

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LEVADURAS AUTÓCTONAS EN VIÑEDO DE LA VARIEDAD MALVASÍA BLANCA

Dra. María Berradre^{a*}, Lcda. Luzmila Meza^b, Dr. Braulio Esteve-Zarzoso^c, MSc. Jorge Ortega^d, MSc. Betzabé Sulbarán^a, MSc. Graciela Ojeda^a, MSc. Laura Soto^a, MSc. Mairy Fuenmayor^a

^a Laboratorio de Alimentos. Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

^b Laboratorio de Micología. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

^c Departament de Bioquímica y Biotecnología. Facultat d'Enologia. Universitat Rovira i Virgili. Marcel·lí Domingo s/n, 43007. Tarragona, España.

^d Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

*Autor para la correspondencia. Email: marinaty@gmail.com

Recibido: 8-2-2018 / Aceptado: 30-4-2018

RESUMEN

Se realizó el aislamiento e identificación de levaduras nativas de un viñedo de la especie *Vitis vinifera* variedad Malvasía blanca, en la Región Zuliana. Se muestrearon aséptica y aleatoriamente bayas y partes de la planta (hojas, raquis, corteza y suelo), de un total de 123 plantas, correspondientes a un viñedo de la variedad de uva Malvasía. A aproximadamente a 500m del viñedo, se encuentra la bodega. La identificación de las levaduras aisladas en el viñedo se realizó por técnicas moleculares mediante PCR-RFLP, sometiendo los productos amplificados a un análisis de restricción con las enzimas Hinf I, Hae III, CfoI y DdeI. La distribución de las levaduras en los diversos sustratos fue en el suelo 60% *Hanseniaspora guilliermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% por *Aureobasidium pullulans* y en las bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*. En el viñedo están ampliamente difundidos los géneros Ascomycetos *Hanseniaspora*, *Candida* y *Aureobasidium* y el género Basidiomycetos *Rhodotorula*, siendo las levaduras oxidativas *Aureobasidium* y *Rhodotorula* las de mayor difusión en el mismo, sin embargo, cabe destacar la presencia de levaduras fermentativas como los géneros *Hanseniaspora* y *Candida*, importantes levaduras con reconocido potencial enológico, que podrán ser utilizadas en futuras fermentaciones alcohólicas para obtener vinos con calidad única por ser fermentados con levaduras autóctonas adaptadas a clima tropical.

Palabras clave: levaduras autóctonas, variedad Malvasía, PCR-RFLP 5,8S.

ISOLATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF AUTOCHTHONOUS YEASTS IN THE VINEYARD OF THE MALVASÍA WHITE

ABSTRACT



The isolation and identification of native yeasts from a vineyard of the *Vitis vinifera* white variety Malvasia was carried out in Zulia, Venezuela. Aseptically and randomly, berries and parts of the plant (leaves, rachis, bark and soil) were sampled from a total of 123 plants, corresponding to a vineyard of the Malvasia grape variety. A winery is located at approximately 500 m from the vineyard. The identification of the yeasts isolated in the vineyard was carried out by molecular techniques by PCR-RFLP, subjecting the amplified products to a restriction analysis with the enzymes Hinf I, Hae III, CfoI and DdeI. The distribution of the yeasts in the different substrates was in the soil 60% *Hanseniaspora guillermondii* and 40% *Hanseniaspora uvarum*, in the bark 90% *Candida sake* and 10% *Hanseniaspora uvarum*, in leaves 100% by *Rhodotorula mucilagenosa*, in rachis 100% by *Aureobasidium pullulans* and in berries 96% *Rhodotorula mucilagenosa* and 4% *Aureobasidium pullulans*. In the vineyard, the Ascomycetes type *Hanseniaspora*, *Candida* and *Aureobasidium* and the genus Basidiomycetes *Rhodotorula* are widely spread, with the oxidative yeasts *Aureobasidium* and *Rhodotorula* being the most widespread, however, the presence of fermentative yeasts such as the *Hanseniaspora* and *Candida* genera, important yeasts with recognized oenological potential, which can be used in future alcoholic fermentations to obtain wines with unique quality by being fermented with native yeasts adapted to tropical climate.

Key words: native yeasts, Malvasia variety, PCR-RFLP 5.8S.

ISOLAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE LEVEDURAS NATIVAS EM VINHEDOS DE VARIEDADE DE UVAS MALVASIA BLANCA

RESUMO

O isolamento e identificação de leveduras nativas de uma vinha da espécie *Vitis vinifera* variedade Malvasia branco foi realizada na região do Zulia. A amostragem foi realizada de forma asséptica e aleatoriamente entre bayas e partes das plantas (folhas, rãquis, casca, solo), um total de 123 plantas, correspondentes a uma vinha Malvasia variedade de uva. Aproximadamente 500 m da vinha, encontra-se armazenadas. A identificação das leveduras isoladas na vinha foram realizadas por meio de técnicas moleculares como PCR-RFLP, submetendo produtos amplificados para análise de restrição com Hinf I, Hae III, CfoI e enzima DdeI. A distribuição de leveduras em vários substratos no solo foram de 60% *Hanseniaspora guillermondii* e 40% *Hanseniaspora uvarum*, na crosta 90% *Cândida sake* e 10% *Hanseniaspora uvarum*, folhas de 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, em raque 100% por *Aureobasidium pullulans*, bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* e 4% *Aureobasidium pullulans*. Nos gêneros vinhedo Ascomycetes *Hanseniaspora*, *Candida* e *Aureobasidium pullulans* e do gênero Basidiomycetes *Rhodotorula* são generalizadas, assim, a levedura *Aureobasidium* *Rhodotorula* oxidativo foram as de maior difusão, no entanto, incluem a presença de produtos de fermentação de levedura como aquelas dos gêneros *Hanseniaspora* e *Candida*, importantes leveduras enológicas com reconhecido potencial, que podem ser utilizados em fermentações alcoólicas futuras para obter vinhos de qualidade únicas que possam ser fermentados com leveduras indígenas adaptadas ao clima tropical.

Palavras-chave: leveduras autóctones, variedade Malvasia, PCR-RFLP 5,8S.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación del jugo de uva en vino consiste en un complejo proceso bioquímico y ecológico que envuelve el desarrollo secuencial de diferentes especies de levaduras (Beltrán *et al.*, 2002). El origen de la flora natural de levaduras que están involucradas en la elaboración de vino se ha estudiado extensamente, existiendo dos posibles fuentes de

levaduras responsables de la fermentación alcohólica: las provenientes del viñedo y las provenientes de la bodega (Sábate, Cano, Esteve-Zarzoso & Guillamón, 2002; Li *et al.*, 2010). La primera incluye las levaduras provenientes, especialmente de la piel de las uvas y otros órganos de la planta y la segunda incluye los equipos de la bodega (Francesca *et al.*, 2016; Boynton & Greig, 2016).

Estudios recientes indican que se han aislado levaduras del ecosistema del viñedo tales como suelo, aire, hojas, uvas y diversos animales vectores (Portillo & Mas, 2016), así como también del ecosistema de la bodega como en equipos, suelo, utensilios, paredes y cubas de fermentación (Raspor *et al.*, 2006). La composición de la población de levaduras sobre las bayas juega un rol importante en las fermentaciones de vinos (Tristezza *et al.*, 2013). La actividad metabólica de los diferentes géneros y especies influyen la calidad sensorial y las características organolépticas del vino (Raspor *et al.*, 2006). Los más recientes estudios están en común acuerdo en que las levaduras apiculadas han sido las especies predominantes sobre las superficies de la baya, *Hanseniaspora uvarum* (y su forma anamorfa *Kloeckera apiculata*) en 50-75% de la población total de levaduras (Grangateau *et al.*, 2015) y en menor población *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* y *Hansenula* (Moreira *et al.*, 2011), la presencia de estas levaduras no- *Saccharomyces* durante las fermentaciones se limita a los primeros días de la fermentación por la elevada producción de etanol generada por las levaduras *Saccharomyces*, sin embargo, su presencia aporta beneficios como la mejora desde el punto de vista sensorial al vino en cuanto aromas y tipicidad, siendo esto debido a que las levaduras no- *Saccharomyces* poseen unas enzimas diferentes a las levaduras *Saccharomyces*, que interactúan con los metabolitos de la fermentación, generando compuestos aromáticos de calidad óptima desde el punto de vista sensorial, por eso lo importante de su participación en las fermentaciones (Tristezza *et al.*, 2013; Portillo & Mas, 2016). Contrario a lo que lógicamente se pensaba, las especies fermentativas de *Saccharomyces* (e.j. *Saccharomyces cerevisiae*) se han aislado en muy baja población sobre bayas sanas y han sido extrañamente aisladas de granos de uva intactos y de suelos de viñedos (Raspor *et al.*, 2006; Barrajon *et al.*, 2009). Se ha comprobado que estas especies fermentativas están asociadas con el área de la bodega (Beltrán *et al.*, 2002; Sábate *et al.*, 2002) y que son incorporadas dentro del mosto durante el tratamiento mecánico de la uva y el proceso de fermentación (Li *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2009).

El cultivo de la uva en el Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela, es uno de los rubros que ha tenido mayor desarrollo, debido a que la zona presenta las condiciones climáticas

requeridas por el cultivo de la vid, que han permitido la adaptación de las diferentes variedades de uva de vino que se siembran en la región. Para el año 2.000 la producción de uva de vino en el estado Zulia alcanzó una producción de 1.600.000 Kg con un rendimiento de 20 toneladas.ha.año⁻¹ en una superficie sembrada de 80 hectáreas, de la cual el 50% es procesado en el Centro de Desarrollo Vitícola Tropical del estado Zulia y el otro 50% fue llevado a Industrias IPECA. Las únicas variedades de uva de vino que se cultivan en la región zuliana están la Variedad Malvasía (uva blanca) y la variedad Tempranillo (uva tinta) (Molero, Guerrero & Martínez, 2007). En la actualidad, en el estado Zulia las fermentaciones alcohólicas se llevan a cabo mediante inoculación de levaduras importadas, provenientes de ceparios de reconocida calidad, seleccionadas para fermentar mostos en países de climas templados con alta capacidad para la producción de vino, pero no con levaduras adaptadas a las condiciones climáticas de la región, que generen vinos con características sensoriales propias. Aunado a ello está el alto costo de las levaduras secas activas importadas, que encarecen el negocio de la producción de vinos en la región, mientras que al aislar e identificar las levaduras de la región se estarían disminuyendo esos costos. Ciertamente, se pueden aislar levaduras tanto del área del viñedo como del área de la bodega, como arriba se mencionó, sin embargo, es preciso conocer las levaduras del viñedo, para así seleccionar que género de levaduras no-Saccharomyces presentes en el viñedo con potencial enológico importante se puedan utilizar para futuras fermentaciones alcohólicas.

El objetivo de la investigación fue aislar e identificar las levaduras nativas de un viñedo de la especie *Vitis vinifera* variedad Malvasía blanca en la Región Zuliana que posteriormente serán empleadas para la elaboración de vinos tropicales en la región zuliana.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Muestreo

Se recolectaron tres bolsas plásticas ziplot de muestras para cada uno de los sustratos de hojas, raquis y bayas de la variedad agronómica Malvasía, así como, corteza de la vid y suelo, pertenecientes a viñedos del Centro de Desarrollo Vitícola Tropical, ubicado en el municipio Mara, estado Zulia, Venezuela, de la cosecha correspondiente a mayo 2008, a aproximadamente 500 m del viñedo está ubicada la bodega del mismo Centro. De un total de 123 plantas correspondientes a un viñedo de la variedad Malvasía blanca, se muestrearon aséptica y aleatoriamente los diferentes tejidos (uvas y partes de la planta

(hojas, raquis, corteza de árbol y suelo)), colocándolas en bolsas de polietileno, estériles y selladas inmediatamente con una banda. Las muestras de los diferentes tejidos se procesaron inmediatamente y por separado, siguiendo las recomendaciones de Sábate *et al.* (2002) y Raspor *et al.* (2006).

2.2. Aislamiento de levaduras

La preparación de las muestras y diluciones respectivas de cada uno de los tejidos de la vid y suelo asociado al viñedo, muestreados para el análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la Norma COVENIN 1126-89, posteriormente la aplicación de las diluciones en placas se realizó de acuerdo a la Norma Venezolana COVENIN 1337-90.

2.3. Selección de levaduras

Una vez contadas las levaduras, se seleccionaron al azar de acuerdo a su morfología colonial contrastante, aislando 20 colonias diferentes de cada sustrato, de acuerdo a Sábate *et al.*, 2002. Las colonias aisladas se hicieron crecer en agar YEPD a 28 °C y posteriormente se preservaron a 4 °C hasta la futura identificación (Raspor *et al.*, 2006).

2.4. Identificación molecular de las levaduras

Las colonias de levaduras, fueron identificadas a nivel de especies por amplificación y restricción de una región del rADN de acuerdo a Guillamón *et al.* (1998) y Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Se aplicó también esta técnica molecular estándar a la cepa de referencia de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4921 (American Type Culture Collection) con el fin de comprobar la eficacia de la técnica.

2.5. Extracción del ADN de las levaduras

Se realizó mediante la técnica propuesta por Querol, Barrio & Ramón (1992), cuyo fundamento consistió en romper la pared celular y la membrana plasmática y así poder acceder al núcleo de la célula, seguidamente se rompió la membrana nuclear para dejar libre el ADN, y por último se protegió el ADN de enzimas que puedan degradarlo y finalmente para aislarlo se precipitó en alcohol.

2.6. Análisis de restricción de regiones ribosomales (RFLPs) del rADN y ensayos

PCR

La región ribosomal del gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 del ADN extraído de cada una de las levaduras se sometieron a amplificación por PCR

(reacción en cadena de la ADN polymerasa) mediante los cebadores ITS1 (5`-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3`) e ITS4 (5`TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3`) según el procedimiento descrito por Guillamón *et al.* (1998) y Esteve-Zaroso *et al.* (1999). Todas las amplificaciones se ejecutaron en un Sistema PCR GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los productos amplificados fueron analizados por electroforesis sobre geles de agarosa al 1,4% p/v en solución amortiguadora TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MI, USA) y visualizados bajo luz UV.

2.7. Digestión con enzimas de restricción

Los productos amplificados obtenidos del ADN amplificado mediante PCR de cada levadura se digirieron con las endonucleasas de restricción HaeIII, HinfI, CfoI y DdeI (Boehringer Mannheim, Germany) (Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zaroso *et al.*, 1999). La digestión de los productos amplificados del ADN se analizó por electroforesis sobre geles de agarosa al 3% p/v en solución amortiguadora TBE (Tris/Borate/EDTA) 1X, teñidos con bromuro de etidio (Sigma, St. Louis, MI, USA) y visualizados bajo luz UV.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Levaduras aisladas e identificadas en sustratos del viñedo de la variedad de uva Malvasía.

Se aislaron e identificaron un total de 284 colonias de levaduras en el viñedo, 35 en suelo, 43 en corteza, 52 en hojas, 32 en raquis y 122 en bayas (**Tabla 1**). Se incluye también la distribución de las especies de levaduras aisladas por sustrato, donde se observa que en el suelo asociado al cultivo hubo presencia de un 60% *Hanseniaspora guillermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas estuvo representado en 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% por *Aureobasidium pullulans* y en las bayas estuvo presente 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*. Estos resultados demuestran que en el viñedo están ampliamente difundidos los géneros *Ascomycetos Hanseniaspora*, *Candida* y *Aureobasidium* y el género *Basidiomycetos Rhodotorula*. El viñedo se caracteriza por la presencia de levaduras con carácter oxidativo más que fermentativo, como son los géneros *Rhodotorula* y *Aureobasidium* (Raspor *et al.*, 2006), los cuales no presentan potencial enológico por ser levaduras incapaces de fermentar azúcares, también se ha asociado el género *Rhodotorula* con el área de viñedos por presentar compuestos carotenoides que lo

hacen resistente a las radiaciones solares (Sábate *et al.*, 2002). Cabe destacar, que *Aureobasidium pullulans* es un hongo filamentoso que crece como levadura en cultivo y que ha sido incluido en el grupo de levaduras como “levadura negra”, es considerado como parte de la microbiota de levaduras en viñedo, ya que está ampliamente difundido en el mismo (Sábate *et al.*, 2002; Tristezza *et al.*, 2013).

Tabla 1. Frecuencia de aparición de especies de levaduras aisladas de diferentes sustratos del viñedo de la variedad de uva Malvasía.

SUSTRATO ¹	ESPECIE DE LEVADURA	FRECUENCIA (%)
Suelo	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	60
35 colonias	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	40
Corteza de árbol	<i>Candida sake</i>	90
43 colonias	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	10
Hojas	<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	100
52 colonias		
Raquis	<i>Aureobasidium pullulans</i>	100
32 colonias		
Bayas variedad Malvasía, Cosecha mayo 2008	<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	96
122 colonias	<i>Aureobasidium pullulans</i>	4

¹ Los resultados obtenidos son producto de análisis por triplicado.

En el suelo y corteza se observa una amplia presencia de dos géneros de levaduras *Hanseniaspora* y *Candida*, respectivamente, a pesar de ser sustratos con ausencia de azúcares (Carrascosa, Muñoz & González, 2005), es el medio a través del cual se difunden las levaduras con carácter fermentativo por efecto del viento e insectos hasta llegar a las bayas (Sábate *et al.*, 2002) y ser de esta manera las iniciadoras de los procesos de fermentación espontánea (Raspor *et al.*, 2006), siendo la presencia de la bodega cerca del viñedo la que pudo influenciar en la existencia de estas levaduras en estos sustratos (Grangeteau *et al.*, 2015). *H. uvarum* aislado de suelo, presenta características enológicas ya que actúa durante los primeros días de fermentación del mosto en vino, aportando beneficios en el aroma y sabor del vino (Milanovic, Comitini & Ciani, 2013).

En las bayas, se observa presencia abundante del género *Basidiomyceto Rhodotorula*, característico de variedades de uvas blancas, coincidiendo con lo reportado por Raspor *et*

al. (2006), sin embargo, a diferencia de otras investigaciones (Li *et al.*, 2010; Cordero-Bueso, Arroyo, Serrano & Valero, 2011) hay ausencia del género *Hanseniaspora* en las bayas, lo que puede estar asociado con factores como temperatura, pluviosidad, grado de maduración de la baya, altitud y uso de fungicidas, que pueden afectar el desarrollo de este género. La elevada presencia de levaduras oxidativas permite considerarlas como residentes del viñedo y a las levaduras fermentativas como habitantes transitorios (Sábate, *et al.*, 2002).

Se corroboró que el ascomyceto *A. pullulans* estuvo extendido en el viñedo (raquis y bayas) se considera como residente del mismo y parte de la microbiota (Barrajon *et al.*, 2009). Se comprobó la ausencia de la levadura *S. cerevisiae*, con alto potencial enológico en cualquiera de los sustratos del viñedo, por poseer estos sustratos bajo contenido de azúcares (Cordero-Bueso *et al.*, 2011).

En la **Tabla 2** se presentan los fragmentos de restricción de las especies de levaduras aisladas en los distintos sustratos del viñedo muestreados.

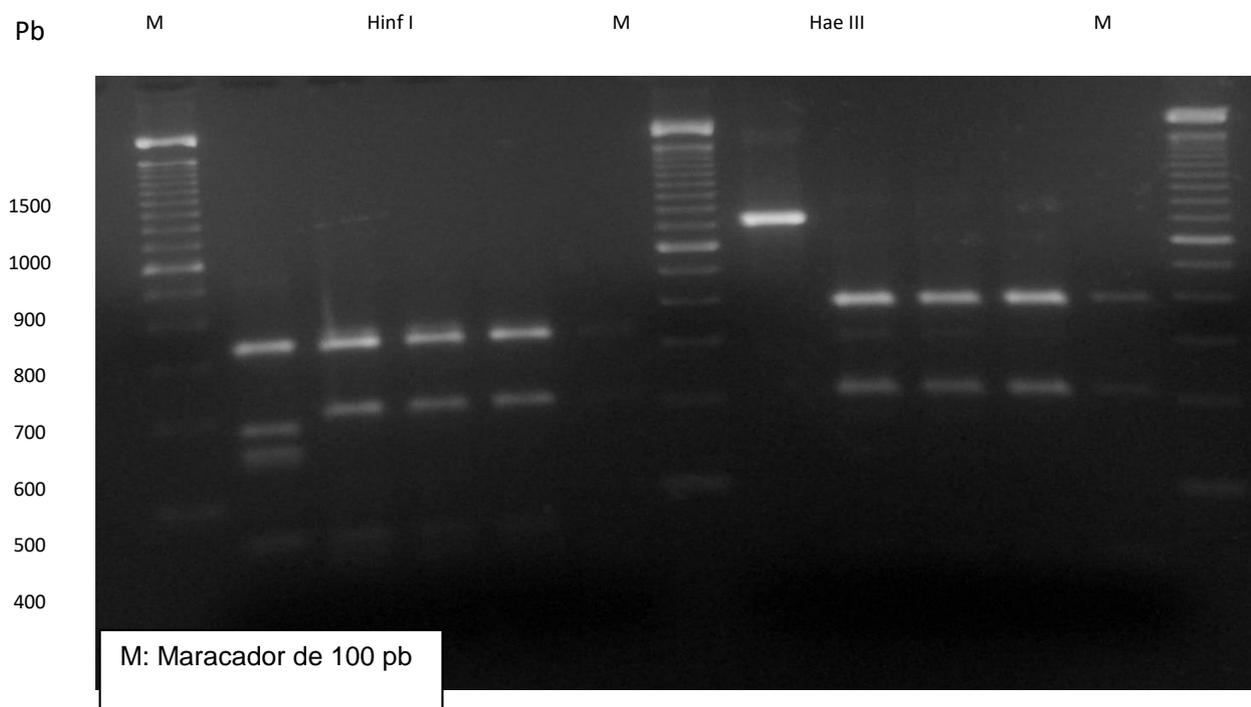
Tabla 2. Levaduras aisladas e identificación de acuerdo a longitud en pares de base (pb) de la región amplificada del gen 5.8S-ITS por PCR y fragmentos obtenidos después de la digestión con enzimas de restricción.

ESPECIE DE LEVADURA	PRODUCTO AMPLIFICADO (pb)	FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN			
		Hinf I	Hae III	CFol	Dde I
<i>Rhodotorula mucilagenosa</i>	640	340+225+75	425+215	320+240+80	---
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	300+180+ 95+90+85
<i>Hanseniaspora guillermondii</i>	750	350+200+180	750	320+310+105	380+180+ 95+80
<i>Aureobasidium pullulans</i>	600	290+180+100	150+450	190+175+96	---
<i>Candida sake</i>	450	230+220	450	250+200	---

Los productos amplificados obtenidos estuvieron comprendidos entre 450-750 pb y estos se compararon directamente con los obtenidos en la investigación de Esteve-Zarsoso *et al.* (1999), que se encargó de desarrollar una base de datos disponible para un gran número de especies de levaduras aisladas de alimentos y bebidas. Los productos amplificados

fueron digeridos con las enzimas de restricción *Hinf I*, *HaeIII*, *CfoI* y con la enzima *DdeI* sólo los géneros de *Hanseniaspora*, para diferenciar entre dos especies de *H. uvarum* y *H. guillermondii* (Esteve-Zarsoso *et al.*, 1999; Milanovic *et al.*, 2013).

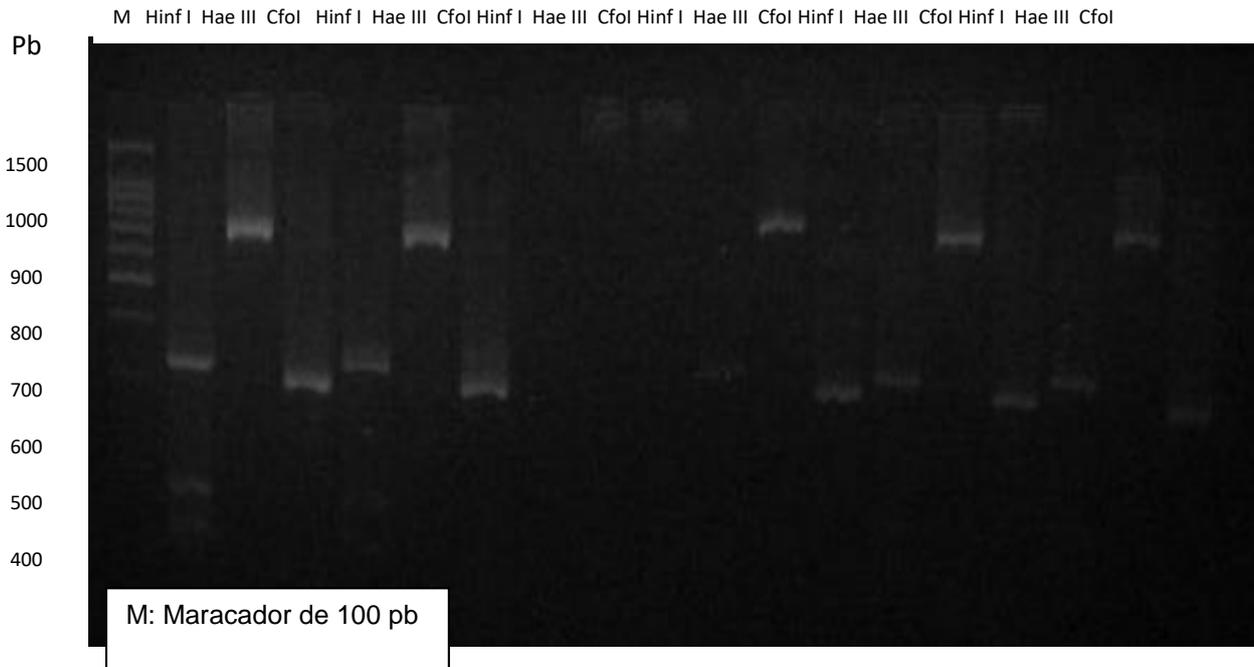
En las **Figuras 1, 2 y 3** se presentan patrones de restricción diferentes que después de ser comparados con las masas moleculares previamente descritas por Esteve-Zarsoso *et al.* (1999), se identificaron como *Rhodotorula mucilagenosa*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Aureobasidium pullulans* y *Candida sake*. En la **Figura 1** se observan los patrones de restricción de las especies de levaduras *Hanseniaspora uvarum* y *Rhodotorula mucilagenosa* presentes en sustratos como corteza, hoja y bayas.



Las columnas 2 y 8 muestran el fragmento de restricción correspondiente a la especie *Hanseniaspora uvarum* aislada de corteza. Las columnas 3-6 y 9-12 corresponden a la especie *Rhodotorula mucilagenosa* aislada de los sustratos baya y hoja.

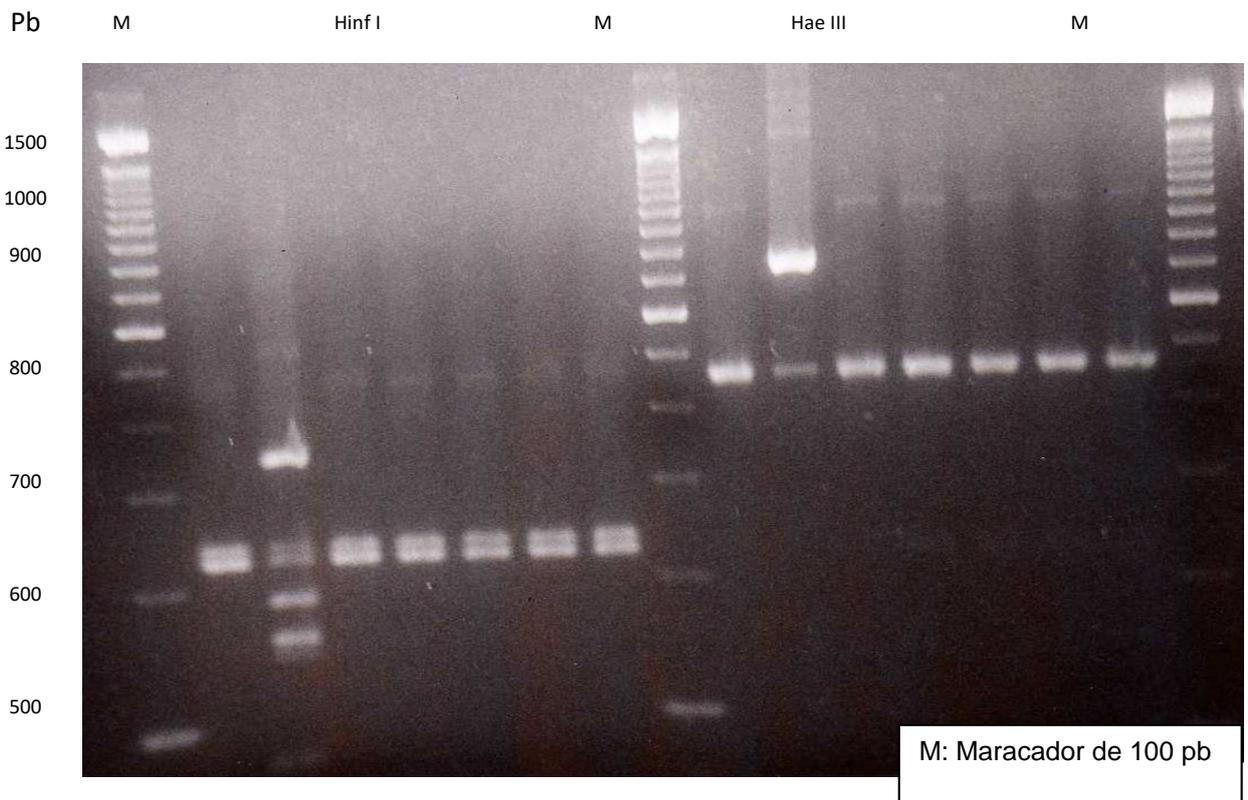
Figura 1. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas *Hinf I* y *Hae III* de dos de las especies aisladas en sustratos de viñedo (corteza, baya y hoja) de la variedad de uva Malvasía.

En la **Figura 2** el género *Hanseniaspora* (*H. uvarum* y *H. guillermondii*) en suelo. En la **Figura 3** *Candida sake* y *Hanseniaspora uvarum* en corteza. Estas especies de levaduras han sido comúnmente aisladas de diversos sustratos del viñedo (Sábate *et al.*, 2002; Raspor *et al.*, 2006) y considerada parte de la flora de levaduras del mismo en investigaciones realizadas por Esteve-Zarsoso *et al.* (1999) y Chavan *et al.* (2009).



Las columnas 2-19 representan los fragmentos de restricción correspondientes al género *Hanseniaspora* aislada del suelo del viñedo.

Figura 2. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas Hinf I, Hae III y CfoI de dos de las especies aisladas en el sustrato de viñedo (suelo) de la variedad de uva Malvasía.



Las columnas 2,10,12-16 muestran el fragmento de restricción correspondiente a la especie *Candida sake* aislada de corteza. Las columnas 3 y 11 corresponden a la especie *Hanseniaspora uvarum* aislada del sustrato corteza.

Figura 3. Gel de agarosa al 3% p/v representando los fragmentos de restricción con las enzimas Hinf I y Hae III de dos de las especies aisladas en el sustrato de viñedo (corteza) de la variedad de uva Malvasía.

4. CONCLUSIONES

En el viñedo se detectó la presencia de cinco especies de levaduras mediante la siguiente distribución por sustrato del viñedo, en suelo 60% *Hanseniaspora guillermondii* y 40% *Hanseniaspora uvarum*, en la corteza 90% *Candida sake* y 10% *Hanseniaspora uvarum*, en hojas 100% por *Rhodotorula mucilagenosa*, en raquis 100% *Aureobasidium pullulans* y en las bayas 96% *Rhodotorula mucilagenosa* y 4% *Aureobasidium pullulans*.

La Técnica molecular PCR-RFLP utilizada, sometiendo los productos amplificados a un análisis de restricción con las enzimas *Hinf* I, *Hae* III, *Cfo*I y *Dde*I fue eficiente para la identificación molecular de levaduras en viñedo de la variedad de uva Malvasía.

5. REFERENCIAS

- Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L. & Briones, A. (2009). Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control*, 20, 778–783.
- Beltrán, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J., Rozès, N. & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A sixyear follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
- Boynton, P. & Greig, D. (2016). Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. *Fungal ecology*, 22,61-72.
- Carrascosa, A., Muñoz, R. & González, R. (2005). *Microbiología del Vino*. Primera edición. Antonio Madrid Vicente (ed), España.
- Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, DP., Shouche, Y. & Deshpande, MV. (2009). Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiology*, 26, 801-808.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. & Valero, E. (2011). Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 23-29.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999). Identification of yeast by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.
- Francesca, N., Gaglio, R., Alfonzo, A., Settanni, L., Corona, O., Mazzei, P., Romano, R., Piccolo, A. & Moschetti, G. (2016). The wine: typicality or mere diversity? The effect of spontaneous fermentations and biotic factors on the characteristics of wine. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 769-773.
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., Wallbrunn, Ch., Alexandre, H. & Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation?. *Food microbiology*, 50, 70-77.
- Guillamón, J., Sábate, J., Barrio, E., Cano, J. & Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species base on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392.
- Li, S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J., Yan, B., Han, B. & Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 85-90.
- Milanovic, V., Comitini, F. & Ciani, M. (2013) Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 240-246.
- Molero, T., Guerrero, R. & Martínez, E. (2007). Caracterización del sistema de producción de uva de vino en el Municipio Mara, estado Zulia. Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 24, 343-366.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J., Hogg, T. & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guillermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22, 662-667.
- Norma Venezolana COVENIN 1126-89. (1989). Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico. 7 p.
- Norma Venezolana COVENIN 1337-90. (1990). Método para recuento de Mohos y Levaduras. 6 p.

- Portillo, MC. & Mas, A. (2016). Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 317-321.
- Querol, A., Barrio, E. & Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439-446.
- Raspor, P., Milek, D., Polanc, J., Možina, S. & Čadež, N. (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.
- Sábate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. & Guillamón, J. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial ADN. *Microbiological Research*, 157, 267-274.
- Sun, H., Ma, H., Hao, M., Pretorius, I. & Chen, S. (2009). Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China. *Annals of microbiology*, 59, 69-76.
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G. & Grieco, F. (2013). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food microbiology*, 36, 335-342.