

DOCUMENTO □
TECNICO □

Enrico Vaudano
Emilia Garcia-Moruno

*CRA - Centro di Ricerca
per l'Enologia - Asti*

*Da sinistra:
E. Garcia-
Moruno,
E. Vaudano*

DISCRIMINAZIONE INTRASPECIFICA DI *S. CEREVISIAE* CON LA TECNICA PCR MULTIPLEX DI MICROSATELLITI

In questo lavoro si propone un metodo rapido per l'identificazione di ceppi di *S. cerevisiae*, basato sulla PCR multiplex di tre loci microsatellitari, seguita dall'analisi dell'amplificato con elettroforesi su gel di agarosio. Sono stati discriminati trenta ceppi commerciali e si è studiata la dominanza in un coinoculo di due ceppi a diverse temperature.

Introduzione

L'uso dei lieviti selezionati nella fermentazione alcolica è ormai ampiamente diffuso. Di pari passo è divenuta sempre più chiara ed evidente l'influenza dei lieviti sulla qualità dei vini, specialmente per quanto riguarda il loro contributo olfattivo; il lievito produce o contribuisce a produrre un ampio spettro di molecole con impatto sensoriale quali esteri, acidi grassi, aldeidi, composti solforati ed alcoli

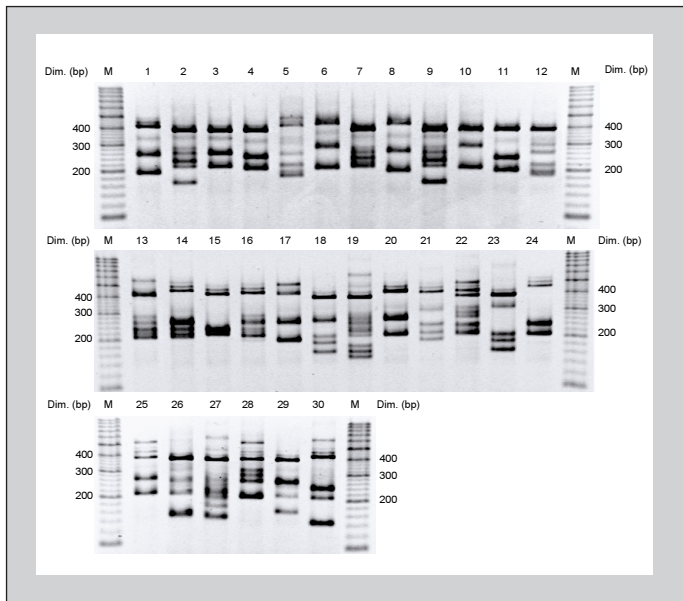
superiori, i quali interagiscono fortemente con l'aroma del vino (Lambrechts e Pretorius 2000; Swiegers *et al.* 2005).

Gli enologi moderni sono consapevoli che da fermentazioni con diversi ceppi di lievito si ottengono vini sensibilmente differenti e questo ha indotto le case produttrici a selezionare un grande numero di lieviti con differenti caratteristiche e per diverse applicazioni. Oggi sono presenti sul mercato centinaia di ceppi apparte-

nenti per la maggior parte, alla specie *Saccharomyces cerevisiae*.

Parallelamente, da parte di tecnici e ricercatori, è cresciuto l'interesse nello sviluppo di metodologie rapide in grado di distinguere in modo inequivocabile i diversi ceppi di lievito. Tali metodi permetterebbero di verificare la dominanza in fermentazione dei ceppi inoculati rispetto ai ceppi selvatici presenti nel mosto, di seguirne la crescita durante la fermentazione e, dal punto

Fig. 1 - Profilo dei 30 ceppi selezionati di *S.cerevisiae* ottenuto con elettroforesi in 2.5% di agarosio (M: marcatore molecolare).



di vista delle industrie produttrici di lieviti selezionati, di controllare la purezza dei ceppi prodotti e di verificare eventuali frodi.

Gli studi ecologici sono un ideale campo di applicazione di queste metodologie. Nella vinificazione il lievito selezionato è inoculato in mosto non sterile dove sono presenti diversi ceppi di *Saccharomyces* e non *Saccharomyces*. Una metodologia di discriminazione rapida offre la possibilità di osservare la dinamica di popolazione dei lieviti e l'influenza dei fattori ambientali sulla loro crescita.

Negli ultimi anni, gli studi di discriminazione si sono focalizzati sulle metodologie molecolari basate sul DNA (descritte recentemente nella review di Beh *et al.* 2005) quali la cariotipizzazione (Carle and Olson 1985; Blondin and Vezinhet 1988) e l'analisi RFLP del DNA mitocondriale (restriction fragment length polymorphism) (Querol *et al.* 1992) oltre a metodi basati sulla amplificazione del DNA, la PCR (polymerase chain reaction) tra i quali ricordiamo l'analisi delle sequenze ITS (internal transcribed sequence) dei geni ribosomali (Montrocher *et al.* 1998), il

polimorfismo degli elementi delta (Cameron *et al.* 1979, Ness *et al.* 1993), l'AFLP (amplified fragment length polymorphism) (De Barros Lopes *et al.* 1999), la tecnica RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Baleiras Couto *et al.* 1996) ed altre ancora.

Questi metodi rappresentano un importante miglioramento rispetto ai tradizionali metodi fisiologici in termini di risoluzione e di tempo di analisi, ma alcuni mostrano dei limiti in quanto sono difficilmente applicabili alla analisi di routine, oppure, quando facili da implementare, risultano non sufficientemente discriminanti a livello di ceppo. Inoltre, in alcuni metodi, come l'analisi degli elementi delta e nella RAPD, la riproducibilità è fortemente dipendente dalla purezza e dalla concentrazione del DNA estratto (Fernandez-Espinar *et al.* 2001, Beh *et al.* 2005). Questi inconvenienti implicano un passaggio di estrazione del DNA costoso in termini economici e di tempo.

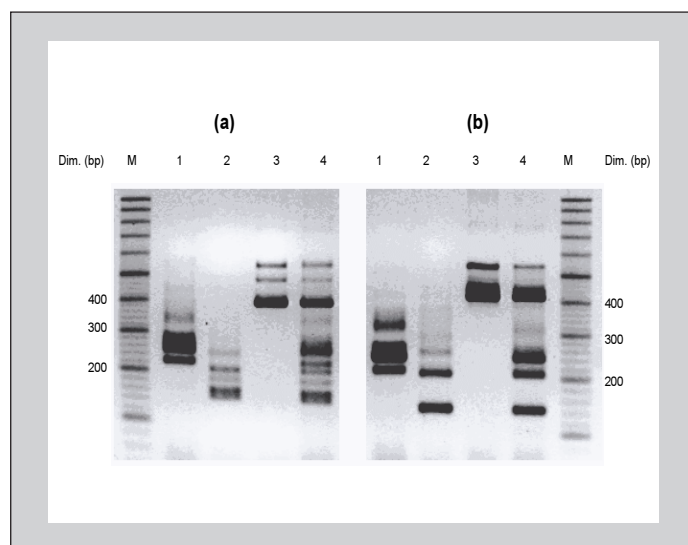
L'analisi dei microsatelliti, basata sul polimorfismo di lunghezza di loci (regioni di DNA) caratterizzati da semplici sequenze ripetute, è stata usata con successo per discriminare ceppi di *S.cerevisiae* (Field and Wills 1998; Gonzalez Téchera *et al.* 2001; Pérez *et al.* 2001; Hennequin *et al.* 2001; Malgoire *et al.* 2005) e, recentemente, la tecnica PCR multiplex di microsatelliti con alto grado di polimorfismo, ha permesso di discriminare un grande numero di ceppi commerciali Schuller *et al.* 2004; Bradbury *et al.* 2005; Legras *et al.* 2005). Il potere discriminante, unito alla robustezza ed applicabilità sul DNA grezzo (Howell *et al.* 2004), ha reso la PCR dei loci microsatellitari uno dei metodi più popolari ed usati.

Il punto critico nella applicazione di routine di questa tecnica risiede nella analisi dei frammenti amplificati. L'uso di gel di poliaccrilamide per sequenziamento o del sequenziatore per determinare la grandezza dell'amplificato, richiede lunghi tempi di analisi ed elevati investimenti in strumentazione. Per superare questi limiti sono state proposte semplici corse in agarosio ad alta concentrazione (Routman and Cheverud 1994; Ferraro *et al.* 1998). Recentemente, Howell *et al.* (2004) hanno suggerito la tipizzazione basata sull'amplificazione del locus microsatellitare SC8132X e la corsa ~~successive~~ in gel pronto (precast) di poliaccrilamide seguita da colorazione con etidio bromuro.

In questo lavoro, con lo scopo di fornire un metodo di routine applicabile anche in laboratori che non possono andare incontro ad alti investimenti economici e che necessitano di ~~un'alta~~ produttività, abbiamo messo a punto una tecnica di discriminazione intraspecifica di *S. cerevisiae* basata sulla PCR multiplex di tre loci microsatellitari, seguita dall'analisi dell'amplificato con corsa elettroforetica su gel di agarosio.

Nella prima parte del lavoro abbiamo verificato la capacità discriminatoria del metodo su di un panel di trenta ceppi commerciali di *S. cerevisiae*. L'applicabilità del metodo è stata successivamente verificata in prove di fermentazione dove è stato osservato l'effetto della temperatura sulla cinetica di sviluppo e sulle capacità competitive di due ceppi coinoculati. Nella fermentazione del mosto la temperatura è, infatti, uno dei fattori ambientali che maggiormente influenzano la crescita dei lieviti (Fleet and Heard 1993) ed alcuni studi ecologici hanno mostrato differenti comportamenti da parte di ceppi di *S. cerevisiae* come risposta a diverse temperature (Epifanio *et al.* 1999, Torija *et al.* 2003).

Dal punto di vista pratico,

Fig. 2 - Profilo ottenuto con elettroforesi in 2.5% di agarosio dei ceppi 19 (a) e 30 (b).

Linea 1: singleplex locus SCPSY7; linea 2: singleplex locus SC8132X; linea 3: singleplex locus YOR267C; linea 4: multiplex dei tre loci (M: marcatore molecolare)

una delle caratteristiche tecnologiche più richieste dai vinificatori è la capacità di condurre buone fermentazioni a determinate temperature. Spesso, in una tipica fermentazione in bianco, la temperatura di fermentazione è mantenuta al disotto di 18°C, ma non è raro raggiungere temperature di 12-15° allo scopo di aumentare la produzione di esteri profumati e ridurre la formazione di alcoli superiori.

A queste temperature rallentamenti e blocchi di fermentazione sono frequenti e, conseguentemente, l'individuazione di lieviti selezionati con metabolismo criofilo ed aventi la capacità di dominare la fermentazione a bassa temperatura può esse-

re utile nella ottimizzazione del processo produttivo.

Materiali e metodi

Ceppi di *S. cerevisiae*. Sia nella verifica della capacità discriminativa della tecnica che nelle successive prove di competizione, sono stati utilizzati ceppi selezionati di *S. cerevisiae*. Questi, numerati da 1 a 30, sono stati acquistati da fornitori di lieviti vinari ad eccezione del ceppo tipo (type strain) CBS 1171 (ceppo 30) proveniente dalla collezione conservata presso la sezione di microbiologia enologica del CRA-Centro di Ricerca per l'Enologia di Asti.

I ceppi di lievito commerciali sono stati sottoposti a reidratazione in una soluzione sterile al 5% di saccarosio per 30 min a 40°C. In seguito, i lieviti sono stati diluiti in soluzione fisiologica, distribuiti in piastre contenenti il terreno YMA (yeast malt agar) ed incubati a 24°C per 48 h.

Metodi di estrazione del DNA. Nella prima parte del lavoro, riguardante l'applicazione del metodo nella discriminazione dei ceppi commerciali, il DNA è stato estratto secondo il metodo descritto da Harju et al., (2004). Le singole colonie cresciute in YMA sono state prelevate con un'ansa sterile, risospese in provette da 1,5 mL contenenti 200 µL di tampone di estrazione (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mmol l-1 NaCl, 10 mmol l-1 Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol l-1

EDTA pH 8.0) e poste in freezer a -80°C per 5 min fino al completo congelamento. In seguito, le provette sono state poste in termomixer (termostato-agitatore) a 95°C per 1 min. Questo procedimento di congelamento e riscaldamento è stato ripetuto una seconda volta. Al termine del processo, le provette sono state ~~agitati~~ con il vortex alla massima velocità per 30 s.

In seguito le provette sono state raffreddate e sono stati addizionati 200 µL di cloroformio. Successivamente sono state agitate alla massima velocità per 2 min e centrifugate a 20000g per 5 min a 5°C.

Terminata la centrifugazione, le fasi acquose sono state prelevate e trasferite in nuovi tubi da 1,5 mL a cui sono stati aggiunti 400 µL di etanolo assoluto conservato a -20°C.

I campioni sono stati posti per 10 min a -20°C per favorire la precipitazione del DNA e poi centrifugati a 20000g per 10 min a 5°C. In seguito, il surnatante è stato eliminato, i pellet sono stati lavati e risospesi con 0,5 mL di etanolo al 70% freddo e centrifugati a 20000g per 10 min a 5°C.

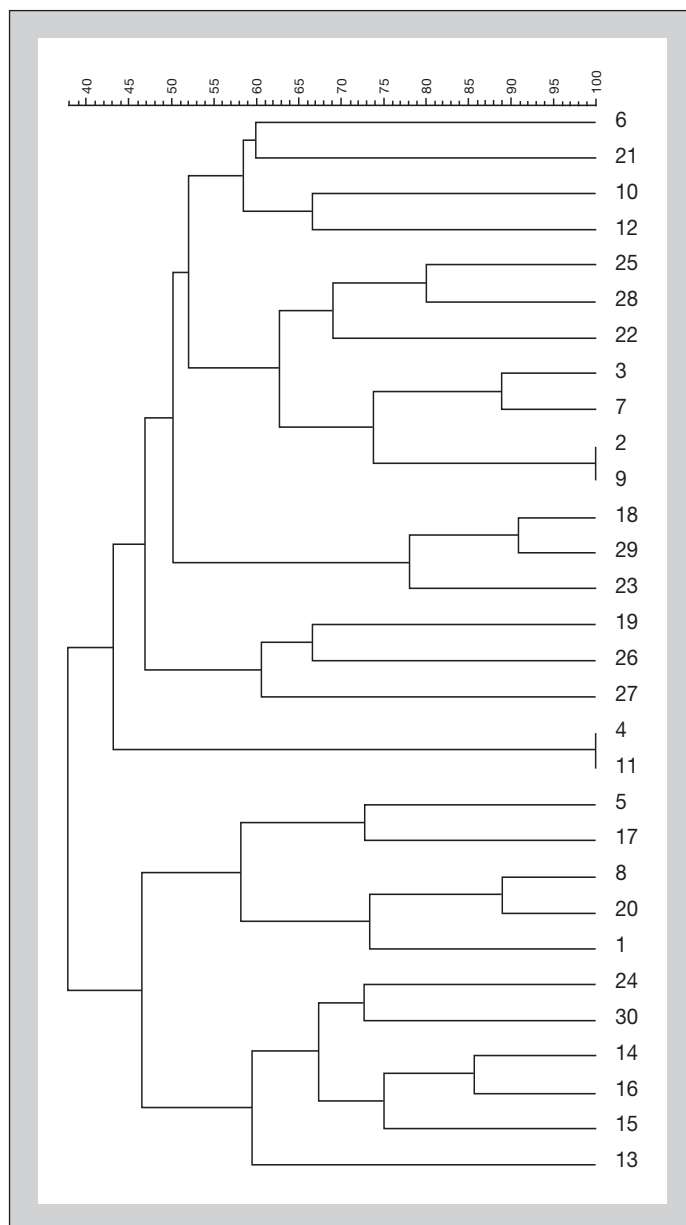
Successivamente il surnatante è stato eliminato ed i campioni sono stati messi in un evaporatore centrifugo a 45°C, per eliminare l'etanolo residuo. Al termine il DNA estratto è stato risospeso in 15 µL di TE

Durante la seconda parte del lavoro, nella applicazione del metodo per distinguere

Tab. 1 - Primers utilizzati nell'amplificazione dei tre loci microsatellitari di *Saccharomyces cerevisiae*

Locus	Cromosoma	Primers	Dimensioni in bp calcolate da BLAST(ceppo modello s288c)
SC8132X	XVI	FW: CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG RV: CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC	174
YOR267C	XV	FW: GGTGACTCTAACGGCAGAGTGG RV: GGATCTACTTGCAGTATACGGG	411
SCPSY7	XIII	FW: AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT RV: AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT	295

Fig. 3 - Analisi dei cluster dei 30 ceppi esaminati con elettroforesi in agarosio a 2.5%



re i ceppi in prove di competizione, la PCR è stata eseguita direttamente su cellule prelevate da colonia mediante il puntale di una micropipetta e risospese nella mix per PCR, preventivamente distribuita in piastre da 96 pozzetti da 0,2 mL.

Analisi PCR. I loci microsatellitari utilizzati in questo studio, SC8132X, YOR267C e SCPTSY7, sono stati scelti per il loro alto grado di polimorfismo (Field e Wills, 1998; Gonzalez Techera et al., 2001). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando coppie di primer specifici le cui sequenze sono mostrate

in Tab. 1.

I primers per il locus SC8132X e il primer forward per YOR267C sono stati disegnati da Field e Wills (1998), il primer reverse per YOR267C è stato disegnato da Gonzalez Techera *et al.* (2001) mentre il primer forward del locus SCPTSY7 è stato disegnato da Pérez *et al.* (2001). Il primer reverse del locus SCPTSY7 è stato disegnato da noi utilizzando il software Primer 3, in modo da generare dei prodotti di amplificazione che non si sovrappongano con i prodotti degli altri primer.

L'amplificazione è stata eseguita in un termociclatore Biorad MyCycler in un volume di 20 µL contenenti 1 µL di DNA estratto (20-40 ng of DNA), 3,1 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0,200 mmol L⁻¹ di ogni dNTP, 2 µL di 10X PCR buffer senza magnesio, 2 unità di Taq DNA polymerase (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), 10 pmol di ogni primer per il locus SCYOR267C, 15 pmol di primers per il locus SC8132X e 40 pmol di primers per il locus SCPTSY7 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). La concentrazione di ogni componente è stata ottimizzata per ridurre al minimo le amplificazioni non specifiche. Nelle prove di competizione la reazione di amplificazione è stata eseguita in un volume di 10 µL con le stesse concentrazioni dei reagenti, dimezzando quindi le quantità di Taq-DNA polimerasi e di altri reattivi costosi.

Il protocollo di amplificazione ottimizzato per la PCR multiplex è stato il seguente: riscaldamento iniziale a 94°C per 4 minuti, 28 cicli di 94°C per 30 s, 56°C per 45 s, 72°C per 30 s e ciclo finale a 72°C per 10 min.

Gli amplificati sono stati analizzati con elettroforesi in gel di agarosio MS-8 (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) a 2.5% di dimensioni 15 X 10 cm in buffer TBE (tris borato EDTA) applicando un campo elettrico di 100 V a voltaggio costante per

80 min ed il gel è stato colorato con etidio bromuro.

Quando impiegata, l'elettroforesi con poliacrilamide è stata eseguita utilizzando un gel pronto all'uso (pre-cast) al 10% in TBE delle dimensioni di 8.6 X 6.8 cm applicando 100V a voltaggio costante per 60 min.; come marcatore molecolare è stato usato il set 100-20 bp (Sigma).

I gel sono stati analizzati con il software di analisi dei cluster Bionumerics (Bionumerics, Applied Maths, Keestraat, Belgium) utilizzando l'indice di similarità Dice e il dendrogramma è stato costruito con il metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). L'affidabilità dei cluster è stata verificata calcolando l'indice cofeneticco come descritto da Rossetti e Giraffa (2005).

Ripetibilità del metodo e stabilità dei marker microsatellitari. La ripetibilità del metodo è stata controllata amplificando il DNA di 5 colonie per ogni ceppo ed analizzando i prodotti in cinque corse indipendenti.

Per verificare la stabilità dei loci microsatellitari durante la fermentazione alcolica sono state saggiati i ceppi 2, 3 e 5. Dopo la reidratazione i ceppi sono stati inoculati singolarmente in mosto sterile in beute da 500 ml. La fermentazione è stata condotta a 16°C ed è stata completata in 20 giorni.

L'analisi PCR è stata eseguita su 10 colonie scelte casualmente derivanti da campionamenti fatti all'inizio e alla fine della fermentazione.

Prove di fermentazione

Fermentazioni. Per le prove di fermentazione a diversa temperatura sono stati scelti i ceppi 3 e 5 in quanto possiedono caratteristiche ed applicazioni simili come indicato dai produttori nella scheda tecnica, quali l'utilizzo nella fermentazione in bianco, la tolleranza all'alco-

Fig. 4 - Profili elettroforetici delle coppie di ceppi con similarità superiore all'80% ottenuti con agarosio al 2.5% (a) e poliacrilamide al 10% in TBE (b) (M: marcatore molecolare)

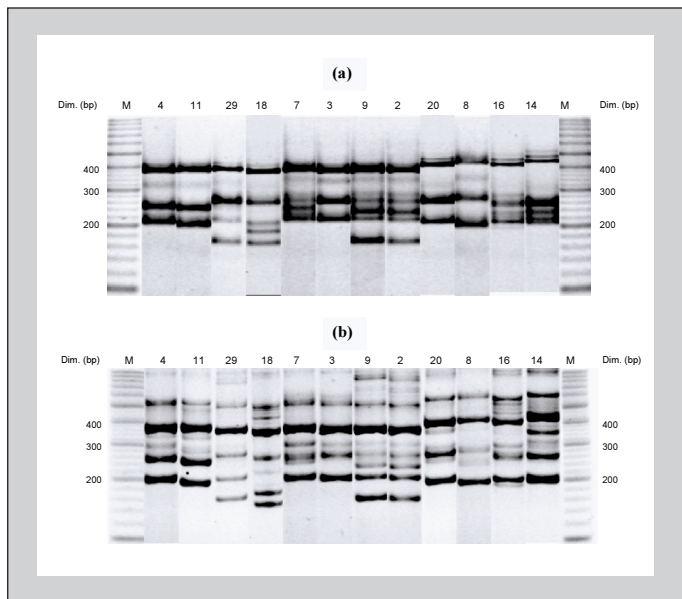
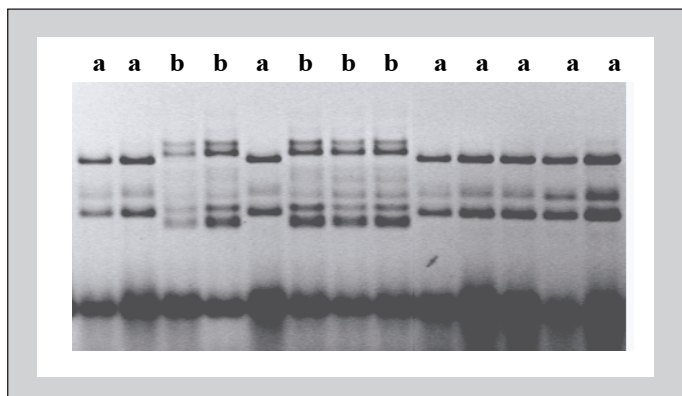


Fig. 5 - Esempio di profilo elettroforetico ottenuto su gel di agarosio a 2.5% mediante PCR effettuata direttamente su colonia. Profilo (a) ceppo 3; profilo (b) ceppo 5



ol e il fenotipo killer.

È stato utilizzato mosto d'uva sterile addizionato di solfato e fosfato ammonico alla concentrazione di 150 mg/L per ogni composto.

Inoltre la concentrazione zuccherina è stata portata a 200g/L con saccarosio. Le fermentazioni sono state eseguite in beute da 2 L contenenti 1.6 L di mosto.

I due ceppi sono stati distribuiti in agar e una colonia per ceppo è stata testata con la PCR per controllarne l'identità. In seguito la stessa colonia identificata è stata inoculata singolarmente in un mezzo di precoltura costituito da mosto d'uva sterile addizionato con solfato d'ammonio e fosfato d'ammonio ma senza l'aggiunta di zucchero.

Il co-inoculo delle fermentazioni è stato effettuato dopo 24 h di crescita aerobica nel mezzo di precoltura a 20°C con 100 oscillazioni per minuto ed è stato eseguito in ragione di 0.5×10^6 cellule/mL di ciascun ceppo. Le fermentazioni sono state condotte a 15°C e a 20°C e sono state eseguite in doppio per ogni temperatura. Parallelamente sono state allestite le prove in monocultura alle diverse temperature, per verificare la capacità dei due ceppi di completare singolarmente la fermentazione.

I campionamenti sono stati eseguiti dopo 10 min dall'inoculo, al 66% di zuccheri residui, al 33% di zuccheri residui e alla fine della fermentazione (< 2g/L di zuccheri). La concentrazione zuccherina è stata determinata attraverso l'analisi HPLC utilizzando la colonna Polysphere OAKC Merck, Darmstadt, Germany) con detector rifrattometrico.

I campioni sono stati distribuiti in piastre contenenti il terreno YMA. Dopo 48 h d'incubazione a

25°C, le colonie sono state scelte in modo randomizzato per l'analisi PCR, campionandole da piastre contenenti da 150 a 300 colonie. Per ogni campionamento, sono state saggiate in PCR 48-60 colonie verificando la quantità relativa dei due ceppi. In totale sono state analizzate circa 900 colonie.

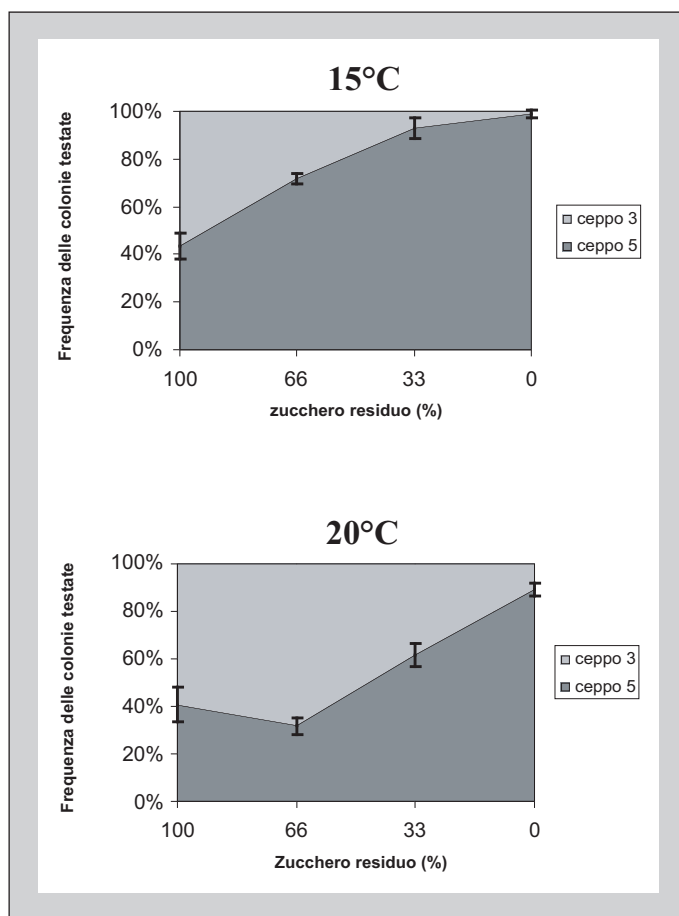
Risultati della ricerca

Discriminazione dei ceppi. I risultati ottenuti con l'elettroforesi su agarosio sono mostrati in Fig. 1. Per ogni ceppo oltre a bande intense sono visibili bande di debole intensità probabilmente dovute ad amplificazioni non specifiche. Per due ceppi che esibiscono un grande numero di tali bande, il 19 e il 30 (Type Strain) è stata eseguita l'amplificazione di un solo locus per volta (singleplex) ed i risultati sono stati confrontati con l'amplificazione multiplex. Come mostrato in Fig. 2, le bande deboli sono presenti anche nelle amplificazioni singleplex e non sono dovute quindi ad interazioni tra i set di primers dei tre loci. Anche se riproducibili, queste bande non sono state considerate per l'analisi del polimorfismo tra i ceppi.

Considerando solo le bande più intense sono state riscontrate differenze tra i ceppi sia in numero che in dimensione dei frammenti amplificati, i ceppi 1, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 15, 20, 24, e 25 sono visibili solo 3 bande intense ma la maggioranza dei ceppi mostra un numero superiore di frammenti che

Tab. 2 - Esempio di ripetibilità ottenuta con il metodo su cinque ceppi di *Saccharomyces cerevisiae* commerciali

Ceppo No.	Media della dimensione della banda (n=5) ± deviazione standard
3	392 ±3, 265 ±1, 217 ±1
4	391 ±4., 250 ±2, 211 ±1
9	393 ±2, 285 ±4, 266 ±2, 237 ±1, 220 ±1, 170 ±2
11	392 ±3, 245 ±2, 201 ±3
30	425 ±6, 245 ±3, 211 ±2, 146 ±1

Fig. 6 - Frequenze relative dei due ceppi durante le prove di fermentazione a 15°C e 20°C .

varia da quattro a nove. Il confronto computerizzato dei profili di banda, fatto con il software Bionumerics (Fig. 3), rivela tra i ceppi una similarità ^{superiori} all'80% nelle coppie 3-7, 18-29, 8-20 e 14-16 con piccole ma apprezzabili differenze nelle dimensioni delle bande, mentre le coppie 2-9 e 4-11 hanno un indice di similarità del 100%. Tutti i cluster con similarità superiore al 80% risultano statisticamente attendibili con un indice cofenetico del 100%.

Per verificare queste similitudini, i prodotti di amplificazione sono stati ulteriormente analizzati con il gel al 10% di poliaccrilamide ed i risultati sono stati confrontati con il gel di agarosio (Fig. 4). Il profilo elettroforetico in poliaccrilamide (Fig. 4b) mostra che le coppie 3-7 e 4-11 sono simili ma distinguibili osservando i frammenti di amplificazione riferibili al locus SCPTSY7 per

quanto riguarda la coppia 3-7, mentre la coppia 4-11 è polimorfica per quanto riguarda gli amplificati dei locus SCPTSY7 e SC8132X.

Infine, anche con il gel di poliaccrilamide, la coppia 2-9 mostra totale identità dei profili.

Nelle prove di verifica della ripetibilità, tutte le ripetizioni per ceppo effettuate presentano lo stesso profilo di ~~amplificazione con~~ i frammenti che mostrano una deviazione standard che non eccede l'1.5% della dimensione media (Tab. 2); i profili, analizzati con il software Bionumerics, risultano avere una similarità del 100%.

Per quanto riguarda la stabilità dei locus microsatellitari, le amplificazioni eseguite all'inizio ed alla fine delle fermentazioni dei tre ceppi esaminati non esibiscono differenze nel profilo dimostrando così che i mar-

ker microsatellitari rimangono stabili durante la fermentazione (dati non mostrati).

Fermentazioni a diverse temperature. In queste prove l'amplificazione è stata eseguita direttamente su colonia evitando il passaggio di estrazione del DNA.

I profili di amplificazione non mostrano differenze quando ottenuti direttamente da colonia rispetto a quelli ottenuti da DNA ottenuto con il metodo descritto. Le bande sono nette e le differenze tra i due ceppi utilizzati sono evidenti (Fig. 5). Le proteine ed altri componenti cellulari migrano molto rapidamente e sono presenti al fondo del gel di agarosio non interferendo con la migrazione del DNA amplificato.

Le frequenze relative dei due ceppi, coinoculati nelle prove di fermentazione, sono mostrate in Fig. 6. Nella prova a 15°C, il ceppo 5 domina rapidamente la fermentazione; al 60% circa di zuccheri residui questo ceppo raggiunge il 70% della popolazione totale e, alla fine della fermentazione il ceppo 3 risulta completamente scomparso.

Nella fermentazione a 20°C il comportamento dei due ceppi è stato differente. Nella prima metà della prova i due ceppi co-dominano, mentre nella parte finale della fermentazione la popolazione del ceppo 5 aumenta fino a rappresentare l'85-90% della popolazione totale.

Discussione dei risultati

Sebbene l'analisi con il sequenziatore, che permette l'accurata determinazione della dimensione dei frammenti amplificati, rimanga lo standard di riferimento nella tipizzazione con i microsatelliti, l'alto costo degli investimenti per la strumentazione ed il tempo necessario per analisi rappresentano degli ostacoli all'applicazione di routine nel campo enologico. Il metodo

che abbiamo proposto, basato sull'analisi del profilo elettroforetico generato dalla PCR multiplex, può essere considerato un buon compromesso tra la capacità discriminatoria, il tempo ed i costi di analisi.

Il metodo ha permesso di ottenere 29 profili differenti tra i 30 ceppi analizzati: i ceppi che hanno mostrato un'alta similarità con il gel di agarosio sono stati ulteriormente analizzati e distinti con il gel di poliacrilamide. Solo due, il ceppo 2 ed il ceppo 9 appaiono indistinguibile in ambedue le elettroforesi.

Recentemente una analisi genetica di questi due ceppi, basata su 17 marker limorfici (Bradbury *et al.*, 2005) ha rivelato leggere differenze in quattro loci, incluso il locus SC8132X da noi analizzato. Questo locus mostra, in questo studio, un allele nel ceppo 2 e due alleli nel ceppo 9, separati da 47 paia di basi. Questa differenza sostanziale dovrebbe essere chiaramente visibile attraverso l'analisi elettroforetica con agarosio o poliacrilamide ma i nostri saggi indicano una totale identità dei due ceppi con nessuna differenza nell'amplificazione del locus SC8132X.

Questa discordanza nell'analisi potrebbe essere dovuta a mutazioni occorse durante la produzione di diversi lotti di lievito; un'altra ipotesi è che i produttori vendano due diversi ceppi con lo stesso nome in mercati differenti e che quindi il nostro studio e quello di Bradbury abbiano preso in esame ceppi diversi ma aventi la stessa designazione commerciale.

Come dato interessante, abbiamo rilevato che nella maggior parte dei ceppi è presente un numero di bande intense elevato. Quando per ogni locus si ottiene più di un frammento dopo amplificazione, questo è probabilmente dovuto all'eterozigosi del locus in ceppi diploidi, poliploidi o aneuploidi, caratteristiche comuni

tra i ceppi commerciali enologici (Bakalinsky and Snow 1990; Hennequin *et al.* 2001; Bradbury *et al.* 2005). Quando il locus amplifica con una sola banda la ploidia non può essere stimata in quanto potrebbe trattarsi sia di aploidia che di poliploidia con omozigosi.



Dal punto di vista pratico, i risultati ottenuti applicando la PCR direttamente su colonia, durante le fermentazioni a diverse temperature, hanno rivelato la robustezza e la semplicità del metodo. Inoltre la possibilità di evitare la fase di estrazione del DNA consente di velocizzare l'analisi e la possibilità di utilizzare l'agarosio rappresenta un vantaggio economico oltre che in termini di sicurezza (la poliacrilamide è tossica). Negli studi di tipo ecologico, dove la possibilità di seguire la crescita di un singolo ceppo con un buon approccio statistico è fondamentale, la capacità di eseguire l'analisi genetica in modo veloce, economico e affidabile su centinaia di campioni, rappresenta un vantaggio evidente.

Come esempio di applicazione abbiamo osservato l'influenza della temperatura di fermentazione sulla crescita di due ceppi coinoculati. Il differente comportamento alle due temperature conferma l'influenza di questo fattore sullo sviluppo e sulla interazione dei ceppi di *S.cerevisiae* (Fleet and Heard 1993, Torija *et al.* 2003). Il ceppo 5 ha dimostrato di essere più criofilo rispetto al ceppo 3 dominando completamente la fermentazione a 15°C e quindi di essere maggiormente adatto a fermentazioni a bassa temperatura. Nella prova a 20°C, anche se nella prima parte della fermentazione i due ceppi sono equamente presenti, il ceppo 5 tende a dominare

nelle fasi finali della fermentazione, cioè quando le condizioni ambientali diventano più difficili a causa dell'aumento della concentrazione di etanolo.

Questo comportamento può essere spiegato con la diversa tolleranza all'alcool, causa primaria di rallentamenti e arresti fermentativi (Casey and Ingledew 1985; D'Amore and Stewart 1987; Carrasco *et al.* 2001).

In conclusione, la buona capacità discriminatoria, unita alla rapida estrazione del DNA da colonia senza l'utilizzo di reagenti pericolosi come il fenolo, l'amplificazione senza l'uso di reagenti costosi, come primer marcati con fluorescenti e Taq polimerasi specifiche, oltre alla possibilità di impiegare l'agarosio per l'elettroforesi, rendono il metodo utilizzabile nell'analisi di routine in condizioni di sicurezza, con alta produttività e senza un investimento economico eccessivo. Una volta che le colonie sono cresciute, sono necessarie solamente 4 ore per ottenere l'identificazione. Inoltre la PCR fatta direttamente su colonia riduce il tempo di analisi a meno di 3 ore e permette di analizzare centinaia di campioni al giorno utilizzando le piastre da 96 pozzetti.

Dal punto di vista applicativo, la possibilità di valutare la capacità la dominanza o la proporzione di un ceppo selezionato inoculato, può essere di aiuto nella selezione di un ceppo ottimale per ogni tipo di fermentazione oltre che nell'ottimizzazione dell'inoculo e nella valutazione dell'impatto sensoriale dei ceppi in fermentazione.

Uno sviluppo futuro sarà l'applicazione della PCR multiplex dei microsatelliti in un approccio coltura indipendente, cioè direttamente sul mosto in fermentazione, in modo da avere uno strumento rapido di controllo dell'impianto del ceppo inoculato, permettendo quindi di intervenire rapidamente durante la fermentazione. ■

Ringraziamenti. Desideriamo ringraziare Lia Rossetti e Giorgio Giraffa del CRA-Centro di Ricerca per le Produzioni Foraggiere e Lattiero Casearie di Lodi, per l'aiuto nella Cluster Analysis con il software Bionumerics.

Nota. Questo articolo rappresenta la versione italiana di: Enrico Vaudano, Emilia Garcia-Moruno (2008). Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food Microbiology* 25, 56-64.

Bibliografia

- Bakalinsky, A. and Snow, R. (1990) The chromosomal constitution of wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 367-382.
- Baleiras Couto, M.M., Ejisma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. and Vossen J.M.B.M. (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol* 62, 41-46.
- Beh, A.L., Fleet, G.H., Prakitchaiwattana, C. and Heard, G.M. (2006). Evaluation of molecular methods for the analysis of yeasts in foods and beverages. *Adv Exp Med Biol* 571, 69-106.
- Blondin, B. and Vezinhet, F. (1988) Identification des souches de levure oenologiques par leur cariotypes obtenus en électrophorèses en champ pulsée. *Rev Fr Enol* 28, 7-11.
- Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Lee, S.A., Dumbar, P.R. and Gardner, R.C. (2005) A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek* 3, 1-12
- Cameron, J.R., Loh, E.Y. and Davis R.W. (1979) Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* 16, 739-751.
- Carle, G. and Olson, M. (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3756-3760.
- Carrasco, P., Querol, A. and Del Olmo, M. (2001) Analysis of stress resistance of commercial wine strains. *Arch Microbiol* 175, 450-457.
- Casey, G.P. and Ingledew, W.M. (1985) Reevaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewers yeast. *J Am Soc Brew Chem* 43, 75-83.
- D'Amore, T. and Stewart, G.G. (1987) Ethanol tolerance of Yeast. *Enzyme Microb Technol* 9, 322-330.
- De Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int J Syst Bacteriol* 49, 915-924.
- De Barros Lopes, M., Soden, A., S., Henschke, P. A. and Langridge, P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice primers. *Appl Environ Microbiol* 62, 4514-4520.
- Epifanio, S.I., Gutierrez, A.R., Santamaría, M.P. and López, R. (1999) The influence of oenological practices on the selection of wild yeast strains in spontaneous fermentation. *Am J Enol Vitic* 50 (2), 219-224.
- Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. and Querol, A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* 70, 1-10.
- Ferraro, T., Schill, J., Ballas, C., Mulholland, N., Golden, G., Smith, G., Buono, R. and Berrettini, W. (1998) Genotyping microsatellite polymorphism by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining: application to quantitative trait loci analysis of seizure susceptibility mice. *Psychiatr Genet* 8, 227-233.
- Field, D. and Wills, C. (1998) Abundant microsatellite polymorphism in *Saccharomyces cerevisiae*, and the different distributions of microsatellites in eight prokaryotes and *S. cerevisiae*, result from strong mutation pressures and a variety of selective forces. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1647-1652.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993). Yeasts: growth during fermentation. In: Fleet, G.M (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publisher, Chur, Switzerland, pp. 27-54.
- Gonzalez Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M. and Caggero, C. (2001) Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett Appl Microbiol* 33, 1, 71-75.
- Harju, S., Fedosyuk, H. and Peterson, K.R. (2004) Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotech* 4, [Http://www.biomedcentral.com/1472-6750/4/8](http://www.biomedcentral.com/1472-6750/4/8).
- Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G. F., Lecointre, G., Nguyen, H. V., Gaillardin, C., Dujon, B. (2001). Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Clin Microbiol* 39, 2, 551-559.
- Howell, K.S., Bartowsky, E.J., Fleet, G.H. and Henschke, P.A. (2004) Microsatellite PCR profiling of *Saccharomyces cerevisiae* strains during wine fermentation. *Lett Appl Microbiol* 38, 315-320.
- Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S. (2000) Yeasts and its importance to wine aroma - A review. *S Afr J Enol and Vitic* 21, 97-129.
- Legras, J.L., Ruh, O., Merdinoglu, D. and Karst, F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol* 102, 73-83.
- Malgoire, J.Y., Bertout, S., Renaud, F., Bastide, J.M. and Mallié, M. (2005) Typing of *Saccharomyces cerevisiae* clinical strains by using microsatellite sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 43, 1133-1137.
- Montrocher, R., Verner, M.C., Briolay, J., Gautier, C. and Marmeisse, R. (1998) Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphism of rDNA spacer sequences. *Int J Syst Bacteriol* 48, 295-303.
- Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. and Dulau, L. (1993) Identification of yeast strain using the polymerase chain reaction. *J Sci Food Agric* 62, 89-94
- Pérez, M. A., Gallego, F. J., Martínez, I., Hidalgo, P., 2001 Detection and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett Appl Microbiol* 33, 1, 461-466.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol* 58, 2948-2953.
- Routman, E. and Cheverud, J. (1994) A rapid method of scoring simple sequence repeat polymorphism with agarose gel electrophoresis. *Mamm Genome* 5, 187-188.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast. *FEMS Microbiology Letters* 231, 19-26.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Pretorius, I., 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust J Grape Wine Res* 11, 127-138.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M. and Mas, A. (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 80, 47-53.