

PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S como herramienta de identificación de levaduras: ventajas y desventajas

PCR-RFLP of the ITS-5.8S regions as an identification tool for yeasts: advantages and disadvantages

Luis E. Segura G.¹, Manuel R. Kirchmayr¹, Ericka P. Flores B.¹, Anne C. Gschaedler M.¹
luisedosegun@hotmail.com / manukir@yahoo.de / flores@ciatej.net.mx / agschaedler@ciatej.net.mx

Recibido: septiembre 22, 2009 / Aceptado: enero 25, 2010 / Publicado: enero 28, 2010

RESUMEN. Las levaduras juegan un papel muy importante en los procesos de fermentación de bebidas y alimentos, por lo que es necesario identificarlas. A finales de los años 90 se propuso la técnica de análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ITS-5.8S como una herramienta rápida y confiable para identificarlas. En este trabajo se analizaron 104 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la colección de CIATEJ. Además se analizaron los patrones de bandas publicados hasta el momento para levaduras, lo que nos permitió establecer el parámetro de error de dicha técnica. A partir de este análisis se comprobó que esta técnica es rápida y confiable en la gran mayoría de los casos, sin embargo para algunas especies de levaduras existen ambigüedades en los patrones publicados o no permite diferenciar especies cercanas.

Palabras clave: Levadura, *Saccharomyces cerevisiae*, identificación, técnica molecular, alimentos y bebidas fermentados.

ABSTRACT. Yeasts play an important role in foods and beverages fermentation process, so it is necessary to identify them. In the late 90's a technique based on the restriction fragments length polymorphism (RFLP) of the ITS-5.8S regions was proposed as a fast and reliable tool to identify them. In this study 104 strains of *Saccharomyces cerevisiae* were analyzed from the CIATEJ collection. Also all the polymorphism patterns published in yeast were analyzed too which allowed us to set the parameter error of this technique. From this analysis it was found that this technique is fast and reliable in most cases, however for some yeast species there are ambiguities in the published standards or does not differentiate closely related species.

Keywords: Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, identification, molecular technique, fermented foods and beverages.

INTRODUCCION

Las levaduras juegan un papel muy importante en el proceso de fermentación de bebidas alcohólicas y de algunos alimentos. Los procesos de fermentación son utilizados para la conservación de algunos alimentos, hacer el producto más digerible o incrementar su valor nutricional.

En la elaboración de bebidas alcohólicas en general, *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que principalmente produce etanol en la fermentación. Durante la elaboración del vino al inicio de la fermentación se desarrollan varias especies de levaduras no-*Saccharomyces* de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metchnikowia*, *Pichia* que le confieren notas características al producto final. Estas levaduras son importantes debido a la capacidad que tienen de producir compuestos aromáticos al inicio de la fermentación y son reemplazadas debido a su baja tolerancia a etanol y por no tener la capacidad de fermentar todos los azúcares presentes en el mosto [1-2]. Las levaduras del género *Hanseniaspora* y algunas especies del género *Candida* con capacidad para fermentar presentan actividad proteolítica, glicosidasa y pectinolítica en diferentes alimentos fermentados y bebidas alcohólicas

¹ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), Normalistas 800 Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, 44270, Jalisco, México. www.ciatej.net.mx

además de producir metabolitos secundarios. En alimentos como queso y salami, *Debaryomyces hansenii* incrementa el pH y actúa sinérgicamente con bacterias produciendo factores de crecimiento y *Yarrowia lipolytica* presenta actividad lipolítica, proteolítica y ureasa favoreciendo la reducción de la rancidez de la grasa [3].

Debido a su gran importancia en los procesos de fermentación, es necesario identificarlas por lo que se debe contar con una técnica rápida, confiable y económica para ello. Las técnicas morfofisiológicas convencionales son tardadas ya que requieren de la realización de muchas pruebas para lograr una correcta identificación, y son poco reproducibles y en ocasiones conducen a una identificación errónea.

Las técnicas moleculares que existen actualmente para identificar levaduras fueron desarrolladas como una alternativa a las pruebas morfofisiológicas tradicionales y para obtener una rápida identificación. Las 4 técnicas más utilizadas actualmente son: secuenciación de las regiones ribosomales, siendo la región D1/D2 del gen 26S la más utilizada, el estudio del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de las regiones ribosomales, principalmente las regiones ITS-5.8S, electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (PCR-DGGE) empleando iniciadores universales y PCR en tiempo real [4]. La técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S se desarrolló como una alternativa de identificación de levaduras de manera rápida para su utilización en la industria. Esta técnica ha sido utilizada por diferentes autores para identificar levaduras aisladas de diferentes fuentes como mostos de vinos [1,5-10], cidra [11], jugo de naranja [12], miel [13], cerveza de sorgo [14], masa [15], productos lácteos [16-18] y recientemente en muestras clínicas para la identificación de levaduras y hongos patógenos [19-21].

El objetivo de este trabajo fue analizar mediante la técnica de PCR-RFLP de las regiones ITS-5.8S, 104 cepas de *S. cerevisiae* de la colección de levaduras del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), además de analizar los patrones de bandas de todas las especies de levaduras publicados hasta el momento por distintos autores, con el fin de determinar el rango de error de la técnica.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio se analizaron 104 cepas de *S. cerevisiae* de la colección de CIATEJ aisladas de diferentes procesos de fermentación. La gran mayoría de las cepas estudiadas fueron aisladas de procesos de elaboración de bebidas derivadas de *Agave*, principalmente mezcal y tequila.

PCR amplificación

La técnica utilizada para la amplificación por PCR fue adaptada de la descrita por Esteve-Zarzoso y colaboradores en 1999 [23]. Las regiones ITS-5.8S rADN fueron amplificadas con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Las mezclas para PCR fueron hechas con perlas de PCR puReTaq® Ready-To-Go PCR (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) en un volumen total de 25 µL conteniendo 1 µL de muestra de ADN previamente extraído con la técnica de Tapia-Tussell y colaboradores [22] y 0.5 µM de cada iniciador. La amplificación fue realizada en un termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) programado bajo las siguientes condiciones: etapa inicial de desnaturalización a 95°C por 15 min y 35 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 2 min, 72°C por 2 min, seguido por 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa ultrapura (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) al 1% teñido con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), y fotografiado en un transiluminador UV GelDoc system (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). El tamaño de los fragmentos fue estimado mediante comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt 100 bp DNA ladder, Invitrogen) y con el software Quantity One (Bio-Rad).

Digestión del ADN

Para el análisis de restricción de las regiones ITS-5.8S se siguió la metodología de Esteve-Zarzoso y colaboradores [23]. Se tomaron alícuotas de 7 μ L del producto de PCR y se digirieron con 1 U de enzima de restricción en 25 μ L de volumen de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las enzimas de restricción utilizadas fueron *Hha* I, *Hae* III y *Hinf* I (Invitrogen). La reacción fue incubada a 37°C por 2 h y los productos de restricción se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa ultrapura (Invitrogen) al 3%. Todas las electroforesis fueron realizadas en cámaras de electroforesis de 13 X 16.7 cm (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) a 120 V por 80 min, en TAE 1X. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) y fotografiado en un transiluminador UV GelDoc system (Bio-Rad). El tamaño de los fragmentos fue estimado por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (TrackIt 100 bp DNA ladder, Invitrogen) y con el software Quantity One (Bio-Rad).

Secuenciación de los productos de PCR

Para la secuenciación de las regiones ITS-5.8S. Los productos de PCR, se amplificaron con los iniciadores ITS1 e ITS4 y se enviaron las muestras a Macrogen USA (Rockville, Maryland) para limpieza y secuenciación. La comparación de las secuencias fue realizada con la base de datos en línea Blast del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El análisis de las secuencias se realizó con el programa CLC Sequence Viewer 6 (CLCbio) disponible en línea (<http://www.clcbio.com>), primeramente se alinearon las secuencias y con el mismo programa se busco el sitio de corte de cada una de las enzimas para la realización de un RFLP *in silico* de las secuencias digitales, obteniendo el número y tamaño de los fragmentos generados por cada una de las enzimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la [Tabla 1](#) se muestra el promedio del tamaño de los fragmentos de restricción de las cepas analizadas y la desviación estándar obtenida al realizar el análisis de RFLP de las 104 cepas de *S. cerevisiae* en donde se observa una desviación estándar de 10 pb, considerando el promedio de todas las desviaciones estándar de los fragmentos generados por las tres enzimas de restricción. Asimismo se muestran los tamaños de los fragmentos de restricción para *S. cerevisiae* reportados por diferentes autores. Para comprobar que la variación en el tamaño de restricción era causado solo por la técnica y no por diferencia en la secuencia, se tomaron 10 cepas que presentaban tamaños de fragmentos distintos y se secuenciaron los productos de PCR amplificados con ITS1 e ITS4, y se observó que los fragmentos de las 10 cepas tenían variaciones de cambio de base en 2 o 3 bases sin afectar el sitio de corte, por lo que los fragmentos de restricción deberían de ser iguales. Es por esto que se atribuye la variación en los resultados únicamente a las condiciones de migración del gel. En nueve trabajos reportan los tamaños de los fragmentos de restricción de *S. cerevisiae* en diferentes procesos de fermentación y alimentos (vino, cidra, cerveza, cerveza de sorgo, masa y miel) y la desviación estándar observada es semejante a la encontrada con las cepas analizadas en este trabajo.

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos de restricción de las regiones ITS-5.8 S de las cepas de *S. cerevisiae* obtenidos en este trabajo y de los reportados por diferentes autores.

Especie de levadura	Producto de PCR	Enzimas de restricción											Referencia
		Hha I			Hae III				Hinf I				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	385	365	130	320	230	180	150	365	180	155	[13]	
	880	385	365		320	230	180	130	360	350	180	[1]	
	880	380	360	160	290	220	165	130	395		145	[11]**	
	880	385	365		320	230	180	150	365		155	[23]	
	880	385	365		320	220	180	145	365		155	[24]	
	850				325	230	170	125	375	365	110	[14]	
	880				320	220	180	145	370	370	130	[15]	
	850	390	360		310	220	170	150	340	340	150	[10]	
	850	375	325	150	325	230	170	125	375	365	110	[28]	
X	870	384	358	147	317	226	175	139	368	358	146		
s	15	4.76	14.7	15.3	10.9	5.27	6.12	11.1	14.6	12.5	25.8		
X*	850	360	334	135	72	310	232	173	129	76	364	121	77
s	10	14	8.9	8.6	8.5	15	12	11	8.8	5.8	17	7.8	6.1

*Promedio del resultado de las 104 cepas de *S. cerevisiae* analizadas en este estudio.

(X) Promedio

(s) Desviación estándar

** Patrones de bandas publicados por Coton y colaboradores en 2006 que se invirtieron para las enzimas *Hae III* y *Hinf I*

De manera general existen publicados los tamaños de los fragmentos de restricción de casi 200 especies de levaduras diferentes. Al realizar una revisión de dichos patrones encontramos que para algunas especies de levaduras existen más de un patrón reportado por diferentes autores como se puede observar en la [Tabla 2](#). El promedio de las variaciones encontradas para estos patrones de bandas es de 14pb. Para la realización de este análisis algunos de los patrones publicados por Coton y colaboradores [11], se invirtieron para las enzimas *Hae III* y *Hinf I* ya que al comparar los patrones de bandas con los publicados por otros autores hay una correspondencia mayor al invertirlos.

Tabla 2. Patrones de bandas de varias especies de levaduras con más de un patrón publicado.

Especie de levadura	Producto de PCR	Enzimas de restricción												Referencia
		Hha I				Hae III				Hinf I				
<i>Candida boidinii</i>	690	325	295			690				345	175	140		[11] ***
	750	350	310	90		700				390	190	160		[23]
	700	330	295			700				370	180	145		[24]
	700	330	300			700				370	180	145		[24]
	X	710	334	300	90		698				369	181	148	
s	27.1	11.1	7.07			5				18.4	6.29	8.66		
<i>Candida sake</i>	450	250	200			450				230	220			[23]
	470	250	210			445				230	210			[24]
	430	230	200			430				220	210			[11]
	X	450	243	203			442				227	213		
	s	20	11.5	5.77			10.4				5.77	5.77		
<i>Candida stellata</i>	475	215	110	90	60	475				235	235			[1]
	450	200	110			450				215	215			[11]
	475	215	110	80	60	475				235	235			[23]; [8]
	500	220	130			480				260	240			[24]
	500	220	130			480				260	240			[24]
	480	210	105	105	60	480				240	240			[25]
	470	220	110	80	60	470				235	235			[10]
	X	479	214	115	88.8	60		473			240	234		
s	17.5	7.32	10.4	11.8	0		10.7			15.8	8.86			
<i>Candida tropicalis</i>	500	265	235			395	90			250	250			[11]
	550	280	250			450	90			270	270			[23]; [24], [8]
	X	525	273	243			423	90		260	260			
	s	35.4*	10.6	10.6			38.9*	0			14.1	14.1		
<i>Candida vini</i>	500	230	180	90		500				220	220	60		[23]
	480	230	170			480				240	240			[24]
	X	490	230	175	90		490			230	230	60		
s	14.1	0	7.07			14.1				14.1	14.1			
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	750	320	310	105		750				350	200	180		[23]
	750	320	310	115		750				340	190	170	60	[25]
	775	320	310	105		775				385	200	160	80	[6]
	X	758	320	310	108		758			358	197	170	70	
	s	14.4	0	0	5.77		14.4			23.6*	5.77	10	14.1	
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	750	275	185	150	95	460	120	90	80	390	360			[23]
	750	275	150	135	95	460	120	90	80	390	360			[23], [8]
	775	290	160	140	100	480	130	105	90	385	385			[6]
	X	758	280	165	142	96.7	75	467	123	95	388	368		
	s	14.4	8.66	18	7.64	2.89	0	11.5	5.77	8.66	5.77	2.89	14.4	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	745	315	305	105		745				350	200	175		[11] ***
	760	320	315	105		760				360	200	180		[24]
	750	320	310	115		750				340	190	170	60	[25]
	750	330	310	110		750				370	200	180		[10]
	750	320	310	105		750				350	200	180		[23]; [8], [1]
	775	320	310	105		775				385	200	160	80	[6]
	X	755	321	310	108		755			359	198	174	70	
	s	11	4.92	3.16	4.18		11			16.3	4.08	8.01	14.1	
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	730	620	110			730				235	210	160	105	[11] ***
	750	630	120			750				250	220	170	105	[23]
	775	670	105			775				250	220	160	110	[6]
	X	752	640	112			752			245	217	163	107	
	s	22.5*	26.5*	7.64			22.5*			8.66	5.77	5.77	2.89	

	525	200	180	70	60	380	90	40	220	150	140	[1]
	450	205	190	95		390	95		210	170		[8]
<i>Issatchenkia orientalis</i>	480	240	100	80	70	320	100	55	260	110	110	[25]
	490					380	110		210	150	130	[15]
X	486	215	157	81.7	65	368	98.8	47.5	225	145	127	
s	30.9	21.8*	49.3	12.6	7.07	32*	8.54	10.6	23.8*	25.2*	15.3	
	425	120	95	75	70	290	120		225	100	95	[1]
<i>Issatchenkia terricola</i>	450	130	100	90	85	290	125		240	105	105	[23]; [8]
	460	120	95	95	70	290	130		240	110	100	[25]
X	445	123	96.7	86.7	75	290	125		235	105	100	
s	18	5.77	2.89	10.4	8.66	8.66	0	5	8.66	5	5	
	375	205	90	80		280	100		190	175		[1]
	380	195	95	90		265	105		190	180		[11] ***
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	205	100	95		280	100		200	190		[23]
	390	210	100			285	100		200	190		[24]
	400	205	100	95		280	100		200	190		[25]
X	389	204	97	90		278	101		196	185		
s	11.4	5.48	4.47	7.07		7.58	2.24		5.48	7.07		
	640	560				580			315	315		[11] ***
<i>Pichia anomala</i>	650	575				600	50		310	310		[23]
	680	600				600	80		340	310		[10]
X	657	578				593	65		322	312		
s	20.8*	20.2				11.5	21.2		16.1	2.89		
	480	240	170	70		480			265	215		[11] ***
<i>Pichia delftensis</i>	500	260	180	60		500			270	230		[23]
X	490	250	175	65		490			268	223		
s	14.1	14.1	7.07	7.07		14.1			3.54	10.6		
	450	120	84	70		260	80		260	120		[12]
	450	170	100	100	80	340	90		250	200		[1]
<i>Pichia fermentans</i>	450	170	100	100	80	340	80	30	250	200		[23]
	470	170	110	80		340	85		260	210		[24]
X	455	158	98.5	87.5	80	320	83.8	30	255	183		
s	10	25	10.8	15	0	40	4.79		5.77	41.9		
	460	160	100	90	75	315	90	55	270	195		[11] ***
	500	260	110	75		330	90	50	275	200		[23]
<i>Pichia membranifaciens</i>	500	175	110	90	75	330	90	50	275	200		[23], [13]
	500	180	120			340	100		280	220		[24]
X	490	194	110	85	75	329	92.5	51.7	275	204		
s	20	45	8.16	8.66	0	10.3	5	2.89	4.08	11.1		
	640	320	240	80		425	215		340	225	75	[23], [13]
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	640	320	240			425	215		340	225		[24]
X	640	320	240	80		425	215		340	225	75	
s	0	0	0			0	0		0	0		
	830	350	330	140		490	210	130	360		120	[11] ***
<i>Saccharomyces bayanus</i>	880	385	365			500	220	145	365		155	[23], [24]
	850					495	230	125	375	365	110	[14]
X	853	368	348	140		495	220	133	367	365	128	
s	25.2*	24.7*	24.7*			5	10	10.4	7.64		23.6*	
	675	320	200	90		400	200	75	400	275		[23]
<i>Saccharomyces exiguus</i>	750	375	300			500	250		350	250	150**	[28]
X	713	348	250	90		450	225	75	375	263	150	
s	53*	38.9*	70.7*			70.7*	35.4*		35.4*	17.7		

	880	385	365			320	230	180	150	440	440		[23]	
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	850					325	230	170	125	375	365	110	[14]	
	850	375	325	150		325	230	170	125	375	365	110	[28]	
	X	860	380	345	150	323	230	173	133	397	390	110		
s	17.3	7.07	28.3			2.89	0	5.77	14.4	37.5	43.3	0		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> var. <i>pombe</i>	1050	600	400			1050				600	450		[23]	
	950	525	375			950				500	425		[23]	
	X	1000	563	388		1000				550	438			
	s	70.7*	53*	17.7			70.7*				70.7*	17.7		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	790	320	270	95	95	690	90			340	225	160	55	[23]
	775	330	295			700				340	230	175		[24]
	770	310	270	95	90	700	70			330	220	160	60	[25]
	X	778	320	278	95	92.5	697	80			337	225	165	57.5
	s	10.4	10	14.4	0	3.54	5.77	14.1			5.77	5	8.66	3.54
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	825	350	285	100	90	725	100			425	400		[23]	
	825	330	220	150	100	800				425	400		[23]	
	X	825	340	253	125	95	763	100		425	400			
s	0	14.1	46*	35.4*	7.07	53				0	0			
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	750	290	200	170	90	400	210	90		350	260	140	[23], [13]	
	725	295	205	175		400	220			335	240	150	[24]	
	X	738	293	203	173	90	400	215	90	343	250	145		
s	17.7	3.54	3.54	3.54		0	7.07			10.6	14.1	7.07		

(X) Promedio

(s) Desviación estándar

* Desviaciones estándar por arriba de 20pb

** Fragmentos por arriba de 100pb que solo son reportados por algún autor

*** Patrones de bandas publicados por Coton y colaboradores en 2006 que se invirtieron para las enzimas *Hae* III y *Hinf* I

En la [Tabla 3](#) se muestran distintos patrones de bandas publicados para *Cryptococcus laurentii*, *Debaromyces polymorphus*, *Dekkera anomala* y *Rhodotorula glutinis*. Una hipótesis sería que estas levaduras no pertenecen a la misma especie o que existe una variación en la secuencia estudiada para estas especies. En estos casos sería importante disponer del estudio morfofisiológico y de la secuencia del dominio D1/D2 o de las regiones ITS-5.8S de cada una de las cepas para comprobar su identidad.

Tabla 3. Patrón de bandas para una misma especie publicados con mayor diferencia.

Levaduras	Producto de PCR	Enzimas de restricción										Referencia	
		Hha I				Hae III			Hinf I				
<i>Cryptococcus laurentii</i>	600	575				600			340	260		[23]	
	550	290	260			375	100		270	270		[23]	
X	575	433	260			488	100		305	265			
s	35.4	202				159			49.5	7.07			
<i>Debaromyces polymorphus</i>	730	300	200	180	100	650	80		310	200	140	100	[23]
	650	300	300	50		420	150	90	325	325			[23]
X	690	300	250	115	100	535	115	90	318	263	140	100	
s	56.6	0	70.7	91.9		163	49.5		10.6	88.4			
<i>Dekkera anomala</i>	540	280	155	85		220	220	90	420	120			[11]
	800	340	340	120		800			360	190	160	80	[23]
X	670	310	248	103		510	220	90	390	155	160	80	
s	184	42.4	131	24.7		410			42.4	49.5			
<i>Rhodotorula glutinis</i>	640	320	240	80		430	210		340	225	75		[23]
	640	320	240			430	210		170	150			[24]
X	640	320	240	80		430	210		255	188	75		
s	0	0	0			0	0		120	53			

(X) Promedio

(s) Desviación estándar

Es importante mencionar que para algunas especies de levaduras los patrones de bandas son muy similares lo que resulta difícil la correcta identificación como es el caso de *Kluyveromyces lactis* y *Kluyveromyces marxianus* que se muestran en la [Tabla 4](#). Estas dos especies de levaduras no solo presentan problemas de identificación molecular sino también la correcta identificación morfofisiológica es complicada, ya que no existe una prueba definitiva la cual marque una correcta diferencia entre estas dos especies. Nguyen y colaboradores [26], proponen el uso de otros iniciadores y el corte con la enzima *Alu I*, y de esta manera poder hacer la diferenciación entre *K. lactis* y *K. marxianus*.

Tabla 4. Patrones de bandas de tres cepas de *Kluyveromyces*.

Levaduras	Producto de PCR	Enzimas de restricción										Referencia	
		Hha I				Hae III		Hinf I					
<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	285	190	165	90	655	80	290	180	120	80	65	[23]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	745	295	190	160	100	620	80	270	200	130	85		[11] *
	740	285	185	140	100	655	80	240	185	120	80	65	50

* Patrones de bandas publicados por Coton y colaboradores en 2006 que se invirtieron para las enzimas *Hae III* y *Hinf I*

Como se ha demostrado en las [Tablas 1 y 2](#), en la gran mayoría de los casos la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S es válida y confiable para la identificación de las levaduras más comunes. González y colaboradores [7], identificaron levaduras aisladas de fermentación de vino tan solo con la utilización de esta técnica bajo las condiciones que reporta Esteve Zarzoso [23]. Debido a que la gran mayoría de los estudios realizados con esta técnica han sido en levaduras del vino se logra la identificación de todas las levaduras analizadas. Por lo que se demuestra el gran potencial de esta técnica como herramienta de identificación rápida de levaduras una vez que se tienen los patrones de los fragmentos de restricción de todas ellas.

Como ya se ha mencionado en varios trabajos, las técnicas moleculares son más rápidas y confiables que las morfofisiológicas. En estudios recientes De Llanos y colaboradores, comparan el sistema Vitek y las galerías API-32C con la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S. Analizaron 101 cepas identificadas como *S. cerevisiae* (por API-32C y Vitek) encontraron 3 patrones de bandas de restricción diferentes correspondientes a *C. glabrata*, *K. lactis* y *C. cantarellii* [19 y 20], mostrando que las bases de datos para los kits utilizados en ese estudio son restringidas a unas cuantas especies, lo que llega a generar esos errores de identificación.

Las enzimas más utilizadas para la generación de los fragmentos de restricción son la *Hha* I (homólogo *Cfo* I), *Hae* III y *Hinf* I, para complementar el análisis y realizar una identificación más certera. Recientemente para aquellas especies en donde el patrón generado con esas enzimas es el mismo, es necesario utilizar otras endonucleasas que generen patrones de polimorfismo diferentes para cada especie. Cadez y colaboradores [27] analizaron 7 diferentes especies de *Hanseniaspora* con 11 enzimas de restricción diferentes obteniendo que si se adiciona *Dde* I como la cuarta enzima permite diferenciar las especies de *Hanseniaspora*. Nisiotou y Nichas en 2007 [25], proponen el uso de *Dra* I para diferenciar *H. guilliermondii* de *H. opuntiae*, y con esta misma enzima generaron un patrón de bandas para *C. stellata* y otro para *C. zemplinina*. Fernández Espinar y colaboradores en 2000 [28], proponen el uso de *Hpa* II y *ScrF* I para la diferenciación de *S. cerevisiae* de *S. paradoxus* sin embargo estas enzimas no diferencian *S. bayanus* de *S. pastorianus*. Esteve Zarzoso y colaboradores [29], comparan la secuencia de la región 18S rADN de *Z. cidir* y *Z. fermentati* y encuentran que más del 99.5% de la secuencia es similar entre ellas, por lo que no es posible diferenciarlas. Debido a que el análisis es sobre una región muy conservada, cabe la posibilidad de que algunas especies lleguen a tener una secuencia muy parecida por lo que solo en algunos casos sería necesario el estudio de otra región. Por ejemplo, Romero y colaboradores [30], proponen para la diferenciación de *H. guilliermondii* de *H. opuntiae* y *K. lactis* de *K. marxianus*, la amplificación de la región IGS localizada entre la 26S y la 18S, el problema es que los productos de PCR son de 2500 pb a 4200 pb (mas difícil de separar en geles de agarosa convencionales) comparado con las regiones ITS-5.8S que es de 380 pb a 1050 pb.

Una desventaja al realizar el análisis es no encontrar un patrón de bandas igual al que se obtuvo, ya que aun no se han reportado todos los patrones de bandas para todas las especies. Como posible solución al problema de no tener los patrones de bandas reportados previamente, Raspor y colaboradores [31], propone la realización de RFLP *in silico*. El problema que representa esta técnica, es que, no se encuentran las secuencias de las regiones ITS-5.8S de todas las especies o no están completas y al no saber o no tener una idea de la especie a identificar es muy complicado llegar a encontrar el patrón que corresponda al realizar el análisis *in silico*. Ya que para esta técnica se debe de realizar el análisis para todas las especies de levaduras reportadas, con una probabilidad muy baja de llegar a encontrar el patrón que corresponda al de la levadura en cuestión.

Otro problema en el análisis de los patrones de restricción es que en los artículos que publican patrones de bandas no reportan todas las condiciones en las que realizaron la técnica y es indispensable conocerlas para poder realizar la técnica bajo las mismas condiciones a fin de comparar los patrones de bandas con los propios generados en el laboratorio con fines de identificación. La variación encontrada en los resultados reportados de la técnica se puede deber a las diferentes condiciones de electroforesis utilizada por cada investigador. Las condiciones que más influyen en la variación de los resultados es la concentración de agarosa que va de 1.5% a 3%. Esteve-Zarzoso y colaboradores, recomiendan el uso de agarosa al 3% para la electroforesis de los fragmentos de restricción [23]. Además, otros factores que influyen en el resultado final son el voltaje de migración de 70V a 180V así como el tiempo de migración que no son señalados en muchos de los artículos; el tipo de amortiguador que se utiliza para la

electroforesis, ya que algunos autores emplean TAE y otros TBE en concentraciones de 1X y 0.5X. Otro factor importante es el marcador de peso molecular utilizado para hacer la estimación del tamaño de los fragmentos de restricción y la manera en que se estiman los tamaños de los fragmentos. Únicamente en tres de los artículos revisados se reporta la utilización de un software especializado para la estimación del tamaño de los fragmentos de restricción, por lo que, la estimación manual del tamaño de los fragmentos podría ser otra variable a considerar en la variación de los resultados. Debido a esto se recomienda la utilización de las mismas condiciones para que no exista una variación tan grande entre los resultados de cada laboratorio y se pueda realizar la comparación de los fragmentos de restricción publicados en todos los artículos con fines de identificación de levaduras. En la [tabla 5](#) se resumen las ventajas y desventajas de la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S

Ventajas	Desventajas
Rápida identificación para realizar de rutina, cuando se tiene el patrón de bandas previamente reportado.	Si no se encuentra un patrón de bandas igual no se logra realizar la identificación.
Económica, una vez que se tiene montada la técnica en el laboratorio.	Montar la técnica requiere de una infraestructura especializada (Laboratorio de biología molecular).
Confiable, ya que si el patrón de bandas coincide con los previamente publicados, no es necesario realizar la secuenciación para confirmar la identidad.	
Se pueden generar nuevos patrones de bandas que se depositan en las bases de datos, incrementado la posibilidad de identificar especies en estudios posteriores.	

Una vez que ya tiene uno los patrones de bandas establecidos para cada una de las levaduras con las que se va a trabajar, esta técnica es muy sencilla y se puede hacer un monitoreo de la levadura o levaduras en cuestión. Actualmente existe una base de datos en línea donde se encuentran los patrones de bandas de todas las levaduras analizadas hasta el momento en la dirección web <http://yeast-id.com>.

CONCLUSIÓN

Considerando que no todos los laboratorios cuentan con un secuenciador para la identificación de levaduras, este trabajo demuestra que la técnica de RFLP es una excelente opción para la identificación sin necesidad de secuenciar para confirmar, lo que permite ahorrar tanto tiempo como recursos económicos.

El problema más común para la identificación de levaduras mediante la técnica de RFLP de las regiones ITS-5.8S, es la comparación de los patrones de bandas obtenidos con los publicados por otros grupos de investigación, por esta razón en base a las desviaciones estándar obtenidas para todos los fragmentos de restricción de las tres enzimas se establece un parámetro de error de 20 pb al momento de hacer la comparación de los patrones de bandas.

Una sugerencia para estandarizar las condiciones se recomiendan las siguientes condiciones durante las etapas de digestión y electroforesis: 2 h de digestión con las enzimas de restricción y para la electroforesis de los fragmentos, geles de agarosa al 3% en TAE 1X y migración a 120V durante 80min. Además llevar a cabo la estimación del tamaño de los fragmentos de restricción con el marcador de peso molecular de 100 pb y analizar los geles con un software para realizar las interpolaciones sin considerar fragmentos menores a 80 pb ya que bajo estas condiciones es difícil llegar a detectarlos.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto SEP-CONACYT 24556

BIBLIOGRAFIA

- [1] Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., Rodríguez-Vico, F. (2004). Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* **21**: 149-155.
- [2] Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud Funel, A., Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology* **125**: 197-203.
- [3] Romano, P., Capece, A., Jespersen, L. (2006). Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. "Yeasts in Food and Beverages". Amparo Querol y Graham Fleet (Eds.). 13-53. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
- [4] Fernandez-Espinar, M. T., Marorell, P., De Llanos, R., Querol, A. (2006). Molecular methods to identify and characterize yeast in foods and beverages. "Yeast in Food and Beverages". Amparo Querol y Graham Fleet (Eds.). 55-82. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
- [5] Espinosa, J. C., Fernandez-Gonzalez, M., Ubeda, J., Briones, A. (2002). Identification of wine yeast by PCR-RFLP without previous isolation on plate. *Food Technology and Biotechnology* **40**: 157-160.
- [6] Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., E., G.-M., Uruburu, F., Querol, M. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2056-2061.
- [7] González, S. S., Barrio, E., Querol, A. (2006). Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *Journal of Applied Microbiology* **102** (4): 1018-1025.
- [8] Hierro, N., González, A., Mas, A., Guillamón, J. M. (2006). Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentation effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research* **6**: 102-111.
- [9] Las Heras-Vázquez, F. J., Mingorance-Cazorla, L., Clemente Jimenez, J. M., Rodríguez-Vico, F. (2003). Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Research* **3**: 3-9.
- [10] Renouf, V., Falcou, M., Miot-Sertier, C., Perello, M. C., De Revel, G., Lonvaud Funel, A. (2006). Interactions between *Brettanomyces bruxellensis* and other yeast species during the initial stages of winemaking. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1208-1219.
- [11] Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **108**: 130-135.
- [12] Arias, C. R., Burns, J. K., Friedrich, L. M., Goodrich, R. M., Parish, M. E. (2002). Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1995-1961.
- [13] Carvalho, C. M., Rocha, A., Estevinho, M. L. F., Choupina, A. (2005). Identification of honey yeast species based on RFLP analysis of the ITS region. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* **5**: 11-17.
- [14] Naumova, E. S., Korshunova, I. V., Jespersen, L., Naumov, G. I. (2003). Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Research* **3**: 177-184.
- [15] Pulvirenti, A., Caggia, C., Restuccia, C., Gullo, M., Giudici, P. (2001). DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs. *Annals of Microbiology* **51**: 107-120.
- [16] Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., Giudici, P. (2001). Identification of *Pichia anomala* isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. *International Journal of Food Microbiology* **71**: 71-73.
- [17] Vasdinyei, R., Deák, T. (2003). Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* **86**: 123-130.

- [18] El-Sharoud, W. M., Belloch, C., Peris, D., Querol, A. (2009). Molecular Identification of Yeasts Associated with Traditional Egyptian Dairy Products. *Food Microbiology and Safety* **74**: 341-346.
- [19] De Llanos, R., Querol, A., Planes, A. M., Fernández Espinar, M. T. (2004). Molecular characterization of clinical *Saccharomyces cerevisiae* isolated and their association with non-clinical strains. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 427-435.
- [20] De Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M., Fernández Espinar, M. T. (2006). Food and probiotic strains from the *Saccharomyces cerevisiae* species as a possible origin of human systemic infections. *International Journal of Food Microbiology* **110**: 286-290.
- [21] Tappia-Tussell, R., Lappe, P., Ulloa, M., Quijano-Ramayo, A., Cáceres-Farfán, M., Larqué-Saavedra, A., Perez-Brito, D. (2006). A rapid and simple method for DNA extraction from yeasts and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology* **33**: 67-70.
- [22] Mirzahoseini, H., Omidinia, E., Shams-Ghahfarokhi, M., Sadeghi, G., Razzaghi-Abyaneh, M. (2009). Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes for clinical specimens. *Iranian Journal of Public Health* **38**: 18-24.
- [23] Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 329-337.
- [24] Guillamón, J. M., Sabate, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology* **169**: 387-392.
- [25] Nisiotou, A. A., Nychas, G. J. E. (2007). Yeast Populations Residing on Healthy or *Botrytis*-Infected Grapes from a Vineyard in Attica, Greece. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 2765-2768.
- [26] Nguyen, H. V., Pulvirenti, A., Gaillardin, C. (2000). Rapid differentiation of the closely related *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* and *K. marxianus* strains isolated from dairy products using selective media and PCR/RFLP of the rDNA non transcribed spacer 2. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 1115-1122.
- [27] Cadez, N., Raspor, P., de Cock, A. W. A. M., Boekhout, T., Smith, M. T. (2002). Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Klockera*. *FEMS Yeast Research* **1**: 279-289.
- [28] Fernández-Espinar, M. T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**: 87-97.
- [29] Esteve-Zarzoso, B., Zorman, T., Belloch, C., Querol, A. (2003). Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology* **26**: 404-411.
- [30] Romero, P., Patiño, B., Quirós, M., González Jaén, M. T., Valderrama, M. J., de Silóniz, M. I., Peinado, J. M. (2005). Differential detection of *Debaryomyces hansenii* isolated from intermediate-moisture food by PCR-RFLP of the IGS region of rDNA. *FEMS Yeast Research* **5**: 455-461.
- [31] Raspor, P., Zupan, J., Cadez, N. (2007). Validation of yeast identification by *in silico* RFLP. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **15**: 267-281.