular pudimos conocer sus tamaños.

2.3.4. Análisis e identificación de las secuencias

Tras la amplificación del fragmento de ADN de interés mediante un termociclador y su posterior visualización en gel de agarosa 1% para comprobar que se había efectuado correctamente la PCR, se llevaron los candidatos además de WLP001, WLP830 y *Candida tropicalis*, al servicio de secuenciación del IBMCP.

Una vez tuvimos nuestros fragmentos amplificados y secuenciados, seleccionamos las partes de cada secuencia de mejor calidad para los candidatos y los controles, visualizando las muestras mediante el programa Chromas 2.6.5®. Con estas secuencias, realizamos un análisis informático empleando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine). Dentro de la herramienta BLAST, existen diversos programas según el objetivo de nuestra búsqueda. Escogemos el programa BLASTN (*nucleotide blast*), que buscará en una base de datos de nucleótidos la secuencia de nucleótidos que queremos consultar, lo que nos permitirá comparar secuencias entre especies. Para ello, buscamos las secuencias en la base de datos, tanto del producto de la PCR de la región NL como con la región ITS.

Los pasos seguidos para la búsqueda son los siguientes:

- Introducción de la secuencia a consultar (*query sequence*)
- Definir un rango a consultar de la secuencia introducida, escogiendo las secuencias de mejor calidad (*query subrange*).

- Escogemos la base de datos de la colección de nucleótidos (*Database: nucleotide collection*)
- Utilizamos el algoritmo megablast, que es el que nos va a dar los resultados lo más parecidos posibles.
- Número máximo de resultados que te permite obtener: 20000 (*Max target sequences*).

El resto de parámetros son los que el programa establece por defecto.

Una vez finalizada la búsqueda, los resultados mostrados proporcionan datos como: *description*, *max score*, *total score*, *query cover*, *e-value*, *% identity* y *accession number* (identificador del resultado dentro del NCBI). Seleccionamos aquellos resultados que coincidían en un 100% de identidad con nuestra secuencia de interés.

2.3.5. Análisis RFLPs

Aunque el análisis BLAST es informativo, estas regiones de secuencia genómica son difíciles de secuenciar con la fidelidad deseada debido a que son secuencias con un alto contenido en segmentos repetidos que dificulta el análisis posterior. Por tanto, para completar el análisis molecular, es necesario confirmar los resultados obtenidos de las secuencias ITS con un análisis de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (en adelante RFLP). Este análisis consiste en realizar una serie de cortes enzimáticos de los fragmentos de PCR con enzimas de restricción que reconocen secuencias específicas de nucleótidos y cortan generando fragmentos de distinto tamaño, que varían entre especies.

Para este análisis, empleamos los datos de RFLPs disponible en la base de datos de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, www.yeast-id.org). Como nuestro interés principal es identificar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, seleccionamos las enzimas de restricción HaeIII HpaII y ScrFI para la digestión de la región ITS.

Realizamos las digestiones para cada producto de PCR de las secuencias ITS, para los aislados y los controles. La composición de cada reacción según la enzima empleada es la siguiente:

Tabla 9. Componentes de las reacciones RFLPs.

ScrFI	HaeIII	HpaII
2 µL 10x Buffer O	2 µL 10x Buffer R	2 µL 10x Buffer Tango
1 µL Bme1390I	1 µL BSURI	1 µL MspI
12 µL agua	12 µL agua	12 µL agua

www.thermoscientific.com/onebio nº producto: #ER1421, #ER0151 y #ER0541.

Añadimos a cada una de estas reacciones 5 µL del producto de la PCR. Se incubaron a 37°C durante 2,5 horas.

Para observar los cortes de la digestión originados por las enzimas de restricción sobre cada producto de PCR, se preparó un gel de agarosa de 50 mL al 2% (50 mL TAE 1x, 1g de agarosa y 3 µL de bromuro de etidio). A las muestras se les añadió 4 µL de tampón de carga. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder de Thermo Fisher Scientific. Se dejó correr

el gel a 70 V durante 2 horas. A continuación, se observó con luz ultravioleta el tamaño de los fragmentos.

Con este análisis, no fue posible identificar a nivel de especie uno de los candidatos, por lo que realizamos una digestión adicional con la enzima Taq I (Romi *et al.* 2014). Como control utilizamos *Saccharomyces cerevisiae*. Para conocer el tamaño de las bandas esperado de esta especie, realizamos una digestión virtual (bioinformatics.org) empleando dicha enzima.

Posteriormente, visualizamos el tamaño de los fragmentos tras la digestión con Taq I preparando 30 mL de gel de agarosa al 2% con 1,5 μ L de bromuro de etidio. Utilizamos como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

3. RESULTADOS

Transcurridos 21 días desde la inoculación en el medio selectivo, de las 75 muestras tomadas, observamos crecimiento en las muestras n° 2, 7 y 73, además de los controles WLP001, WLP830 y *C. tropicalis*. En el medio YPD crecieron todas las cepas.

El crecimiento de cada muestra lo determinamos agitando vigorosamente los tubos, para movilizar los sedimentos y, por comparación con el control negativo, concluimos cuál presentaba crecimiento. Como se observa en la Figura 5, el n° 7 presenta crecimiento, a diferencia del control negativo. Aunque, este crecimiento es notablemente menor al de las WLP001 y WLP830.

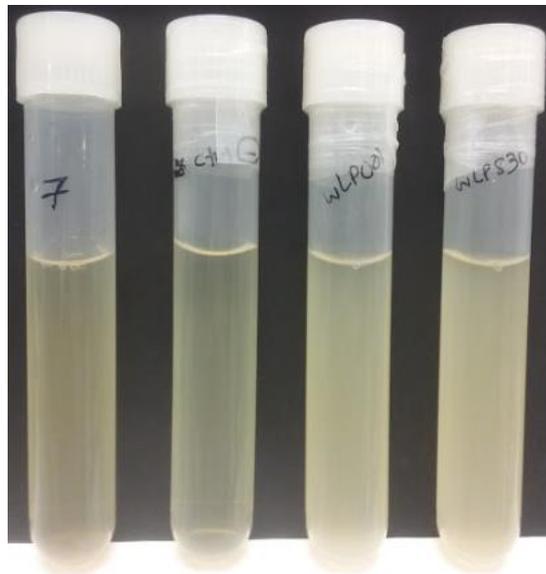


Figura 5. Crecimiento de las muestras en medio selectivo. De izquierda a derecha: candidato n° 7, control negativo, WLP001 y WLP830.

Tras determinar qué tubos presentaban crecimiento, observamos en el microscopio todas las muestras, presentasen o no crecimiento. La morfología que presentaban al microscopio los candidatos 2, 7 y 73, que fueron los que presentaban crecimiento, fue similar a los controles WLP001 y WLP830 (ver Figura 6). De aquellas muestras que no presentaron un crecimiento marcado en el medio selectivo no se detectaron células en el microscopio.

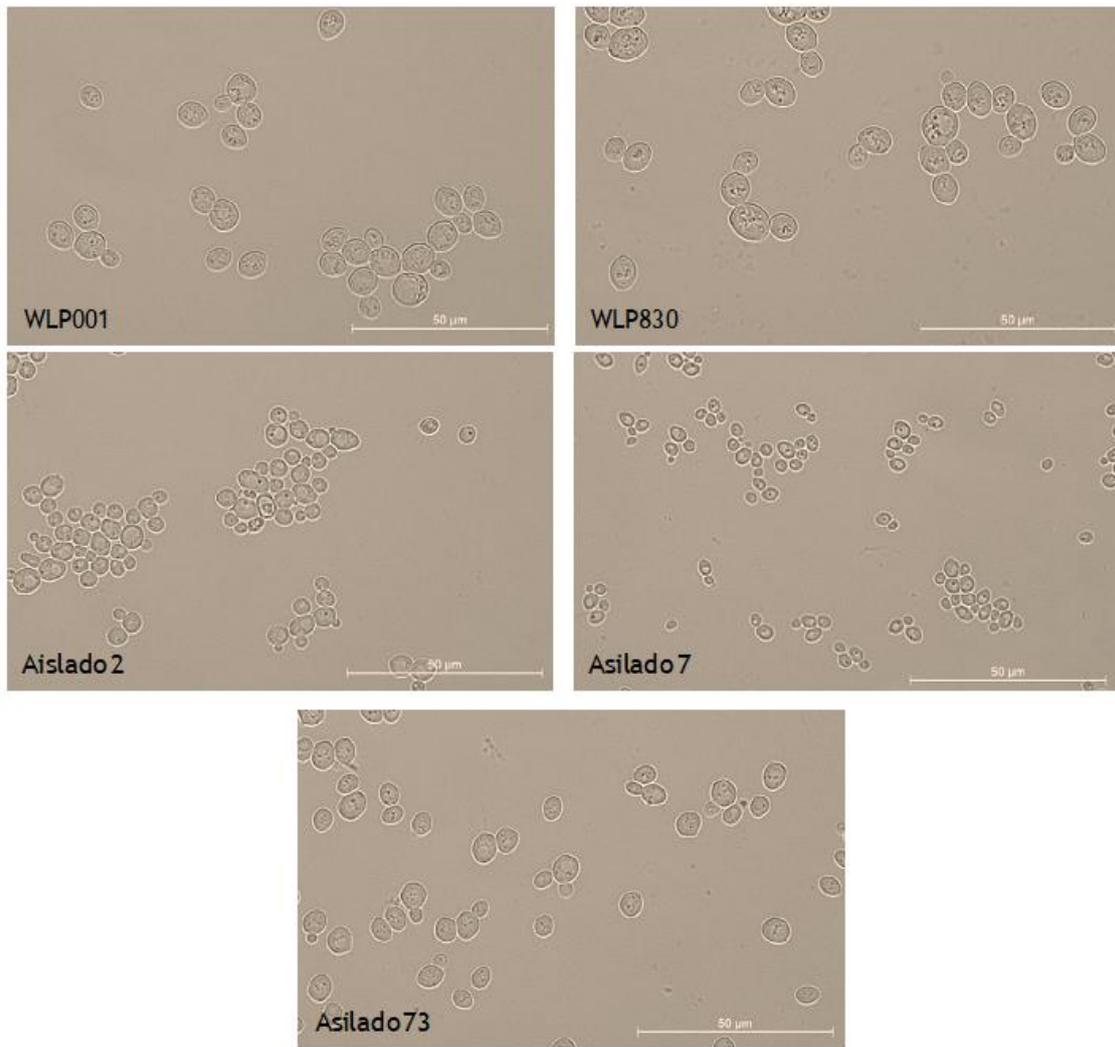


Figura 6. Comparación morfológica de las muestras con las cepas conocidas WLP001 y WLP830.

Una vez observada la morfología de cada muestra, caracterizamos el crecimiento de cada candidato. En el medio YPD crecieron los candidatos y los controles como era de esperar. En la Figura 7, puede observarse cómo el candidato n° 73 junto con *Candida tropicalis*, presentaron un crecimiento a las 24 h muy marcado.

En el medio selectivo, como puede observarse en la Figura 8, el crecimiento de todas las cepas se ve notablemente reducido respecto al que presentan en YPD. Aun así, el número 73 crece de forma considerable durante las primeras 24 horas en comparación con el resto de microorganismos, los cuales tienen un crecimiento más tardío respecto a este. Las WLP001 y WLP830, presentan un crecimiento en este medio muy similar al resto de cepas.

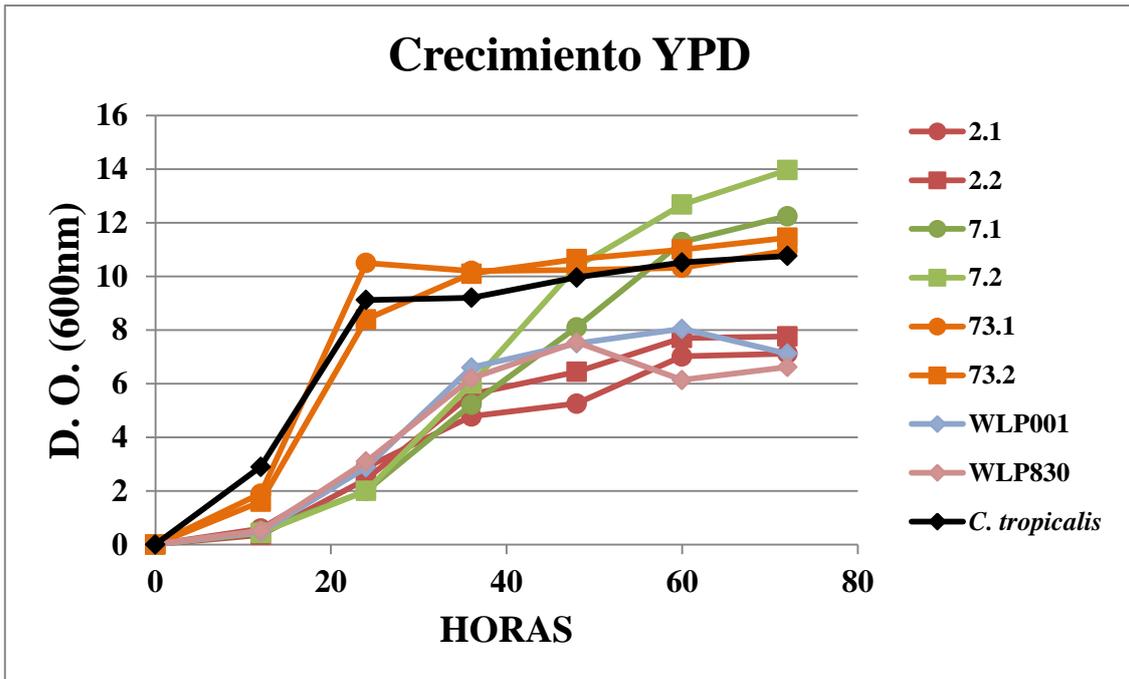


Figura 7. Curva de crecimiento en medio YPD con una densidad óptica inicial de 0.1.

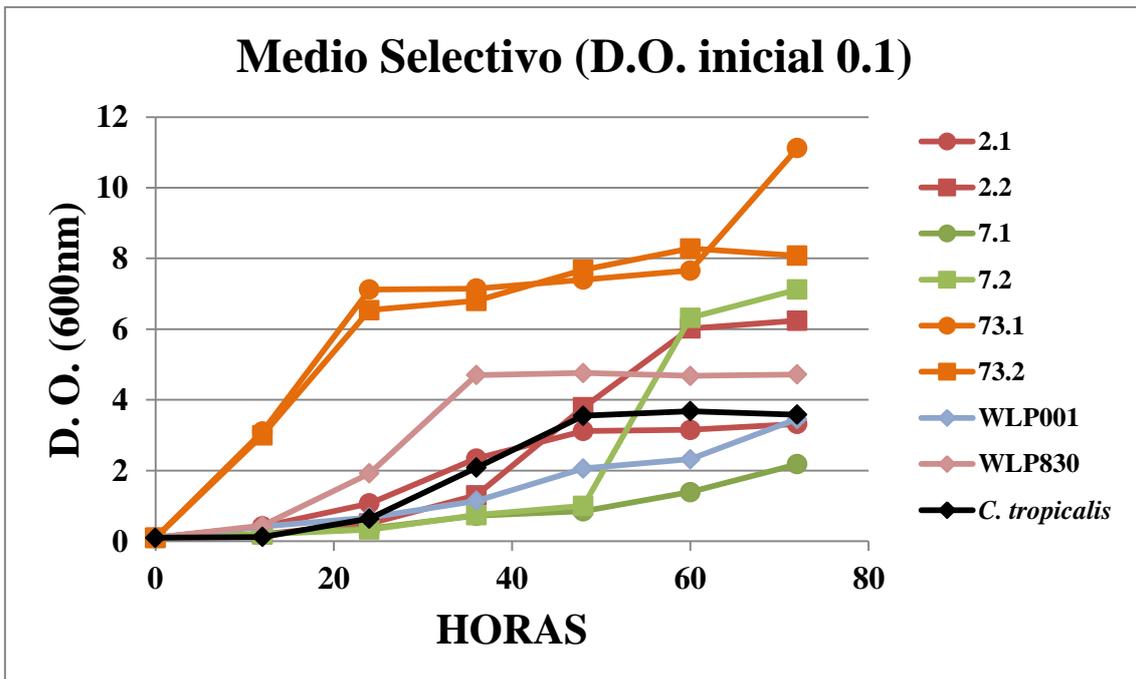


Figura 8. Curva de crecimiento en medio selectivo con una densidad óptica inicial de 0.1

En cuanto a los ensayos de crecimiento en placa, como se observa en la Figura 9, en el medio YPD han crecido todas las cepas, como era de esperar. En el caso del medio Agar Lisina, observamos que las cepas control de *Saccharomyces cerevisiae* (WLP001 y WLP830) no son capaces de crecer, al igual que los candidatos 73.1 y 73.2, mientras que los aislados 2 y 7 crecen, al igual que *Candida tropicalis*. En el medio E.S.A. han crecido todas las cepas debido probablemente a la volatilización del etanol.

Por otro lado, todas las cepas presentaban un color blanco-crema, con colonias de un tamaño similar excepto *Candida tropicalis*, la cual presentaba colonias de mayor tamaño.

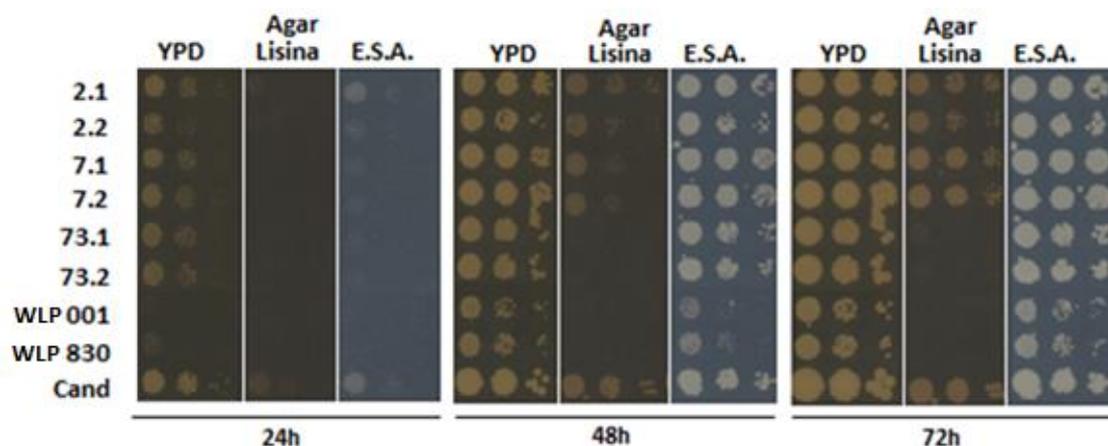


Figura 9. Ensayos de crecimiento con diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada cepa en medio YPD, agar lisina y medio E.S.A. tras 24, 48 y 72h.

Una vez realizada la caracterización fenotípica, procedimos a la caracterización molecular para confirmar los posibles candidatos obtenidos, que eran el número 2, 7 y 73. Comenzamos con la extracción del ADN seguida de una extracción fenol-cloroformo.

Tras extraer y purificar el ADN genómico, amplificamos por PCR las regiones de interés. Para comprobar que la PCR se había llevado a cabo correctamente, visualizamos los productos de la PCR de las secuencias NL e ITS en gel de agarosa al 1%, aplicando luz UV para observar las bandas (ver Figura 10 y Figura 11).

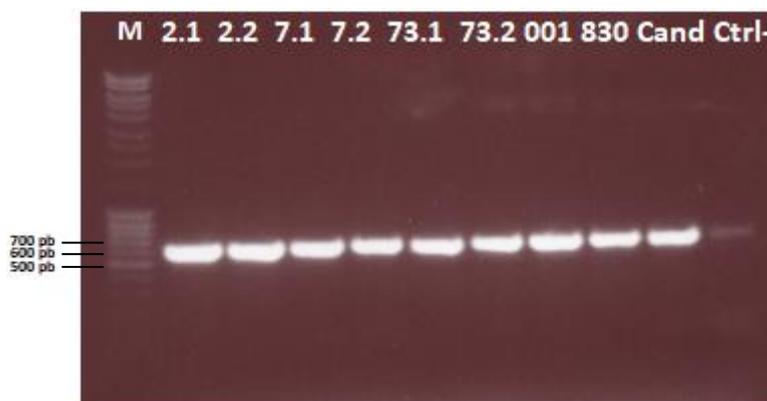


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Amplificación de PCR con los cebadores NL1 y NL4. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder.

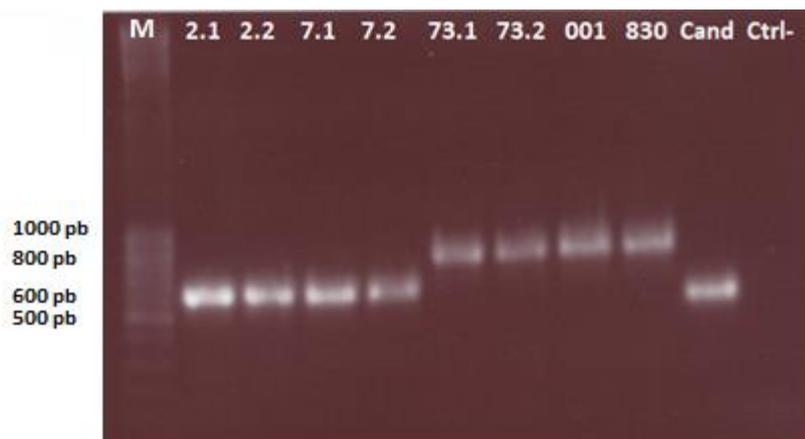


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Amplificación de PCR con los cebadores ITS1 e ITS4. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder.

Para la secuencia NL como puede observarse en la Figura 10, el tamaño de las bandas obtenido es el mismo para todas las especies. Sin embargo, los tamaños de los fragmentos obtenidos de la secuencia ITS, son característicos para cada especie. Como puede observarse en la Figura 11, el tamaño de las bandas del candidato 73 coincide con el tamaño de las bandas de los controles WLP001 y WLP830. Esto es una evidencia adicional de que se trata de *S. cerevisiae*. Por el contrario, para el caso de los candidatos 2 y 7, el hecho de que presentan bandas de distinto tamaño a los controles WLP001 y WLP830, nos indica de que se trata de especies diferentes.

Sabiendo que se habían amplificado correctamente las regiones de interés de los candidatos y los controles, se llevaron al servicio de secuenciación del IBMCP. Introdujimos en Chromas las secuencias acotándolas, seleccionando aquellas regiones de mayor calidad, e introdujimos estas secuencias acotadas en la herramienta informática BLASTN. Los resultados obtenidos con un 100% de identidad para cada candidato fueron los siguientes:

Tabla 10. Resultados obtenidos en BLASTN de los diferentes candidatos.

	NL	ITS
Clon 2	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i> <i>Stephanoascus ciferrii</i>
Clon 7	<i>Meyerozyma caribbica</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Meyerozyma voucher</i> <i>Pichia caribbica</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Candida fermentati</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Candida carpophila</i> <i>Pichia guilliermondii</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida albicans</i>
Clon 73	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Pichia kudriavzevii</i> <i>Saccharomyces paradoxus</i> <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> <i>Lichtheimia corymbifera</i> <i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Glomus versiforme</i> <i>Diversispora sabulosa</i> <i>Vibrio anguillarum</i>

	<i>Saccharomyces pastorianus</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Wickerhamomyces anomalus</i> <i>Pichia membranifaciens</i> <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> <i>Rhodsporidium</i> <i>kratochvilovae</i>	
--	--	--

Como podemos observar en la Tabla 10, hay una especie, máximo dos, que coinciden en ambas secuencias NL e ITS. Estos resultados sugieren que el aislado 2 corresponde a *Wickerhamomyces ciferrii*, mientras que el aislado 7 coincide tanto con *Meyerozyma caribbica* como con *Meyerozyma guilliermondii*. Finalmente, el aislado 73 comparte homología con *Saccharomyces cerevisiae*.

Para confirmar estos resultados, realizamos una digestión con las enzimas de restricción HpaII, HaeIII y ScrI. Los patrones esperados de la digestión con las endonucleasas (obtenidos de la base de datos de la CECT, ver Tabla 11) concuerdan con los patrones obtenidos experimentalmente (ver Figura 12 y Figura 13). En estas dos figuras, puede observarse cómo el candidato 73 coincide en el tamaño de los fragmentos obtenidos con los controles WLP001 y WLP830, para las tres enzimas utilizadas. *Candida tropicalis*, muestra tamaños de fragmentos distintos a las WLP001 y WLP830. Los fragmentos más pequeños no son visibles en estos geles.

Además de los datos que corresponden a *Saccharomyces cerevisiae*, incluimos en la Tabla 11 los resultados esperados para las especies que identificamos empleando el análisis BLAST descrito anteriormente.

Tabla 11. Longitud en pares de bases de los fragmentos teóricos obtenidos de la digestión con las enzimas de restricción HpaII, HaeIII y ScrI de la región ITS amplificada por PCR.

Especie	Longitud de los fragmentos de restricción (pb)			Referencia
	HpaII	HaeIII	ScrI	
<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	ND	625	ND	Yeast-id.org
<i>Meyerozyma caribbica</i>	ND	5 + 17 + 68 + 110 + 390	ND	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	ND	5 + 17 + 80 + 116 + 390	ND	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	125 + 725	125 + 170 + 230 + 325	125 + 325 + 400	

ND: No disponible



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Digestión con HpaII y HaeIII de la región ITS. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder.

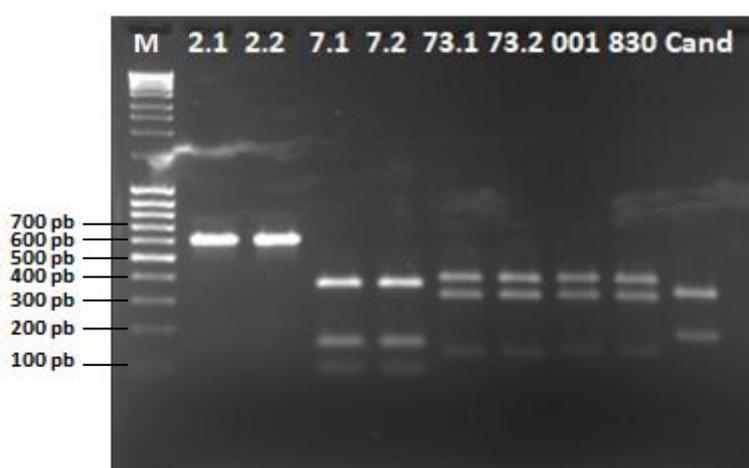


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Digestión con SrfI de la región ITS. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder.

En el caso del candidato n° 7, estos análisis no son capaces de distinguir entre dos especies altamente relacionados. Por tanto, en este caso, se realizó una digestión adicional con la enzima Taq I, diferenciándonos así la especie de la que se trataba (ver Figura 14 y Figura 15). El control que en este caso fue *S. cerevisiae* también coincidió con el patrón esperado (ver Tabla 12).

Tabla 12 . Longitud en pares de bases de los fragmentos teóricos obtenidos de la digestión con Taq I de la región ITS amplificada por PCR.

Especie	Longitud de los fragmentos de restricción (pb)	Referencia
	Taq I	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Carril 1 (ver Figura 16)	(Romi <i>et al.</i> , 2014)
<i>Meyerozyma caribbica</i>	Carril 2 (ver Figura 16)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59 + 97 + 258 + 289	PCR virtual y posterior digestión virtual con la herramienta Bioinformatics Sequence Manipulation Suite (PCR Products y Sequence Manipulation Suite:

		Restriction Digest).
--	--	----------------------

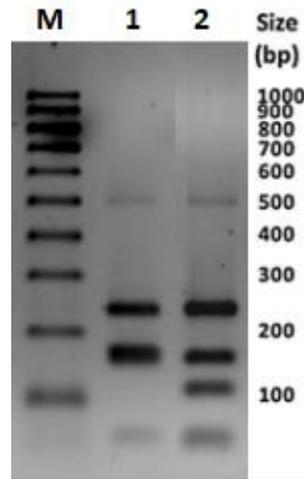


Figura 14. Diferenciación entre *Meyerozyma caribbica* y *M. guilliermondii*. Carril 1: *Meyerozyma guilliermondii* y carril 2: *Meyerozyma caribbica* (Romi et al., 2014).

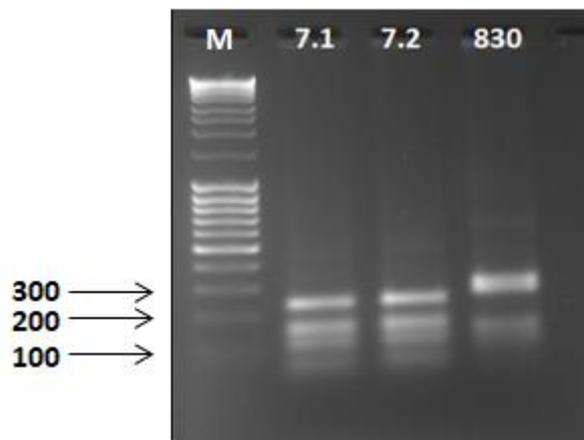


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Digestión con Taq I de la región ITS. M: marcador molecular 100 bp DNA Ladder

Como se puede observar en esta Figura 15, comparándola con la Figura 14, el hecho de obtener 4 bandas para el aislado 7 que corresponden con los tamaños de las bandas de *Meyerozyma caribbica* nos permite la identificación de este aislado. Además, el control de la cepa WLP830 (*S. cerevisiae*) también produce el patrón esperado.

4. DISCUSIÓN

El interés fundamental del presente estudio ha sido obtener levaduras autóctonas, principalmente *S. cerevisiae*, para la fabricación de cerveza. Son numerosos los estudios recientes sobre la selección de levaduras autóctonas para la elaboración del vino (Rodríguez, 2007; Blanco y Orriols, 2012). Sin embargo, son escasos aquellos estudios en los que la selección de levaduras para la producción de bebidas alcohólicas, proceden de un hábitat distinto al de los viñedos. He aquí la incertidumbre de si hallaríamos levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de los campos de Alboraya, puesto que, como veremos a continuación, se desconoce con claridad el hábitat de esta especie en cuestión (*S. cerevisiae*).

S. cerevisiae es la principal responsable de la fermentación alcohólica en los vinos. Esto no quiere decir que en los viñedos esta especie sea la especie dominante, si no que en tales condiciones durante la fermentación alcohólica, donde hay una alta concentración de etanol en el medio, *S. cerevisiae* es la que mejor crece. De hecho, la fermentación la empiezan otros microorganismos, y cuando estos ya no son capaces de seguir creciendo, es cuando *S. cerevisiae* toma la dominancia sobre la fermentación. Goddar (2008) señala que mientras el resto de levaduras de *S. cerevisiae* no son capaces de crecer frente al aumento de temperatura en un medio con etanol, esta experimenta una mejor adaptación, lo que indica la alta capacidad que posee esta especie de habitar en una gran diversidad de ambientes.

Algunos autores sugieren que esta especie se encuentra en frutos con una alta concentración de azúcares, como es el caso de la uva (Cappello *et al.*, 2004; Schuller *et al.*, 2005). Sin embargo, en los frutos que hemos muestreado que poseen una alta cantidad de azúcares como el plátano, no se ha encontrado *S. cerevisiae*. Identificamos tres posibles razones: el alto contenido de azúcar en un fruto no es la razón por la cual sea el hábitat ideal de *S. cerevisiae*; deberíamos de haber efectuado un mejor muestreo con el fin de tomar la levadura de interés; o ambas dos anteriores.

El modelo de adaptación predice que los organismos adaptados a un nicho deberían de abundar en tal nicho. Sin embargo, *S. cerevisiae* es de hecho extremadamente raro en la fruta, incluso en viñedos (Mortimer y Polsinelli 1999; Knight y Goddard 2015). En un estudio en el que investigan la presencia de *S. cerevisiae* en esta fruta (Mortimer y Polsinelli, 1999), indicaron que tan solo una de cada 100 cepas aisladas procedentes de los viñedos, correspondía a *S. cerevisiae*. Además, sugerían que las levaduras son llevadas a las bayas por insectos como abejas, avispas y *Drosophila* y que se multiplican en el interior de la uva.

Es interesante el hecho de que las levaduras identificadas que presentaban tolerancia frente al etanol, son las que obtuvimos del suelo, en nuestro caso del nisperero (nº 2), del limonero (nº 7) y de la higuera (nº 73). Sniegowski *et al.*(2002) hallan *Saccharomyces* de suelos asociados a robles en bosques del sureste de Pensilvania, E.E.U.U. También resulta interesante observar cómo en el caso del nisperero y del limonero realizamos el muestreo en el suelo de forma doble y sin embargo, solamente se halló crecimiento en el medio selectivo en una de las dos tandas de muestreo. Quizá sea debido a las diferentes condiciones climatológicas en cada muestreo, o a que fue meramente arbitrario el encontrar tales especies, o quizá que las cepas aisladas del

primer muestreo eran más robustas que las del segundo y por ello fueron capaces de crecer en el medio selectivo.

En definitiva, nuestros datos apoyan la hipótesis de que *S. cerevisiae* realmente no está adaptado a un nicho específico, si no que presenta la habilidad de habitar y persistir en muchos ambientes diferentes (Goddard y Greig, 2015).

También ha sido interesante el uso de las cepas *S. cerevisiae* que utilizan ciertas empresas cerveceras para fabricar cerveza, la WLP001 y la WLP830. Hemos observado las diferencias fenotípicas entre las cepas domesticadas (WLP001 y WLP830) y las salvajes (clon nº 73). Las primeras, acostumbradas a crecer en un determinado ambiente, se han mostrado más inadaptables a la hora de crecer en el medio selectivo. Sin embargo, las salvajes, han crecido con gran vigor, probablemente habituadas a vivir en condiciones ambientales cambiantes. Se ha argumentado que *S. cerevisiae* presenta una alta tolerancia frente a una gran diversidad de condiciones ambientales, como por ejemplo la temperatura y el pH (Goddard y Greig, 2015), de ahí que las cepas salvajes fuesen capaces de crecer en el medio selectivo.

El método empleado para el muestreo ha sido sencillo y ha cumplido con su función, que era la de tomar levaduras del campo. De las 75 muestras tomadas de diferentes lugares y plantas, una resultó ser *Saccharomyces cerevisiae*, aunque esto depende más bien del hábitat de las levaduras.

El crecimiento en el medio YPD de todas las muestras, pone de manifiesto la viabilidad de los microorganismos. El medio selectivo 7,6% etanol (v/v), ha resultado ser útil para aislar *Saccharomyces cerevisiae* (Sniegowski *et al.*, 2002). El crecimiento únicamente de 3 de las 75 muestras es debido a que solamente unos pocos microorganismos presentan tal tolerancia a la presencia de etanol en el medio. Incluso a concentraciones relativamente bajas, el etanol inhibe la división celular, disminuye el volumen celular y la tasa de crecimiento específico (Birch y Walker 2000).

Han sido más del doble de días, concretamente 21, que han debido de transcurrir para asegurarnos del crecimiento de todas las muestras posibles, con el fin de no descartar falsos negativos. La muestra nº 73, que correspondía a *S. cerevisiae*, creció rápidamente dentro del intervalo de los 10 días (Sniegowski *et al.*, 2002), mientras que la muestra nº 2 y 7, dentro de estos 10 días se observaba un crecimiento poco marcado pero que se diferenciaba del control negativo. Los controles WLP001 y WLP830 crecieron, aunque no con tanto vigor como lo hizo el nº73. El control *Candida tropicalis* también creció, a la par que los controles WLP001 y WLP830. Con esto se demuestra la vigorosidad de *S. cerevisiae* para crecer en medios con alto contenido en etanol, y cómo la domesticación de esta misma especie (WLP001 y WLP830, las cuales han sido seleccionadas para obtener unas características concretas, beneficiosas para producir cerveza), ha restringido la capacidad de crecimiento de estas cepas en condiciones diversas.

En definitiva, este medio es selectivo no para el género *Saccharomyces* exclusivamente, si no para aquellas levaduras que presentan una tolerancia media-alta al etanol. *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies de este género son los organismos más tolerantes al etanol de los eucariotas, pueden crecer entre un 12-15% v/v etanol y de producir más de un 12%, incluso algunas cepas de levadura pueden llegar a producir un 20% v/v de etanol. Otras cepas de levaduras como por ejemplo *Kloekera apiculata* son capaces de crecer en presencia de un

6% v/v etanol, sin embargo, por encima de esta concentración no son capaces de crecer (Suárez Lepe, 1997).

Tras observar el crecimiento de las muestras en el medio selectivo, observamos por el microscopio la morfología de estas. Aunque el análisis morfológico no es una característica determinante a la hora de evaluar la similitud entre dos cepas, sí que nos proporciona información relevante. La cepa que resultó ser *S. cerevisiae* presentó la misma morfología que los controles positivos WLP001 y WLP830. Sin embargo, las otras dos cepas que presentaron crecimiento (nº 2 y 7) presentaron una morfología similar a los controles positivos, pero no tan parecida como con la nº 73, de hecho se veían más pequeñas las células en las no-*Saccharomyces*. No barajamos descartar las nº 2 y 7 porque podrían ser *S. cerevisiae*. El estar en un medio tan agresivo, influye a las células negativamente y por ende a su morfología.

El medio agar lisina fue introducido por Morris y Eddy (1957) para el aislamiento de levaduras silvestres en cervecería en el momento del lanzamiento de las levaduras. Las *Saccharomyces* no son capaces de crecer en este medio, pero otros géneros sí crecen, usando los grupos NH₂ de la lisina como única fuente de nitrógeno para los requerimientos de la levadura (Walters y Thiselton, 1953). El nitrógeno es esencial para las levaduras, puesto que interviene en la síntesis de aminoácidos, proteínas y otros compuestos fundamentales para la fisiología de estas. Por lo que, este medio nos confirma que el clon 73 es un posible candidato de ser *S. cerevisiae*, descartando el clon 2 y 7. El medio A.S.E. no ha funcionado, porque probablemente se ha volatilizado el etanol. Por esto, nuestros datos sugieren que el medio selectivo de Sniegowski *et al.* (2002) es más útil para diferenciar *Saccharomyces* de no-*Saccharomyces*.

Las regiones seleccionadas para realizar la PCR han sido adecuadas para analizar las cepas de este estudio. La secuencia de la región ITS para el candidato 73 no fue de calidad, tal como esperábamos. Como se puede observar en la Figura 16 aparece un ruido de fondo muy acusado. Por ello, realizamos el análisis RFLPs, como análisis adicional de identificación, para confirmar las especies de los candidatos. Aun así, seleccionando las secuencias de mejor calidad para la región ITS del candidato nº 73, según Chromas, fue posible mediante BLASTN obtener unos buenos resultados, con una fiabilidad del 100%. La región ITS es más específica para las *Saccharomyces*, pero la utilización de la región NL nos ha permitido comparar y confirmar resultados (Goddard 2008).

Las condiciones de las PCR fueron las adecuadas, siendo la T_m fundamental para llevarla a cabo. La resolución conseguida con la electroforesis en gel para confirmar que la PCR se había realizado con éxito, fue la adecuada. También fue la adecuada para el análisis de los RFLPs, excepto para la diferenciación a nivel de especie del candidato nº 7, como se puede observar en la Figura 15. Sin embargo, fue suficiente para discriminar entre las especies *M. caribbica* y *M. guilliermondii*.

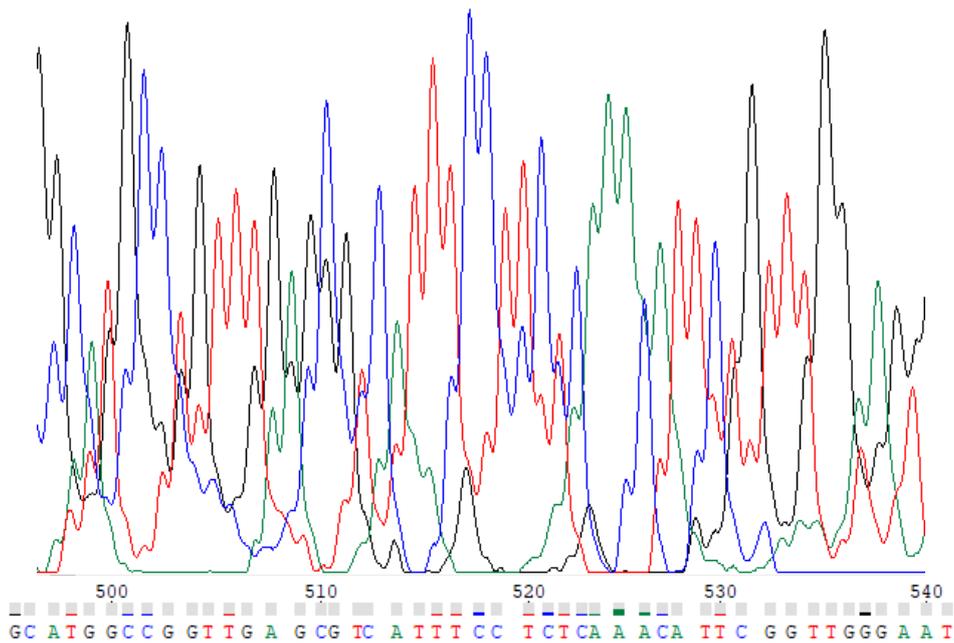


Figura 16. Secuencia de la región ITS del clon 73 observado mediante el programa Chromas.

La cantidad de resultados obtenida por BLASTN para cada secuencia fue relativamente baja. En el caso de haber utilizado únicamente una región concreta para analizar cada muestra, no habríamos obtenido unos resultados claros, puesto que con una fiabilidad del 100% BLASTN proporcionó más de un resultado. Fue al comparar ambas regiones, ITS y NL, cuando obtuvimos un resultado más claro, excepto para el caso del clon nº 2, que detallaremos más adelante.

Con el análisis de los RFLPs, utilizando las enzimas HaeIII, HpaII y ScrFI (Sun *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2012), confirmamos los resultados obtenidos del BLASTN. Por otro lado, el utilizar estas enzimas, limitó la comprobación de los perfiles de los candidatos diferentes al clon 73. Esto es porque la base de datos que recoge estos perfiles de restricción, contempla mayoritariamente las enzimas Cfo I, Hae III e Hinf I, y no otras, por lo que, solamente podríamos comprobar el patrón obtenido para la enzima Hae III. Especies de mayor interés como son las del género *Saccharomyces*, contemplan un patrón de restricción más completo, teniendo datos para las enzimas: Cfo I, Hae III, Hinf I, DdeI, Hind III, Hpa II, ScrF I. En nuestro caso, aconsejados por el personal de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, www.yeast-id.org), nos limitamos a emplear las enzimas HaeIII, HpaII y ScrFI, y fueron suficientes, puesto que lograron diferenciar la especie *S. cerevisiae*, confirmando los resultados obtenidos en BLASTN.

Mediante el análisis de las regiones ITS y NL, no fue posible discriminar a nivel de especie el candidato nº 7. Esto es porque las dos especies que nos daba como posible resultado, *Meyerozyma caribbica* y *M. guilliermondii* son especies que están estrechamente relacionadas. Como indica Romi *et al.* (2014), mediante la secuenciación de los dominios D1/D2 no fue posible discriminar entre estas dos especies. Mediante un análisis RFLP de la región ITS1-5.8S-ITS2 es posible la asignación taxonómica precisa de *M. guilliermondii* y *M. caribbica* (Romi *et al.*, 2014), realizando una digestión con la enzima Taq I.

Otros métodos pueden ser de utilidad para diferenciar entre estas dos especies, como por ejemplo los microsatélites (Wrent *et al.*, 2016). Sin embargo, el análisis RFLPs es un método sencillo que proporciona resultados claros.

Por último, a modo de resumen, los diferentes análisis empleados han sido de utilidad para la identificación de cepas *S. cerevisiae*. Pese a que la caracterización fenotípica no proporciona datos determinantes, sí que ha proporcionado información relevante para realizar una criba inicial. Y ha sido mediante la caracterización molecular, con el uso de diferentes vías de identificación como la secuenciación de la región ITS y los dominios D1/D2 además del análisis RFLP, lo que nos ha permitido proporcionar datos consistentes en la identificación de uno de los aislados de los campos de Alboraya como una cepa de *S. cerevisiae*. La identificación definitiva y su utilidad en el proceso de la producción de cerveza requieren estudios adicionales.

5. CONCLUSIONES

1. Hemos aislado e identificado 3 cepas procedentes de los campos de Alboraya (ver Tabla 13).

Tabla 13. Información sobre las cepas aisladas e identificadas. .

Nº muestra	Especie identificada	Origen de la muestra
2	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	Suelo <i>Eriobotrya japonica</i>
7	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Suelo <i>Citrus x limón</i>
73	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suelo <i>Ficus carica</i>

2. *Saccharomyces cerevisiae* está presente en suelos asociados a la higuera (*Ficus carica*).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Banno, I. y Mikata, K. (1981) Ascomycetous yeasts isolated from forest materials in Japan. *IFO Res. Comm.* 10, 10–19
- Birch, R. y Walker, G. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(9-10), pp.678-687.
- Blanco, P. y Orriols, I. (2012). Estudio de la implantación de levaduras autóctonas y comerciales en fermentaciones con mostos y bagazos de variedades gallegas. *Spanish Journal of Rural Development*, [online] 3, pp.p85-93. 9p. Available at: <http://www.sjruraldevelopment.org> [Accessed 22 Jul. 2018].
- Botstein, D., white, R., skolnick, M. y davis, R. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, pp.314-331.
- Cameron, J., Loh, E. y Davis, R. (1979). Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell*, 16(4), pp.739-751.
- Cappello, M., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. y Zacheo, G. (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), pp.1274-1280.
- De Deken, R. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), pp.149-156.
- Fischer, S. y Lerman, L. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(6), pp.1579-1583.
- Gilliland, R. (1971). Yeast classification*. *Journal of the Institute of Brewing*, 77(3), pp.276-284.
- Goddard, M. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89(8), pp.2077-2082.
- Goddard, M. y Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast Research*, 15(3).
- Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, H., Davis, R., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E., Mewes, H., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. y Oliver, S. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), pp.546-567.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. y Griffith, R. (1992). Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Biotechnology*, 10(4), pp.413-417.

- Li, E., Liu, C. y Liu, Y. (2012). Evaluation of Yeast Diversity During Wine Fermentations with Direct Inoculation and pied de cuve Method at an Industrial Scale. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(7), pp.960-966.
- Loviso, C. y Libkind, D. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Kurtzman, C. P. y Phaff, H. J. (1987). Molecular taxonomy of yeasts. In: Rose, A. H. y Harrison, J. S. (Eds.), *The Yeasts*. Vol. 1. Academic Press, New York, pp. 63-94.
- Kurtzman C. P., Fell JW y Boekhout T. (2011) *The Yeasts: a taxonomic study*. 5th edn. Cap. 1 “Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts”. Amsterdam: Elsevier.
- Maksoud, S., El Hadidi, M. y Amer, W. (1994). Beer from the early dynasties (3500–3400 cal B.C.) of Upper Egypt, detected by archaeochemical methods. *Vegetation History and Archaeobotany*, 3(4), pp.219-224.
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente Edita: © Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica Centro de Publicaciones Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <http://publicacionesoficiales.boe.es/> NIPO: 013-17-137-0 Depósito legal: M-18772-2017.
- Morris, E. y Eddy, A. (1957). Method for the measurement of wild yeast infection in pitching yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 63(1), pp.34-35.
- Mortimer, R. y Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150(3), pp.199-204.
- Muyzer, G., de Waal, E. y Uitterlinden, A. (1993). Profiling complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, pp.695-700.
- Naseeb, S., James, S., Alsammar, H., Michaels, C., Gini, B., Nueno-Palop, C., Bond, C., McGhie, H., Roberts, I. y Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), pp.2046-2052.
- Nassonova, E. (2008). Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biology*, 2(6), pp.557-565.
- Naumov, G., Naumova, E. y Sniegowski, P. (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(11), pp.1045-1050.
- Nwaiwu, O. (2016). Use of Fragments from D1/D2 Domain of 26S rRNA Gene to Select *Saccharomyces cerevisiae* from Palm Wine. *Journal of Applied Life Sciences International*, 5(4), pp.1-5.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. y Nirenberg, H. I. (1998). Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, 90:465–493.

- Pires, E., Teixeira, J., Brányik, T. y Vicente, A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), pp.1937-1949.
- Rodríguez, M. (2007). *Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas*. Doctorado. Universidad de Cádiz.
- Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G. y Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 14(1), p.52.
- Salazar Montes, A., Sandoval Rodríguez, A. y Armendáriz Borunda, J. (2016). *Biología molecular*. 2nd ed. Cap. 18 pp. 153-164.
- Sampaio, J. y Goncalves, P. (2008). Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), pp.2144-2152.
- Schoch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C., Chen, W., ungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), pp.6241-6246.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. y Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(2), pp.167-177.
- Schwartz, D. y Cantor, C. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1), pp.67-75.
- Sharma-Kuinkel, B., Rude, T. y Fowler, V. (2014). Pulse Field Gel Electrophoresis. *Methods in Molecular Biology*, pp.117-130.
- Sjakste, T., Paramonova, N. y Sjakste, N. (2014). Functional Significance of Microsatellite Markers. *Medicina*, 49(12), p.79.
- Sniegowski, P., Dombrowski, P. y 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 Research*, 1(4), pp.299-306.
- Sorof Uddin, M. y Cheng, Q. (2015). Recent application of biotechniques for the improvement of mango research. *Applied Plant Genomics and Biotechnology*, pp.195-212.
- Suárez Lepe, J. (1997). *Levaduras vínicas*. Bilbao: Mundi-Prensa, pp.55-67.
- Sun, Y., Qin, Y., Pei, Y., Wang, G., Joseph, C., Bisson, L. y Liu, Y. (2016). Evaluation of Chinese *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strains from Different Geographical Origins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68(1), pp.73-80.

- Tintó García-Moreno, A., Sánchez Lomares, F., Vidal Taboada, J. y Vijande Majem, P. (2010). La cerveza artesanal. 3rd ed. Sabadell: Cerveart, pp.144-187.
- Trask, B. (1991). Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, 7(5), pp.149-154.
- Vergnaud, G. y Denoeud, F. (2000). Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Research*, 10(7), pp.899-907.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Resource* 23: 4407-4414.
- Walters, L. y Thiselton, M. (1953). Utilization of lysine by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 59(5), pp.401-404.
- White, T.J., Bruns, Tom, Lee, Steven, Taylor, John, A Innis, M, H Gelfand, D y Sninsky, John. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *Pcr Protocols: a Guide to Methods and Applications*,. 31. 315-322.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J, Rafalski, J.A. y Tingery, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Wrent, P., Rivas, E., Peinado, J. y de Silóniz, M. (2016). Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. *International Journal of Food Microbiology*, 217, pp.1-6.
- Xuan, Y., Shen, Y., Ge, Y., Yan, G. y Zheng, S. (2017). Isolation and identification of *Acanthamoeba* strains from soil and tap water in Yanji, China. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 22(1).
- Zabeau, M. y Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. [online] Available at: <http://insilico.ehu.es/AFLP/info.html> [Accessed 28 Jul. 2018].