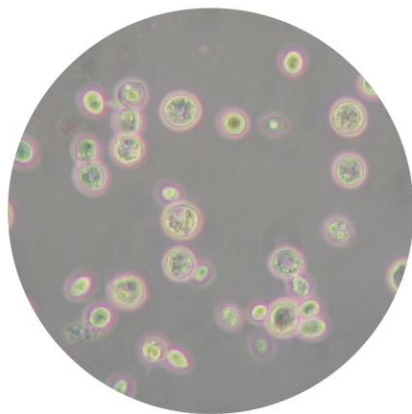


EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA DE **LEVADURAS SACCHAROMYCES**

EN VIÑEDOS DE LA ZONA ALTA
DEL RÍO MENDOZA



Licenciatura en Bromatología

Magalí Lucía Rosa González

Mendoza, 04 de Junio de 2015



Tema:

“Evaluación de la persistencia de levaduras Saccharomyces en viñedos de la zona alta del Río Mendoza”

Autor:

Magalí Lucía Rosa González
DNI 35.133.447 - Legajo N°: 2248
Teléfono: 0261 - 155883511
Mail: magali6gonzalez@gmail.com

Directora de Tesis:

Dra. Laura Analía Mercado
mercado.laura@inta.gob.ar

Co-Directora de Tesis:

Dra. Mariana Combina
combina.mariana@inta.gob.ar

Tribunal Evaluador de Tesis:

Presidente:

Lic. en Bromatología: Elizabeth SFREDDO

Vocales:

Dr. Ivan CIKLIC
Msc. Ing. Agrónomo. Marcos MAZZA

Suplente:

Ing. Agrónomo: Joaquín LLERA

Lugar:

Estación Experimental Agropecuaria Mendoza – INTA. (EEA)
Centro de Estudios de Enología
Laboratorio de Microbiología Enológica
San Martín 3853 (5507)
Luján de Cuyo, Mendoza, Argentina.
TE: +54 261 4963020/332 (Int.295)



“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas.”

Albert Einstein (1879-1955)

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
LISTADO DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS USADOS	X
AGRADECIMIENTOS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Vitivinicultura Argentina	1
1.1.1. Breve Reseña Histórica	1
1.1.2. La Vitivinicultura Argentina en Cifras	3
1.1.2.1. Situación Actual en el Mundo	3
1.1.2.2. Situación Actual del País.....	3
1.1.2.3. Situación actual del consumo mundial y nacional.....	5
1.1.3. Características Generales de las Zonas Vitícolas de Argentina	6
1.1.4. Regiones Vitivinícolas de Argentina.....	7
1.1.4.1. Regiones Vitícolas de la Provincia de Mendoza	9
1.2. Rol de las levaduras en la producción de vinos.....	10
1.2.1. Taxonomía de las levaduras.....	12
1.2.2. La especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
1.2.3. Identificación y Clasificación de levaduras	14
1.2.3.1. Métodos Clásicos.....	14
1.2.3.2. Métodos basados en Técnicas de Biología Molecular	15
Métodos basados en el análisis del Regiones Ribosomales o ARNr	15
<i>Secuenciación de Regiones Ribosomales:</i>	16
<i>Análisis de Restricción de Regiones Ribosomales (PCR-RFLP)</i>	16
Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (PCR-DGGE).....	16
PCR en tiempo real (Real Time PCR)	16
Microchips.....	16
Métodos para diferenciar cepas de la especie <i>S. cerevisiae</i>	16
<i>Electroforesis de cromosomas en campo pulsado o Análisis de Cariotipos (PFGE)</i>	16
<i>Análisis de Restricción del ADNmt</i>	16
<i>Métodos basados en la técnica de PCR</i>	16
1.2.4. Biodiversidad y origen de las levaduras.....	18



2. OBJETIVOS.....	21
2.1. OBJETIVO GENERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Delimitación del ámbito y características generales del estudio	22
3.2. Muestreo	22
3.2.1. Diseño estadístico del muestreo	22
3.2.2. Toma de muestra	22
3.3. Aislamiento	24
3.4. Conservación	24
3.5. Identificación tradicional	24
3.6. Caracterización molecular	25
3.6.1. Extracción del ADN	25
<input type="checkbox"/> <i>Producción de Biomasa</i>	25
<input type="checkbox"/> <i>Solubilización de ácidos nucleicos:</i>	25
<input type="checkbox"/> <i>Precipitación de Ácidos Nucleicos</i>	25
<input type="checkbox"/> <i>Eliminación de ARN</i>	26
<input type="checkbox"/> <i>Precipitación de ADN</i>	26
3.6.2. Cuantificación del ADN genómico	26
3.6.2.1. Armado del gel de agarosa al 0.7%	26
3.6.2.2. Preparación de las muestras y electroforesis en gel de muestras de ADN	26
3.6.3. Amplificación por PCR	27
3.6.3.1. Preparación de la PCR	27
3.6.3.2. Condiciones de la PCR.....	28
3.6.4. Visualización de los productos de PCR.....	28
3.6.5. Evaluación de los Patrones de Amplificación encontrados	29
3.7. Conservación de la biodiversidad.....	29
3.8. Cepas Comerciales usadas.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1. Etapa de Aislamiento	30
4.2. Diferenciación de cepas <i>S. cerevisiae</i> en el viñedo.	33
4.3. Identificación de cepas <i>S. cerevisiae</i> en el agua de riego del viñedo.	39
4.4. Comparación entre cepas <i>S. cerevisiae</i> aisladas del viñedo y cepas comerciales.	40
4.5. Evaluación de persistencia de cepas <i>S. cerevisiae</i> aisladas del viñedo	41
5. CONCLUSIONES.....	43



BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO I: Estados Fisiológicos de la Vid.....	48
ANEXO II: Formulación de Medios de Cultivo, Soluciones y Reactivos.....	49
ANEXO III: Identificación de Cepas del Viñedo que no amplificaron con la PCR <i>Inter δ</i>	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Situación Mundial de la Vitivinicultura Argentina.....	3
Tabla 2: Cantidad y Superficie de viñedos en el País - Distribución por provincias	4
Tabla 3: Cantidad y Superficie de viñedos en Mendoza - Distribución por departamento.....	4
Tabla 4: Evolución anual del consumo <i>per cápita</i> en Argentina. Año 2003-2013.....	5
Tabla 5: Resumen de las características climáticas y ecológicas de la provincia de Mendoza	9
Tabla 6 Continuación: Resumen de las características climáticas y ecológicas de Mendoza	10
Tabla 7: Clasificación de levaduras frecuentes en mostos y vinos	12
Tabla 8: Especies del género <i>Saccharomyces</i>	13
Tabla 9: Factores que afectan la microflora levuriana del viñedo y las uvas.....	18
Tabla 10: Fases del ciclo fenológico de la Vid.	20
Tabla 11: Esquema de la parcela de viñedo implantado con uvas Malbec en estudio.....	23
Tabla 12: Concentraciones y volúmenes de reactivos usados en la PCR Inter - δ mejorada.....	27
Tabla 13: Programa de PCR interdelta utilizado	28
Tabla 14: Presencia de <i>S. cerevisiae</i> (+/-) en las etapas de muestreo según la muestra tomada..	30
Tabla 15: Detalle del muestreo y aislamiento realizados por etapa y tipo de muestra	32
Tabla 16: Identificación de los aislados que no amplificaron por PCR <i>Inter-δ</i>	33
Tabla 17: Patrones de amplificación de cepas <i>S. cerevisiae</i> aisladas del viñedo	34
Tabla 18: Estimación de la Biodiversidad Total hallada y la Parcial de cada etapa en estudio	37
Tabla 19: Patrones moleculares de <i>S. cerevisiae</i> aisladas del agua de riego.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista actual de un viñedo implantado en Mendoza.....	1
Figura 2: Principales Exportaciones de Vinos Varietales Argentinos. Año 2013. Fuente INV	3
Figura 3: Principales variedades para elaborar mostos y vinos. Año 2013. Fuente: INV	5
Figura 4: Países con mayor consumo de vino. Años 2000, 2005 y 2012. Fuente: OIV	5
Figura 5: Principales regiones productoras de vinos en la Argentina.....	6
Figura 6: Grupos climáticos del Sistema CCM Geovítica para los índices IH, IF y IS.....	7
Figura 7: Distribución de las Regiones Vitivinícolas Argentinas.....	8
Figura 8: Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza.....	8
Figura 9: Tapa de "Estudios sobre la fermentación" de Louis Pasteur.....	11
Figura 10: Fotografías al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido	14
Figura 11: Esquema de la organización de los genes ribosomales	15
Figura 12: Métodos basados en la técnica de PCR para la diferenciación de cepas	17
Figura 13: Principio de identificación de <i>S. cerevisiae</i> por PCR asociada a los elementos δ	17
Figura 14: Ciclo Fenológico de la Vid.	19
Figura 15: Fotografías propias de muestras con características típicas de <i>S. cerevisiae</i> :.....	24
Figura 16: Fotografía propia de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> en placa de Petri con medio YPD	25
Figura 17: Preparación de un gel de electroforesis horizontal	26
Figura 18: Fotografía propia. Preparación de muestras para electroforesis en gel	27
Figura 19: Gel de PCR <i>Inter-δ</i> mejorada de 9 aislados de corteza del sector 8, por duplicado.....	28
Figura 20: Patrones 13 _{6/9} , 16, 19 y 26 obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.....	35
Figura 21: Patrones electroforéticos 2, 3, 6 y 7 obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.....	36
Figura 22: Patrones electroforéticos 6, 17, y 22 obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.....	36
Figura 23: Patrones electroforéticos 6, 14 y 15 obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.....	37
Figura 24: Patrones moleculares 27 a 35 obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.....	39
Figura 25: Patrones electroforéticos obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.	40
Figura 26: Patrones electroforéticos 1 _{6/9} y VIII obtenidos por PCR <i>Inter-δ</i> mejorada.	41



RESUMEN

La producción de vid y la elaboración de vino constituyen por excelencia dos actividades de amplia tradición y gran impacto económico en Mendoza. Dos aspectos fundamentales para potenciar el desarrollo de dichas actividades son el agregado de valor a la producción de vinos y la diversificación a nivel vitivinícola. Ambas perspectivas pueden abordarse desde una estrategia microbiológica, considerando que las levaduras presentes en el mosto son las principales responsables de la fermentación alcohólica del vino. En todas las regiones vitivinícolas del mundo se colectan, estudian, conservan y aprovechan las levaduras asociadas al ecosistema del viñedo. El conocimiento y la comprensión de los fenómenos que determinan la presencia de distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en los viñedos de una región vitícola, ha sido posible gracias al uso de técnicas específicas de biología molecular, y constituye una herramienta imprescindible para el abordaje de los desafíos actuales que plantea la producción de vinos a nivel mundial. La Zona Alta del Río Mendoza constituye la principal región vitícola donde se cultiva la variedad Malbec, vino emblemático de Argentina. En el presente estudio se propuso abordar la evaluación de la persistencia de *S. cerevisiae* en un viñedo de variedad Malbec de esta región, a fin de estudiar sus reservorios a lo largo del ciclo fenológico de la vid y contribuir a mantener la biodiversidad propia de esta región. Para ello, se evaluaron las poblaciones *S. cerevisiae* presentes en uvas, suelo, corteza, yemas, hojas y flores en diferentes etapas desde cosecha hasta la floración. Se pudo verificar la presencia de diferentes cepas de *S. cerevisiae* en el ecosistema del viñedo que presentaron un carácter dinámico en el período evaluado. La información generada integrará la colección de recursos genéticos que reflejan la biodiversidad de nuestra región y que permitirá abordar a futuro el desarrollo de inóculos que contribuyan a la diversificación de vinos argentinos y expresión del *terroir* en vinos Malbec de Mendoza.

Palabras clave:

Ecosistema del viñedo, Biodiversidad de *Saccharomyces* Nativas, Ciclo Fenológico de la vid

LISTADO DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS USADOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNgn: Ácido Desoxirribonucleico Genómico o Nuclear

ADNmt: Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

ADNr: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal

ARN: Ácido Ribonucleico

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante

EEA INTA: Estación Experimental Agropecuaria Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

et al.: Y colaboradores

ETS: *External Transcribed Spacers*, Espaciadores Externos Transcritos

INV: Instituto Nacional de Vitivinicultura (Argentina)

IGS o NTS: *Intergenic Spacers* ó *No Transcribed Spacers*, Espaciadores Intergénicos

ITS: *Internal Transcribed Spacers*, Espaciadores Internos

LSA: Levadura Seca Activa

LSU ARNr: *Nuclear Large Subunit Ribosomal*, Región 26 S de los genes ribosomales

LTR: *Long Terminal Repeat*, Secuencias Largas de Repetición directa

msnm: metros sobre el nivel del mar

OIV: Organización Internacional de la Vid y el Vino

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, Electroforesis en Campo Pulsado

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*; Polimorfismo en Longitud de Fragmentos de Restricción

SSR: *Simple Sequence Repeats*, Secuencias Simples Repetidas, Microsatélites

SSU ARNr: *Nuclear Small Subunit Ribosomal*, Región 18 S de los genes ribosomales

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

WL: Medio Agar Nutritivo Wallerstein Laboratorio

ZARM: Zona Alta del Río Mendoza

AGRADECIMIENTOS

A Dios, infinito amor, por ser el principio, el centro y el fin de mi vida...

*A mis abuelos, por formar mi familia y ser mis grandes ejemplos de lucha...
Gracias Lalita mía por enseñarme que todos los días puedo aprender algo nuevo...
Gracias abue Luis por darme tu sabiduría, tus historias y tu sonrisa compañera...
Desde el cielo sé que ambos están festejando conmigo el cierre de esta etapa...*

A mis papás, Érica y Gaspar, quiero agradecerles por su amor y apoyo incondicionales, por criarme con tantos valores y por ser siempre un ejemplo de voluntad, trabajo y constancia...

A mis hermanos, Romina, Luciano y Emanuel, por ser mi hogar, mis compañeros de juegos y estudio, mis primeros amigos... Por amarme y aceptarme como soy y por enseñarme a compartir de verdad...

A mis tíos y tías, Manuel, Jaime, Cachó, Soraya, Beatriz, Silvia y Sonia, por motivarme a cuestionarme y mostrarme que la familia es lo más importante y debe permanecer unida...

A todos mis profesores por transmitirme su conocimiento y experiencia...

A mis compañeros de la facu, Angie, Gabby, Nico A. y Nico C., por las risas, las horas de estudio y los mates... Fue hermoso vivir esta etapa junto a ustedes...

A Mariana, por su generosidad, su inagotable experiencia, su inquebrantable optimismo y su delicado trato con las personas...

A Laura, mi directora, por su sencillez, sus palabras de afecto, su calidez como madre e investigadora y por creer y confiar en mí para este trabajo...

A toda la gente de Micro del INTA, Pao, Ceci R., Camilo, Elen, Lore, Vale, Raúl, Iván y Ceci L., por compartir conmigo sus personas, su pasión y dedicación en el trabajo, los mates, las risas y por abrirme las puertas del laboratorio de par en par...

A mis amigos, hermanos de la vida, Dana, Flor, Guari, Franco, Fedé, Toki, Francisco, Clau, Marcos, Gabo, Cintia, Nico R., Chechu, Nadia, Cristián, Pancho, Pola, Martín S. por dos, Gustavo, Casandra y Augusto, por llenarme con su presencia, compartir mis búsquedas, ser mi cable a tierra, caminar a mi lado y sostenerme siempre...

A todos y cada uno, les agradezco infinitamente que me hayan brindado su corazón y me ayuden a ser quien soy.

¡¡Espero que me alcance la vida para devolverles tanto amor!!

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Vitivinicultura Argentina

1.1.1. Breve Reseña Histórica

Las crónicas suelen coincidir en que el origen de la vid se remonta al período terciario del tiempo geológico, mucho antes de la aparición del hombre. No obstante, la elaboración del vino, concebida como una actividad humana intencional y planificada, comenzó su desarrollo en el período Neolítico, entre el 8.000 y el 6.000 a.C., cuando el hombre dejó de ser nómada e inventó la agricultura, la metalurgia y así, surgieron las primeras ciudades (Fondo Vitivinícola, 2014). El cultivo de la vid comenzó en la zona del Asia Menor (actuales Turquía, Siria, Irak e Irán) y desde aquí, se extendió hacia el Cercano Oriente y el Mediterráneo a través de las culturas babilónica, fenicia, griega, romana, etrusca y cartaginesa. En el segundo milenio a.C., llegó a China y Japón y luego se extendió a todo el mundo (Fondo Vitivinícola, 2010).

En América Latina, la vitivinicultura tiene ya más de cinco siglos. Si bien existían variedades de *vitis* silvestres antes de la colonización, las primeras plantas de *Vitis vinífera* fueron traídas por los españoles y llegaron a Cuzco a mediados del siglo XVI. En nuestro país, el cultivo se introdujo en el año 1557 en Santiago del Estero, gracias al sacerdote mercedario Juan Cidrón (o Cedrón), quien cruzó la Cordillera de Los Andes trayendo consigo estacas de vid (Pandolfi y Cuello, 2005). En Cuyo, las primeras vides se plantaron en la segunda fundación de Mendoza (marzo de 1562). Desde aquí y siempre bordeando la cordillera, la vitivinicultura se propagó hacia las provincias andinas, que favorecidas por las óptimas condiciones climáticas y de suelo, se establecieron así como las zonas vitivinícolas más importantes del Cono Sur (Fondo Vitivinícola, 2014).

Durante los siglos XVI, XVII y XVIII, la elaboración del vino se caracterizó por ser rudimentaria y doméstica y solo se producían volúmenes limitados a satisfacer las necesidades de las pequeñas comunidades coloniales. De esos tiempos data el vino "patero", cuyo proceso de elaboración se reducía a pisar las uvas en cueros de vaca, recolectar el mosto y trasvasarlo a tinajas de barro para promover su fermentación (Pandolfi y Cuello, 2005). A partir del siglo XIX, la organización constitucional de la Argentina y una sucesión de eventos importantes, permitieron el desarrollo de la vitivinicultura moderna y posibilitaron que la región de Cuyo se transformara en la zona vinícola más importante del país. Se pueden considerar tres grandes etapas en esta transformación (Tacchini, 2001).

En la primera etapa, de 1853 a 1930, la creación de la Quinta Normal de Agricultura y la Bodega de la Escuela de Enología, la instalación del ferrocarril que vinculaba Mendoza y San Juan con Buenos Aires, el dictado de leyes de aguas y tierras y la corriente inmigratoria europea de principios de siglo, condujeron a la especialización vitivinícola de Cuyo debido a la adopción del modelo francés (Pandolfi y Cuello, 2005). La aplicación de nuevas técnicas de cultivo (como los injertos y la poda racional), la introducción de otras variedades de vid (como por ej.: Cabernet Sauvignon, Malbec y Pinot Noir) aptas para la elaboración de vinos finos, la importación de maquinarias e implementos agrícolas, la capacitación y el perfeccionamiento de los técnicos y la innovación en las prácticas enológicas utilizadas en bodegas, fueron algunas de las mejoras conseguidas que contribuyeron a formar un mercado



Figura 1: Vista actual de un viñedo implantado en Mendoza.
Fuente Fondo Vitivinícola 2014

nacional de consumidores habituales de vino (Figura 1) (Fondo Vitivinícola, 2014).



La segunda etapa del desarrollo de la vitivinicultura argentina transcurrió entre 1930 y 1989. Implicó la intervención del Estado como protagonista de la economía, vía regulaciones y controles; y como productor de bienes y servicios mediante empresas monopólicas. En el marco legal, el acontecimiento más importante fue la sanción de la Ley de Vinos 14.878 en el año 1959. Con ella también se creó el INV, ente responsable de la fiscalización, promoción, desarrollo y el control técnico de la producción, industria y comercio vitivinícola (Tacchini, 2001).

En la década del '60, en respuesta a un mercado que demandaba producción de bajo costo y en grandes cantidades, ocurrió un cambio de paradigma en Mendoza y San Juan. Variedades nobles de vid fueron reemplazadas por parrales de vides criollas de alto rendimiento cuantitativo (criollas y cerezas). Si bien en este tiempo se alcanzó la mayor producción de uva y vinos de mesa, y el mayor consumo de la Argentina (aproximadamente 88 L *per cápita* por año), la crisis de este modelo llegó a fines de los '70 con la caída del precio del vino y la disminución de su consumo (Pandolfi y Cuello, 2005). En la década de 1980, el gobierno junto con las entidades gremiales y empresarias, comenzaron a trabajar en una reconversión del sector. Para afrontar la crisis de sobreproducción, decidieron la eliminación de un porcentaje de producción anual (derramamiento de vinos) y la erradicación o abandono de viñedos dañados o de baja calidad. Esta fue la caída de los imperios construidos por los inmigrantes y la monopolización de la elaboración en pocas grandes empresas (Greco, Peñaflor, Catena) (Fondo Vitivinícola, 2012; Tacchini, 2001).

Finalmente, la tercera etapa del desarrollo vitivinícola argentino comenzó en 1989 con la caída del muro de Berlín. Este suceso puso fin a la Guerra Fría entre el capitalismo occidental y el comunismo soviético, y dio inicio al fenómeno económico de la Globalización que trajo consigo la mundialización de los mercados y una nueva revolución tecnológica. A partir de los '90, el sector vitivinícola comenzó su recuperación a través de la reconversión, la integración de productores, el establecimiento definitivo del fraccionamiento en origen y la enajenación de las empresas de tipo familiar que fueron adquiridas por grandes grupos financieros provenientes de todo el mundo (Fondo Vitivinícola, 2014). La entrada de capitales extranjeros permitió una mayor inversión e importación de bienes de capital, tecnología de punta e insumos de calidad con menores costos y financiación. Esto, sumado a la implantación de viñedos de alta calidad enológica y la diversificación y especialización de las zonas vitivinícolas, condujo a la modernización de las bodegas desde la etapa agrícola hasta el producto final (Tacchini, 2001). Estos hechos provocaron un aumento de las exportaciones, al mismo tiempo que produjeron un cambio en la composición del consumo interno de vinos. A partir de 1990 y hasta fines de esa década, los despachos de vinos de mesa de Mendoza se redujeron aproximadamente en un tercio, mientras que el consumo y los despachos de vinos finos se duplicaron (Pandolfi y Cuello, 2005).

En la actualidad, nuestro país compone el Nuevo Mundo Vitivinícola junto a Australia, Estados Unidos, Chile, Sudáfrica y Nueva Zelanda. En el año 2010, la importancia de este grupo en el comercio mundial pasó del 20 % (2001) a casi el 25 %. Durante este período, el grupo fue cambiando su composición hacia una participación menos concentrada de sus actores. Así, la Argentina pasó de participar con el 6 % de las exportaciones al 11,6% (Fondo Vitivinícola, 2012).

Finalmente, para afianzar aún más el posicionamiento del vino argentino en el mercado interno y externo, el Estado, los industriales y los organismos científicos y técnicos están trabajando en conjunto, en el diseño de un Plan Estratégico Vitivinícola 2020. El objetivo del mismo es lograr una industria competitiva y sostenible a través de acciones conjuntas en la promoción de los vinos, el incremento de las exportaciones y el desarrollo de nuevas investigaciones (Fondo Vitivinícola, 2014)

1.1.2. La Vitivinicultura Argentina en Cifras

1.1.2.1. Situación Actual en el Mundo

Por su historia, tradición y escala, la industria vitivinícola argentina se ubica entre las diez principales a nivel mundial. La siguiente tabla muestra la posición de nuestro país según las estadísticas de la OIV en el año 2012.

Tabla 1: Situación Mundial de la Vitivinicultura Argentina

Detalle	Posición en el ranking mundial
Superficie cultivada con vid	9°
Producción de uvas	8°
Elaboración de vinos	5°
Consumo de vinos	8°
Exportaciones de vinos	9°

En el año 2013, el valor FOB¹ de las exportaciones de vinos y mostos fue de 1.105.627.450 dólares estadounidenses, lo que significa un decrecimiento del 4,79% con respecto al año 2012. Los volúmenes de vinos exportados correspondieron a 3.150.515,19 hl. El 66,79% de dicho volumen (2.104.265,83 hl) correspondió a vinos varietales, el 31,50% (992.334,78 hl) a vinos sin mención varietal, el 1,17% (36.896,58 hl) a vinos espumantes y el 0,54% (17.018 hl) a otros vinos (INV, 2013).

El 80,71% de las ventas en 2013 fueron vinos fraccionados en botella, la mayor parte tintos. En cuanto a las preferencias varietales, se destacó la variedad Malbec, seguida por las variedades Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Torrontés Riojano, Syrah-Malbec, Syrah, Sauvignon, Pinot Gris y Moscatel Rosado, entre otros (Figura 2). Con respecto a las provincias de origen de los vinos, el 74,99% correspondió a Mendoza, el 20,56% a San Juan, el 2,04% a La Rioja y el resto de las provincias reunieron en conjunto el 2,41% (INV, 2013).

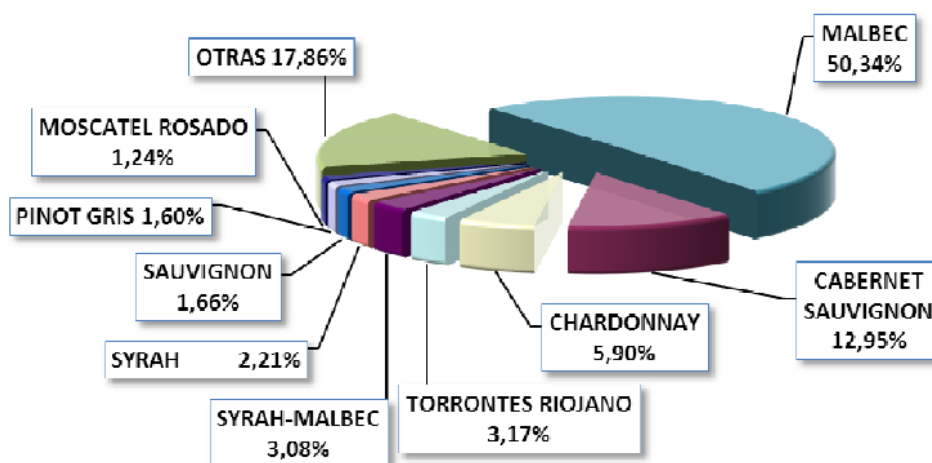


Figura 2: Principales Exportaciones de Vinos Varietales Argentinos – Año 2013. Fuente INV

1.1.2.2. Situación Actual del País

Según el censo realizado por el INV en el año 2013, la Argentina cuenta con una superficie de 223.580 ha cultivadas con vid, distribuidas fundamentalmente entre Mendoza, San Juan, La Rioja, Río Negro, Catamarca, Salta y Neuquén. El resto de las provincias tiene menos de trescientas

¹ Las siglas FOB (acrónimo del término en inglés *Free On Board*, «franco a bordo, puerto de carga convenido») se refieren a una cláusula de comercio internacional que se utiliza para operaciones de compraventa en que el transporte de la mercancía se realiza por barco (mar o vías de navegación interior). Extraído de http://es.wikipedia.org/wiki/Free_On_Board

hectáreas de viñedos (Tabla 2). Nuestra provincia presenta la mayor superficie implantada de vid en el país (71,10 % del total) y esta superficie se encuentra distribuida mayormente en los departamentos de San Martín, Rivadavia, Luján de Cuyo, San Rafael y Lavalle (Tabla 3).

Tabla 2: Cantidad y Superficie de viñedos en el País - Distribución por provincias

Provincias	VIÑEDOS		SUPERFICIE	
	Cantidad	% sobre total	Hectáreas	% sobre total
Mendoza	16.690	65,78	158.964,9628	71,10
San Juan	5.334	21,02	47.632,8238	21,30
La Rioja	1.266	4,99	7.198,5162	3,22
Córdoba	135	0,53	274,9180	0,12
Salta	252	0,99	2.921,8347	1,31
Neuquén	83	0,33	1.689,0259	0,76
R. Negro	273	1,08	1.684,7943	0,75
Catamarca	1.217	4,80	2.638,8605	1,18
B. Aires	43	0,17	117,7355	0,05
La Pampa	14	0,06	215,6683	0,10
Tucumán	24	0,09	83,4527	0,04
Entre Ríos	12	0,05	25,0796	0,01
Jujuy	13	0,05	12,1085	0,01
Chubut	3	0,01	21,0182	0,01
Misiones	7	0,03	5,2500	0,00
S. del Estero	1	0,00	8,8000	0,00
San Luis	5	0,02	85,3260	0,04
Total País	25.372	100	223.580,1750	100

* Base congelada al 31 de diciembre de 2013
Dpto de Estadística y Estudios de Mercado, INV

Tabla 3: Cantidad y Superficie de viñedos en Mendoza - Distribución por departamento

Departamentos	VIÑEDOS		SUPERFICIE	
	Cantidad	% sobre total	Hectáreas	% sobre total
Gral. Alvear	1306	7,83	4403,60	2,77
Godoy Cruz	2	0,01	1,2870	0,00
Guaymallén	196	1,17	757,53	0,48
Junín	1.665	9,98	11.867,11	7,47
La Paz	43	0,26	319,5132	0,20
Las Heras	225	1,35	1.669,50	1,05
Lavalle	1.280	7,67	14.478,76	9,11
Luján de Cuyo	928	5,56	15.304,08	9,63
Maipú	1.179	7,06	12.583,34	7,92
Malargüe	1	0,01	0,8600	0,00
Rivadavia	1.642	9,84	15.914,35	10,01
San Carlos	647	3,88	8.254,43	5,19
San Martín	3.144	18,84	30.188,31	18,99
San Rafael	2.734	16,38	14.433,34	9,08
Santa Rosa	727	4,36	10.550,26	6,64
Tunuyán	397	2,38	8.694,39	5,47
Tupungato	574	3,44	9.544,25	6,00
Total Mendoza	16.690	100	158.965	100

* Base congelada al 31 de diciembre de 2013
Dpto de Estadística y Estudios de Mercado, INV

En el encepado total del país, todavía continúa la reconversión de los viñedos hacia variedades de alta calidad enológica. Si se considera el destino de la uva, se observa un predominio de variedades para vinificar. Estas representan el 92,34% del total implantado y el 66% de ese valor (136.967 ha), corresponde a variedades de alta calidad enológica. Las variedades de mesa constituyeron el 5,60% de la superficie implantada y las uvas aptas para pasas constituyeron el 1,78% (INV, 2013).

Dentro de las variedades tintas para vinificar, el Malbec es la de mayor cantidad de hectáreas plantadas. Le siguen en importancia las variedades Bonarda, Cabernet Sauvignon y Syrah. En las variedades rosadas se pueden mencionar Cereza, Criolla Grande y Moscatel Rosado; mientras que en las blancas la mayor superficie implantada corresponde a la variedad Pedro Giménez, seguida por las variedades Torrontés Riojano, Chardonnay y Moscatel de Alejandría. En el 2013, el 76,84% de las variedades de vinificar fueron variedades tintas de alta calidad enológica y entre ellas, la variedad Malbec representa el 37% (INV, 2013).

El Malbec es la variedad emblemática de la producción vitivinícola argentina. Si bien este cepaje es oriundo de la región de Burdeos (Francia), en nuestro país, muestra particularidades debidas a las diferencias de clima y suelo, características genéticas de las plantas, manejo del viñedo y métodos de elaboración. Las bodegas argentinas han logrado un importante crecimiento en el mercado internacional y un muy buen posicionamiento con los vinos de la variedad Malbec, reconocidos como unos de los mejores del mundo. (Fondo Vitivinícola, 2014).

En el ciclo vegetativo 2013, en el país se registraron 35.890 ha de viñedos con variedad Malbec, representando el 16,05% de la superficie total con vid del país. El 86% de estas hectáreas se encuentran en Mendoza donde el cultivo de esta cepa constituye el 20% del total de la provincia. El Malbec ocupa el primer lugar de importancia entre las variedades de alta calidad enológica destinadas a elaborar, con el 22,92% (Figura 3). Durante el 2013 los varietales Malbec ocuparon el primer lugar en volumen exportado y representaron el 50% del total de los varietales. Con 1.059.381 hl se produjo un incremento del 3,56 % en los volúmenes exportados con relación al año 2012 y el Valor FOB de las ventas de vinos de la variedad Malbec mostró un aumento del 3,42% respecto al mismo año (INV, 2013).

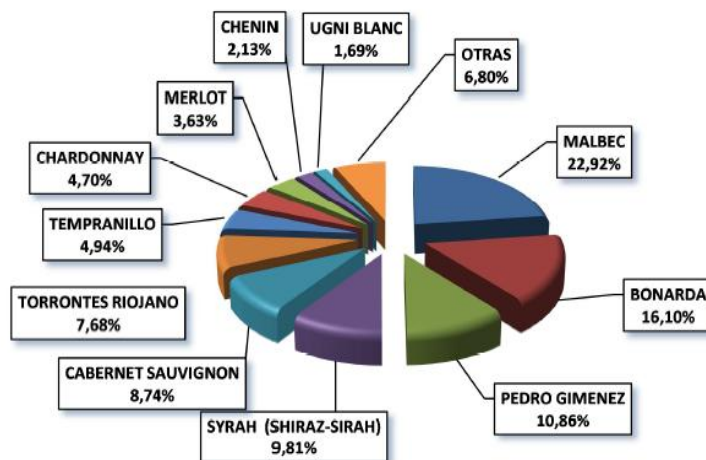


Figura 3: Principales variedades de alta calidad enológica destinadas a elaborar mostos y vinos – Año 2013 – En Quintales. Fuente: INV

1.1.2.3. Situación actual del consumo mundial y nacional

La producción mundial de vino en el año 2013 aumentó de manera significativa y el consumo se estabilizó. Como consumidor, Argentina se ubica en el octavo lugar a nivel mundial (Figura 4), después de Francia, Estados Unidos, Italia, Alemania, China, Reino Unido y Rusia (OIV, 2012).

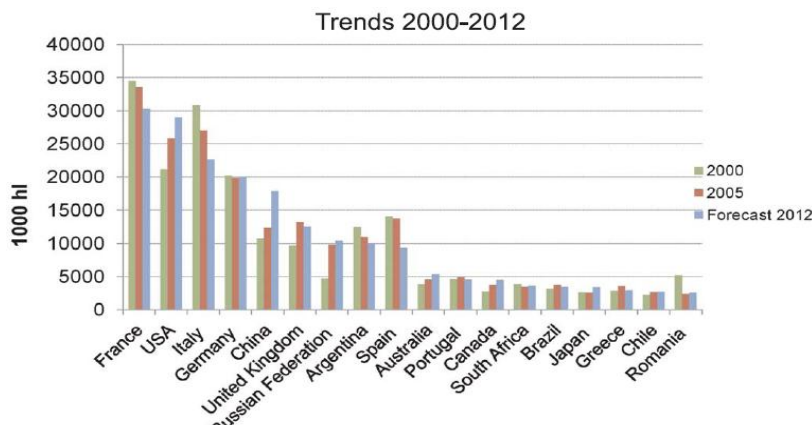


Figura 4: Países con mayor consumo de vino en el mundo. Años 2000, 2005 y 2012. Fuente: OIV, 2012

Nuestro país conserva un importante mercado interno que casi supera los mil millones de litros anuales (Tabla 4). En cuanto a las preferencias, las modificaciones en superficie y variedades plantadas, también provocaron cambios en los consumidores, quienes ahora se inclinan más hacia los vinos de color que al consumo de vinos blancos y espumantes (Pandolfi y Cuello, 2005). También se observa que los consumidores eligen tomar menor cantidad de vino pero de mayor calidad (Fondo Vitivinícola, 2014).

Finalmente, se muestran los últimos datos actualizados sobre la temporada 2015 informados por el INV:

Tabla 4: Evolución anual 2003 al 2013()**

Años	Consumo anual (litros per cápita)
2003	32,90
2004	33,68
2005	29,87
2006	29,18
2007	29,23
2008	29,08
2009	27,79
2010	26,70
2011	24,85
2012	24,95
2013	25,53

(**) Estimado con población total

- ✓ Cantidad de bodegas elaboradoras: 918
- ✓ Cosecha de uvas (dato final 2014) 2.635 millones kg
- ✓ Elaboración de vinos (dato final 2014) 1.520 millones L
- ✓ Consumo Interno (enero 2015) 735.444 hl
- ✓ Exportaciones de vino (enero 2015) 246.727 hl
- ✓ Exportaciones de mosto (enero 2015) 58.567 hl
- ✓ Comercialización de vinos (enero 2015) 1.004.244 hl

1.1.3. Características Generales de las Zonas Vitícolas de Argentina

En Argentina la vitivinicultura orientada a la producción de vinos finos se desarrolla en una extensa franja ubicada en la zona pedemontana de la Cordillera de Los Andes, desde los 22° hasta los 42° de latitud sur (Pandolfi y Cuello, 2005).

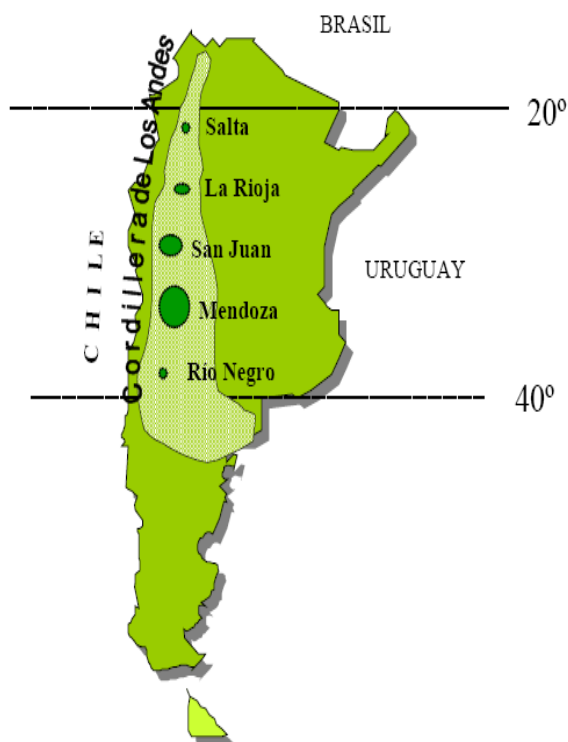


Figura 5: Principales regiones productoras de vinos en la Argentina. Fuente: Catania *et al.*, 2007

En la mayor parte de la franja señalada, la altitud varía entre los 450 y los 1.800 msnm. Esta gran amplitud latitudinal, junto con la topografía de los numerosos valles andinos, provocan grandes variaciones ecológicas que permiten el cultivo de una amplia gama de variedades de vid que producen vinos con notables diferencias organolépticas (Fondo Vitivinícola, 2014). Los principales tipos de clima de la Argentina son cuatro: cálido, templado, árido y frío. La extensión del territorio y los accidentes del relieve, principalmente la Cordillera de Los Andes, determinan la existencia de variaciones en cada tipo de clima. Teniendo en cuenta esto, es posible dividir el territorio argentino en diferentes zonas o regiones vitivinícolas (Figura 5), diferenciadas según la diversidad de sus suelos y sus características climáticas y ecológicas. Esta zonificación explica en parte el diferente potencial de producción de cada región y resulta una herramienta importante para determinar qué variedades resultan más adecuadas para su cultivo

en una zona o región determinada, según sus exigencias climáticas y características enológicas (Catania *et al.*, 2007).

A causa de su altura, La Cordillera de los Andes provoca que las masas de aire húmedo provenientes del océano Pacífico, descarguen su humedad sobre territorio chileno y si penetran en nuestro país, el aire resultante es seco y caliente, conocido como viento Zonda. A su vez, los frentes húmedos que se desplazan desde el océano Atlántico, arriban esporádicamente hasta el piedemonte andino ya que, en general, las precipitaciones se producen en el litoral del país, alcanzando ocasionalmente las provincias centrales y del noroeste (Pandolfi y Cuello, 2005). Como consecuencia de esto, la mayor parte de las zonas vitivinícolas poseen casi exclusivamente clima árido desértico². Este tipo de clima se caracteriza por presentar inviernos bien marcados, veranos calurosos, baja humedad atmosférica y buena insolación durante todo el año. Dado que la vid es una especie criófila, las temperaturas invernales bajo cero resultan muy convenientes para su reposo vegetativo. La gran heliofanía y las temperaturas adecuadas en primavera, permiten que las uvas alcancen una completa maduración con niveles óptimos de calidad. No

² Algunas partes de Córdoba constituyen una excepción a esta afirmación, ya que presentan clima templado húmedo con estación invernal seca. (Catania *et al.*, 2007).

obstante, la ocurrencia de heladas tardías o tempranas es un factor climático limitante para la vitivinicultura en determinadas regiones (Catania *et al.*, 2007).

Debido a las bajas precipitaciones (entre 100 y 300 mm por año, mayormente en verano), la principal reserva de agua en las zonas vitivinícolas se encuentra en embalses y otras obras hidráulicas que captan y almacenan el agua del deshielo cordillerano producido en la época estival. Gracias a esto, las zonas vitivinícolas se configuran como verdaderos oasis perfectamente delimitados y separados, que presentan pendientes del 2 % en las regiones pedemontanas y de hasta alrededor del 0,2 % en las regiones más planas (Fondo Vitivinícola, 2014).

La vitivinicultura se sostiene mediante riego artificial con agua subterránea o de ríos. La irrigación artificial se realiza a través de diversos sistemas (por surcos, a manto, por goteo y por aspersión) y permite que la provisión de agua en el viñedo pueda efectuarse en los volúmenes y épocas más apropiadas, conforme al estado vegetativo de las vides y a la calidad que se busca obtener. Los suelos, en general, son de gran aptitud para el cultivo de la vid. Presentan diversas características, desde arenosos a arcillosos, con predominio de los suelos sueltos y profundos. Tienen reacción alcalina y son ricos en calcio y potasio y pobres en materia orgánica, nitrógeno total y fósforo. Edafológicamente son jóvenes y se han formado por el arrastre de material por el agua de los ríos, la acción del viento y los derrubios coluviales de las formaciones montañosas (Pandolfi y Cuello, 2005).

A continuación, utilizando los grupos climáticos descritos según la metodología del Sistema de Clasificación Climática Geovitícola (Sistema CCM Geovitícola) (Figura 6) citado en Catania *et al.* (2007), se desarrollan las principales características de las cinco regiones vitivinícolas argentinas, haciendo especial énfasis en las zonas encontradas en Mendoza.

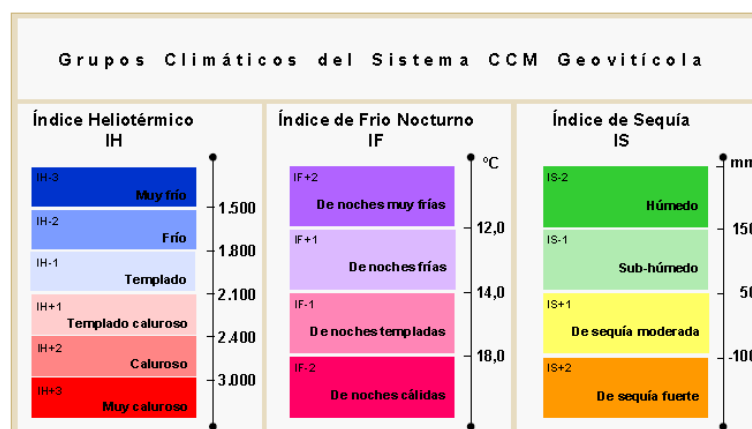


Figura 6: Grupos climáticos del Sistema CCM Geovitícola para los índices IH, IF y IS. Extraído de Catania *et al.*, 2007

1.1.4.Regiones Vitivinícolas de Argentina

En nuestro país se distinguen cinco regiones fundamentales. Las regiones provenientes de las provincias de **Salta, Mendoza y San Juan**; junto con la **Región Noroeste**, comprendida por las provincias de Catamarca, La Rioja y el noroeste de Tucumán, y **la Región Patagónica o Sur**, formada por La Pampa, Neuquén, Río Negro y Chubut (Figura 7). Cada una de estas regiones vitícolas presenta características ecológicas propias, suelo y climas diferenciales. Las vides también expresan rasgos distintivos en cada *terroir*, por lo que la implementación del sistema de indicaciones geográficas y denominación de origen controlada, permitirá resaltar la diferenciación de los vinos y un incremento en el valor agregado, al asociar su identidad con la zona de origen (Catania *et al.*, 2007).

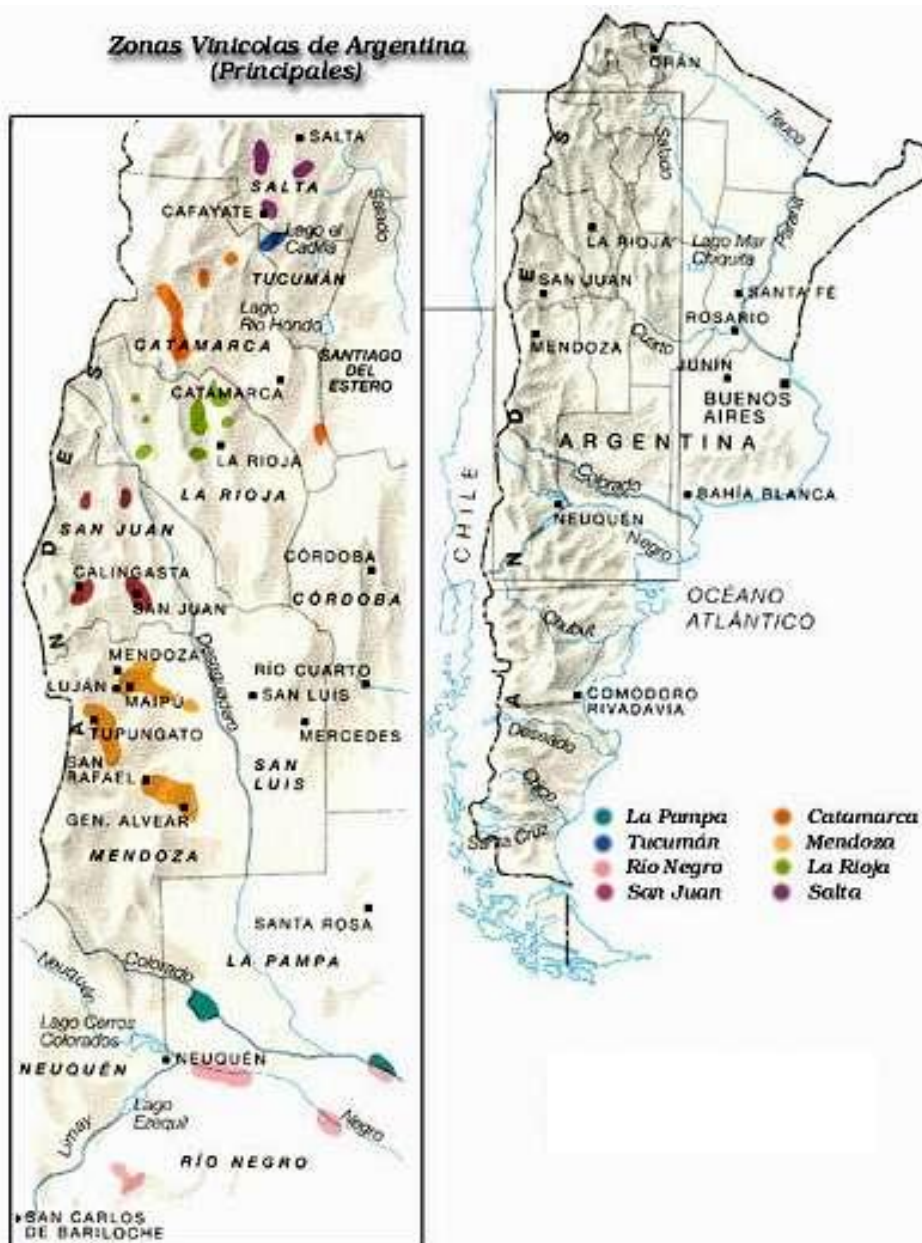


Figura 7: Distribución de las Regiones Vitivinícolas Argentinas.
Extraído de: <http://losvinosgae41.blogspot.com.ar/2011/01/historia-del-vino.html>

En el centro-oeste de la Argentina, se encuentra la zona vitícola más importante de nuestro país. Se extiende desde los 29,5° a los 36° de latitud Sur y representa el 92 % de la superficie total implantada con viñedos. En esta región se pueden distinguir dos subregiones: Mendoza y San Juan, con características bien diferenciadas (Fondo Vitivinícola, 2010). Mendoza es el centro vitivinícola más importante del país. (INV, 2013). Suelos pobres, escasas lluvias, una notable amplitud térmica y la buena insolación de las uvas, son algunos de los factores que caracterizan a los terruños de Mendoza y los hacen ideales para el desarrollo de una vitivinicultura de calidad. En su territorio se distinguen 5 zonas que corresponden a los diferentes oasis mendocinos con diferencias marcadas en altitud, ríos proveedores de agua, suelos y clima (Figura 8)

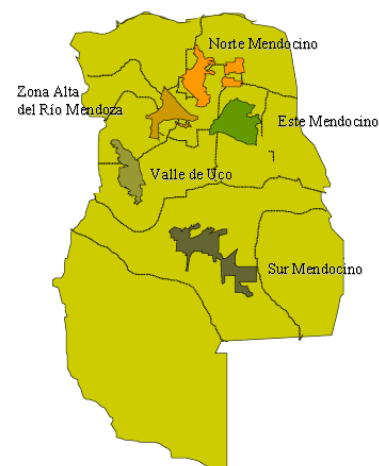


Figura 8: Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza.
Fuente: Catania et al., 2007

(Fondo Vitivinícola, 2010).

1.1.4.1. Regiones Vitícolas de la Provincia de Mendoza

La **Zona Alta del Río Mendoza (ZARM)** es la región pedemontana más importante en la producción de vinos finos. Se encuentra regada por el Río Mendoza y, por su cercanía a la Ciudad de Mendoza, sufre el impacto de la urbanización. Sus condiciones climáticas permiten la formación de color y taninos en los vinos, haciéndolos aptos para un envejecimiento prolongado. El Malbec es el cepaje típico y adquiere más cuerpo, acidez y color en las zonas de mayor altura, condiciones que disminuyen a medida que se desciende en altitud. La **Región del Norte Mendocino** representa el 9,87% del total de la superficie vitícola de la provincia y comprende las áreas de menor altura sobre el nivel del mar irrigadas por el Río Mendoza. En general, se adapta para la producción de vinos tintos livianos y de marcado carácter varietal, junto con vinos blancos como Chenin y Torrontés. La **Zona del Este** es una planicie que recibe las aguas del Río Tunuyán y es la mayor productora de vinos de la provincia de Mendoza. La **Región del Valle de Uco** es la zona de mayor desarrollo vitivinícola en este momento. Está formada por una planicie pedemontana que se extiende en ambas márgenes del Río Tunuyán. Se caracteriza por la amplitud térmica que en muchas localidades supera los 15°C. Los cepajes tradicionales son el Semillón del Departamento de Tupungato y el Malbec de la localidad de La Consulta. Finalmente, la **Región del Sur Mendocino** es una planicie ubicada en los márgenes de los Ríos Atuel y Diamante. Es la principal zona de producción de Chenin (Pandolfi y Cuello, 2005).

Tabla 5: Resumen de las características climáticas y ecológicas de la provincia de Mendoza

Zona Alta del Río Mendoza (ZARM)	
	<p>Departamentos: Luján de Cuyo, Maipú, Guaymallén y Las Heras</p> <p>Ubicación: Se ubica en Mendoza, a 33° de latitud Sur</p> <p>Altitud: de los 1.060 a los 650 msnm</p> <p>Clima Vitícola: IH+2 IF+1 IS+1</p> <p>Clima caluroso, de noches frías y de sequía moderada. Riesgo de heladas tardías y granizo</p> <p>Precipitaciones: 200 mm por año</p> <p>Suelo: francos a franco arcillosos, con bastante material grueso (grava y canto rodado)</p> <p>Enfermedades presentes: El oidio, la peronóspora y la podredumbre de los racimos</p> <p>Variedades Cultivadas: Tintas: Cabernet Sauvignon y Malbec (emblemática) Blancas: Chardonnay y Sauvignon; Espumantes: Pinot Negro, Chardonnay, Chenin y Semillón</p>
Zona del Norte Mendocino	
	<p>Departamentos: Lavalle, Maipú, Guaymallén, Las Heras y San Martín</p> <p>Ubicación: Se ubica en Mendoza, a 32° 5' de latitud Sur</p> <p>Altitud: aprox. a los 500 msnm</p> <p>Clima Vitícola: IH+2 IF-1 IS+2</p> <p>Clima caluroso, de noches templadas y de sequía fuerte. Riesgo de heladas tardías y granizo</p> <p>Precipitaciones: menores 200 mm por año</p> <p>Suelo: francos a franco arcillosos, con bastante material grueso (grava y canto rodado)</p> <p>Enfermedades criptogámicas: rara incidencia</p> <p>Variedades Cultivadas: Tintas: Syrah y Bonarda Blancas: Chardonnay, Chenin, Pedro Gimenez, Ugni Blanc y Torrontés</p>

Continuación Tabla 6: Resumen de las características climáticas y ecológicas de Mendoza

Zona del Este Mendocino



Departamentos: Junín, Rivadavia, S. Martín y Sta Rosa

Ubicación: Se ubica en Mendoza, a 33° 2' de latitud Sur

Altitud: desde los 640 a los 750 msnm

Clima Vitícola en San Martín y Junín: IH+2 IF-1 IS+2
Clima caluroso, de noches templadas y de sequía fuerte.
Riesgo de heladas tardías y granizo

Precipitaciones: cerca de 200 mm por año

Suelo: de origen eólico, textura franco arenosa y areno limosa y ricos en potasio

Enfermedades criptogámicas:

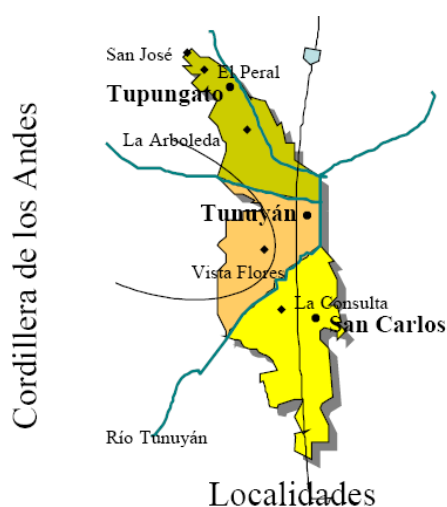
El oidio, la peronóspora y la podredumbre de los racimos

Varietades Cultivadas:

Tintas: Bonarda, C. Sauvignon, Sangiovese y Tempranillo

Blancas: Pedro Giménez y Ugni Blanc

Zona del Valle de Uco Mendocino



Departamentos: Tupungato, Tunuyán y San Carlos

Ubicación: Sudoeste de Mendoza, entre los 33° 5' y los 34° de latitud Sur

Altitud: desde los 900 a los 1.400 msnm

Clima Vitícola en Tupungato y Tunuyán: IH+1 IF+2 IS+1
Clima templado caluroso, de noches muy frías y de sequía moderada. Riesgo de heladas tardías y granizo

Clima Vitícola en San Carlos: IH+2 IF+2 IS+1

Clima caluroso, de noches muy frías y de sequía moderada. Riesgo de heladas tardías y granizo

Precipitaciones: de 200 a 400 mm por año

Temperatura media anual: 14,2°C.

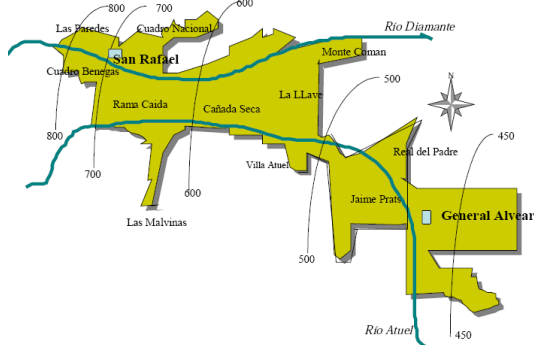
Enfermedades criptogámicas: El oidio, la peronóspora y la podredumbre de los racimos

Varietades Cultivadas:

Tintas: Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot y Tempranillo; Blancas: Chardonnay, Sauvignon y Semillón;

Espumantes: Pinot Negro, Chardonnay y Semillon.

Zona del Sur Mendocino



Departamentos:

San Rafael y General Alvear

Ubicación: A 34° 5' y 35° de latitud Sur

Altitud: desde los 450 a los 800 msnm

Clima Vitícola: IH+2 IF+1 IS+1.

Clima caluroso, de noches frías y de sequía moderada. Riesgo de heladas tardías y granizo

Precipitaciones: cerca de 250 mm por año

Enfermedades criptogámicas: incidencia moderada

Varietades Cultivadas:

Tintas: Bonarda, Cabernet Sauvignon, Syrah y Malbec

Blancas: Chenin y Chardonnay

Elaboración propia. Fuente: Catania *et al.*, 2007

1.2. Rol de las levaduras en la producción de vinos

La levadura es el más simple de los organismos eucariotas: su célula presenta envolturas celulares, un citoplasma que contiene organelas y un núcleo verdadero recubierto por una membrana. Como toda célula fúngica, la levadura posee dos envolturas celulares, la pared y la membrana plasmática. Entre la pared y la membrana se encuentra el espacio periplasmático. El conjunto citoplasma-membrana plasmática constituye el protoplasma (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

El rol de las levaduras en la fermentación alcohólica, en particular en la transformación de la uva en vino, fue establecido a mediados del siglo XX. La primera demostración de que la levadura era un organismo vivo, capaz de multiplicarse, perteneciente al reino vegetal, y cuya actividad vital se encontraba en el origen de la fermentación de los líquidos dulces, fue llevada a cabo por un químico francés, Charles Cagnard de la Tour, en 1837. Esta teoría fue confirmada por el naturalista alemán Schwann, quien también demostró que la fermentación alcohólica es un proceso que puede ser detenido por el calor o por ciertos productos químicos. Además, llamó a la levadura de cerveza “*zuckerpilz*”, es decir, “hongo del azúcar”, nombre que le dio origen al término *Saccharomyces* utilizado por primera vez en 1838, por Meyen. Sin embargo, fue Louis Pasteur en sus dos famosas obras, *Estudios sobre el vino* (1866) y *Estudios sobre la cerveza* (1876) (Figura 9), quien acreditó definitivamente la tesis vitalista de la fermentación alcohólica. Pasteur demostró que las levaduras responsables de la fermentación espontánea de la vendimia prensada o del mosto, provienen de la superficie de la uva, y que existen muchas variedades y especies que pueden ser aisladas (Fleet, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

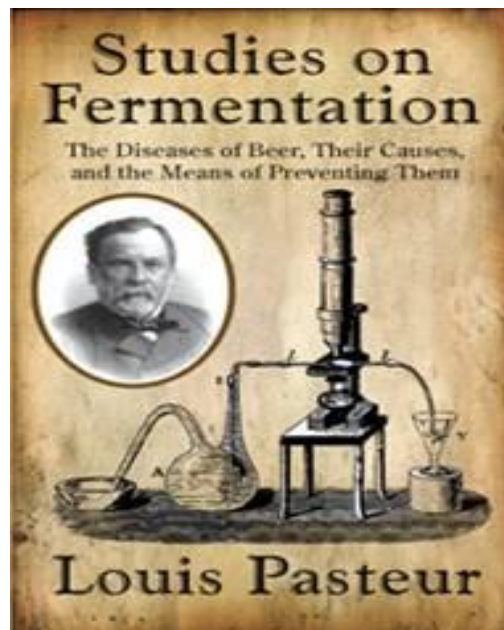


Figura 9: Tapa de “Estudios sobre la fermentación” de Louis Pasteur. Fuente: <http://louispasteurcmc.blogspot.com.ar/>

Esencialmente, todo el proceso de vinificación es una compleja interacción ecológica y bioquímica entre especies de levaduras, bacterias del ácido láctico y del ácido acético, hongos filamentosos, y los micovirus y bacteriófagos que afectan a estos microorganismos (Aranda *et al.*, 2005; Fleet, 1993). La fermentación alcohólica es la reacción más importante en este proceso y entre estos organismos, las levaduras, y en especial *Saccharomyces cerevisiae*, desempeñan el rol central en la conducción de la misma. Durante la fermentación, las levaduras utilizan los azúcares y otros constituyentes del jugo de uva como sustratos para su crecimiento, convirtiéndolos en etanol, dióxido de carbono y otros productos metabólicos finales, que contribuyen a la composición química y la calidad sensorial del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, la producción del vino se ha llevado a cabo permitiendo que las levaduras procedentes de la superficie de las uvas, fermenten espontáneamente los azúcares del mosto. Durante las primeras horas, la microflora del mosto es muy similar a la de la uva. Una serie de especies No-*Saccharomyces*, con predominancia de levaduras apiculadas y de *Metschnikowia pulcherrima*, conducen la fermentación espontánea y contribuyen al aroma del vino. Luego de unas horas, *S. cerevisiae* empieza a multiplicarse rápidamente y coexiste con las levaduras mencionadas. Después de tres o cuatro días de fermentación, las cepas de *S. cerevisiae* desplazan a otros microorganismos y son las responsables últimas de la fermentación alcohólica (Combina *et al.* 2005a). Los principales parámetros de esta presión selectiva son la anaerobiosis, el sulfitado de los mostos o de las vendimias, la riqueza en azúcar y la presencia de etanol (Aranda *et al.*, 2005; Ribéreau- Gayon *et al.*, 2003).

Para entender la participación de las levaduras en este proceso, es esencial conocer la identidad taxonómica de cada especie que está contribuyendo en la fermentación, la cinética de su crecimiento, las propiedades bioquímicas y los cambios químicos que producen, y las influencias de los factores de la vinificación sobre su cinética de crecimiento y los cambios químicos. Además, la habilidad para medir la presencia y cuantificar las poblaciones de levaduras en las uvas, el vino, las superficies de los equipos de la bodega, las preparaciones comerciales, los agentes clarificantes, las enzimas, los corchos, etc., es fundamental para entender mejor la ciencia de la vinificación e implementar programas de manejo y aseguramiento de la calidad total (Fleet, 1993).

1.2.1. Taxonomía de las levaduras

La taxonomía comprende la clasificación e identificación. La clasificación permite agrupar a los organismos en *taxa*, en función de sus similitudes y/o de sus lazos con un ancestro común. El *taxon* de base es la especie. Una especie se define como una colección de cepas que presentan en común un número de caracteres morfológicos, fisiológicos y genéticos (descripción estándar). La identificación consiste en comparar un organismo desconocido con individuos ya clasificados y nombrados, que presentan caracteres similares (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Las levaduras constituyen un gran grupo taxonómicamente heterogéneo y profundamente complejo. Pertenecen al reino *Fungi* y dentro de él, a la división *Eumycota* que agrupa a los hongos verdaderos (Mercado, 2001). Se trata de hongos unicelulares que se reproducen vegetativamente por brotación o escisiparidad, y que no forman sus formas sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero (Pretorius *et al.*, 2000). El primer nivel de la clasificación de levaduras se basa en aspectos de su sexualidad. Las levaduras esporógenas encontradas en la uva y el vino pertenecen principalmente a la subdivisión *Ascomycotina*; mientras que las que carecen de la fase sexual en el ciclo de vida se encuentran en las *Deuteromycotina* (Pretorius *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

En los Ascomicetes, el cigoto se desarrolla dentro de una estructura en forma de saco, el asco. El núcleo sufre dos divisiones meióticas (con frecuencia seguidas de una o más divisiones mitóticas) y en torno a cada núcleo hijo y el citoplasma circundante, se forma una pared, originando cuatro ascosporas dentro del asco. Después, el asco se rompe y se liberan las ascosporas, que pueden germinar y producir nuevas células vegetativas. Los Deuteromicetes u Hongos Imperfectos, son levaduras asporógenas. Pueden ser haploides heterotálicos para los cuales el par de conjugación todavía no ha sido encontrado, o también levaduras haploides o diploides con condición de esporulación todavía desconocida (Aranda *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Las subdivisiones taxonómicas inferiores (familia, subfamilia, género y especie) están basadas en varios criterios morfológicos y fisiológicos. La forma y la dimensión de las células, la formación de esporas, los caracteres culturales, la fermentación de diferentes azúcares, la asimilación de fuentes de nitrógeno, las necesidades en factores de crecimiento, la resistencia a la cicloheximida, etc. (Kurtzman *et al.*, 2011; Pretorius *et al.*, 2000). Según Barnett *et al.* (2000), las levaduras presentes en las divisiones *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* y *Deuteromycotina*, se distribuyen en 93 géneros relacionados con 678 especies y 4000 subespecies. Pese a esta gran diversidad, las especies de importancia enológica representan cerca de 15 géneros y la realización de una serie de pruebas fenotípicas permite identificar estas especies, con una metodología muy laboriosa pero sin dificultades (Fleet, 1993; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Tabla 7: Clasificación de levaduras frecuentes en mostos y vinos. Adaptada de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006.

Subdivisión	Clase	Orden	Familia	Subfamilia	Género
Ascomycetes o Levaduras Esporógenas	Hemiasco- mycetes	Endo- mycetales	Saccharo- mycetaceae	<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
					<i>Saccharomycodes</i>
				<i>Nadsonioideae</i>	<i>Hanseniaspora</i>
					<i>Saccharomyces</i>
					<i>Debaryomyces</i>
					<i>Dekkera</i>
					<i>Hansenula</i>
				<i>Saccharomycetoideae</i>	<i>Kluyveromyces</i>
					<i>Pichia</i>
					<i>Zygosaccharomyces</i>
		<i>Torulaspota</i>			
Deuteromy- cetes o Levaduras Asporógenas	Blasto- mycetes		<i>Spermophthora</i>	-	<i>Metschnikowia</i>
					<i>Brettanomyces</i>
					<i>Candida</i>
			<i>Cryptococcaceae</i>	-	<i>Kloeckera</i>
					<i>Rhodotorula</i>

Si bien los rasgos fenotípicos sentaron la base en la taxonomía de las levaduras, no necesariamente reflejan la relación genética entre las mismas. Esto, sumado a la variabilidad intraespecífica de algunos de esos caracteres e incluso a su inestabilidad en una cepa durante su multiplicación vegetativa, hizo que cada vez fuera más evidente que la diferenciación de especies no podía apoyarse solamente en los criterios de discontinuidad fenotípica. De esta manera, gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular que analizan el genoma independientemente del estado fisiológico de la levadura, se impuso una delimitación de especie basada en la significación biológica y genética, relacionando la filogenia con la taxonomía (Aranda *et al.*, 2005; Pretorius *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

1.2.2. La especie *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras del género *Saccharomyces*, principalmente *S. cerevisiae*, son las responsables de la fermentación alcohólica y por ello esta especie es reconocida como la “levadura vínica por excelencia” (Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2000). Dentro de los 57 géneros existentes de levaduras ascosporógenas, la última clasificación de levaduras reconoce diez especies incluidas en el género *Saccharomyces* (Barnett *et al.* 2000). Estas especies, a su vez, se encuentran distribuidas en tres grupos (Tabla 8).

Tabla 8: Especies del género *Saccharomyces*. Extraído de Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006

Levaduras	
Grupo I: <i>Saccharomyces sensu stricto</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Saccharomyces bayanus</i>
	<i>Saccharomyces paradoxus</i>
	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
Grupo II: <i>Saccharomyces sensu lato</i>	<i>Saccharomyces dairensis</i>
	<i>Saccharomyces exiguus</i>
	<i>Saccharomyces unisporus</i>
	<i>Saccharomyces servazzi</i>
	<i>Saccharomyces castelli</i>
Grupo III	<i>Saccharomyces kluyveri</i>

Las especies de interés enológico, *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, junto con las especies *S. paradoxus* y *S. pastorianus*, resultan imposibles de diferenciar entre sí por pruebas fisiológicas, y forman el grupo “*Saccharomyces sensu stricto*”. Como su nombre lo indica, están especializadas para crecer en ambientes con alto contenido de azúcar y presentan una elevada tolerancia al etanol. En comparación con otras levaduras, en presencia de altas concentraciones de azúcar, favorecen la fermentación sobre la respiración (Barnett *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Más recientemente, cuatro especies más fueron incorporadas en este grupo: *S. cariocanus*, *S. kudriazevii*, *S. mikatae* y *S. arboricolus* (Wang *et al.*, 2008).

Aunque la especie más frecuente en la fermentación alcohólica es *S. cerevisiae*, por su proximidad filogenética, otras especies pertenecientes al grupo *sensu stricto* pueden estar presentes e incluso llegar a ser dominantes en la misma. Tal es el caso de *S. bayanus* en vinos elaborados en regiones de clima continental o de *S. paradoxus* que ha sido descrita recientemente como predominante en vinos croatas (Fernández-Espinar *et al.*, 2005).

Más allá de la clasificación taxonómica, la denominación de *levaduras enológicas* ha sido y aún sigue siendo confusa. Para los taxonomistas, *S. bayanus* es una especie distinta de *S. cerevisiae*, mientras que para los enólogos es una raza fisiológica de esta especie que no fermenta galactosa y posee mayor resistencia al etanol que *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

La delimitación de especies basada en caracteres fenotípicos no es adecuada para este reducido grupo de especies altamente relacionadas de interés enológico, debiendo utilizar

herramientas de biología molecular para la correcta asignación y diferenciación entre las especies incluidas dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (Mercado, 2009; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

Por otro lado, la especie *S. cerevisiae* está constituida por numerosas cepas que ofrecen propiedades tecnológicas variables: producción de etanol, resistencia a diferente contenido de SO₂, velocidad de fermentación, capacidad fermentativa en condiciones no óptimas, naturaleza y cantidad de productos secundarios producidos y características aromáticas (Aranda *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). De esta manera, la cepa de *S. cerevisiae* que conduce la fermentación, influirá significativamente en la calidad del vino, al afectar en gran medida los parámetros de la fermentación como la acidez volátil, la producción de sulfuro, el carácter aromático y el azúcar residual (Fleet, 1993; Khan *et al.*, 2000).

1.2.3. Identificación y Clasificación de levaduras

1.2.3.1. Métodos Clásicos

La metodología de identificación está basada en los criterios propuestos por Barnett *et al.* (2000) y Kurtzman *et al.* (2011):

- a) Caracteres morfológicos y sexuales (forma y tamaño celular, reproducción vegetativa y sexual).
- b) Caracteres fisiológicos y bioquímicos (formación de película en medio líquido, fermentación de azúcares, asimilación de compuestos nitrogenados, entre otros)

La observación de la morfología celular es el primer criterio para caracterizar y clasificar levaduras como pertenecientes al género *Saccharomyces*. *S. cerevisiae* presenta células redondas u ovals sin filamentos (Figura 10) pero que pueden tener pseudohifas simples. Al igual que otras levaduras esporógenas, puede multiplicarse por vía vegetativa (gemación multilateral) o de manera sexual formando de una a cuatro esporas en ascos persistentes. Las ascosporas son redondas o levemente ovals y con paredes lisas

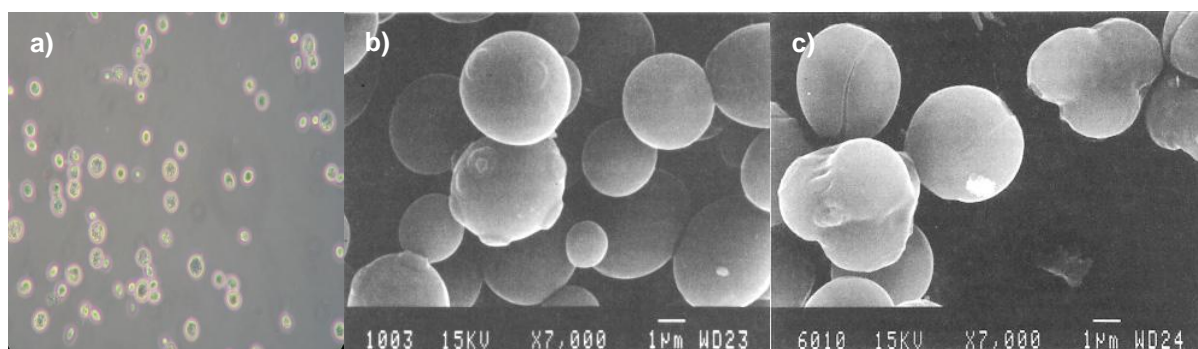


Figura 10: Fotografías al microscopio óptico (a) y al microscopio electrónico de barrido (b y c).

a) Células características de *S. cerevisiae*. Fuente: Mercado, 2009

b) Células proliferantes de *S. cerevisiae*. Detalle de cicatrices de brotación. Fuente: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006

c) Células de *S. cerevisiae* donde se observan los ascos conteniendo esporas. Fuente: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006

Otros dos criterios tradicionales de clasificación para levaduras del género *Saccharomyces*, se basan en el procedimiento estándar de siembra de muestras de uvas, mosto, vino y ambientes de la bodega en medios selectivos con agar, para aislar y enumerar las levaduras (Fleet, 1993).

Heard y Fleet (1986) demostraron que el Medio Agar Lisina puede usarse para aislar y enumerar selectivamente las poblaciones de levaduras No-*Saccharomyces* presentes en las uvas y/o las fermentaciones, ya que *S. cerevisiae* es incapaz de usar la lisina como fuente de nitrógeno y por lo tanto no interfiere en el crecimiento de otras levaduras en este medio. Igualmente, Pallmann *et al.* (2001) demostraron que el color y/o la morfología de las colonias crecidas en el

medio WL, pueden utilizarse para distinguir las poblaciones de levaduras nativas típicamente encontradas en las fermentaciones de vino. Las especies *Saccharomyces* se caracterizan por presentar colonias de color crema a verde, de superficie lisa y opaca, forma umbricada y consistencia cremosa.

Si bien estos caracteres fenotípicos resultan criterios prácticos para una identificación presuntiva de levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, son insuficientes para una identificación certera, pues algunas características pueden variar según el estado fisiológico de la levadura y las condiciones de crecimiento. Frente a esto, las técnicas de biología molecular se presentan como una alternativa a los métodos tradicionales ya que en ellas se analiza el genoma independientemente del estado fisiológico de la célula, permitiendo una identificación más precisa de los microorganismos (Fernández-Espinar *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

A continuación se comentan aquellas técnicas que han sido utilizadas preferentemente en el campo de las levaduras enológicas.

1.2.3.2. Métodos basados en Técnicas de Biología Molecular

En la actualidad, es un hecho ya aceptado que deben utilizarse métodos de genética molecular para la identificación de levaduras. La aplicación de técnicas moleculares brinda una correcta asignación de la especie y una evaluación exacta de la biodiversidad en las investigaciones ecológicas de levaduras, lo cual era imposible cuando las levaduras eran identificadas a partir de fenotipos (Kurtzman *et al.*, 2011).

Los estudios de biología molecular aplican el siguiente criterio; mientras más cercana es la relación ancestral entre dos organismos, mayor es el número de secuencias de bases de ADN en común. En ese sentido, Kurtzman *et al.* (2011) definieron el criterio de especie de levadura a partir del uso de secuencias del dominio D2 cercano al extremo 5' de la subunidad larga 26S ARNr, y establecieron que un grupo de cepas que presentan menos de 1% de diferencias nucleotídicas es considerada como la misma especie.

Métodos basados en el análisis del Regiones Ribosomales o ARNr

Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S se agrupan en tándem formando unidades de transcripción que se repiten entre 100 y 200 veces en el genoma. Cada unidad (Figura 11) presenta dos regiones, los ITS y los ETS, que se transcriben pero no son procesadas. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los IGS. El gen 5S no se incluye en la unidad de transcripción descrita, pero, en el caso de las levaduras, aparece adyacente en la misma unidad de repetición en tándem. Los genes ribosómicos 5.8S, 18S y 26S y los espaciadores ITS y NTS, son poderosas herramientas para la identificación de especies y el establecimiento de las relaciones filogenéticas. Esto se debe a la existencia de secuencias altamente conservadas entre las regiones variables de sus unidades de transcripción, y a la mayor similitud que presentan estas secuencias conservadas dentro de una misma especie (Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Kurtzman *et al.*, 2011).

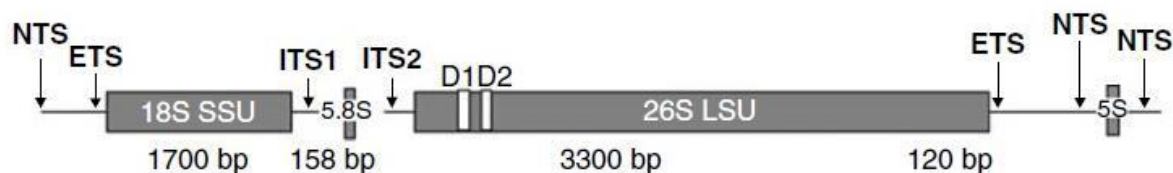


Figura 11: Esquema de la organización de los genes ribosomales. Extraído de Fernández-Espinar *et al.*, 2006

Se han desarrollado diferentes métodos para identificar especies de levadura utilizando la información contenidas en estas regiones:

Secuenciación de Regiones Ribosomales:

Es un método basado en la determinación y comparación de secuencias nucleotídicas del ARNr. Las regiones más utilizadas son los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S y el gen 18S. La disponibilidad de estas secuencias en bases de datos posibilita que una levadura desconocida se asigne a una especie concreta, cuando el porcentaje de homología sea mayor o igual al 99% (Fernández-Espinar *et al.*, 2005).

Análisis de Restricción de Regiones Ribosomales (PCR-RFLP)

La técnica se basa en la amplificación por PCR del ARNr y posterior restricción de los productos amplificados. Los fragmentos de distinto tamaño corresponden a especies diferentes, mientras que los de igual tamaño deben ser digeridos para hacer la identificación definitiva (Fernández-Espinar *et al.*, 2005). Si bien este método no es tan discriminatorio como la secuenciación de gen 26S del ARNr, se ha utilizado ampliamente para identificar levaduras enológicas (Lopes *et al.*, 2002; Pramateftaki *et al.*, 2000).

Otras metodologías utilizadas:

Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (PCR-DGGE) (Kurtzman *et al.*, 2011).

PCR en tiempo real (Real Time PCR) (Fernández-Espinar *et al.*, 2005; Kurtzman *et al.*, 2011).

Microchips (Fernández-Espinar *et al.*, 2005).

Métodos para diferenciar cepas de la especie *S. cerevisiae*

Dada la implicancia de *S. cerevisiae* en la vinificación, son numerosos los trabajos que abordan la identificación molecular de esta levadura tanto a nivel de especie como a nivel de cepa. Algunos de ellos, concluyen que es necesaria la combinación de varias técnicas para llegar a la definitiva caracterización a nivel de cepa (Fernández-Espinar *et al.*, 2001, 2005; Pramateftaki *et al.*, 2000). Las metodologías más utilizadas se mencionan a continuación con una breve descripción de las que se utilizarán en el presente estudio.

Electroforesis de cromosomas en campo pulsado o Análisis de Cariotipos (PFGE) (Fernández-Espinar *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Vezinhet *et al.*, 1992)

Análisis de Restricción del ADNmt (Fernández-Espinar *et al.*, 2005; Querol *et al.*, 1992; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

AFLP (Fernández-Espinar *et al.*, 2005).

Métodos basados en la técnica de PCR

Los métodos moleculares más rápidos son los que desarrollan alguna variante de la técnica de PCR básica (Figuras 12 y 13), para detectar polimorfismos en los fragmentos de ADN sin necesidad de utilizar enzimas de restricción. Las técnicas RAPD y microsátélites son las más usadas para la diferenciación intraespecífica de levaduras a nivel de cepa, mientras que la amplificación de secuencias δ y la amplificación de "intron splice sites" han sido desarrollados específicamente para la diferenciación de cepas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

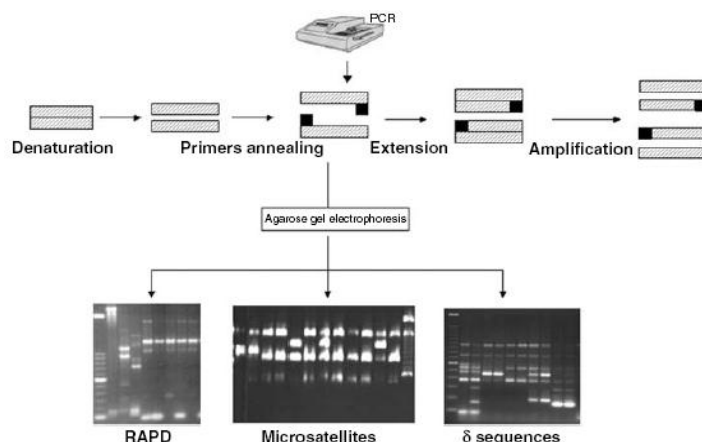
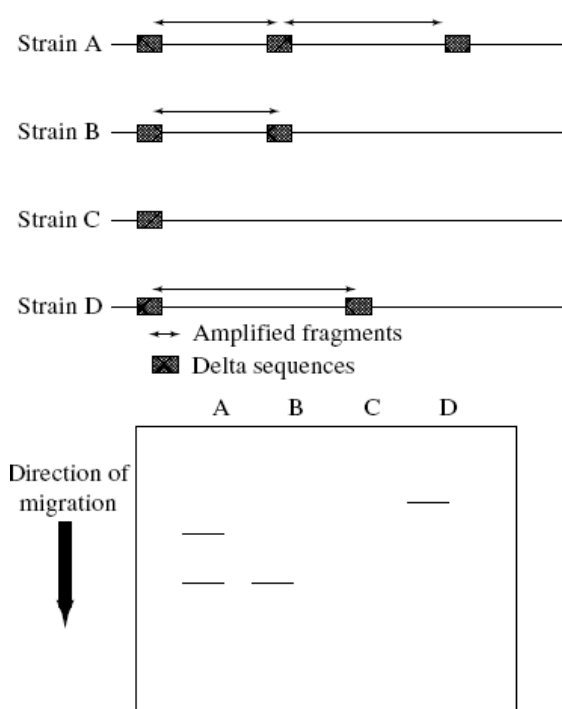


Figura 12: Métodos basados en la técnica de PCR para la diferenciación de cepas. Extraído de Fernández-Espinar, 2006

Amplificación de Secuencias δ

Los elementos δ son LTRs de 0,3 kb que están repetidos, de forma aislada o como parte de los retrotransposones Ty1, al menos 100 veces en el genoma de *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). En función de esto, Ness *et al.* (1993) diseñaron una técnica PCR para realizar la diferenciación intraespecífica de *S. cerevisiae*, usando como *primers* dos secuencias deltas (δ_1 y δ_2). En el año 2003, Legras y Karst optimizaron la técnica diseñando un nuevo par de *primers*, δ_{12} (5' TCA ACA ATG GAA TCC CAA C 3') y δ_{21} (5' CAT CTT AAC GTA TAT GA 3'). El uso de δ_{12} y δ_{21} o de δ_{12} con δ_2 , revela un mayor polimorfismo que se refleja en patrones con un mayor número de bandas en los geles.

La PCR *Inter- δ* puede realizarse sobre ADN previamente extraído o directamente a partir de un lisado de células obtenido mediante calentamiento. Los amplificados se separan por electroforesis en gel y se visualizan bajo luz UV. Como cada cepa posee distinto número y distribución de secuencias δ , la amplificación del ADN entre dos elementos δ , variará de una cepa a otra en número y longitud (Fernández-Espinar *et al.*, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Actualmente, la PCR asociada a las secuencias δ es la técnica más rápida para identificar cepas de *S. cerevisiae*. Es una técnica robusta, de sencilla implementación en un laboratorio de Biología Molecular básico y ampliamente discriminativa para diferenciar cepas de *S. cerevisiae* estrechamente relacionadas; por lo cual se ha privilegiado su uso en muchos estudios de ecología de poblaciones y para el control de implantación durante la vinificación (Capello *et al.*, 2004; Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Legras y Karst, 2003; Le Jeune *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2002; Mercado *et al.*, 2007, 2011; Pramateftaki *et al.* 2000; Schuller *et al.*, 2007; Versavaud *et al.*, 1995).



Analysis of amplified fragments by electrophoresis in agar gel

Figura 13: Principio de identificación de las cepas de *S. cerevisiae* por la técnica PCR asociada a los elementos δ . Fuente: Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006

1.2.4. Biodiversidad y origen de las levaduras

Las levaduras están sumamente diseminadas en la naturaleza. Al ser inmóviles, su dispersión natural se debe al viento, los insectos, otros animales y la actividad humana. Pueden ser aisladas de ambientes terrestres, acuáticos y aéreos, pero sus hábitats preferidos son los tejidos de las plantas (Aranda *et al.*, 2005; Pretorius *et al.*, 2000). En la superficie de la vid, las levaduras están distribuidas en forma desparrada. Son poco numerosas en las hojas, en los escobajos y en las uvas verdes. Los azúcares lixivian o difunden de los tejidos internos hacia la superficie de la uva y de este modo, al estimular el crecimiento de las mismas, colonizan la piel de las bayas en maduración. Se multiplican preferentemente en los exudados liberados de las microlesiones en las zonas situadas alrededor de los estomas (Fleet, 2003; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

La microflora de las uvas es altamente variada. Las uvas inmaduras albergan muy pocas levaduras (10^2 - 10^3 UFC/g), con un predominio de los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus* y *Candida*, junto con el hongo semejante a levaduras *Aureobasidium pullulans*. En las uvas maduras, las levaduras apiculadas poco tolerantes al alcohol, correspondientes al género *Kloeckera*, representan cerca del 50-75% de la población total en la superficie de la uva (Fleet, 1993, 2003; Pretorius *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Significantes por su presencia, pero en menor proporción a las nombradas anteriormente, es posible encontrar especies estrictamente oxidativas o débilmente fermentativas y poco tolerantes a etanol, pertenecientes a los géneros *Metschnikowia*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Picchia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*. Las uvas dañadas tienen mayor incidencia de estas especies, junto con *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*, así como también de bacterias lácticas y acéticas (Aranda *et al.*, 2005; Fleet, 1993, 2003; Pretorius *et al.*, 2000).

Si bien es un hecho aceptado que *S. cerevisiae*, conocida como la levadura del vino, tiene el rol más importante en la fermentación alcohólica; todos los autores coinciden en lo difícil de encontrar la presencia de cepas de esta especie en la uva. Aparece en poblaciones extremadamente bajas (entre 10-100 UFC/g) en bayas intactas, y se aísla mejor por cultivos con enriquecimiento que por siembra directa en placa (Aranda *et al.*, 2005; Combina *et al.*, 2005b; Fleet, 1993, 2003; Khan *et al.*, 2000). El número de levaduras en una baya justo antes de la cosecha, está comprendido entre 10^4 y 10^6 , según la situación geográfica del viñedo, las condiciones climáticas de la maduración, el estado sanitario de la vendimia y los tratamientos de pesticidas aplicados en las vides. Las poblaciones más abundantes se obtienen en situaciones cálidas (bajas latitudes, temperaturas elevadas) (Fernández-Espinar *et al.*, 2001; Fleet, 1993, 2003; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). La población total y la proporción relativa de cada especie de levadura en las uvas, puede verse afectada por un gran número de factores. La Tabla 9 resume los principales factores que afectan la microflora del viñedo y las uvas y las variables relacionadas a los mismos.

Tabla 9: Factores que afectan la microflora levuriana del viñedo y las uvas.

Factores Modificantes	Variables Involucradas
Influencias Climáticas	Temperatura
	Precipitaciones
	Viento
	Microclima afectado por prácticas culturales, como el manejo de la canopia
Suelo y Prácticas Culturales	Tipo de suelo
	Fertilización
	Irrigación
Uva	Aplicación de fungicidas
	Variedad
	Grado de madurez en la cosecha
Especie de Levadura	Daño físico por ataque de pájaros, insectos y mohos
	Compatibilidad fisiológica y bioquímica con las características de la superficie de la uva
	Tolerancia al estrés natural causado por temperatura, luz solar y desecación
	Tolerancia a compuestos químicos inhibitorios de la uva y de agroquímicos
	Interacciones con otras levaduras, bacterias y/o hongos filamentosos

Elaboración propia. Fuentes: Aranda *et al.*, 2005; Fleet, 1993, 2003; Pretorius *et al.*, 2000

Las variaciones en las poblaciones microbianas de la uva antes mencionadas, se deben a que en las regiones templadas, la vid es sometida a un ritmo o ciclo anual. En este ciclo podemos distinguir dos fases: una fase de reposo (coincidente con el invierno en nuestras latitudes), y un periodo de vida activa donde se realizan el ciclo reproductivo y el vegetativo en forma conjunta. El ciclo reproductivo de la vid consta de tres procesos: la iniciación floral, la floración, polinización y fecundación y el desarrollo de la baya. Por su parte, el ciclo vegetativo comprende dos procesos: el desarrollo de los órganos vegetativos (pámpanos, hojas, zarcillos y raíces) y el agostamiento. De esta forma, la vid asegura su desarrollo y producción en un año y adquiere condiciones para superar el periodo invernal e iniciar su actividad en el ciclo siguiente. Cada estado característico de crecimiento de los órganos vegetativos y reproductores de la planta es un estado fenológico. La sucesión de estos, se denomina ciclo fenológico de la vid y consta de varias etapas (Figura 14, Tabla 10 y Anexo I). En Mendoza se inicia a principios de la primavera y concluye en el otoño (Fondo Vitivinícola, 2014; Lissarrague y Baeza Trujillo, 2008).

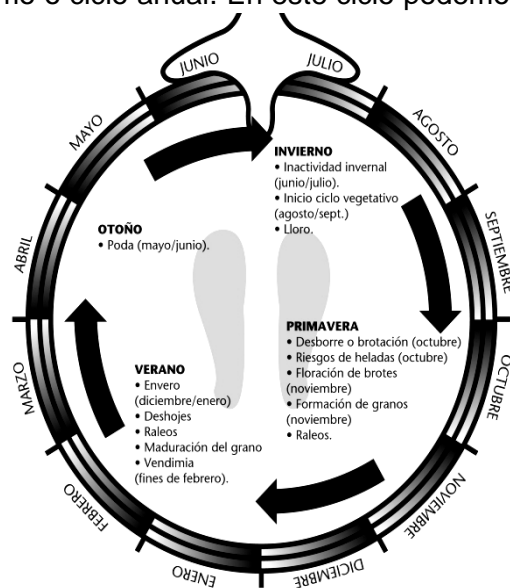


Figura 14: Ciclo Fenológico de la Vid.
Fuente: <http://s3images.coroflot.com/>

Para muchos autores, la fuente primaria de levaduras vínicas es el viñedo. Incluso se han identificado una serie de parámetros que contribuyen a la diversidad genética de las cepas de *S. cerevisiae* en el viñedo. Entre ellos podemos destacar la variedad de uva cultivada, las prácticas culturales y enológicas realizadas en el viñedo, las condiciones climáticas y geográficas y la edad del mismo (Khan *et al.*, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Diversos estudios biogeográficos sobre la diversidad genética de las cepas de *S. cerevisiae*, han enfatizado la naturaleza dinámica y policlonal de sus poblaciones (Vezinhet *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1995; Comi *et al.*, 2000; Mercado *et al.*, 2007). A través de los años, estas cepas han sido aisladas de los viñedos y seleccionadas para ser usadas como cultivos *starters* comerciales. La gran biodiversidad hallada dentro de varias regiones enológicas es una reserva genética importante para el desarrollo de levaduras mejoradas (Khan *et al.*, 2000; Pretorius *et al.*, 2000).

Mendoza es la principal provincia productora de vid y vino de Argentina, conocer la diversidad de levaduras nativas de sus regiones se plantea como fundamental en el desarrollo de una vitivinicultura de calidad. Los estudios de la biodiversidad de levaduras nativas de sus viñedos han abordado la descripción de las poblaciones de levaduras en uvas maduras y fermentaciones espontáneas (Combina *et al.* 2005a-b; Mercado *et al.* 2007) y por otro lado se ha estudiado en forma exhaustiva las poblaciones de cepas de *S. cerevisiae* en viñedos ubicados en diferentes sectores de la ZARM (Mercado *et al.* 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos en este último estudio mencionado, los viñedos de uvas Malbec de la ZARM presentan una elevada diversidad de cepas de *S. cerevisiae*, mostrando cada viñedo su propia población de cepas y más aun mostrando diferentes poblaciones en diferentes partes de un mismo viñedo. Estos resultados dejaron entrever la posibilidad que el viñedo mismo actúe como reservorio de sus propias levaduras las cuales así podrían permanecer en diferentes sustratos y aparecer en uvas maduras en el momento de la cosecha. A su vez, Lúquez Biliboni *et al.* (2007) estudiaron la permanencia de levaduras en diferentes órganos de la vid durante el ciclo natural de la vid y encontraron que las yemas serían el principal reservorio durante el invierno. Estos autores sólo estudiaron poblaciones totales de levaduras sin identificar las especies o géneros encontradas.

Actualmente, se estima que el 80% de los vinos de todo el mundo se producen usando alguna variante de la fermentación espontánea. Esto se debe a que, sensorialmente, las levaduras nativas introducen una mayor variedad de sabores y olores característicos en los vinos, reflejando así las características de una región vitivinícola dada (Khan *et al.*, 2000). En los últimos años se ha extendido la utilización de cepas de *S. cerevisiae* autóctonas de cada región para conseguir así

que el vino mantenga las características sensoriales de cada zona productora. A pesar de estos avances, las levaduras secas activas de uso enológico disponibles en el mercado, todavía no son representativas de las levaduras indígenas de la mayoría de las regiones vitícolas de la Argentina. Por ello, existe entonces una creciente necesidad de encontrar, aislar y seleccionar las cepas *S. cerevisiae* mejor adaptadas a las variedades de uva, prácticas culturales y técnicas de vinificación utilizadas en las diferentes regiones productoras de vinos argentinos (Lopes et al., 2002).

Tabla 10: Fases del ciclo fenológico de la Vid.

Etapa	Características
Reposo vegetativo	<p>Sinónimos: Estado Inactivo o latente o Sueño Invernal</p> <p>Época del año: Parte del otoño y todo el invierno</p> <p>Aspecto de la planta: Tronco con brazos y sarmientos, solo la parte leñosa. Ausencia de actividad vegetal. No hay hojas ni ninguna estructura verde. Se poda la planta, suprimiendo los sarmientos del año anterior y conservando, tan sólo, unos trozos, con más o menos yemas según el tipo de poda elegido.</p> <p>Causas: Temperatura atmosférica y del suelo menor a 10°C. No hay absorción de los nutrientes del suelo por parte de las raíces</p>
Llanto	<p>Sinónimos: Lloro o Sangrado de la Vid.</p> <p>Época del año: Finales de invierno y principios de primavera</p> <p>Aspecto de la planta: El llanto es el exudado de un líquido incoloro por heridas de poda fresca que marca la reanudación de la actividad de las raíces.</p> <p>Causas: Cuando la temperatura del suelo es suficientemente alta para que el sistema radical inicie su actividad.</p>
Desborre	<p>Época del año: Finales de invierno y principios de primavera.</p> <p>Aspecto de la planta: Las yemas francas aparecidas y diferenciadas el año anterior se hinchan debido al aumento del volumen de sus células y a la proliferación merismática, se separan las escamas y la borra se hace visible. El cono de la yema da lugar al pámpano, las hojas, las inflorescencias y los zarcillos primordiales a sus órganos correspondientes.</p> <p>Causas: Aumento de la temperatura media diaria y de la absorción radical. Se produce cuando la temperatura se encuentra durante 50 días por encima de 10°C.</p>
Brotación	<p>Época del año: Inicios de primavera.</p> <p>Aspecto de la planta: Primero salen las hojas que después se extienden y luego, racimillos muy pequeños. Posteriormente, las yemas se hinchan y hacen estallar la borra que las protege, dando lugar a un brote joven del que nacerán las hojas nuevas.</p> <p>Causas: Las temperaturas primaverales. El desarrollo será más rápido cuanto mayor sea el número de horas de insolación y la disponibilidad de agua.</p>
Floración y Cuajado	<p>Época del año: Avanzada la primavera.</p> <p>Aspecto de la planta: Se desprenden unos capuchones y queda libre la flor con su pistilo y sus cinco estambres. El aire y los insectos transportan el polen desde los estambres hasta el pistilo y se produce la polinización. Se empiezan a formar los granos de uva por crecimiento del pistilo. Primero son bayas con forma y tamaño de guisante.</p> <p>Causas: Temperaturas de 20-25 °C y tiempo seco.</p>
Envero	<p>Época del año: A mediados del verano.</p> <p>Duración: Unos 15 días. Coincide con el inicio de la lignificación de los tallos herbáceos (agostamiento)</p> <p>Aspecto de la planta: El grano empieza a aumentar de tamaño y después cambia de color verde a amarillento en uvas blancas y a rojo claro en las tintas.</p> <p>Causas: Intensa actividad respiratoria y crecimiento de la baya debido a multiplicación y a distensión o agrandamiento celular</p>
Maduración	<p>Época del año: Desde mediados de verano a inicios de otoño. Al final de este periodo se produce la Vendimia.</p> <p>Aspecto de la planta: La uva aumenta continuamente de tamaño, pierde la acidez que tenía hasta el momento, acumula más azúcares y se ablanda.</p> <p>Causas: Cambios hormonales</p>
Caída de las Hojas	<p>Época del año: Entre uno y dos meses después de la Vendimia.</p> <p>Aspecto de la planta: Las hojas se tornan de un color rojizo y llega un momento en que caen. A partir de aquí, inicia el reposo invernal, completándose el ciclo de un año.</p> <p>Causas: Las condiciones atmosféricas conducen a una menor actividad en la planta.</p>

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar y conservar la biodiversidad de las poblaciones de levaduras nativas de viñedos como base genética de nuevos recursos contribuyentes a la mejora de la calidad y diversificación de vinos argentinos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Evaluar la persistencia de *Saccharomyces cerevisiae* a lo largo del ciclo fenológico de *Vitis vinífera* var Malbec cultivadas en un viñedo de la Zona Alta del Río Mendoza,
- ✓ Estudiar reservorios de levaduras en el ecosistema del viñedo mediante la evaluación de la biodiversidad de *S. cerevisiae* en órganos aéreos reproductivos y vegetativos de la vid y suelo del viñedo.
- ✓ Conservar la biodiversidad de levaduras *Saccharomyces* mediante almacenamiento adecuado de los aislados obtenidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo, se detallan los materiales y la metodología utilizados para realizar el estudio de reservorios de levaduras nativas en el ecosistema del viñedo y la evaluación de su persistencia en el mismo. La formulación de medios de cultivo, soluciones y reactivos utilizados se detallan en el Anexo II.

En líneas generales, se llevó a cabo un relevamiento que incluyó muestreo, aislamiento, conservación y caracterización intraespecífica de levaduras *Saccharomyces* residentes en distintas partes de la planta de vid (frutos, hojas, corteza, yemas, flores) y suelo de un viñedo, en diferentes etapas de un ciclo fenológico. Se incluyó una identificación tradicional y molecular de las *Saccharomyces* aisladas.

De acuerdo con esto, los patrones moleculares obtenidos de las cepas *Saccharomyces* aisladas del viñedo, fueron comparados entre sí, y también, se compararon con los patrones moleculares de algunas de las cepas comerciales más usadas en la región, a fin de establecer su verdadera autenticidad.

3.1. Delimitación del ámbito y características generales del estudio

Se seleccionó un viñedo de uvas Malbec ubicado a 900 msnm en el predio de la EEA INTA localizado en Luján de Cuyo (Región Cuyo, Mendoza, Argentina). El mismo fue implantado en el año 2001, presenta un diseño de 2,5 m entre hileras y 1,5 m entre plantas y se encontraba en perfecto estado sanitario. En el viñedo se efectúan tratamientos fitosanitarios básicos (azufre y cobre como fungicidas), no se utilizan coberturas ni abonos y recibe riego por manto o inundación.

3.2. Muestreo

3.2.1. Diseño estadístico del muestreo

Para realizar la toma de muestras en el viñedo, se diseñó un plan de muestreo sistemático con arranque aleatorio cuyos parámetros se describen a continuación.

El lote está constituido por la superficie considerada del viñedo para muestrear. En este caso, el tamaño del lote (N) quedó conformado por un total de 120 claros, ya que se tomaron los cuatro primeros claros, correspondientes a media hilera, de una parcela con 30 hileras.

El intervalo de muestreo (k) representa cada cuántas unidades del lote se debe tomar una muestra representativa. Se calcula haciendo el cociente entre el tamaño del lote (N) y el tamaño de muestra (n). Dado que se definió previamente un tamaño de muestra igual a 10, el valor del intervalo de muestreo fue igual a 12 ($k=N/n=120/10=12$).

Finalmente, el arranque aleatorio (r) es un número comprendido en la serie de 1 hasta k y se obtuvo por sorteo. En nuestro caso, r fue igual a 2, por lo que el primer punto de muestreo estuvo en el segundo claro de la primera hilera. A partir de este, se contaron siempre 12 claros a la derecha y hacia abajo para volver a tomar una muestra. La división de la parcela, los puntos de muestreo y su ubicación se muestran en la Tabla 11.

3.2.2. Toma de muestra

El muestreo del viñedo se realizó en cinco etapas correspondiente a distintos momentos de un ciclo fenológico completo de la vid (maduración o cosecha, caída de las hojas o post-cosecha, reposo vegetativo o poda de invierno, brotación y floración). Siguiendo el esquema obtenido con el plan de muestreo sistemático con arranque aleatorio, en cada una de las etapas se tomaron 10 muestras representativas de suelo en cada sitio seleccionado del viñedo y 10 muestras de distintas partes disponibles de la planta de vid (frutos, corteza, yemas y/o flores) en esos mismos sitios.

Tabla 11: Esquema de la parcela de viñedo implantado con uvas Malbec en estudio

Hileras	Claros			
	01	02	03	04
1		1		
2				
3				
4		2		
5				
6				
7		3		
8				
9				
10		4		
11				
12				
13		5		
14				
15				
16		6		
17				
18				
19		7		
20				
21				
22		8		
23				
24				
25		9		
26				
27				
28		10		
29				
30				

Los cuadros sombreados representan los sitios en los cuales se tomaron las muestras

La primera etapa del muestreo (cosecha) se cumplió en marzo. En esta instancia se tomaron muestras de racimos de uvas, corteza y suelo. En los meses de abril y mayo (poscosecha), las muestras fueron de hojas, corteza y suelo del viñedo. En las épocas de poda y brotación se muestrearon yemas, corteza y suelo; mientras que en la floración, las muestras estaban formadas por flores, corteza y suelo.

La cantidad de muestras recolectada fue diferente para cada tipo de muestra. Las muestras de uvas pesaron aproximadamente 2 kg, mientras que las de suelo, corteza y yemas pesaron entre 15 y 22 g. En todos los casos se usó el total de la muestra para los análisis microbiológicos, a excepción del suelo, donde se utilizaron porciones de 5 g de las muestras originalmente colectadas.

Todas las muestras se obtuvieron en condiciones de asepsia y se colocaron dentro de bolsas de muestreo plásticas estériles. Estas se sellaron herméticamente y fueron transportadas en frío al laboratorio para su procesamiento, el cual se realizó de manera independiente.

Por último, en la etapa de floración, excepcionalmente también se tomaron muestras de agua de riego. Usando frascos estériles, se midieron 500 mL de agua de los canales - mayor y menor -

que riegan el viñedo. Esta es la única etapa que cuenta con muestras de agua debido a que las fechas de muestreo de las etapas anteriores no coincidieron con las fechas programadas del turno de riego.

3.3. Aislamiento

Se realizó una etapa de enriquecimiento para favorecer el desarrollo de las levaduras *Saccharomyces*, teniendo en cuenta información previa acerca de la baja proporción que presenta esta levadura en muestras de uva sana y madura (Combina *et al.*, 2005b).

En el laboratorio, las uvas se descobajaron y molieron en condiciones de asepsia para obtener sus propios mostos; mientras que las muestras de suelo, corteza, hojas, yemas, flores y agua, se colocaron en mostos previamente esterilizados y corregidos a 24°Brix y pH 3,5. Los mostos se incubaron a 25°C para permitir su fermentación espontánea debido a la presencia de levaduras *Saccharomyces* nativas, y el seguimiento del proceso se realizó midiendo la pérdida de peso.

Una vez que el 75% de los azúcares presentes inicialmente estuvieron fermentados, se tomaron muestras de los mostos y se realizaron diluciones decimales en agua peptonada al 0,1 % (p/v). A continuación, dichas diluciones fueron sembradas en placas de Petri con el medio de cultivo WL (Oxoid) suplementado con cloranfenicol (50 µg/mL), obteniéndose así un medio de cultivo selectivo adecuado para el crecimiento de levaduras e inhibitorio para el de bacterias.

Las placas sembradas en superficie se colocaron en estufa a 28°C por 48 h. Luego de su incubación, se realizó el recuento de las mismas, y teniendo en cuenta sus características macroscópicas (textura, superficie, margen, elevación y color), se tomaron colonias representativas para obtener subcultivos en tubos con agar inclinado conteniendo el medio de cultivo YPD.

3.4. Conservación

Los cultivos aislados se conservaron a 4 °C en tubos con agar YPD en pico de flauta y, a -20°C en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL con glicerol al 30 % (v/v) como agente crioprotector.

3.5. Identificación tradicional

Se realizó una identificación presuntiva de las levaduras a nivel de género, clasificándolas como *Saccharomyces* cuando reunieron las siguientes características (Figura 15):

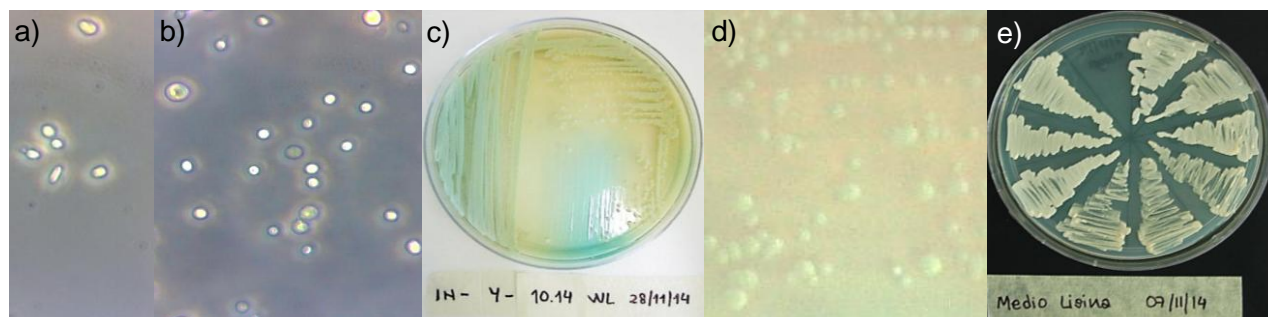


Figura 15: Fotografías propias tomadas de muestras analizadas con características típicas de *S. cerevisiae*:

- Observación de fresco al microscopio óptico. Objetivo 40X. Detalle de levaduras gemando.
- Observación de fresco al microscopio óptico.
- Crecimiento de colonias en medio WL (Oxoid)
- Detalle de colonias típicas de *S. cerevisiae* crecidas en medio WL (Oxoid)
- Crecimiento en medio Lisina. Negativo para levaduras *Saccharomyces* y positivo para No-*Saccharomyces*.

- ✓ Observación al microscopio: Forma globosa, ovalada o redondeada. Gemación multipolar.
- ✓ Crecimiento en medio WL: Colonias con forma redonda, de borde definido, color verde claro a blanco amarillento, consistencia cremosa (no opaca ni seca), forma umbricada y productoras de ácido.
- ✓ Crecimiento en medio Lisina: Negativo

Aquellas cepas que reunieron las características mencionadas como propias de *Saccharomyces* por estos métodos, fueron analizadas por métodos moleculares.

3.6. Caracterización molecular

Cada aislado fue caracterizado con un patrón molecular y estos fueron comparados entre sí y con los obtenidos de 40 cepas comerciales, a fin de analizar semejanzas y establecer presencia de patrones comunes.

A continuación se detallan cada una de estas etapas.

3.6.1. Extracción del ADN

La extracción total del ADN se realizó usando una adaptación del protocolo rápido de Hoffman y Winston (1987). Este método está basado en la ruptura de las células combinando un detergente con la agitación mecánica con perlas de vidrio, la precipitación de las proteínas celulares usando como solvente una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y la extracción y precipitación del ADN total con alcohol absoluto.



Figura 16: Fotografía propia de cultivo de *S. cerevisiae* en placa de Petri con medio YPD

➤ *Producción de Biomasa*: Una porción de cada cultivo puro aislado (Figura 16) se colocó en 1,5 mL de caldo YPD y se incubaron en estufa a 28°C durante 20-24 horas, tiempo en el cual las cepas de *Saccharomyces* alcanzan su fase exponencial de crecimiento, o bien, 48 horas, en el caso de trabajar con especies no *Saccharomyces*.

Después de esto, los tubos se centrifugaron a 2.500-3.000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante (fase acuosa superior). El pellet residual se re-suspendió en 1 mL de agua miliQ estéril, se homogeneizaron los tubos, se centrifugaron a 13.000 rpm (velocidad máxima) por 5 minutos y nuevamente se eliminó el sobrenadante. De esta manera, el material se encuentra listo para realizar la extracción de su ADN.

➤ *Solubilización de ácidos nucleicos*: A todos los tubos se les adicionaron 200 µL de Solución 1F; 0,3 g de perlas de vidrio lavadas (diámetro: 0,45-0,52 nm) y 200 µL de la solución fenol/cloroformo/ isoamílico (25:24:1). Se verificó que su cierre sea hermético y se agitaron en vórtex por 3 ó 4 minutos. A continuación, se agregó 200 µL de Buffer TE (1X) y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Con precaución de no remover la fase inferior, se recuperó la fase acuosa superior (aproximadamente 370 µL) y se colocó en un nuevo tubo de 1,5 mL.

Es necesario que todos los pasos mencionados en el párrafo anterior se efectúen bajo campana extractora de gases y que se descarten, en recipiente especialmente destinado para ello, los tips y los microtubos que estuvieron en contacto con la solución de fenol, ya que este compuesto es altamente tóxico a humanos por cualquier vía de exposición.

➤ *Precipitación de Ácidos Nucleicos*: Una vez que la fase acuosa resultante de la extracción se puso en un nuevo tubo, se le adicionó 1 mL de etanol absoluto a -18°C, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos. Luego, se eliminó el sobrenadante y se

resuspendió el residuo en 0,1 mL de Buffer TE (1X). Si la extracción del ADN, no se realiza en una sola etapa, se puede parar en este paso y conservar el material a -20°C en freezer.

➤ *Eliminación de ARN:* Hasta este momento, como se ha producido la extracción del ADN y ARN presentes en las células de las levaduras, el paso siguiente es llevar a cabo la digestión de dicho ARN remanente. Para ello, a los tubos se les añadió 2 μL de la enzima RNAasa A (10 U/ μL , Cat. N°12091-021, Invitrogen) se colocaron dentro de un baño de agua y se incubaron de 1 a 4 horas en estufa a 37°C (temperatura óptima para la actividad de la enzima).

➤ *Precipitación de ADN:* Después de esto, se agregó 1 mL de etanol absoluto a -18°C y 4 μL de una solución 10 M de acetato de amonio a los tubos para precipitar totalmente el ADN extraído. Los tubos se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 13000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante, se lavaron con 200 μL de una solución de etanol al 70% (v/v a -18°C) y se volvieron a centrifugar 2 minutos a 13000 rpm.

Finalmente, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el residuo a temperatura ambiente. Luego, el residuo final se resuspendió en 50 μL de TE o agua miliQ estéril y el ADN se conservó a -20°C hasta su uso posterior.

3.6.2. Cuantificación del ADN genómico

El ADN genómico extraído se cuantificó por comparación visual con cantidades conocidas de ADN testigo (ADN fago λ digerido con las enzimas *EcoRI/HindIII*, Invitrogen) después de la electroforesis en geles de agarosa al 0,7%.

3.6.2.1. Armado del gel de agarosa al 0.7%

Utilizando guantes de nitrilo, se pesaron 0,42 g de agarosa (Invitrogen) sobre papel de aluminio en balanza analítica y se transfirieron a un Erlenmeyer de 250 mL. Luego, se agregaron 60 mL de buffer TBE 1X.

Debido a que la agarosa solo se disuelve en caliente, el Erlenmeyer se colocó en el microondas y se calentó a 60% de potencia. Mientras se realiza esto, es importante ir agitando cuidadosamente para homogenizar su contenido. El tiempo empleado será el necesario para lograr una completa disolución y depende del volumen preparado.

Una vez que la agarosa estuvo disuelta, se enfrió hasta una temperatura aproximada de 55°C . Mientras tanto, en la mesada destinada a tal fin, se armó la plataforma de la cuba según las instrucciones del fabricante y se ubicó el peine correspondiente.

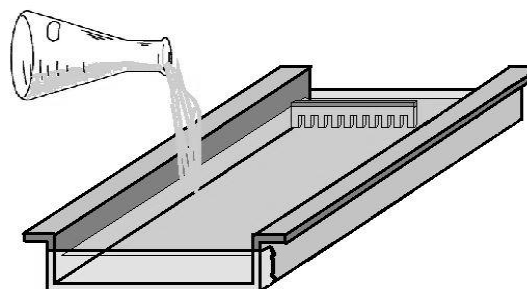


Figura 17: Preparación de un gel de electroforesis horizontal. Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Electroforesis_en_gel

Luego, se agregaron 60 μL de la solución de Bromuro de Etidio ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de la solución stock: 10 mg mL^{-1}), en el Erlenmeyer y con movimientos suaves se homogenizó la solución.

La mezcla se volcó desde uno de los extremos de la plataforma de la cuba, evitando que se formen burbujas (Figura 17). Si esto ocurre, las burbujas se rompen con una punta de micropipeta. Los peines se retiraron cuando el gel hubo solidificado (~ 15 a 30 minutos), teniendo cuidado de no romper los orificios formados.

3.6.2.2. Preparación de las muestras y electroforesis en gel de muestras de ADN



Figura 18: Fotografía propia. Preparación de muestras para electroforesis en gel.

Las muestras de ADN se prepararon colocando 5 μL de la solución de trabajo de loading Buffer 5X (Blue Juice, 10 X, Cat. N° 10816-015, Invitrogen) y 5 μL del ADN genómico correspondiente. Para los marcadores, se mezclaron 0,5 μL de fago λ *EcoRI/HindIII* de Invitrogen (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 5 μL de la solución de trabajo de loading buffer y se completó el volumen a 10 μL con agua miliQ estéril (Figura 18). Después de esto, usando guantes de nitrilo, se sumergió el gel solidificado en una cuba de electroforesis que contenía una solución de buffer TBE (1X). El nivel del buffer siempre debe estar aproximadamente 5 mm por encima del gel, por lo que si es necesario se debe agregar más buffer.

Inmediatamente, se cargó el volumen total de la muestra (10 μL) y se sembró cuidadosamente en un pocillo del gel. Los marcadores siempre se colocaron en el primer y el último pocillo de la corrida, mientras que las muestras de ADN se cargaron entre estos, siendo de vital importancia que el operador registre el orden de siembra de sus muestras. Una vez hecho esto, se conectó la cuba electroforética, se le colocó la tapa y se ajustaron los valores de voltaje/amperaje y el tiempo de la corrida. Las moléculas de ADN a pH neutro están cargadas negativamente, por lo que durante la electroforesis migrarán a través del gel hacia el electrodo positivo o cátodo (de color rojo).

Cumplido el tiempo de la corrida, se desconectó la cuba, se sacó el gel de la cuba y se realizó la captura de imagen mediante transiluminador Bio-Rad Universal Hood II S.N 76S/03696. Un sistema de cámaras toma una o varias fotografías del gel bajo luz UV que sirven para cuantificar aproximadamente el ADN genómico extraído al compararlo visualmente con los marcadores fago λ *EcoRI/HindIII* que tienen cantidades conocidas de ADN testigo.

3.6.3. Amplificación por PCR

En este estudio, se utilizó el método PCR Interdelta mejorada (Legras y Karst, 2003) para hacer la diferenciación intraespecífica de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, se describen los componentes de la mezcla de reacción y las condiciones de la amplificación.

3.6.3.1. Preparación de la PCR

En primer lugar, se prepararon las muestras de ADN a analizar en microtubos de 0,2 mL. Para esta técnica, la concentración de ADN necesaria en cada reacción debe estar comprendida entre 50 y 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$; por ello, cuando fue necesario, se realizaron diluciones en agua miliQ estéril de las muestras de ADN previamente extraídas. En segundo lugar, se efectuó el cálculo teórico del volumen necesario de cada reactivo y del volumen final del master mix de reacción considerando los posibles errores de pipeteo (Tabla 12).

Tabla 12: Concentraciones y volúmenes de reactivos usados en la PCR Inter - δ mejorada

Componentes	Concentración final	Volumen a adicionar en 1 reacción	Volumen a adicionar en (n+1) reacciones
H ₂ O miliQ estéril	-	8,0 μL	
PCR Buffer 10 X	1 x	3,0 μL	
MgCl ₂ (50mM)	2,5 mM	1,5 μL	
dNTPs mix (1 mM de c/u)	200 μM	6,0 μL	
Delta 21 (sol. de trabajo: 15 μM)	1,5 μM	3,0 μL	
Delta 12 (sol. de trabajo: 15 μM)	1,5 μM	3,0 μL	
Taq polimerasa ² (5U/ μL)	2 U	0,5 μL	
ADN		5,0 μL	
Volumen final		30,00 μL	

² La enzima Taq Polimerasa utilizada corresponde al producto Cat.N° 11615-010 de Invitrogen.

Para preparar el master mix de reacción, se incorporó el volumen calculado de cada reactivo a un microtubo de 1,5 mL, de acuerdo con el orden que se observa en la tabla anterior. Es de suma importancia trabajar en bloque frío o sobre hielo y en caso que el volumen final de reacción supere la capacidad de un microtubo, se deben preparar dos o más master mix según sea necesario.

Una vez que el mix de reacción estuvo listo, se mezcló por inversión y se centrifugó a 2.500 rpm por 30 segundos. A continuación, se distribuyeron 25 μ L del master mix en cada uno de los tubos para PCR (muestras y blanco de reacción), evitando que el líquido toque o quede sobre las paredes. Finalmente, se agregaron 5 μ L de la dilución de ADN de cada muestra, teniendo la misma precaución.

3.6.3.2. Condiciones de la PCR

Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador con tapa caliente Eppendorf AG 22331 (Hamburgo, Alemania) y las condiciones de los ciclos se detallan a continuación:

Tabla 13: Programa de PCR interdelta utilizado

	PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	Desnaturalización inicial	95	4 minutos
2 ^a	Desnaturalización	95	30 segundos
3 ^a	Annealing	46	30 segundos
4 ^a	Extensión	72	90 segundos
5	Extensión final	72	10 minutos

^a Los pasos 2, 3 y 4 se repiten **35 CICLOS**.

El programa completo de PCR Inter – δ tiene una duración aproximada de 2 horas. Una vez finalizado, los tubos con los productos de la PCR pueden conservarse por 24 horas a 4°C o bien, a – 20°C por varios meses.

3.6.4. Visualización de los productos de PCR

Los productos de la PCR *Inter- δ* se separaron en geles de agarosa 1,2% (p/v) con buffer TBE 1X y se tiñeron con Bromuro de Etidio (0,5 μ g/mL). El procedimiento extendido para el armado del gel de agarosa, preparación y siembra de las muestras y la electroforesis en gel, es el mismo que fue descrito en el apartado 1.6.2, salvando algunas modificaciones que se describen a continuación. Se sembró un volumen de 12 μ L (10 μ L de producto de PCR + 2 μ L de loading buffer 5X) para las muestras y el blanco de reacción. En el caso del marcador, este volumen correspondía a 1 μ L de 100 bp DNA ladder (Cat. N° 15628-019, Invitrogen) + 2 μ L de loading buffer 5X + 9 μ L de agua miliQ estéril. La corrida se realizó a 90 V durante una hora y al final de la misma, los geles se revelaron bajo luz UV y se fotodocumentaron (Figura 19).

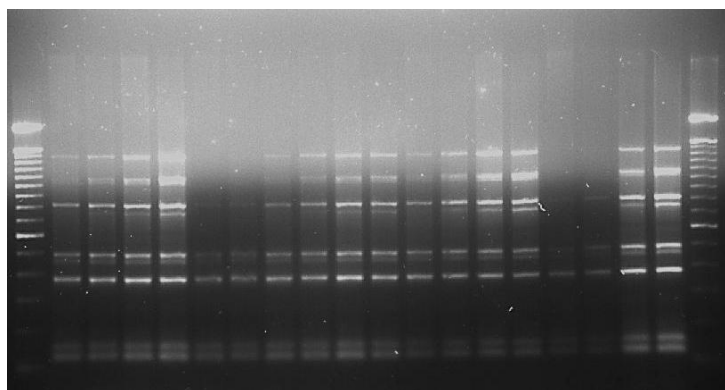


Figura 19: Fotografía propia. Gel revelado de productos de PCR *Inter- δ* mejorada. Aislados de 9 muestras de corteza del sector 8, por duplicado.

3.6.5. Evaluación de los Patrones de Amplificación encontrados

Con el objetivo de evaluar la persistencia y la biodiversidad de las cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo, una vez que se obtuvieron todos los perfiles de amplificación luego de las electroforesis, se procedió a realizar su análisis por medio de una minuciosa comparación visual. Este procedimiento se realizó en tres etapas y con varias repeticiones para reafirmar los resultados encontrados y disminuir las posibilidades de error.

En la primera etapa, se elaboró una matriz con los patrones de bandas encontrados a fin de compararlos entre sí y determinar qué aislados del viñedo produjeron el mismo patrón de bandas. Los resultados obtenidos se utilizaron para definir diferentes patrones o cepas *S. cerevisiae*, los cuales fueron identificados con un número arábigo.

Posteriormente, los diferentes patrones hallados en el viñedo en este estudio fueron comparados con los perfiles de bandas obtenidos de las cepas nativas aisladas de las uvas del mismo viñedo durante la cosecha del año 2009 (Mercado *et al.*, 2011). En el caso que algún patrón fuera aislado en ambos años, la identificación del mismo se haría usando el número arábigo asignado en el presente estudio con un sufijo que indicaría el perfil coincidente obtenido previamente por Mercado (2011).

Finalmente, también se elaboró otra matriz con los patrones de bandas obtenidos de las cepas comerciales más usadas en la región vitivinícola de la ZARM. Los perfiles comerciales se caracterizaron usando números romanos y se procedió a realizar su comparación con los patrones moleculares obtenidos del viñedo en este estudio, de manera de establecer su verdadera autenticidad.

3.7. Conservación de la biodiversidad

Las levaduras obtenidas y estudiadas fueron purificadas, conservadas e incorporadas a la Colección de Microorganismos de Uva y Vino pertenecientes al Laboratorio de Microbiología Enológica, Centro de Estudios de Enología, EEA Mendoza.

Para ello, se realizó el control de pureza y viabilidad mediante cultivo en medios adecuados, conservación a -20°C y la incorporación de todos los cultivos en una base de datos en soporte informático, para la sistematización de la información referida a esta colección.

3.8. Cepas Comerciales usadas

El laboratorio de Microbiología Enológica de la EEA INTA Mendoza cuenta con una amplia colección de microorganismos que también incluye numerosas cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas como cultivos *starters* en bodegas de la región.

Para realizar nuestro estudio, se seleccionaron 38 cepas comerciales integrantes de dicha colección y se identificaron con un código para preservar su identidad comercial. Como los cultivos se encontraban bajo la presentación de LSA, se procedió a realizar su rehidratación. En tubos de ensayo limpios se colocaron: 2 mL de agua destilada estéril; 0,5 g de sacarosa y 0,1 g de LSA de cada cepa comercial elegida. Después de homogeneizar su contenido, los tubos se incubaron en estufa a 28°C por 30 minutos con agitación periódica.

Cuando los tubos comenzaron a burbujear, se tomó una porción de su contenido y se replicó en placas de Petri con medio YPD. Pasadas las 24 horas de incubación, se aislaron algunas colonias de cada cepa comercial y se realizó la multiplicación de las mismas en un medio líquido. A continuación, se extrajo su ADN y aplicando el método PCR *Inter-δ*, cada cepa comercial fue caracterizada con un patrón molecular que después fue comparado con los perfiles obtenidos de las cepas *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del viñedo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Etapa de Aislamiento

El muestreo realizado en el viñedo se dividió en cinco momentos (cosecha, post-cosecha, poda, brotación y floración), acompañando diferentes etapas del ciclo fenológico de la vid. En cada una de estas etapas se tomaron muestras en condiciones de asepsia del suelo del viñedo, de los órganos aéreos de la planta (frutos, hojas, corteza, yemas y/o flores) disponibles en el momento de muestreo y del agua de riego del viñedo, cuando fue posible.

Con respecto a las uvas Malbec evaluadas estaban en buenas condiciones sanitarias y presentaron recuentos totales de levaduras en promedio de $3,4 \pm 0,24$ log UFC/mL, valores similares a los mencionados como habituales para uvas sanas y maduras (Ribereau Gayon *et al.*, 2006), incluso de nuestra región (Combina *et al.*, 2005b; Mercado *et al.*, 2007, 2011).

Las levaduras aisladas por siembra directa en placa a partir de las uvas, presentaron todas las características propias de levaduras No-*Saccharomyces*, tanto por la morfología de sus colonias en medio WL como por su habilidad para utilizar lisina como fuente de nitrógeno, cualidad que permite diferenciar a las levaduras del género *Saccharomyces* que carecen de esta capacidad. La metodología seleccionada como pre-tratamiento para el aislamiento de levaduras totales, molienda manual de uvas, ha sido previamente mencionada como adecuada para uvas de esta variedad permitiendo una mejor recuperación de las poblaciones de levaduras presentes en las mismas (Combina *et al.*, 2005b).

Con el objetivo de estudiar las levaduras *Saccharomyces* presentes en el ecosistema del viñedo, se realizaron procedimientos de enriquecimiento para permitir su desarrollo, teniendo en cuenta que las levaduras de este género no fueron aisladas por siembra directa por su baja proporción en uvas (Combina *et al.*, 2005b). Las muestras de uvas se molieron en forma aséptica y se permitió su fermentación espontánea como forma de auto-enriquecimiento de las poblaciones de *Saccharomyces* presentes en las mismas. Con este mismo fin, las muestras de suelos y partes de la planta diferentes a las uvas, se colocaron en mostos estériles para permitir el enriquecimiento. Los aislamientos positivos y negativos para *Saccharomyces* en las distintas muestras se presentan en la Tabla 14. En el caso de las uvas, se verificó el crecimiento de levaduras en todas las muestras, observándose al momento de consumo del 75 % de los azúcares inicialmente presentes, poblaciones uniformes en el orden de $7,61 \pm 0,32$ log UFC/mL, correspondiendo en todos los casos a levaduras tipo *Saccharomyces*.

Tabla 14: Presencia de *S. cerevisiae* (+/-) en las etapas de muestreo según la muestra tomada

Etapa de Muestreo	Época del año	Tipos de muestras tomadas	Aislamiento de <i>S. cerevisiae</i>
Cosecha	Marzo	Uvas	+
		Hojas	-
		Corteza	-
		Suelo	-
Post - Cosecha	Abril y Mayo	Hojas	-
		Corteza	-
		Suelo	+
Poda	Junio	Yemas	+
		Corteza	-
		Suelo	-
Brotación	Octubre y Noviembre	Hojas/Yemas	+
		Corteza	-
		Suelo	-
Floración	Diciembre	Hojas/Flores	-
		Corteza	+
		Suelo	-
		Agua	+

Resaltado: Tipos de muestras con aislamientos positivos de *S. cerevisiae*

Como se puede apreciar en la Tabla 14, si bien en cada etapa del ciclo fenológico estudiado se muestrearon todas las partes disponibles en la planta en ese momento, el tipo de sustrato en el cual se encontraron cepas *S. cerevisiae* fue distinto a lo largo del año. En la cosecha, *S. cerevisiae* sólo estuvo presente en muestras de uva, en la etapa de post-cosecha permanecieron en el suelo; durante el invierno se encontraron en las yemas mientras que la última etapa evaluada fue el único momento en que estas levaduras se aislaron de la corteza de las plantas.

Las especies incluidas dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, como su nombre científico lo indica, por lo general necesitan altas concentraciones de azúcar y humedad durante su ciclo biológico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Durante la época de cosecha, el aislamiento de *S. cerevisiae* solo fue posible en las muestras de uva. Según Cordero-Bueso *et al.* (2011), este hecho tiene un fundamento estacional debido a que las bayas maduras presentan un mayor contenido de azúcar y humedad, constituyéndose así en el hábitat preferencial de las levaduras durante esta época.

Cordero-Bueso *et al.* (2011), estudiaron la dispersión de una cepa comercial en un viñedo de Madrid, evaluando la persistencia de la misma durante un período total de 3 años. Estos autores detectaron que tres meses después de la cosecha, la presencia de dicha cepa comercial de *S. cerevisiae* solamente fue constante en el suelo del viñedo. Ellos consideran que esto podría deberse a la reconstrucción de la materia orgánica de la vid, por medio de las hojas y uvas viejas durante el período de senescencia. En nuestro caso, ocurrió lo mismo, ya que en la post-cosecha cuando la temperatura disminuyó con el avance del otoño, las poblaciones de *S. cerevisiae* fueron detectadas solamente en el suelo del viñedo.

En la poda del mes de junio, el aislamiento positivo de *S. cerevisiae* se efectuó solo en las muestras de yemas. Este hecho coincide con los resultados encontrados por Lúquez Bibiloni *et al.* (2007), quienes observaron una máxima cantidad de levaduras en las yemas cerradas a fines del otoño. Estos autores realizaron un estudio de las poblaciones de levaduras presentes en los órganos aéreos de la planta durante las diferentes épocas del ciclo vegetativo de la vid, y de acuerdo a los resultados que obtuvieron postulan que las yemas constituyen el principal reservorio de levaduras durante los meses invernales, ya que estas encuentran refugio debajo de las pérulas que cubren el meristema de las yemas.

Al inicio de la primavera, Lúquez Bibiloni *et al.* (2007) encontraron un número muy bajo de levaduras en las yemas en brotación. Estos autores también reportaron que solo durante el período primaveral, la ritidomía o corteza de la vid supera a las yemas en cuanto a la cantidad de levaduras/cm². Estas dos afirmaciones coinciden con los resultados encontrados en el presente estudio, ya que en el mes de octubre solo se detectaron cepas de *S. cerevisiae* en las yemas, mientras que en diciembre solo fue posible aislarlas de las muestras de corteza del viñedo.

A medida que avanzó la expansión vegetativa de la vid con el progreso de la primavera y el verano, Lúquez Bibiloni *et al.* (2007) notaron un aumento uniforme de las poblaciones de levaduras en todas las partes aéreas de la planta, hasta que los valores alcanzaron su punto máximo en las bayas durante el período de maduración de los frutos, en los meses de febrero y marzo. Este resultado confirma entonces lo antes expuesto por Cordero-Bueso *et al.* (2011) sobre el aislamiento casi exclusivo de *S. cerevisiae* en las bayas en la época de cosecha. Coincidiendo con estos resultados, pudimos observar que las uvas mostraron una presencia más homogénea de *S. cerevisiae*, encontrándose presente en todas las muestras de los diez sitios seleccionados para el muestreo en la etapa de cosecha o madurez. En el resto de las muestras y etapas evaluadas se pudo observar una distribución heterogénea de la presencia de *S. cerevisiae* en los diez sitios seleccionados para la toma de muestras. Las etapas de post-cosecha y floración contaron con su presencia en cinco de los sitios seleccionados, y en el resto de las etapas del trabajo fue posible aislar esta levadura de cuatro sitios o menos (Tabla 15).

Si bien no se pudo realizar el seguimiento continuo de la presencia de *S. cerevisiae* en los diez sitios muestreados durante las etapas del estudio, es interesante resaltar que esta levadura

mostró una permanencia algo mayor en una parte del viñedo, aislándose efectivamente de los sitios 4 y 5 del viñedo en cuatro de las etapas estudiadas (cosecha, post-cosecha, brotación y floración).

Tabla 15: Detalle del muestreo y aislamiento realizados por etapa y tipo de muestra

Tipo de Muestra	Etapas de muestreo	Época del año	Sitios con aislamiento (+) de <i>S. cerevisiae</i>	Número de cepas aisladas	Número de cepas analizadas
Uva	Cosecha	Marzo	Sitio 1	16	12
			Sitio 2	20	20
			Sitio 3	15	13
			Sitio 4	10	10
			Sitio 5	15	11
			Sitio 6	15	10
			Sitio 7	15	12
			Sitio 8	15	12
			Sitio 9	15	15
			Sitio 10	16	13
Suelo	Post-cosecha	Abril y Mayo	Sitio 1	15	14
			Sitio 2	15	15
			Sitio 3	11	11
			Sitio 4	15	12
			Sitio 5	15	09
Yemas	Poda de invierno	Junio	Sitio 6	20	18
Yemas	Brotación de primavera	Octubre y Noviembre	Sitio 1 ¹	04	- ²
			Sitio 4	05	04
			Sitio 5	10	07
			Sitio 6 ¹	02	-
			Sitio 7 ¹	04	-
			Sitio 9	20	20
Sitio 10 ¹	20	16			
Corteza	Floración	Diciembre	Sitio 3	20	19
			Sitio 4	20	18
			Sitio 5	20	14
			Sitio 8	20	17
			Sitio 9 ¹	01	-
			Sitio 10	20	19

¹: sitios en los que aislaron levaduras identificadas posteriormente como no-*Saccharomyces*

² - : sitios en los que los aislados inicialmente obtenidos no pudieron ser recuperados

En la Tabla 15 la última columna detalla la cantidad de levaduras *S. cerevisiae* que pudieron recuperarse de los aislamientos realizados. En algunos casos, el número expuesto coincide con la cantidad de colonias aisladas en ese sitio, pero en otros no pudo ser así. Esto se debió a que durante la etapa de aislamiento y obtención de cultivos puros se manejó un elevado número de muestras y aislamientos, que implicó que algunos de los cultivos sufrieran deshidratación, contaminación con hongos filamentosos durante el almacenamiento inicial o no pudieran recuperarse cuando se subcultivaron para su posterior análisis.

Además, en algunos casos (sitios indicados con ¹ en la Tabla 15), levaduras aisladas inicialmente como *Saccharomyces* de acuerdo a los criterios previamente adoptados de crecimiento en WL y observación de morfología celular, posteriormente no pudieron ser analizadas con el marcador intraespecífico PCR *Inter-δ*, razón por la cual estos aislados fueron sometidos a una identificación molecular aplicando la secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S (Fernández-Espinar *et al.*, 2006) para determinar la especie de levadura. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16: Identificación de los aislados que no amplificaron por PCR *Inter-δ*

Código de Muestra	Identificación	% Homología
IN - Y - 01 - 1.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ¹	99% id
IN - Y - 01 - 1.7	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99% id
IN - Y - 06 - 6.3	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99% id
IN - Y - 07 - 7.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99% id
IN - Y - 07 - 7.3	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100% id
IN - Y - 07 - 7. 4	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99% id
IN - Y - 10 - 10.1	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98% id
IN - Y - 10 - 10.4	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	98% id
IN - Y - 10 - 10.17	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99% id
IN - Y - 10 - 10.18	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	99% id
IN - C - 09 - 9.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	99% id

¹: *W.anomalus* era clasificada antes como *Pichia anomala* o *Hansenula anomala*.

Como se puede apreciar en la Tabla 16, la secuenciación de los aislados que no amplificaron por PCR *Inter-δ*, comprobó que se trataban de levaduras de especies diferentes a *S. cerevisiae*.

Por otra parte, excepcionalmente, durante la etapa de floración, se tomaron muestras de agua del Canal Mayor (CM) y del Canal Menor (cm) de riego que rodean el viñedo estudiado. Luego de realizar diluciones seriadas, 1 mL de las mismas fue sembrado en los medios WL (Oxoid) y Agar Lisina (Oxoid), para realizar la identificación presuntiva de las cepas *S. cerevisiae* por las técnicas de microbiología tradicional. De las placas sembradas para el CM y el cm, se tomaron al azar 9 colonias caracterizadas como *S. cerevisiae* y se hicieron cultivos puros de los aislados para su posterior análisis molecular.

Teniendo en cuenta todo lo antes expuesto, el número de *S. cerevisiae* aisladas que fueron analizadas mediante las técnicas moleculares fue de 128 cepas en la cosecha, 61 en la post-cosecha, 18 en la poda de invierno, 43 en la brotación, 106 en la floración (87 del viñedo y 18 del agua de riego), haciendo un total de 356 cepas.

4.2. Diferenciación de cepas *S. cerevisiae* en el viñedo.

Se aplicó la técnica PCR *Inter- δ* mejorada (Legras & Karst, F., 2003) para el análisis de las cepas previamente identificadas como *S. cerevisiae* por los métodos tradicionales de taxonomía. Los patrones de amplificación obtenidos permitieron caracterizar las diferentes cepas aisladas en el viñedo. Los resultados obtenidos se presentan en las Tabla 17.

Tabla 17: Patrones de amplificación de cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo (frecuencia relativa %)

Etapa	Cosecha										Post - Cosecha					Poda	Brotación					Floración				
Muestra	Uva										Suelo					Yema	Yema/Flor					Corteza				
Sector	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	4	5	9	10	3	4	5	8	10	
Patrón																										
1 _{1/9}	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	
2	-	-	92,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	7,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	54,5	-	-	-	-	-	21,4	-	72,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	45,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
13 _{6/9}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95	-	-	-	-	-	-	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	100	-	

-: Patrón no observado; **Resaltado**: Patrones que persistieron en otras etapas del estudio; **en negrita**: Patrones coincidentes con el perfil de alguna cepa comercial; 1_{1/9}: Patrón coincidente con el Patrón 1 de la cosecha del 2009; 13_{6/9}: Patrón coincidente con el Patrón 6 de la cosecha del 2009

Como se puede apreciar en la Tabla 17, todas las cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo se agruparon en 26 patrones de amplificación diferentes: 13 hallados en las muestras de uvas de la etapa de cosecha, 5 encontrados en el suelo durante la post-cosecha, 1 presente en las yemas durante el muestreo realizado en la poda de invierno, 5 correspondientes a las yemas en brotación y 2 obtenidos de las muestras de corteza en la etapa de floración.

Se puede afirmar a nivel general que la mayoría de los sitios muestreados en el viñedo tuvieron un comportamiento semejante, todos los aislados de un mismo sector mostraron el mismo patrón inter- δ o una presencia mayoritaria de un único patrón. La Figura 20 presenta 4 fotografías de algunos geles revelados en este estudio que ilustran esta situación.

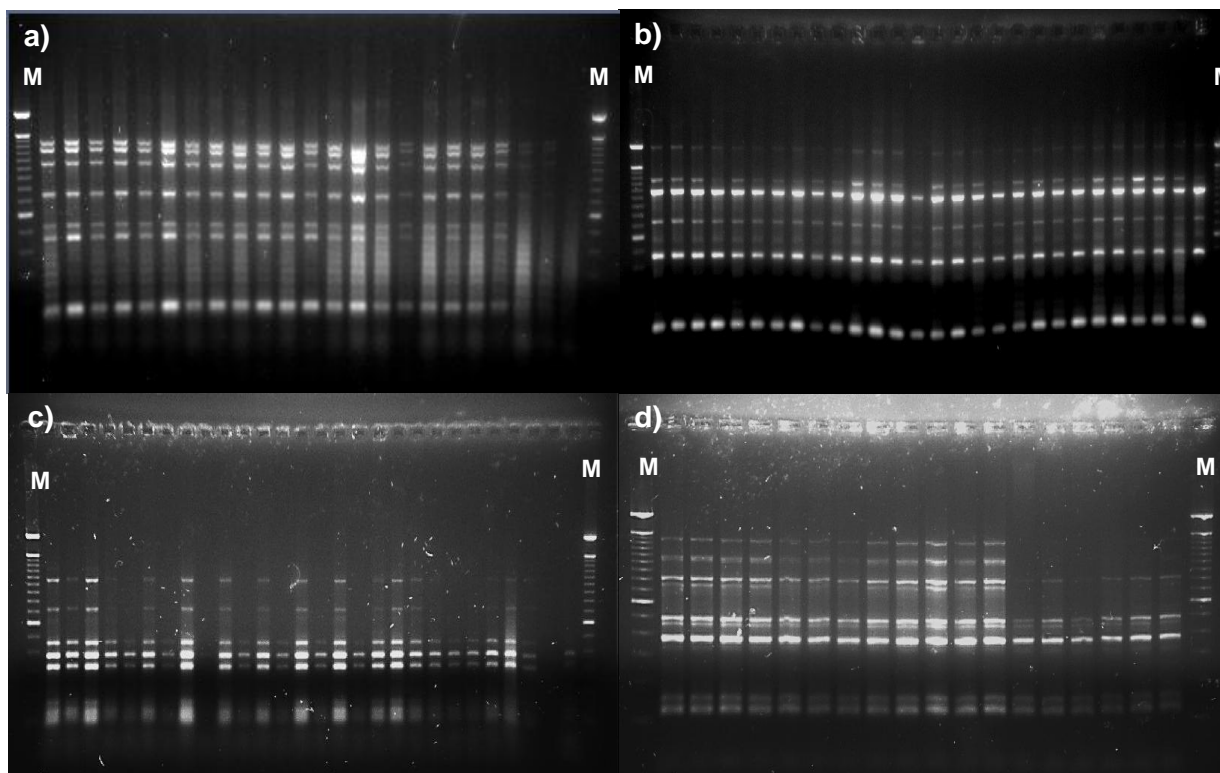


Figura 20: Patrones 13_{6/9}, 16, 19 y 26 obtenidos por PCR *Inter- δ* mejorada. M: marcador peso molecular 100 pb;
a) Aislados del Sector 10 en Cosecha, por duplicado.
b) Aislados del Sector 2 en Post-cosecha, por duplicado.
c) Aislados del Sector 6 en la Poda, por duplicado.
d) Aislados del Sector 5 en Floración, por duplicado.

Por otra parte, si bien en la mayoría de los sitios muestreados hubo un patrón molecular dominante, algunos sectores manifestaron la presencia de dos perfiles de amplificación distintos. En estos casos, igualmente hubo un patrón prevalente, cuya incidencia siempre fue superior al 55% del total de los aislados. Esta situación se encuentra ejemplificada en las fotografías contenidas en las Figuras 21 y 22 que se encuentran a continuación.

En la parte a) de la Figura 21 se muestran dos perfiles de amplificación obtenidos de muestras de uvas del sector 3 en la etapa cosecha. El 92,3% de las cepas aisladas exhibió el **Patrón 2** y el 7,7% presentó el **Patrón 3**. En la parte b) de la figura, se observan otros dos patrones hallados en las uvas, pero provenientes del sector 5. En este caso, se puede observar una distribución más homogénea de los dos perfiles, ya que el 54,5% de los aislados presentó el **Patrón 6** y el restante 45,5%, el **Patrón 7**.

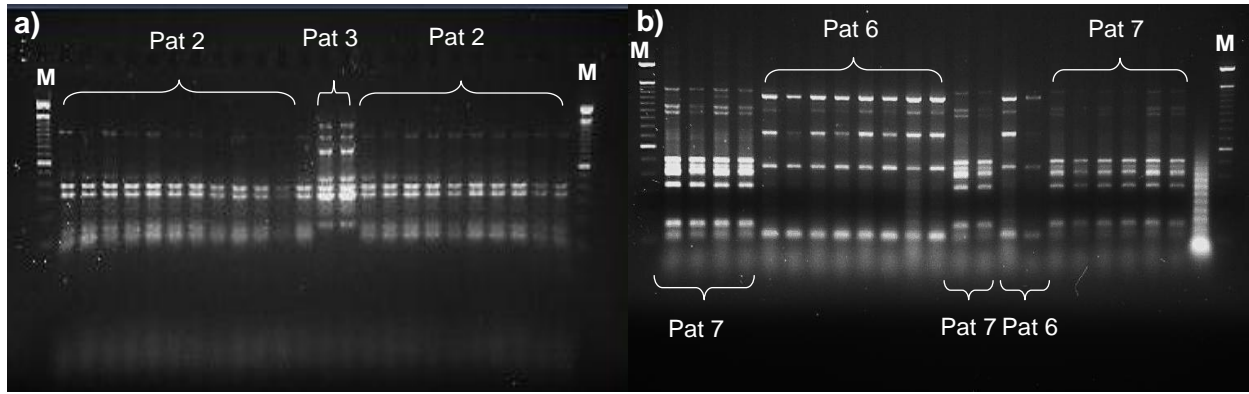


Figura 21: Patrones electroforéticos 2, 3, 6 y 7 obtenidos por PCR *Inter-δ* mejorada. M: marcador peso molecular 100 pb;

- a) Aislados del Sector 03 en Cosecha, por duplicado.
- b) Aislados del Sector 05 en Cosecha, por duplicado.

Como se puede apreciar en la parte a) de la Figura 22, las cepas *S. cerevisiae* aisladas de las muestras de suelo del sector 3 en la post-cosecha, exhibieron dos patrones moleculares. El **Patrón 17** fue encontrado en el 27,3% de las cepas aisladas, mientras que el **Patrón 6** estuvo presente en el otro 92,7%. Asimismo, en la parte b) de la figura se observan los dos perfiles de amplificación obtenidos de las muestras de yemas del sector 9 en la etapa de brotación. El **Patrón 23** estuvo presente en el 5% de los aislados y el resto de estos presentó nuevamente el **Patrón 24**.

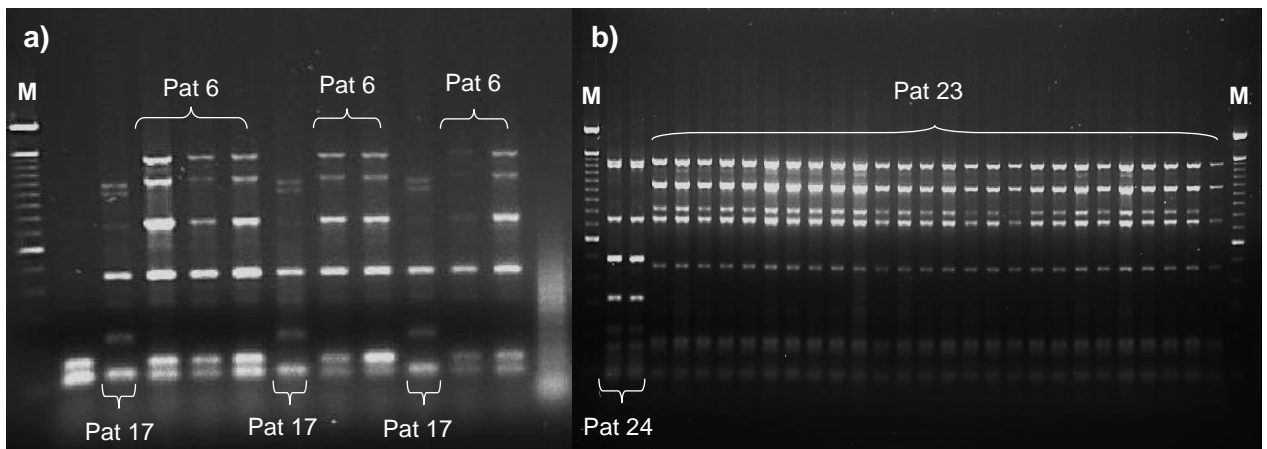


Figura 22: Patrones electroforéticos 6, 17, y 22 obtenidos por PCR *Inter-δ* mejorada. M: marcador de peso molecular 100pb

- a) Aislados del Sector 03 en la Post-cosecha, por duplicado.
- b) Aislados del Sector 09 en la Brotación, por duplicado.

El único caso en donde se observaron 3 patrones diferentes en un mismo sector, lo constituyen las muestras de suelo en el sector 1 del viñedo durante la post-cosecha. El **Patrón 14** fue el perfil predominante en este sector ya que estuvo presente en el 64,3% del total de aislados. El 21,4% presentó nuevamente el **Patrón 6** y el 14, 3% restante tuvo el **Patrón 15** (Figura 23).

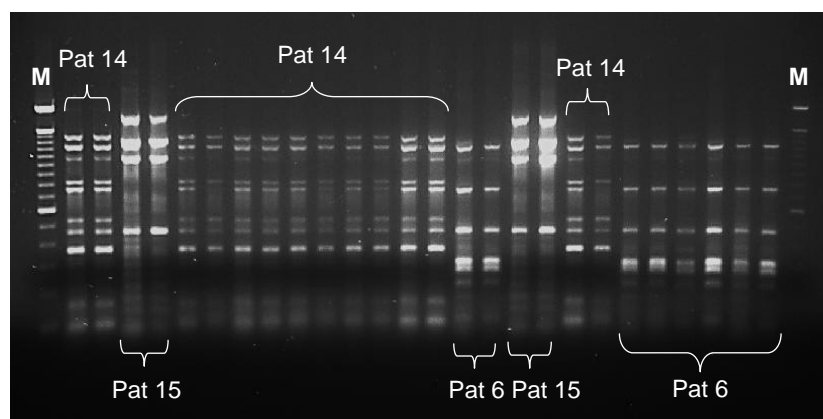


Figura 23: Patrones electroforéticos 6, 14 y 15 obtenidos por PCR *Inter-δ* mejorada.
M: marcador de peso molecular 100pb. Aislados del Sector 01 en Post-cosecha, por duplicado.

Hasta aquí, se ha analizado la variedad de patrones moleculares hallados en el viñedo, sin hacer consideraciones respecto a la etapa del ciclo fenológico en la cual se observaron ni a la diversidad total y parcial hallada en este estudio. Una estimación aproximada de la biodiversidad en el viñedo puede realizarse efectuando la relación entre el número de patrones moleculares obtenidos y el número de cepas aisladas (Mercado *et al.*, 2011; Schuller *et al.*, 2005). La Tabla 18 muestra los valores obtenidos.

Tabla 18: Estimación de la Biodiversidad Total hallada y la Parcial de cada etapa en estudio

Etapa de muestreo	Número de <i>S. cerevisiae</i> aisladas (A)	Número de Patrones Distintivos (P)	Número de Patrones hallados en un único sitio del viñedo	Número de Patrones hallados en más de un sitio del viñedo	% de Biodiversidad $B = [(P/A) \cdot 100]$
Cosecha	128	13	11	2	10,16 %
Post-Cosecha	61	6	4	2	9,84 %
Poda de Invierno	18	1	1	-	5,56 %
Brotación	43	6	5	1	13,95 %
Floración	87	2	-	2	2,30 %
Total	337	26	20	5	7,72 %

El cálculo de la biodiversidad total y por etapas, refleja valores muy bajos teniendo en cuenta el alto número de aislados obtenidos en todo el viñedo y en cada etapa del estudio. Esto significa entonces que las poblaciones de *S. cerevisiae* obtenidas presentaron un bajo nivel de polimorfismo.

Si bien todas las fases del ciclo fenológico estudiadas tuvieron un bajo índice de biodiversidad, las dos etapas que presentaron los valores más altos fueron la brotación y la cosecha respectivamente. En el caso de la brotación, el índice de biodiversidad calculado se debe a la mayor proporción encontrada entre el número de patrones identificados y los aislados obtenidos de las yemas en este período. Mientras que en la época de cosecha, el valor de biodiversidad obtenido evidencia que el 48% de los perfiles de amplificación encontrados en el viñedo pertenecen a cepas aisladas en esta etapa. Durante la cosecha, a diferencia del resto de las otras fases, se detectó la presencia de *S. cerevisiae* en los 10 sitios del viñedo seleccionados para la toma de muestras, por lo que entonces, se obtuvo mayor cantidad de aislados y se observó el mayor número de patrones diferentes.

Este hecho podría ser explicado debido a la mayor facilidad que presenta *S. cerevisiae* para crecer en las bayas con respecto a los otros sustratos analizados. Cordero-Bueso *et al.* (2011) encontraron que la ocurrencia, y sobre todo la dominancia de *Saccharomyces*, en

muestras de suelo, hojas y restos vegetales en descomposición, son extremadamente raras y menores a los valores hallados en las uvas. Estos autores explicaron este fenómeno en función de un número de factores (como la temperatura, la humedad relativa, el grosor de la cutícula, el número de estomas y otras características anatómicas de los tejidos vegetales), que afectan la cantidad y calidad del agua y los nutrientes disponibles en los diferentes tejidos vegetales para el crecimiento de las levaduras.

Considerando la ocurrencia estacional de los frutos y las mayores ventajas que estos presentan para la nutrición microbiana en comparación con las muestras de suelo, yemas, flores y hojas, resulta natural entonces que los mayores recuentos de levaduras, así como el mayor número de aislados de cepas de *S. cerevisiae* y de patrones moleculares distintivos, hayan sido obtenidos en la etapa de la cosecha.

No obstante, la situación actual del viñedo, en relación a la diversidad de patrones diferentes detectados durante la cosecha, sería completamente distinta a la verificada 5 años antes; ya que en un estudio previo realizado sobre uvas provenientes de este viñedo, Mercado *et al.* (2011) encontraron una gran diversidad en la población nativa de *S. cerevisiae*, por lo cual se clasificó a este viñedo como altamente polimórfico. En el presente estudio, según el valor de biodiversidad obtenido en el viñedo, ya no sería altamente polimórfico sino que, por el contrario, se clasificaría como de bajo polimorfismo de acuerdo al criterio previamente considerado. La gran diferencia detectada en la biodiversidad obtenida entre ambos estudios, refleja profundos cambios en las características cuali y cuantitativas de las poblaciones de *S. cerevisiae* aisladas del viñedo en ambos momentos.

En primer lugar, se puede afirmar que la población hallada en el 2009 fue mucho más diversa y difirió totalmente de la encontrada en el presente estudio. En la cosecha del 2009, Mercado *et al.* (2011) encontraron 26 patrones moleculares diferentes, la mayor parte de los cuales solo estuvo presente en un único sitio del viñedo. Cinco patrones, dos de ellos coincidentes con los perfiles de las cepas comerciales EC 1118 y D254, se encontraron en más de un sitio del viñedo en el estudio realizado en esa oportunidad. En nuestro caso, si bien la biodiversidad detectada fue mucho menor, trece patrones en total detectados en uvas, la mayoría de los perfiles de amplificación también fueron únicos y solamente el Patrón 1_{1/9} se repitió en las uvas de los sectores 1 y 2 del viñedo.

Por otro lado, la población nativa de *S. cerevisiae* en el año 2009, presentó una distribución irregular donde cada sitio muestreado contó con sub-poblaciones en su mayoría diferentes. En general, casi todos los sitios exhibieron de 2 a 5 patrones moleculares distribuidos ampliamente entre los aislados analizados (en el sector 2 se encontró un máximo de 10 perfiles distintos), a excepción de los sitios 7 y 8 que tuvieron un único patrón en su totalidad. En los resultados de nuestro estudio, la situación encontrada fue inversa a la descrita anteriormente. Siete de los diez sectores analizados, presentaron un único patrón entre sus aislados, y en los tres casos donde se observaron 2 perfiles de amplificación distintos (sitios 3, 4 y 5), las frecuencias relativas obtenidas igualmente demostraron la predominancia de una cepa con respecto al total de los aislados dentro del sitio.

Con el fin de evaluar las poblaciones de levaduras dominantes en las regiones de Franciacorta y Oltrepò Pavese, Vigentini *et al.* (2014) realizaron un estudio a largo plazo, tomando muestras de aire, uvas y vino de las cosechas 2009, 2010 y 2011 en diferentes viñedos y bodegas ubicados en dichas zonas vitivinícolas. Al considerar los resultados de los análisis de cada año y el índice de biodiversidad de Shannon-Wiener obtenido, estos autores afirman que el año de aislamiento o cosecha resulta ser el factor que afecta más significativamente la biodiversidad de las especies de levaduras presentes. De esta manera, el factor de la cosecha supera ampliamente a la suma de factores que definen el sitio geográfico o *terroir* (temperatura, humedad relativa, insolación, tipo de suelo, variedad de uva, etc.). De acuerdo con esto, entonces, es posible entender las grandes diferencias encontradas en las poblaciones nativas de *S. cerevisiae* del viñedo en el presente estudio y las halladas previamente en la cosecha del año 2009.

4.3. Identificación de cepas *S. cerevisiae* en el agua de riego del viñedo.

Si bien las dos muestras de agua de riego, colectadas en etapa floración, constituyeron un caso excepcional en el presente estudio, los resultados obtenidos (Tabla 19) presentaron algunas características interesantes.

Tabla 19: Patrones moleculares de *S. cerevisiae* aisladas del agua de riego (frecuencia relativa %)

<i>S. cerevisiae</i> aisladas en las muestras de agua																		
Pat	CM 1	CM 2	CM 3	CM 4	CM 5	CM 6	CM 7	CM 8	CM 9	cm 1	cm 2	cm 3	cm 4	cm 5	cm 6	cm 7	cm 8	cm 9
27	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	88,9	-	-	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,1

Pat.: patrón; - : significa “patrón no observado”; CM y cm: muestras de agua de dos canales de riego

Por un lado, como se aprecia en la Tabla 19, la población de *S. cerevisiae* aislada en las muestras de agua fue totalmente diferente a la apreciada en los otros reservorios del viñedo. Los 11 patrones de amplificación obtenidos fueron diferentes con respecto a los 26 hallados en las muestras de uva, hojas, yemas, flores, corteza y suelo del viñedo, y también en relación a los 35 obtenidos de las cepas comerciales más ampliamente usadas en la ZARM (Figura 24). Por otro lado, resulta interesante destacar la gran biodiversidad detectada. Este hecho es muy llamativo, no solo en función de la menor cantidad de aislados analizados molecularmente (18 contra 337 del viñedo), sino también teniendo en cuenta el menor número y volumen tomado de muestra, se evaluaron 2 muestras de agua (500 mL de agua de cada canal) y 160 muestras del viñedo en total.

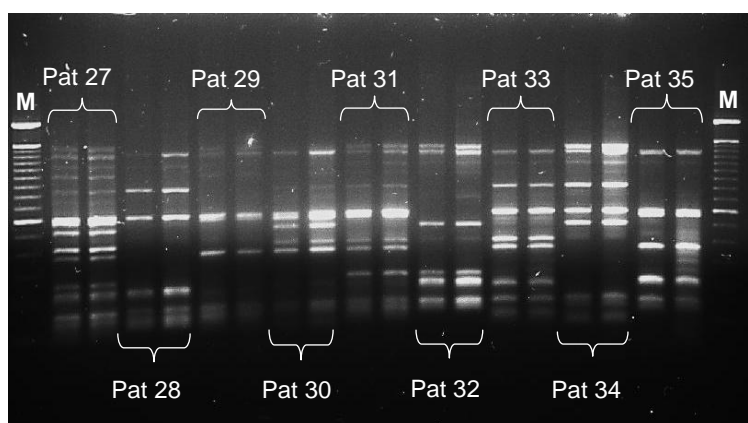


Figura 24: Patrones moleculares 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35 obtenidos por PCR *Inter-δ* mejorada. M: marcador de peso molecular 100pb. Aislados del CM de Riego en la Floración, por duplicado.

Los resultados obtenidos confirman de algún modo el rol del agua de riego como potencial medio de diseminación de levaduras en el viñedo, pero a pesar de lo interesante de estos resultados, la información obtenida sobre las cepas de *S. cerevisiae* en las muestras de agua, resulta preliminar y aún insuficiente para postular un comportamiento con certeza. Por todo ello, resulta evidente la necesidad de diseñar otro estudio para profundizar en el conocimiento de la dinámica poblacional de esta levadura en las muestras de agua de riego.

4.4. Comparación entre cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo y cepas comerciales.

En el presente estudio, además de comparar entre sí los patrones de amplificación obtenidos de las cepas *S. cerevisiae* aisladas en el viñedo, otro objetivo fue realizar la comparación de dichos patrones con los perfiles de amplificación obtenidos de las cepas comerciales más utilizadas en la ZARM, a fin de establecer el carácter nativo de los primeros. El interés de esta comparación surge de la situación actual de la vitivinicultura en nuestra región, donde un gran número de bodegas desarrollan sus actividades haciendo un uso generalizado de levaduras comerciales para llevar a cabo las fermentaciones.

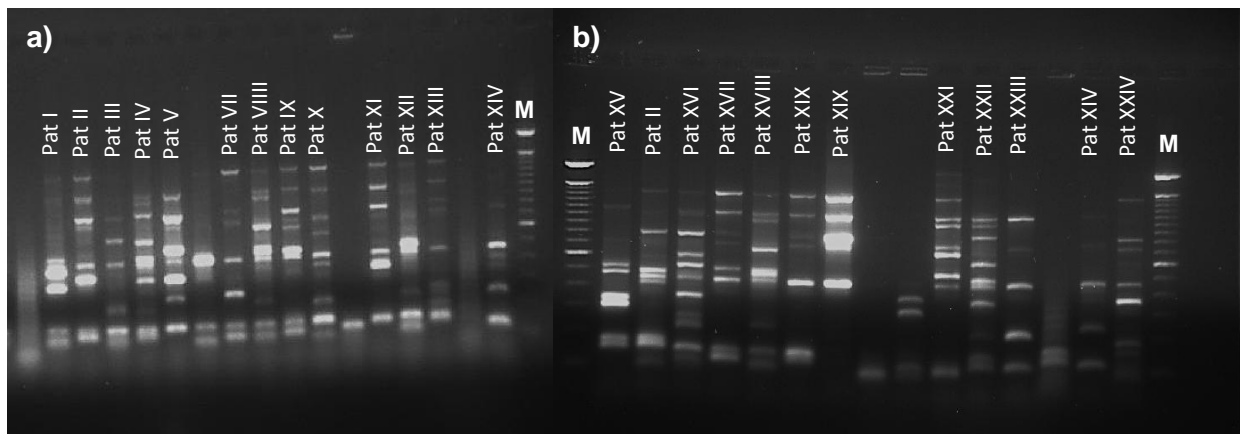


Figura 25: Patrones electroforéticos obtenidos por PCR *Inter-δ* mejorada. M: marcador de peso molecular 100pb.
a) Patrones I a XIV correspondientes a Cepas Comerciales 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13 y 14.
b) Patrones XV a XXIV correspondientes a Cepas Comerciales 15, 37, 16, 17, 18, 19, 38, 20, 21, 22, 23 y 24.

De esta manera, manteniendo las mismas condiciones experimentales, se analizaron molecularmente 38 cepas comerciales. Se obtuvieron 35 patrones de amplificación específicos que se identificaron usando números romanos (Figura 25), ya que hubo coincidencia en los patrones correspondientes a tres pares de cepas, las cuales en todos los casos son comercializadas como productos diferentes. Luego de realizar el análisis comparativo entre los 26 perfiles de las cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo y los 35 patrones moleculares obtenidos de las cepas comerciales, se pudo concluir que solo hubo una coincidencia (ver patrón resaltado en negrita en Tabla 17).

Además, el **Patrón 1**_{1/9} aislado de las muestras de uva provenientes de los sectores 1 y 2 del viñedo, fue compatible con el **Patrón VIII** encontrado en la Cepa Comercial 08 (Figura 26).

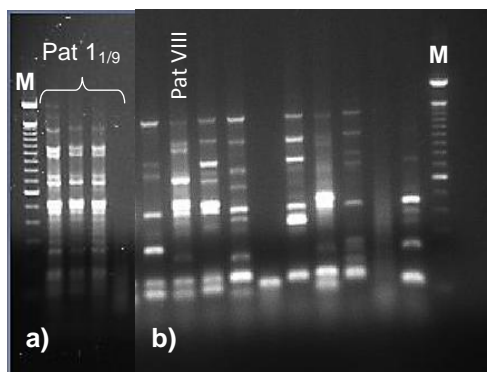


Figura 26: Comparación de patrones electroforéticos $1_{6/9}$ y VIII obtenidos por PCR Inter- δ mejorada.

- a) M: marcador de peso molecular 100pb; Aislado 1 por triplicado. Sector 2 en la Cosecha.
b) M: marcador de peso molecular 100pb; Aislados de Cepas Comerciales 08.

4.5. Evaluación de persistencia de cepas *S. cerevisiae* aisladas del viñedo

La evaluación de la persistencia de las cepas *S. cerevisiae* aisladas en el viñedo se realizó en dos niveles. En primer lugar, se analizó si alguno de los patrones moleculares obtenidos en el presente estudio se repitió en alguna otra fase del ciclo fenológico. Esta comparación se hizo con el fin de evaluar la posible continuidad de esta levadura en los distintos reservorios de la planta según las diferentes etapas del ciclo fenológico de la vid. En segundo lugar, se realizó la comparación de los patrones electroforéticos obtenidos de las cepas nativas aisladas en el presente estudio con los perfiles de bandas obtenidos de las uvas del mismo viñedo durante la cosecha del 2009 (Mercado *et al.*, 2011).

De los 26 patrones distintivos hallados en el viñedo en nuestro estudio, solo dos pudieron observarse en más de una fase del ciclo fenológico. Todas las cepas *S. cerevisiae* aisladas de las uvas de los sectores 1 y 2 del viñedo durante la etapa de cosecha **mostraron el Patrón $1_{1/9}$** . Posteriormente, este patrón también fue observado en los aislados del sector 10 durante la época de brotación, pero con una frecuencia menor a la anterior ya que estuvo sólo en el 60% de los aislados de las muestras de yemas.

Por su parte, el 54,5% de los aislados del sector 5 mostró el **Patrón 6** durante la cosecha. En la etapa siguiente, los aislados de las muestras de suelo de los sectores 1 y 3 también mostraron este patrón con frecuencias relativas de 21,4% y 72,2% respectivamente. Aunque la aparición de este patrón molecular aparentemente es aleatoria a lo largo del estudio, podría suponerse que corresponde a una cepa ampliamente distribuida en el viñedo pero con una capacidad competitiva limitada. Debido a ello, entonces, no pudo ser aislada de todas las muestras obtenidas de los sitios estudiados, y cuando fue posible, no tuvo una presencia única ya que en todos los casos estuvo acompañada con otros patrones

De acuerdo a los resultados obtenidos, además, se pudo comprobar que el viñedo actúa de reservorio de levaduras a lo largo del ciclo vitícola, ya que en las diferentes muestras colectadas en distintos sectores del viñedo pudieron recuperarse diferentes aislados de *S. cerevisiae*. No obstante, no pudo verificarse una persistencia de las mismas cepas a lo largo del ciclo, sino que se observó un comportamiento dinámico de las poblaciones, con pocas cepas persistentes en el período evaluado.

Con respecto a la comparación de los patrones de electroforesis encontrados en el viñedo durante los años 2009 y 2014, hubo dos coincidencias interesantes. Los **Patrones $1_{1/9}$ y $13_{6/9}$** aislados en el presente estudio se asemejaron en gran medida a los **Patrones 1 y 6** encontrados previamente por Mercado (2011). En ambos casos, el porcentaje de coincidencia fue igual o superior al 90,91% de las bandas analizadas.

El **Patrón 1**, formado por 11 bandas de pesos moleculares comprendidos entre 1400 y 150 pb, fue aislado primeramente por Mercado *et al.* (2011) en muestras de uva recolectadas en 4 sitios del viñedo. En los sectores 1, 3 y 5 fue el perfil dominante en algunos casos con frecuencias relativas de 45,5%, 25% y 75% respectivamente. En cambio, en el sitio 10 solo representó el 33,3% de los aislados obtenidos. Asimismo, en el análisis realizado por la autora en este estudio, el **Patrón 1** fue coincidente con el perfil de amplificación obtenido de la **cepa comercial EC 1118** y constituyó una de las cepas más ampliamente distribuida en el viñedo.

En el presente estudio, el **Patrón 1_{1/9}** se encontró en la totalidad de los sectores 1 y 2 de la cosecha, en el período de brotación de las yemas y también coincidió con el **Patrón VIII** obtenido de la misma cepa comercial antes mencionada. No obstante, en nuestro caso, el perfil de amplificación obtenido solo presentó 10 bandas comprendidas entre 1400 y 150 pb, difiriendo así en una banda con el patrón hallado por Mercado *et al.* (2011). Esta discrepancia encontrada entre ambos perfiles podría deberse a las diferencias en las condiciones experimentales de los estudios, siendo necesario realizar más pruebas para confirmar o refutar este resultado.

La otra coincidencia observada entre los patrones moleculares obtenidos en ambos estudios, la constituyen el **Patrón 6** del año 2011 y el **Patrón 13_{6/9}** del 2014, los cuales contaron con 6 bandas comprendidas entre 1400 y 450 pb. A pesar de no observarse diferencias entre los perfiles de amplificación analizados, igualmente es necesario corroborar la coincidencia encontrada. Más aún, ya que este perfil no mostró semejanza con los patrones comerciales obtenidos y fue hallado en un único sitio del viñedo, no coincidente en ambos años, por lo cual podría ser postulado como cepa nativa representativa de este viñedo en función de su persistencia a mediano plazo.

5. CONCLUSIONES

Las diferentes partes de un viñedo constituyen reservorios de levaduras *S. cerevisiae*, ya que distintas cepas pudieron ser aisladas desde diferentes sustratos de la planta de vid (uvas, yemas, hojas, flores y corteza), así como también de muestras de suelo y agua de riego del viñedo.

A lo largo del ciclo fenológico estudiado, no pudo verificarse la persistencia de las mismas cepas *S. cerevisiae* en el viñedo. Por el contrario, se observó un cambio dinámico de poblaciones, con presencia de diferentes cepas a lo largo del período evaluado.

Se observó la presencia de una posible cepa nativa representativa de este viñedo (**Patrón 13_{6/9}**) que nuevamente pudo ser re-aislada a partir de muestras de uvas en un período de 5 años.

Se detectó la presencia de una cepa comercial en el viñedo en muestras de uvas y yemas, pero su diseminación estuvo acotada a pocos sectores del viñedo en ambos tipos de muestras.

Se pudo ampliar la colección de levaduras *S. cerevisiae* representativas de la biodiversidad de este viñedo, extendiendo a un número de 51 los patrones correspondientes a 412 aislados originarios de este viñedo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aranda, A., del Olmo, M. y Matallana, E. (2005). Levaduras *Saccharomyces* I. Levaduras de primera Fermentación. *Microbiología del vino*. (pp 19-56). (1ª ed.). España: AMV Ediciones.
- Barnett J.A. (2000). *Yeast, Characteristics and Identification*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Capello, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellagio, F. y Zacheo, G. (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1274-1280
- Catania, C. D., Avagnina, S., Uliarte, E.M., del Monte, R.F. y Tonietto, J. (2007). *Caracterización climática de regiones vitivinícolas ibero-americanas. El clima vitícola de las regiones productoras de uvas para vinos de Argentina*. (1ª ed.). Brasil: Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves.
- Combina, M., Elía, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A., y Martinez, C. (2005). Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 99, 237-243
- Combina, M.; Mercado, L.; Borgo, P.; Elía, A., Jofré, V., Ganga, A. y Martinez, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1055-1061
- Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C. y Cocolin, L. (2000). Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 117-121
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M.D. y Valero, E. (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 132-139
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. y Valero, E. (2011). Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol Ecol*, 77, 429-437.
- Degré, R. et al. (1989). Wine Yeast Strain Identification. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 40, 4, 309-315
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. y Querol, A. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 1-10.
- Fernández-Espinar, M.T.; Barrio, E. y Querol, A. (2005). Identificación y Caracterización molecular de levaduras vínicas. *Microbiología del vino*. (pp 148-184). (1ª ed.). España: AMV Ediciones.
- Fernández-Espinar, M.T.; Martorell, P.; De Llanos, R. y Querol, A. (2006). Molecular Methods to Identify and Characterize Yeasts in Food and Beverages. *The Yeast Handbook – Volume II. Yeasts in Food and Beverages. microbiología del vino*. (pp 55-82). (1ª ed.). Germany: Springer.
- Fleet, G. H. (1993). The microorganisms of winemaking – isolation, enumeration and identification. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (pp 2-25). Switzerland: Harwood Academic Publishers.
- Fleet, G. H. (1993). Yeasts – Growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*. (pp 27-54). Switzerland: Harwood Academic Publishers.

Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11–22.

Fleet, G. H. (2008). Wineyeasts for the future. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS)*, 8, 979-995.

Fondo Vitivinícola Argentino (2010). *Breve historia del vino*. (Consultado el 09 de marzo de 2014. En: <http://www.fondovitivinicola.com.ar/articulos/vinoYcapacitacion/15/breve-historia-del-vino/>)

Fondo Vitivinícola Argentino (2010). *Terruños*. (Consultado el 09 de marzo de 2014. En: <http://www.fondovitivinicola.com.ar/articulos/vinoYcapacitacion/15/breve-historia-del-vino/>)

Fondo Vitivinícola Argentino (2011). *La vitivinicultura argentina aporta \$ 14 millones anuales a la economía nacional*. (Consultado el 09 de marzo de 2014. En: http://www.fondovitivinicola.com.ar/files/prensa/Cifras_del_sector_vitivinicola.pdf)

Fondo Vitivinícola Argentino (2012). *Impacto de la vitivinicultura en la economía argentina*. (Consultado el 03 de marzo de 2014. En: http://www.fondovitivinicola.com.ar/media/archivos/2013/08/Impacto_econ%C3%B3mico_vitivinicultura.pdf)

Fondo Vitivinícola Argentino (2014). Historia de la Vid y el vino. Desde los orígenes hasta nuestros días. *La Vitivinicultura hace Escuela - La Cultura de la Vid y el Vino*. (pp 2 -37). Argentina

Fondo Vitivinícola Argentino (2014). Argentina Vitivinícola. Un mosaico geográfico. *La Vitivinicultura hace Escuela - La Cultura de la Vid y el Vino*. (pp 41-49). Argentina.

Fondo Vitivinícola Argentino (2014). Factores económicos de la industria. *La Vitivinicultura hace Escuela - La Cultura de la Vid y el Vino*. (pp 51-57). Argentina.

González, S.S. et al. (2007). Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (*Canary Island, Spain*). *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1018-1025.

Heard, G.M. & Fleet, G.H. (1986). Occurrence and growth of yeast species during fermentation of some Australian wines. *Food Technology in Australia*, 38, 22 – 25.

Hoffman, C. S. & Winston, F. A. (1987). A ten minute preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272

INV (2013). *Registro de viñedos y superficie*. (Consultado el 05 de enero de 2015. En: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2013/Registro.pdf)

INV (2013). *Anuarios vitivinícolas. Capítulo I: Viñedos y Superficie*. (Consultado el 05 de enero de 2015. En: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2013/superficie/CapI.pdf)

INV (2013). *Exportaciones Argentinas de productos vitivinícolas*. (Consultado el 05 de enero de 2015. En: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2013/exportaciones/COMENTARIO.pdf)

INV (2013). *Salidas de vino autorizadas para el consumo interno*. (Consultado el 05 de enero de 2015.

En:http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/estadisticas/anuarios/2013/consumo/CUADROS_DEFINITIVOS_DESPACHOS_2013x.pdf)

INV (2015). *Informe variedad Malbec*. (Consultado el 30 de marzo de 2015. En: http://www.inv.gov.ar/inv_contenidos/pdf/Malbec_2014.pdf)

Khan, W., Augustyn, O.P.H., van der Westhuizen, T.J., Lambrechts, M.G. & Pretorius, I.S. (2000). Geographic Distribution and Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Vineyards in the Warmer, Inland Regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 21, 1, 17-31

Kurtzman, C.P; Fell, J.W. and Boekhout, T. (2011). *The Yeasts. A taxonomic study. Volume I*. (5^{ed.}). London: Elsevier.

Legras, J.L. & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS*, 221, 249-255.

Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C. & Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23, 709–716

Lissarrague, J.R., Baeza Trujillo, P., Ruiz García, C., Sánchez de Miguel, P., Sotés Ruiz, V. (2008). *Biología de la Vid*. Departamento de Producción Vegetal. Fitotecnia. Grupo de investigación en Viticultura. Universidad Politécnica de Madrid. (Recuperado el 30 de marzo de 2015. En: <http://ocw.upm.es/produccion-vegetal/viticultura/contenidos/tema2biologia.pdf>)

Lopes, C. A., van Broock, M., Querol, A. y Caballero, A.C. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 01-08

López, V., Querol, A., Ramón, D. y Fernández-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Journal of Food Microbiology*, 68, 75–81.

Lúquez Bibiloni, C.V., Formento, J.C. y Peralta, E.D. (2007). Las yemas, principal reservorio de levaduras entre los órganos aéreos vegetativos y reproductivos de la vid (*Vitis vinifera* var. Malbec). *Revista FCA UNCuyo*, 39, 83-91

Mercado L. (2001) Origen de las levaduras que conforman la flora levuriana del mosto. Tesina de Grado. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo.

Mercado, L., Dalcero, A., Masuelli, R. y Combina, M. (2007). Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24, 403–412

Mercado L. (2009) Biodiversidad de *Saccharomyces* en viñedos y bodegas de la región vitícola "Zona Alta del Río Mendoza". Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Cuyo.

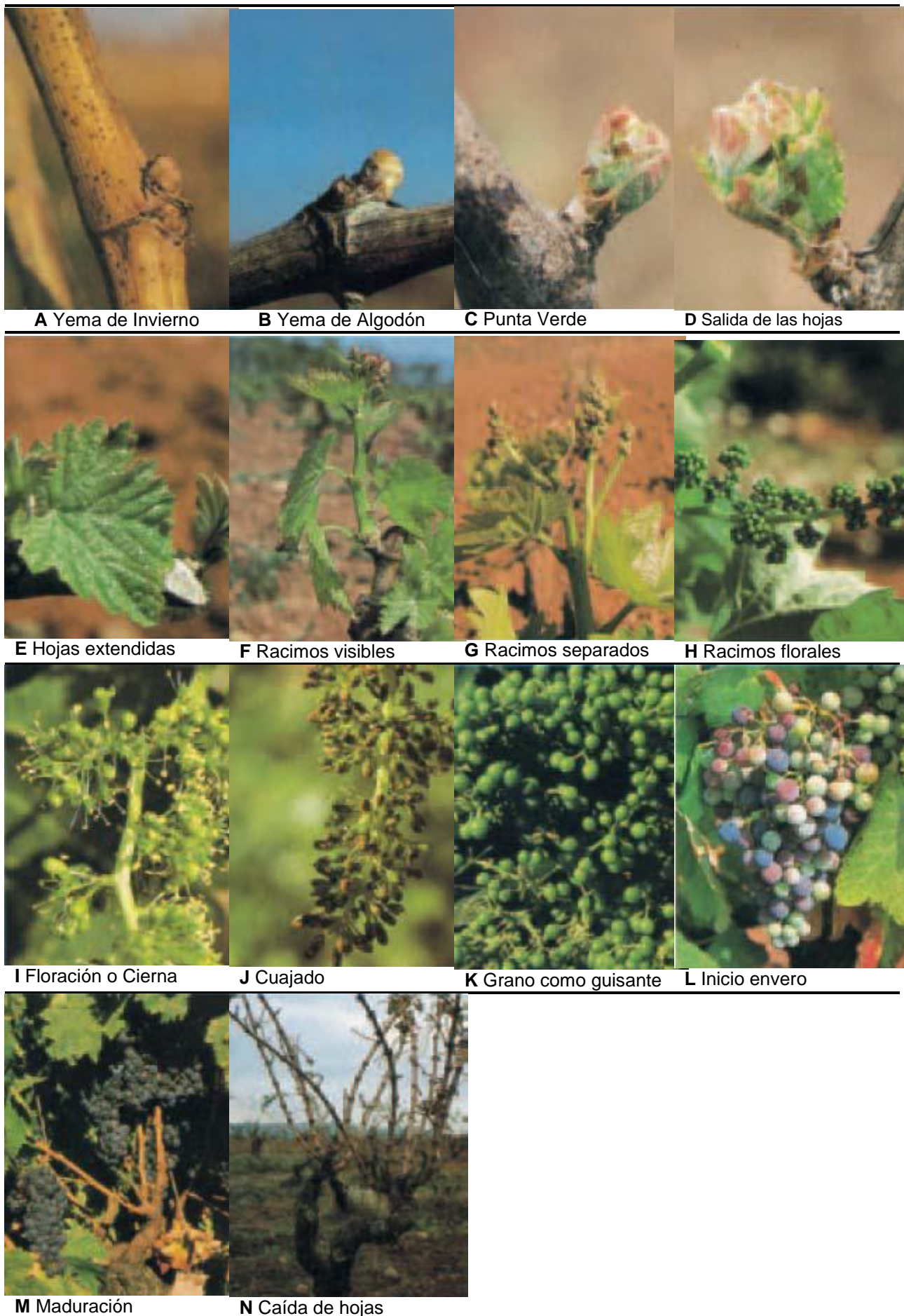
Mercado, L., Sturm, M.E., Rojo, M.C., Ciklic, I., Martínez, C. y Combina, M. (2011). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* populations in Malbec vineyards from the "Zona Alta del Río Mendoza" region in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 319-326.

Ness F, L. F. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal Science Food Agric* 62.: 89–94.

OIV. (2013). *Statistical report on world viticulture*. (Extraído el 04 de febrero de 2015. En: <http://www.oiv.int/oiv/info/esstatsro?lang=es>)

- Pallman, C.L., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A. & Bisson, L.F. (2001). Use of WL Medium to Profile Native Flora Fermentations. *Am. J. Enol. Vitic*, 52:3, 198 – 203.
- Pandolfi, C. y Cuello, I. (2005). Reseña de la vitivinicultura argentina. *Revista de enología científica y profesional (ACE)*, 53. (Recuperado el 23 de noviembre de 2014 de: http://www.acenologia.com/ciencia69_03.htm)
- Pramateftaki, P. V., Lanaridis, P. & Typas, M.A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 236-248
- Pretorius, I. S., van der Westhuizen, T.J. & Augustyn, O.P.H. (2000). Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and its importance to the South African Wine Industry. A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 20, 2, 61-74
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol* 15, 439–446.
- Raspor, P. *et al.* (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 97-102.
- Ribéreau-Gayon, P. *et al.* (2006). *Tratado de Enología – Volumen I. La Microbiología del vino y las vinificaciones*. (2ª ed.). Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd.
- Schuller, D., Alves, H., Dequin, S. & Casal, M. (2005). Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 167–177.
- Schuller, D., Pereira, L., Alves, H., Combon, B., Dequin, S. & Casal, M. (2007). Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast*, 24: 625–636.
- Tacchini, J. (2001). Situación Actual de la Vitivinicultura. Libro de resúmenes *Seminario Internacional de Enología hacia el Tercer Milenio*, Mendoza, Argentina.
- Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. & Hallet, J.N. (1995). Genetic Diversity and geographical Distribution of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains from the Wine-Producing Area of Charentes, France. *Appl Env Microbiol* 74, 9, 2604-2611.
- Vezinhet, F., Hallet, J.N., Valade, M. & Poulard, A. (1992). Ecological Survey of wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *Am. J. Enol. Vitic*, 61:10, 3521 – 3529.
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Fabrizio, V., Valderata, F., Faccincani, M., Panont, C.A., Picozzi, C., Inazio, S.A., Failla, O. y Foschino, R. (2014). The vintage effect overcomes the *terroir* effect: A three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrpò Pavese, two Northern Italian vine-growing areas. *Microbiology*, 161, 362-373.
- Wang, Q.M., Li, J., Wang, S.A. & Bai, F.Y. (2008). Rapid differentiation of phenotypically similar yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Appl Env Microbiol* 74, 9, 2604-2611.

ANEXO I: Estados Fisiológicos de la Vid (Extraído de: www.bodegasmendoza.com/cuadernodecampo)



ANEXO II: Formulación de Medios de Cultivo, Soluciones y Reactivos

- **Medio de Cultivo WL**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
Agar Nutritivo WL (Oxoid)	75 g
Cloranfenicol (50 µg/mL) (agregar después de autoclavado)	

- **Medio de Cultivo Lisina**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
Medio Lisina (Oxoid)	66 g
Lactato de Potasio al 50%	10 ml
Ác. Láctico al 10%	Cant. necesaria para ajuste de pH a 4,8 +/- 0,2

- **Medio de Cultivo YPD**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
Extracto de levadura	05 g
Peptona	05 g
Glucosa	40 g
Agar- agar	20 g

- **TRIS- HCl 1 M**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
Tris Base	121,10 g
Agua Bidestilada	≈ 950 ml
HCl pH 8.00	≈ 42 ml

Esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 min.

- **EDTA 0.5 M pH 8.0**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
EDTA disódico.2H ₂ O	186,10 g
Agua Bidestilada	≈ 850 ml
NaOH pH 8.00	≈ 20,00 g

. Esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 min.

Nota: la sal EDTA disódica no pasará a solución hasta que el pH sea ajustado a aproximadamente a 8.0 por la adición de NaOH.

- **Buffer TBE (10X, 1000 ml)**

Componentes	Cantidad usada para 1000 mL
Tris Base	108,00 g
Ácido Bórico	55,00 g
EDTA 0,5 M pH 8.00	40,00 ml

- **Buffer TE (1X)**

pH usado	Componentes	Para preparar		
		1000 mL	500 mL	100 mL
pH 7.4	10 mM Tris-ClH (pH 7.4)	10 mL	5 mL	1 mL
	1 mM EDTA (pH 8.0)	2 mL	1 mL	0.2 mL
pH 7.6	10 mM Tris-ClH (pH 7.6)	10 mL	5 mL	1 mL
	1 mM EDTA (pH 8.0)	2 mL	1 mL	0.2 mL
pH 8.0	10 mM Tris-ClH (pH 8.0)	10 mL	5 mL	1 mL
	1 mM EDTA (pH 8.0)	2 mL	1 mL	0.2 mL

Esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 min

- **NaCl 5M**

Componentes	Cantidad usada para 50 mL
NaCl	14,61 g
Agua Bidestilda	≈ 40,00 ml
EDTA 0,5 M pH 8.00	40,00 ml

Esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 min

- **SDS 10%**

Componentes	Cantidad usada para 50 mL
SDS	05,00 g
Agua Bidestilda	≈ 40,00 ml
EDTA 0,5 M pH 8.00	40,00 ml

- **TRITÓN 10% v/v**

Componentes	Cantidad usada para 50 mL
Tritón	05,00 ml
Agua Bidestilda	≈ 40,00 ml

- **NH₄Ac 10M:**

Componentes	Cantidad usada para 50 mL
Acetato de amonio	38,50 ml
Agua Bidestilda	≈ 40,00 ml

Esterilizar en autoclave a 115° C durante 20 min

- **Solución 1F**

Componente	Concentración Final	Concentración Stock	Volumen de Stock (mL)
Triton X-100	2%	10 % (v/v)	20
SDS	1%	10 % (p/v)	10
Na Cl	100 mM	5 M	2
TrisHCl pH 8	10mM	1 M	1
EDTA Na pH 8	1mM	0,5 M	0,2

ANEXO III: Identificación de Cepas del Viñedo que no amplificaron con la PCR *Inter δ*

Codificación de la muestra

Secuencia con pb

Identificación con el porcentaje de identidad

—

IN - Y - 1 - 1.1

Secuencia NL1 561 pb

agatacGGCGagtgaNgcGgCacaAGCTCaAaTTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTA
ATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAg
AGGGTGAgAATCCCGTCTGAtGAgATGCCATTCTATGTAAGGTGcTaTcgAAgAGTCgAGTT
GTTTGGGAATGCAGCTCTAAgTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGA
CCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAaagAAcTTTGaaaagAgagtGaaaaagTAc
tGaaatTgttgAAAgGgAacGgCatTacatcAgACtGgtGTTTtacgattatCTTctCTTcttgagttGtGCACTCgt
ATTtactGGgCCagcaTCgATTCgGATGGCAAGATAATGGCagTTGAATGTGGCTTCaCTTCgG
TGGAGTGTATAgCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCgAGGGCTGCgTCTTTTGACTAcg
ATGCTGGCGTAaTGATCTAATGCCgCCCGTCTTgaacNa

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% id

IN - Y - 1 - 1.7

Secuencia NL1 563 pb

CGAgTGAaGCGGCaaAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTT
GAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGG
GTGAgAATCCCGTCTGATGAgATGCCATTCTATGTAAGGTGCTATCgAAgAgTCgAGTTGT
TTGGGAATGCAgCTCTAAgTGGGTGGtAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGgCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAgAGTGAAAAAgTA
CgTGAAATTGTTGAAAGGGGAAGGGCaTTacATCAgACTTGGTGTTTTACgAtTATCTTCTCTTC
TTGAgTTGTGCACTCGTATTTCACTGGgCCagCATCGATTCCGATGGCAAGATAATGGCAGT
TGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCG
AGGGCTGCgTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAaTGATCTAATGCCGCCCGTCTTGAAacAC
ggac

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% id

—

IN - Y - 6 - 6.3

Secuencia NL1 572 pb

taacGGCGANgtGacgCGGCaaAAGCTCaAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGT
AATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATA
gAGGGTGAGAATCCCGTCTGATGAgATGCCATTCTATGTAAGGTGCTaTCgAAgAGTCgA
GTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAgTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
AGACCGATAGCGAACAAGTACaGTGATGGAAAGATGAAaagAAcTTTgaaaagAgagtGaaaaatT
ACatgaaatTgttgAAAgGgAacGgcattacAtcAgAcTtGgtGtTTtacgattatCTTctCTTctTGAgTTGtGCA
CTCgtATTtCacTGGgCCagcATCgATTCgGATGGCAAGATAATGGCaGTTGAATGTGGCTTCA
CTTCgGTGGAGTGTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCgTCTTTT
GACTAgGATGCTGGCgtAaTGATCTAATGCCgCCCGTCTTgaacaacggacc

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% id

IN - Y - 7 - 7.1

Secuencia NL1 570 pb

taNcggcgAGTGaaGCGGCaaaaGCTCaaATTTgAaaTCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAA
TTTGTAGAAGGTAACCTTTGGGGCTGGTCCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAgA
GGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCaGTTCTTTGTAAAGtGCTTtCgAAGAGTCgAGT
TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGgCgAgAG
ACCgATAGCGAACAAgTACagtGATGGAAAGATGAAaagAAcTTtgaAAgAgAgtGAAAatTACat
gaaaTTGtTgAAAgGaAAcGgcatTtgATCAGACaTGgtGTTtgcgCCCTCTGCTCCTTGTGGGtGGgG
GAATCTCGCAGCTCACTGGGCCagCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATCTGCAGGAATGT
AgCTTGCCTCGgTAAGTGTATATCCTGTAgAAATACTGCCAgCTGGgACTGAgGACTGCgAC
TTTACgTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCgCCCGTCTTgaaccacggacc

Identificación

Torulaspora delbrueckii – 99% identidad

IN - Y - 7 - 7.3

Secuencia consenso 592 pb

CAAGACGGGCGGCATATAACCATTATGCCAGCATCCTTGACGTAAAGTCGCAGTCCTCAGT
CCCAGCTGGCAGTATTTCTACAGGATATAACAATTACCGAGGCAAGCTACATTCCTGCAGA
TTTATCCTGCCGCAAAACTGATGCTGGCCCAGTGAGCTGCGAGATTCCCCACCCACAA
GGAGCAGAGGGCGCAAAACACCATGTCTGATCAATGCCCTTCCCTTTCAACAATTCACG
TACTTTTTCACTCTCTTTTTCAAAGTTCTTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTGCGTATCG
GTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCACAAA
CAACTCGACTCTTCGAAAGCACTTTACAAAGAACTGGGATCCTCGCCACACGGGATTCTCA
CCCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGGACCAGCCCCAAAGTTACCTTCTA
CAAATTACAACCTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACT
CGCCGTTACTAAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCG

Identificación

Torulaspora delbrueckii – 100% identidad

IN - Y - 7 - 7.4

Secuencia NL1 565 pb

cGGCGAGtgagcGGCaaAAGCTCAaATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAgTTGTAATT
TGTAAGAgGTAACCTTTGgggcTGGTCCTTGTCTATGTTCCtTGgAACagGACgTCAtAtAgGNNGA
gAATCCCgtGTGGcGAGgAtcccagTTCTTTGTaaagtGCTtccaAaAGTCcAgtGTTTTGGgAATGCa
gCTCTaagTGgGTGGtAAATTCATCTAAagTaaaTattGgCgAcAgAgcgaTtGcgaACaatTacagtga
tggaAgAtgAaaagaactttgaaaatttagtgaaaaatTACAtgaaatTgttgAAAgGaaacGgcattgatcagAccTGg
tgtTttgcgcoctctGCTCctTGTgGtGGgggAATCtCgCagctcactGggccagCATCagtTTTGGcggcaGGA
TAAATCTGCagGAAtGttcTTGCCTCagtAAgTGTATATCCtGtaaaAATACTGCCagCTGGaACT
GAtGACTGctActTtaCcTCaAGGAtGctggcaTAAAtGgttaTatgCcgCCcgtCTTgaaccacagaca

Identificación

Torulaspora delbrueckii – 99% identidad

IN - Y - 10 – 10.1

Secuencia NL1 564 pb

cagAgTGaaGCGgCaaagctcaaATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAA
GATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCATAgAGGGtGA
gAATCCCGtCTGAtgagAtGcCCaTTCCTATGTaAgGTGctatcgAagAgtCgAgtTgTTGggAATGCa
gCTCTaatTGggtGgcaaaTTCCATCTaaagcTaaATATTGcCgAgAgAccgATaGcgAACaAtTACagT
GatGgaAAgATGAAaagAACTTTgaAaAgAgAgTGAaaAAgTACaTGAaaTTGttgAAAGGgAAgGgC
aTTaNATCAgACTTGgtGTTTTACgAttatCTTCTCTTcttgagtTgTGCaCTCctATTtCacTgggCCggc
aTCgATTcggATGGCaAgATAaTGgCagtTgAATGtGgCTTCaTTcggTGGAgTgTATAgCTTCTG
CTGATATTGCCTGTcTGGATCgaGggcTGcctCTTttgACTAcgATGCTGgCgtaatgaTCTaatGccgC
CcgctTtgAaacacgtacc

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 98% identidad

IN - Y - 10 – 10.4

Secuencia NL1 576 pb

agcaccacggcgagtGaaGCGGCaaaacgctcaaATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGt
AATTTGAAGATGGtAACCTTGGGTTTGGCTCTTgTCTATGTTCCCTTGAACAGGACGTCaTAg
AGGGtGagAaTCCCGtCtGAtgagatgccCATTCCCTATGtaagGtGctatcgAagAgtcgAgttGttGggAATG
CagCTCTaAtTGGGtGGtaaaTTCCATCTaaagcTaaATaTTGcCgAgAgAccgATaGcgAACaAttACa
gtGatGgaAAgATgAAaagAacTTTgaaaagagagtgaaaaatTACatgaaatTgttgAAAgGgAacGgCatTac
AtCAgACTTGgtGtTTTAcgAttatCTTCTCTTcttgagttGtGCaCTCccaTTTcactGggcCggcaTCgATT
CggATGGCAAGATAaTGGCagtTGAaTGTGGCTTCaTTcggTGGAgTgTATAgCTTCTGCTGA
TATTGCCTGTCTGGATCgAGGgcTGcctCTTttgACTAcgAtGCTggcgtAatgaTCTaatgcCgCCcgtC
tTgAaacacgtacca

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 98% identidad

IN - Y - 10 – 10.13

Secuencia consenso 615 pb

TCCGTGTTTTCAAGACGGGCGGCATTAGATCATTACGCCAGCATCCTAGTCAAAGAAGCAG
GCCACGCTCCAAATTGGCAATCAACACACCTAAGCTAGAACACCCCATCGAAGTGAACCA
CATTCAACTGCCATTATCTTGCCATCCGAATCGAGGCTGGCCAGTGAATACGAGTGCAC
AACTCAAGAAGAGAAGATAATCGTAAACACCAAGTCTGATCTAATGCCCTTCCCTTTCAAC
AATTTACGTACTTTTTCACTCTTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGT
CGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCA
TTCCCAAACAACCTCGACTCTTCGATAGCACCTTACATAGGAATGGGCATCTCATCAGACGG
GATTCTCACCTCTATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAGAGCCAACCCAAGGTT
ACCATCTTCAAATTACAACCTCGAACACCGAAGGTGCTAGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCG
CTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCCTGTTGGTTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 97% identidad

IN - Y - 10 – 10.17

Secuencia NL1 570 pb

AtacggcGAGTGAAGCGgCaaaaGCTCaAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTA
ATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAg
AGGGTGAgAATCCCGtCTGAtgAgAtGCCATTCTATGTAAGGTGctatcgAAgAgtCgAGtTGtTT
GggAATGCagCTCTaagTGGGtGGtaaaTTCCATCTaaaGcTaAATATTGgCgAgAgACCgATaGCg
AACaAgTaCagTGatGgaAAgATgAAaagAaCTTTgaaaAgAgagtGaaaaagTACatgaaatTgtGAAAG
GgAagGgCaTTacATCAGACTTGgtGtTTtaCgAttaTCTTCTCTTcttgagTTGTGCACTCgtATTTcAc
TGGgCCagCaTCgATTcggATGGCAAGATAATGGCagTTGAATGTGGCTTCaCTTCggTGGAgT
GTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCgAGGGCTGCgTCTTTTGACTIONGATGCT
GGCgTAaTGATCTAATGCCgCCCGTCTTgAAacACggacc

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% identidad

IN - Y - 10 – 10.18

Secuencia NL1 570 pb

TaacggcgagTGacGCGGCaaAAGCTCaAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCgagctgTAAT
TTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGA
GGGTGAGAATCCCGTCTGATGAgATGCCATTCTATGTAAGGTGCTATCGAAgAGTCgAG
TTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAA
AAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGGAAGGGCATTAgATCAGACTTGGTGTTTTACgATTATC
TTCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCCGGATGGCAAGAT
AATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTG
TCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTIONGATGCTGGCGtAATGATCTAATGCCGCCCGT
CTTGAAacacgAcc

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% identidad

IN - C- 8 – 8.2

Secuencia NL1 565 pb

AcggCGaGTGAAGCGGCaaAAGCTCaAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTA
ATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAg
AGGGTGAgAATCCCGTCTGATGAgATGCCATTCTATGTAAGGTGctatcgAAgAgTCgAGTT
GTTTGGGAATGCAGCTCTaAgTGGGTGGTAAATTCCATCTAAaGCTAAATATTGgCGAgAGAC
CgATAGCGAACAAGTACagTGATGGAAAGATGAAaagAAcTfTgaAaagAgAgTGaaaaagTACatg
aaatTGttgAAAgGgAacGgCatTacATcAgAcTTGgtGtTTfacgAttatCTTCTCTTcttgagtTGtGCACTC
gtATTcacTGggcCggcaTCgATTcggATGGCAAGATAaTGGCagTTGAATGTGGCTTCaCTTCgg
TGGAgTGTTATAgCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCgAGGGCTGCgTCTTTTGACTIONGATGCT
ATGCTGGCGtAaTGATCTAATGCCgCCCGTCTTgAAacacggacc

Identificación

Wickerhamomyces anomalus (*Pichia anomala* o *Hansenula anomala*) – 99% identidad

IN - C - 9 – 9.1

Secuencia NL1 565 pb

GCGAGtGaaGCGgCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATT
TG TAGAAGGTAAC TTTGGGGCTGGTCCTTGtCTATGTTCCCTTGgAACAGGACGTCATAgAGG
GtGAgAATCCCGTGTGGCGAGgATCCCaGTTCTTTGTAAAGtGCTTTcGAAgAGTCgAGTTGTT
TGGGAATGCagCTCTaAgTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCG
ATAGCGAACAAGTACAGtGATGGAAAGATGAAaAgAACTTTgAAAAGAgAgTGAaAAgTACgT
GAAATTGTTGAAAGGgAAgGGCaTTTgATCAgACATGGtGTTTTGCgCCCTCTGCTCCTTGtGG
GTGGGGGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATCTGCA
GGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTGTATATCCTGTAgAAATACTGCCAGCTGGGACTGAG
GACTGCgACTTTACgTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCTTgagcaacgga
cca

Identificación

Torulaspota delbrueckii – 99% identidad
