

Validación del método PCR-RFLP para la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* (Fungi: Saccharomycetaceae)

María Esther Molina Ruíz¹, Carolina Orantes García¹,
María Silvia Sánchez Cortés¹, Alma Gabriela Verdugo Valdez^{1*}

Instituto de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, colonia Lajas Maciel, Código Postal 29039, Chiapas, México. Autor de correspondencia*, e-mail: alma.verdugo@unicach.mx

RESUMEN

Se validó el análisis por PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADNr con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HindI como un método de identificación de levaduras, tomando como referencia los perfiles obtenidos en una investigación previa, cuya identidad se confirmó por la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande (26S) ribosomal, así como los datos reportados por diferentes autores. La validación se hizo con base en un análisis de la varianza de la longitud de los fragmentos de digestión generados con cada una de las enzimas de restricción empleadas. Los resultados obtenidos confirmaron que con el 95% de confianza las diferencias en la longitud de las bandas no presentan diferencias estadísticamente significativas, por lo que esta estrategia puede ser utilizada para la identificación de levaduras como se hizo en los aislados a partir de "taberna" en el estado de Chiapas, México.

Palabras clave. PCR-RFLP, *Saccharomyces cerevisiae*, Taberna.

ABSTRACT

Analysis by PCR-RFLP of the ITS-5.8S rDNA region with the restriction endonucleases HhaI, HaeIII and HindIII as a method of identification of yeasts was validated with reference in profiles obtained in a previous investigation, whose identity was confirmed by sequencing the D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal as well as the data reported by different authors. The validation was carried out based on an analysis of variance of the length of digestion fragments generated with each of the restriction enzymes employed. The results confirmed that with 95% confidence the difference in the length of the bands show no statistically significant difference, so this strategy can be used for identification of yeasts as was done in the isolated from "taberna" in the state of Chiapas, México.

Keywords. PCR-RFLP, *Saccharomyces cerevisiae*, Taberna.

INTRODUCCIÓN

Los productos fermentados han sido generados de manera tradicional desde la antigüedad por la mayoría de los pueblos, y cada cultura se ha abocado en la elaboración de algún producto que le ha dado identidad. Por citar algunos ejemplos, si se habla de Japón el sake se puede usar como referencia; en España, los vinos y sus productos cárnicos (Fernández-Espinar *et al.*, 2006); Italia se distingue también por sus embutidos, al igual que Argentina; México produce tradicionalmente pulque y diversas bebidas destiladas de agave, siendo el tequila el más importante económicamente, seguido por el mezcal y se producen además, otras bebidas fermentadas en diferentes regiones del país (Escalante *et al.*, 2008).

Entre los productos fermentados, las levaduras juegan un papel primordial debido a que estos microorganismos se han utilizado durante siglos por la humanidad (Jesperesen, 2011). Las levaduras tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna, desde la Antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación, y actualmente son usadas como fuente de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos celulares, biomasa y otros productos con valor añadido (Orberá Ratón, 2004).

El papel primario de las levaduras en la manufactura de productos fermentados es catalizar la rápida, completa y eficiente conversión de los azúcares y otros compuestos de la materia prima; como sustrato para su

crecimiento, transformándolos en etanol, dióxido de carbono, alcoholes superiores y sus ésteres, entre otros compuestos metabólicos que en conjunto determinan las características organolépticas del producto final (Capello *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2008).

Por la gran diversidad de levaduras encontradas se necesita de técnicas moleculares rápidas y confiables para diferenciar y en su caso identificar las cepas, un ejemplo es el análisis de las regiones ITS-5.8S por el método de PCR-RFLP para la identificación y de ser posible, la caracterización de cepas; como lo han realizado una serie de investigadores, que han trabajado tanto con bebidas alcohólicas como con otros productos en los que están involucrados diferentes levaduras (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarsozo *et al.*, 1999; Nguyen *et al.*, 2000; Casaregola *et al.*, 2001; Caggia *et al.*, 2001; Beltrán *et al.*, 2002; Sabaté *et al.*, 2002; Escalante-Minakata *et al.*, 2008; Verdugo-Valdez *et al.*, 2011).

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento

Las levaduras se obtuvieron a partir de productos fermentados tradicionales, tales como el mezcal producido en San Luis Potosí y “taberna”, bebida fermentada producida de manera artesanal en el estado de Chiapas, a partir de la fermentación de la savia de la palma de coyol (*Acrocomia aculeata* Jacq. Lodd. ex Mart). Las muestras de cada producto se sembraron después de haberse realizado un conteo directo al microscopio con una cámara de Neubauer, para determinar la dilución en la que se obtuvieran aproximadamente 100 colonias aisladas. De las diluciones anteriores se inocularon 100 μ L por dispersión con varilla acodada en cajas con agar WL suplementado con 0.01% de cloranfenicol, y se incubaron a 29° C desde 3 hasta 5 días para el desarrollo de las colonias.

Análisis PCR-RFLP

Las levaduras se recolectaron directamente por picadura a partir de una colonia aislada y se suspendieron en el tubo de reacción de PCR del Kit Pure Taq Ready-To-Go (GE Healthcare), que contiene una perla, que al disolverla en 25 μ L de agua desionizada la concentración final de los componentes es: 1 U/mL de PuRe Taq DNA polimerasa, 200 μ M de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCl, 50

mM de KCl y 1.5 mM de MgCl₂. Para la amplificación de la región ITS-5.8S del rDNA, se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Las condiciones de la reacción fueron las descritas por Esteve-Zarsozo *et al.* (1999): Desnaturalización a 95° C durante 25 minutos; 35 ciclos de 94° C durante un minuto, 55° C por dos minutos, 72° C por dos minutos y una extensión final a 72° C durante 10 minutos, en un termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystem). La digestión enzimática se llevó a cabo usando las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HindI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los fragmentos de restricción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 3.0% (w/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), mezclando 3 μ L de material amplificado con 1 μ L de buffer de carga 6X (Anexo 1). El perfil de migración se alcanzó a 100 V por 1 hora. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL), se visualizaron bajo luz UV con un transiluminador GelDoc (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se analizaron por comparación con las bandas proporcionadas por el marcador de peso molecular TrackIt 100 pb DNA Ladder (Invitrogen) usando el software QuantityOne (Biorad).

Análisis estadístico

Las bandas obtenidas por la digestión de cada enzima utilizada se sometieron a un análisis de Varianza de una sola vía con el 95% de confianza con el programa Statgraphics Plus.

RESULTADOS

Tomando como modelo para este trabajo a *Saccharomyces cerevisiae*; los perfiles obtenidos de las muestras tomadas del mezcal y de algunos registros de otros autores (cuadro 1) se usaron como referencia para la identificación de las colonias aisladas de la taberna. La identidad de las cepas de referencia se confirmó por secuenciación de la región D1/D2 del gen 26S del rDNA. El cuadro 2 contiene los fragmentos de nucleótidos obtenidos de la región amplificada por PCR y digerida con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI de las colonias aisladas de la taberna producida en el estado de Chiapas. La figura 1 presenta el perfil de bandas obtenido para *S. cerevisiae*.

Levaduras identificadas	Núm. de acceso GenBank	Longitud de los fragmentos de restricción (pb)			Autor de referencia
		HhaI	HaeIII	HinfI	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	JF715188	373-347-138	321-241-180-133	374-127	Verdugo-Valdez <i>et al.</i> , 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1942T	385-365-130	320-230-180-150	365-145	Esteve-Zarzoso <i>et al.</i> , 1999
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AY048154	380-360-160	290-220-165-130	395-145	Coton <i>et al.</i> , 2006

CUADRO 1

Longitud en pares de bases de la región ITS-5.8S de *Saccharomyces cerevisiae* amplificada por PCR y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI.

Perfil	Longitud de los fragmentos de restricción (pb)			Identificación
	HhaI	HaeIII	HinfI	
A	370-360-140	320-230-180-140	380,140	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
B	360-330-140	310-240-180-130	360-120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
C	360-330-140	310-240-180-140	360-120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
D	365-330-140	320-240-180-130	370-120	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
E	365-350-140	330-235-180-130	370-130	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
F	375-350-130	330-240-180-140	370-135	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
G	385-360-140	330-240-180-140	385-125	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
H	385-355-145	325-240-180-130	380-130	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
I	360-340-140	330-235-180-130	370-130	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

CUADRO 2

Perfiles moleculares de la región ITS-5.8S amplificada por PCR y de los fragmentos obtenidos después de la digestión con las endonucleasas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI e identificación de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de "Taberna" en el estado de Chiapas.

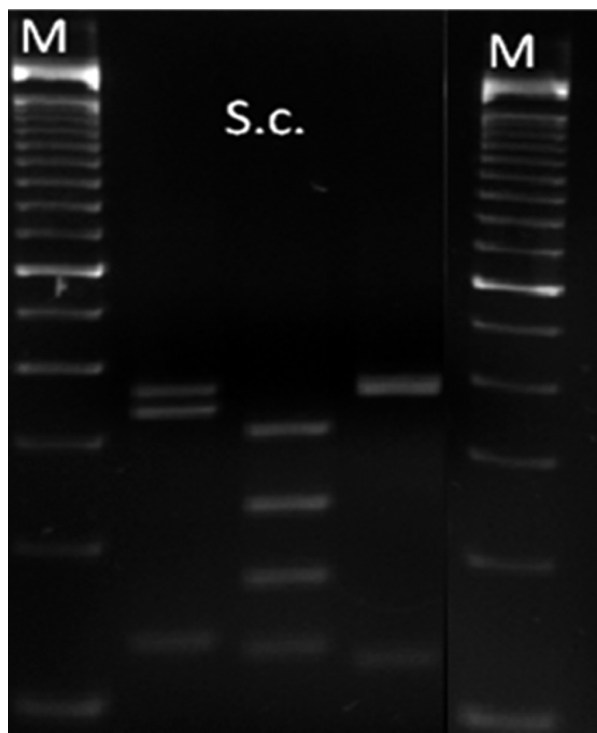


FIGURA 1

Perfil de bandas obtenidas de la digestión de la región ITS-5.8S del ADNr con las enzimas de restricción HhaI, HaeIII e HinfI Abreviaturas: M; marcador de peso molecular de 100 pb; S.c., *S. cerevisiae*.

Después de hacer un ANOVA de una sola vía se confirmó que con un 95% de confianza, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los valores de la longitud en pares de bases de los fragmentos obtenidos después de la digestión con cada una de las endonucleasas de restricción empleadas para la identificación de las levaduras aisladas, como se muestra en el cuadro 3.

Enzima de restricción	p-Valores
Hha I (1,2,3)*	0.0536, 0.1796, 0.3803
HaeIII (1,2,3,4)*	0.1160, 0.0791, 0.0816, 0.6488
HinfI (1,2)*	0.3809, 0.0585

CUADRO 3

Resultados de los p-Valores de la prueba F, después del análisis de varianza de una sola vía con el 95% de confianza. 0* son los valores de cada banda generada por las endonucleasas de restricción usadas para digerir el fragmento de amplificación de la región ITS-5.8S del ADNr.

DISCUSIÓN

Los análisis de restricción de regiones ribosomales han sido usados para identificar especies de levaduras, especialmente aquellas que pertenecen al complejo *Saccharomyces* “*sensu stricto*.” Tal es el caso de la región NTS, el gen 18S con su región vecina NTS o ITS, el gen 18S y diferentes dominios del gen 26S (Fernández-Espinar *et al.*, 2006).

Los genes ribosomales (5.8S, 18S y 26S) están agrupados en tándem formando una unidad de transcripción que se repite en el genoma entre 100 y 200 veces. En cada unidad de transcripción existen otras dos regiones, los espaciadores internos de transcripción (ITS) y los espaciadores externos de transcripción (ETS); estas son regiones que se transcriben pero que no se procesan. A su vez, las unidades codificantes están separadas por los espaciadores intergénicos, también llamados NTS.

Los genes ribosomales 5.8S, 18S y 26S, así como los ITS y NTS, representan herramientas poderosas para identificar especies de levaduras y para establecer relaciones filogenéticas (Fernández-Espinar *et al.*, 2006). La región 5.8S-ITS ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación y caracterización de especies. Los patrones de restricción de esta región se han obtenido por la digestión con las enzimas CfoI (y recientemente su equivalente HhaI), HaeIII e HinfI (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Coton *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Pando Bedriñana *et al.*, 2010; Bautista-Gallego *et al.*, 2011; Verdugo-Valdez *et al.*, 2011). Sin embargo han reportado también que la identificación se confirma por otra herramienta molecular, generalmente una secuenciación. En este trabajo, se hizo una comparación entre perfiles cuya identidad fue confirmada por secuenciación y perfiles obtenidos de muestras de “taberna”, encontrándose que con un análisis de varianza al 95% de confianza, no hay diferencia estadísticamente significativa entre la longitud en pares de bases de los fragmentos de digestión obtenidos, por lo que esta técnica puede usarse por sí sola como una herramienta de identificación para el caso de perfiles de bandas que coincidan con el perfil de *S. cerevisiae*.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se propone que es posible el empleo del análisis de PCR-RFLP como una herramienta de identificación de *S. cerevisiae* con la perspectiva de ampliar su uso para otras especies y contar así con una herramienta de identificación confiable y rápida.

LITERATURA CITADA

- BAUTISTA-GALLEGO, J., F. RODRÍGUEZ-GÓMEZ, E. BARRIO, A. QUEROL, A. GARRIDO-FERNÁNDEZ & F.N. ARROYO-LÓPEZ, 2011. Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Int. J. of Food Microbiol.* 147: 89-96.
- BELTRAN, G., M. J. TORIJA, M. NOVO, N. FERRER, M. POBLET, J. M. GUILLAMÓN, N. ROZÈS & A. MAS, 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.* 25: 287-293.
- CAGGIA, C., C. RESTUCCIA, A. PULVIRENTI & P. GIUDICI, 2001. Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *Int. J. of Food Microbiol.* 71: 71-73.
- CAPELLO, M.S., G. BLEVE, F. GRIECO, F. DELLAGLIO & G. ZACHEO, 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97: 1274-1280.
- CASAREGOLA, S., H-V. NGUYEN, G. LAPATHITHIS, A. KOTYK & C. GAILLARDIN, 2001. Analysis of the constitution of the beer yeasts genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51: 1607-1618.
- COTON, E., M. COTON, D. LEVERT, S. CASAREGOLA & D. SOHIER, 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. of Food Microbiol.* 108:130-135.
- ESCALANTE, A., M. GILES GÓMEZ, G. HERNÁNDEZ, M. S. CÓRDOVA AGUILAR, A. LÓPEZ MUNGUÍA, G. GOSSET & F. BOLÍVAR, 2008. Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int. J. of Food Microbiol.* 124: 126-134.
- ESCALANTE-MINAKATA, P., H. P. BLASCHEK, A. P. BARBA DE LA ROSA, L. SANTOS & A. DE LEÓN-RODRÍGUEZ, 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Let. in Appl. Microbiol.* 46: 626-630.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., C. BELLOCH, F. URUBURU & A. QUEROL, 1999. Identification of yeasts by RFLP análisis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., P. MARTORELL, R. DE LLANOS & A. QUEROL, 2006. *Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages*. The Yeasts Handbook. Yeasts in Foods and Beverages. Querol A. y Fleet G. H. (eds). Springer. 445 p.
- GONZÁLEZ, S. S., E. BARRIO & A. QUEROL, 2006. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J. of App. Microbiol.* 1-8.
- GUILLAMÓN, J. M., J. SABATÉ, E. BARRIO, J. CANO & A. QUEROL, 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 16: 387-392.
- JEPERSEN, L., D.S. NIELSEN, S. HØNHOLT & M. JAKOBSEN, 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 5: 441-453.

- NGUYEN, H-V., A. PULVIRENTI & C. GAILLARDIN, 2000. Rapid defferentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of rDNA non transcribed spacer 2. *Canadian J. Microbiol.* 46 (12):1115-1122 ProQuest Medical Library.
- ORBERÁ RATÓN, T., 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Santiago de Cuba, Cuba. *Revista Iberoamericana Micología.* 21:15-19.
- PANDO-BEDRIÑANA, R., A. QUEROL-SIMÓN & B. SUÁREZ-VALLES, 2010. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiol.* 27:503-508.
- SABATÉ, J., J. CANO, B. ESTEVE-ZARZOSO & J. M. GUILLAMÓN, 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157: 267-274.
- VERDUGO VALDEZ, A., L. SEGURA GARCÍA, M. KIRCHMAYR, P. RAMÍREZ RODRÍGUEZ, A. GONZÁLEZ ESQUINCA, R. CORIA & A. GSCHAEDLER MATHIS, 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leewenhoek.* 100: 497-506.