

# TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS INDUSTRIALES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Fletcher, Tyler (1), García Tapia, Adriana (2), Torres Guzmán, Juan Carlos (3)

1 [Verano de Investigación 2016, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [tmfletcher95@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] |  
Dirección de correo electrónico: [adriana\_gtoo@hotmail.com]

3 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] |  
Dirección de correo electrónico: [torguz@ugto.mx]

## Resumen

El objetivo del trabajo es la identificación molecular de levaduras empleadas en nutrición animal. La tipificación molecular se llevó a cabo mediante la técnica de PCR. Se amplificaron las regiones ITS, interdelta y los microsátélites. Se amplificaron fragmentos internos de los genes MET2, b-tubulina y SC. Los productos de amplificación fueron separados e identificados mediante electroforesis horizontal. Los resultados obtenidos nos permitió generar la huella genética de la cepa Levacrom de *Saccharomyces cerevisiae*.

## Abstract

The objective of this project is the molecular identification of yeasts used in animal nutrition. The molecular classification was determined by the PCR technique. The regions ITS, interdelta, and microsattellites were amplified, along with fragments between the genes MET2, B-tubulina, and SC. The amplified products were separated and identified through horizontal electrophoresis. The obtained results generated the genetic footprint of the strain Levacrom from the family *Saccharomyces cerevisiae*.

## Palabras Clave

Levadura; Levacrom; PCR (Polymerase Chain Reaction – Reacción en Cadena de la Polimerasa); Huella Genética, levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado de manera importante el uso de complementos alimenticios a base de levaduras enriquecidas con metales, para la nutrición humana y animal. Este tipo de levaduras pueden ser enriquecidas con Selenio, Manganeso, Zinc y Cromo (III), que aportan no solo microelementos sino que fortalecen el sistema inmunitario y las defensas contra el estrés oxidativo en general. La levadura con mayor uso en este tipo de industria es *Saccharomyces cerevisiae*.

### Huella Genética

Por lo que el objetivo de este trabajo es realizar la tipificación molecular de cepas de levaduras de uso industrial, específicamente en la industria de nutrición animal. La caracterización se realizó mediante la técnica de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). La técnica de PCR se caracteriza por su rapidez, sensibilidad y reproducibilidad [1]. Usando la técnica de PCR se puede identificar y diferenciar entre distintas cepas de la levadura *S. cerevisiae* mediante la amplificación de distintos elementos génicos:

### ITS (Internal Transcribed Spacers)

El análisis de algunas secuencias de genes ribosomales muestra productos de amplificación diferentes. Las regiones ITS del rDNA contienen secuencias no codificantes variables, las cuales son útiles para distinguir géneros y especies de hongos, entre ellos *Sacchromyces cerevisiae* [1].

### Regiones interdelta ( $\delta_1$ , $\delta_2$ , $\delta_{12}$ , $\delta_{21}$ )

Las secuencias interdelta son elementos que flanquean los retrotransposones TY1 y TY2 en levaduras. Aproximadamente 300 elementos Deltas se han descrito en el genoma de la cepa de laboratorio S288C. El número y la localización de estos elementos poseen una cierta variabilidad intraespecífica que fue aprovechada para desarrollar cebadores específicos ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $\delta_{12}$ ,  $\delta_{21}$ ) útiles para diferenciar entre cepas de *S. cerevisiae* [2].

### Microsatélites

Microsatélites son secuencias cortas repetidas usualmente menores de 10 pb, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Su frecuencia y tipo de repetición varía en los genomas de distintas especies, incluyendo levaduras. Se trata de secuencias altamente variables. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus, por ello es que son empleados como herramienta para la identificación entre las distintas cepas de *S. cerevisiae* [1].

### Gen *MET2*

El uso de PCR/RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen *MET2* fue propuesto para diferenciar entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Para ello es necesario utilizar enzimas de restricción ya que en *S. bayanus* existe sitio de corte para la enzima *Pst*I el cual no existe en *S. cerevisiae*, pero en esta especie existe sitio de corte para *Eco*RI [3].

### Gen $\beta$ -tubulina

La  $\beta$ -tubulina es una proteína abundante en las células eucariotas y es el principal constituyente de los microtúbulos. Se ha reportado que el gen  $\beta$ -tubulina es un marcador ideal para el análisis a profundidad de las filogenias y para grupos de especies complejas [4].

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas utilizadas para este trabajo se muestran en la Tabla 1. Estas levaduras forman parte de la colección de levaduras del Laboratorio de Genética Molecular de Hongos de la Universidad de Guanajuato. Las cepas fueron cultivadas en el medio YPD sólido a 28 °C por 48 horas, para su conservación. Para la extracción de DNA genómico las cepas fueron crecidas en medio YPD líquido a 28°C por 18 horas, un agitador orbital. La extracción de DNA de las levaduras fue con las técnicas convencionales empleando el Tissue

Lyser II de Qiagen. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR 9700, Las reacciones se llevaron a agregando en tubos de PCR, en orden, los siguientes componentes: 1 µL del cada oligonucleótido (1 µg/µL), 1 µL de DNA genómico (100 ng/µL) de cada cepa, 9.5 µL HPLC H<sub>2</sub>O y 12.5 µL de JumpStart™ Taq ReadyMix™.

Los oligonucleótidos y sus secuencias que se usaron para las PCR se muestran en la Tabla 2. Para la identificación del DNA, los fragmentos amplificados fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2.5% y 4 µL SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Los geles fueron fotografiados empleando el equipo Chemi-Doc (Bio-Rad).

**Tabla 1. Cepas de Levaduras empleadas**

Cepa	Genotipo	Referencia
1. BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Laboratorio de Genética Molecular de Hongos
2. LCR1	Levacrom 2000 5-214-1	Levapan®
3. LCR2	Levacrom 2000 5-214-1	Levapan®

**Tabla 2: Oligos empleados**

Oligonucleótidos	Secuencia
1. Delta 1	CAA AAT CAC CTA TAT CT
2. Delta 2	GTG GAT TTT TAT TCC ACC
3. Delta 12	TCA ACA ATG GAA TCC CAA C
4. Delta 21	CAT CTT AAC ACC GTA TAT GA
5. Microsatélites GTG5	GTG GTG GTG GTG GTG
6. Microsatélites M13	GAG GGT GGC GGT TCT
7. MET2 Forward	CGG CTC TAG ACG AAA ACG CTC CAA GAG CTG G
8. MET2 Reverse	CGG CTC TAG AGA CCA CGA TAT GCA CCA GGC AG
9. Tubulina Btub3	TGG GCY AAG GGT YAY TAY AC
10. Tubulina Btub4r	GCC TCA GTR AAY TCC ATY TCR TCC AT
11. SC1	AAC GGT GAG AGA TTT CTG TGC
12. SC2	AGC TTG CAG TAT TCC CAC AG

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se emplearon las levaduras LCR1 y LCR2, dos aislados de levaduras empleadas en la nutrición de ganado bovino. Para la realización

de la huella genética el primer paso fue aislar el DNA genómico de ambos aislados. A partir del DNA aislado se amplificaron las regiones ITS y como se puede observar en la Fig. 1. Se observa una banda entre 900 pb y 800 pb en ambos aislados. El tamaño del amplicon corresponde al esperado para *S. cerevisiae* (880 pb), lo cual nos indica que ambos aislados pertenecen a este género y especie. Para tratar de averiguar si LCR1 y LCR2, son o no la misma cepa se realizaron las siguientes reacciones de amplificación:

### Regiones interdelta

En la Fig. 2 se muestra el patrón de amplificación empleando los oligonucleótidos Delta 1:2. Dicho patrón entre la cepa control BY4741 y las cepas de Levacrom son diferentes. Mientras que en BY4741 se observan cuatro bandas entre 300 y 800 pb, en LC1 y LC2 solo se pueden observar tres bandas entre 300 y 500 pb.

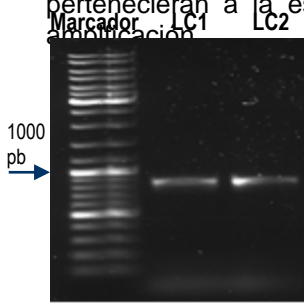
Por el contrario, empleando la pareja de oligonucleótidos Delta 12:21 (Fig. 3) y Delta 2:12 (Fig. 4) podemos observar un mayor número de bandas de amplificación en la cepas LC1 y LC2, que en la cepa control BY4741. En ambos casos el patrón de amplificación en LC1 y LC2 parece ser el mismo.

Empleando los oligonucleótidos para la amplificación de los Microsatélites (Fig. 5) los patrones son casi lo mismos para la cepa BY4741 y las LC1 y LC2. Hay bandas cerca 2500 pb, 1100 pb y 650 pb y 400 pb en BY4741 y LC1 y LC2. La única diferencia apreciable es la banda de alrededor de 375 pb, donde hay bandas para LC1 y LC2, pero no para la cepa control BY4741.

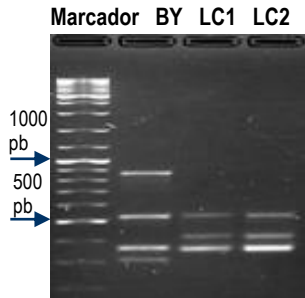
La amplificación de un fragmento del gen de la β-tubulina (Fig. 6) genera un fragmento del tamaño esperado (900 pb).

En la Fig. 7 se muestra la amplificación de un fragmento del gen MET2 corte de *EcoRI*, de un tamaño de 600 pb. Este fragmento al digerirlo con la enzima *PstI* no se observa corte (Fig. 8), sin embargo al digerirlo con la enzima *EcoRI*, se generan dos bandas, de 400 y 200 pb. En *S. bayanus*, si existe un sitio de reconocimiento para la enzima *PstI* en el gen MET2, y no para *EcoRI*, este resultado nos confirma que las cepas LC1 y LC2 corresponden a *Saccharomyces cerevisiae*. Empleando los oligonucleótidos específicos SC1 y SC1 se observan en las tres muestras una

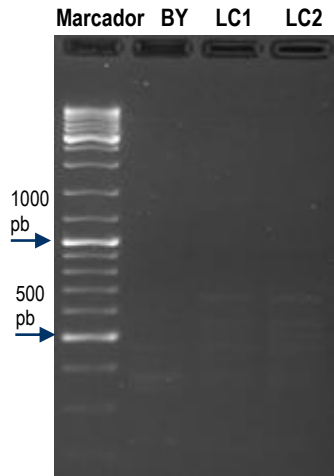
amplificación de 1170 pb (Fig. 9) lo que nos confirma dicho resultado, si ambas cepas pertenecieran a la especie bayanus, no existiría



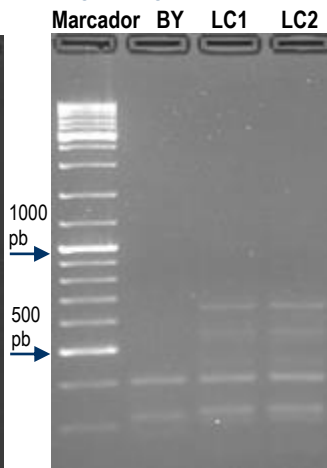
**FIGURA 1:** Amplificación de IT's a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



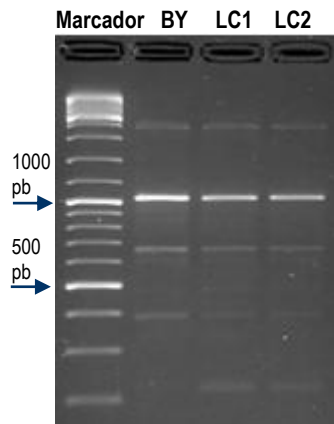
**FIGURA 2:** Amplificación de Delta 1:2 a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



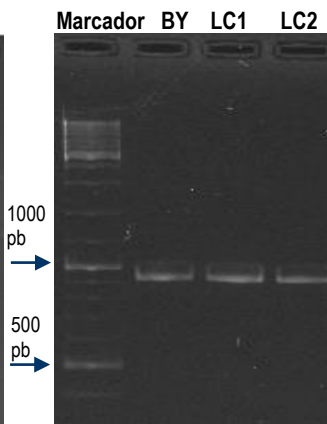
**FIGURA 3:** Amplificación de Delta 12:21 a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



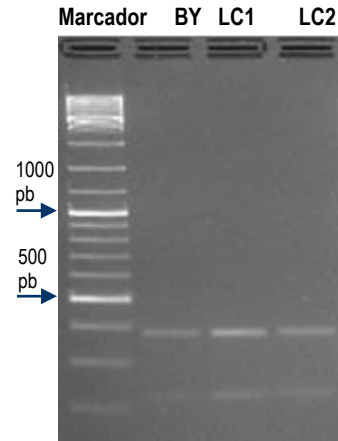
**FIGURA 4:** Amplificación de Delta 2:12 a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



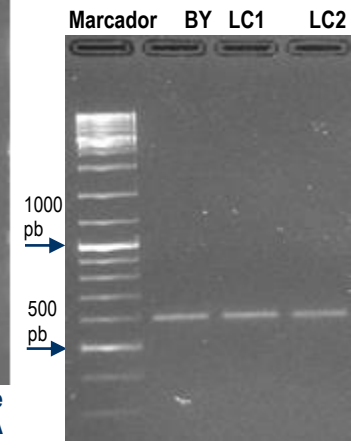
**FIGURA 5:** Amplificación de Microsatélites a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



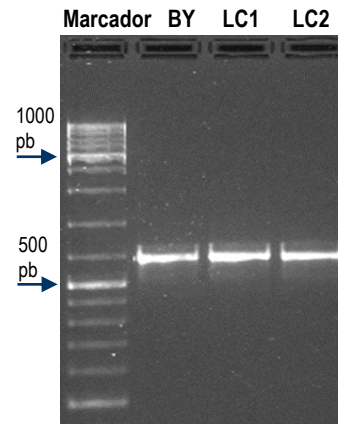
**FIGURA 6:** Amplificación de Tubulina a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



**FIGURA 7:** Amplificación de MET2 EcoRI a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



**FIGURA 8:** Amplificación de MET2 PstRI a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.



**FIGURA 9:** Amplificación de SC1:SC2 a partir de DNA genómico, separado en gel de agarosa 2.5%.

## CONCLUSIONES

Con los datos de amplificación de los ITS de un tamaño de 880 pb, la amplificación y la presencia de un sitio de corte para la enzima *EcoRI* en el amplicon del fragmento del gen MET2, la amplificación con los oligonucleótidos específicos SC1 y SC2, podemos concluir que las levaduras LC1 y LC2 corresponden a *Saccharomyces cerevisiae*. Con el análisis de la amplificación de las regiones interdelta y los microsatélites

podemos concluir que ambos aislados, LCR1 y LCR2, corresponden a la misma cepa de *S. cerevisiae*. La posterior secuenciación de los fragmentos de los ITS, el gen MET y el fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina nos confirmará dicho resultado.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a Adriana por su ayuda, en cooperación con Juan Carlos. Gracias para la oportunidad trabajar en un proyecto muy grande e importante.

El presente proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) proyectos: 388394 and 220780. Universidad de Guanajuato proyectos: 415/2014, 641/2015, 511/2015 y excelencia académica 2014, 2015.

## REFERENCIAS

- [1] Wallace Hoff, Justin. (2012). Molecular Typing of Wine Yeasts: Evaluation of Typing Techniques and Establishment of a database. Tesis presentada para el grado de Maestro en Ciencias en la Universidad de Stellenbosch, Instituto de Biotecnología del vino, Facultad de AgroCiencias.
- [2] Arlorio, Marco; Coisson, Jean Daniel; Martelli, Aldo. (1999). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS región of ribosomal DNA. *Eur Food Res Technol* (209), 185-191.
- [3] Legras, Jean-Luc; Karst, Francis (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* (221), 249-255.
- [4] Masneuf, Isabelle; Aigle, Michel; Dubourdieu, Denis (1996). Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiology Letters* (138), 239-244.
- [5] Chien-Hsun Huang, Fwu-Ling Lee, Chun-Ju Tai (2009). The  $\beta$ -tubulin gene as a molecular phylogenetic marker for classification and discrimination of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Antonie van Leeuwenhoek* (95), 135-142.