

Diversidad genética de levaduras aisladas a partir de uvas de *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi en el área Euroasiática / Genetic diversity of yeasts isolated from Eurasian populations of *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi

Gustavo Cordero-Bueso^{1,a}, Ileana Vigentini², Roberto Foschino², David Maghradze³, y Jesús Manuel Cantoral¹

¹ Department of Biomedicine, Biotechnology and Public Health, University of Cádiz, Spain

² Department of Food, Environmental and Nutritional Sciences, University of Milan, Italy

³ Institute of Horticulture, Viticulture and Oenology, Agricultural University of Georgia, Tbilisi, Georgia

Abstract. *Vitis vinifera* L. ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi is recognized as the dioecious parental generation of today's cultivars. Climatic change and the arrival in Europe of pathogens and pests have led it to be included on the IUCN Red List of Threatened Species in 1997. At best of our knowledge, no studies on microbial populations of grape-berry surfaces have been done. The present work has been focused on the study of yeast occurrence and diversity on grape-berries collected from wild vines. Final outputs have allowed: *i*) to obtain precise information about yeast communities; *ii*) to provide an objective framework for the classification of the broadest range of species according to their extinction risk; *iii*) to select attractive yeast strains for their biotechnological potential, offering new opportunities to winemakers. Sampling plan was performed in Azerbaijan, Georgia, Italy, Romania and Spain. In all, 3180 yeast colonies were isolated and identified as belonging to 50 species, including *Saccharomyces cerevisiae*, by 26S rDNA D1/D2 domains and ITS region sequencing. Isolates of *S. cerevisiae* were also analysed by SSR-PCR obtaining 163 different genotypes. This study highlights the biodiversity potential of pristine environments that still represent a fascinating source to face common problems in winemaking.

1. Introducción

Las poblaciones de vid silvestre euroasiática se extienden desde la región caucásica pasando por la cuenca del Mediterráneo (Turquía, Grecia, Italia, Sur de Francia y Península Ibérica) hasta el macizo del Hindu Kush (Afganistán y Pakistán) y el Magreb (Marruecos, Túnez y Argelia). Sus ejemplares pertenecen al taxón *Vitis vinifera* L. subespecie *sylvestris* Gmelin (Hegi), única especie ancestral en Europa y son parentales dioicos de las variedades de cultivo. Estas últimas son fundamentalmente hermafroditas, aunque pueden encontrarse también ejemplares femeninos, como ocurre en la región Caucásica [1]. La Península Ibérica e Itálica constituyen hoy en día uno de los principales refugios para esta subespecie durante la última glaciación. En España existen pruebas palinológicas del Pleistoceno medio en las turberas de El Padul (Granada), y en la Laguna de Las Madres (Huelva) [2, 3].

Según las referencias de Rivera y Walker [4], dentro de la Península Ibérica, las bayas de vid silvestre han contribuido directamente a la alimentación humana desde el Paleolítico. Las plantas domesticadas por el hombre son aquellas que le sirven para su dieta o son aplicables a sus actividades cotidianas, entre ellas se encontraba esta liana. A partir de los escasos ejemplares hermafroditas aparecidos en la naturaleza como resultado de mutación, se

fueron seleccionando variedades de cultivo [5]. Un estudio publicado en 2006 que lleva a cabo los diversos clorotipos y su distribución en 1201 muestras de muy diverso material silvestre y cultivado, procedente de diferentes áreas de la Península Ibérica, Itálica, Oriente Medio y Norte de África refuerza la teoría del origen policéntrico de la domesticación de la vid [6]. El artículo señala, además, que el 70% de los viñedos de la Península Ibérica e Itálica exhiben clorotipos derivados de las poblaciones silvestres de Europa Occidental, por lo que sostiene la idea sobre la existencia de una región de refugio para la vid, entre otras especies botánicas, en la Península Ibérica y cuyos genes son completamente distintos de las variedades cultivadas. Parece ser que el proceso de domesticación fue acelerado y guiado en primer lugar por la influencia cultural, y después, por las aportaciones directas de las actividades que realizaron los colonos fenicios, griegos y púnicos en la cuenca del Mediterráneo occidental. Se puede pensar, por lo tanto, que en las zonas de distribución de la vid silvestre, la introducción en primer lugar del consumo del vino y, posteriormente, de la viticultura, se sobrepusieron al preexistente sustrato de cultura local, caracterizado por una fase de proto-domesticación de la vid [7].

Antes del empleo de las variedades hermafroditas cultivadas, los racimos silvestres constituyeron la materia prima del vino. Probablemente el hombre, durante milenios, llevó a cabo un proceso de frutalización con el fin de aumentar la presencia de este recurso natural en

^a e-mail: gustavo.cordero@uca.es

sus alrededores en detrimento del uso de la vid silvestre. Con el desarrollo y aumento de las comunicaciones, la acción humana ha ido progresivamente destruyendo los hábitats de esta planta trepadora de forma directa o indirecta, mediante obras públicas (embalses, puentes, trazado de carreteras), expansión de las zonas agrícolas y explotaciones forestales, así como con la limpieza de las cunetas de las carreteras [7], por lo cual a día de hoy sólo quedan algunos reductos de poblaciones en la Península Ibérica, Itálica, Helénica, Anatolia y región Transcaucásica. Arnold et al. [8] concluyen, además, que la vid silvestre en Europa está más afectada que en otros lugares del Mundo debido a que quedan muy pocos refugios para la misma y la tasa de supervivencia es muy baja, pues los intentos de recuperarla mediante trasplantes y reforestación suponen un elevado coste económico y con sin éxito. Así, todo ese creciente impacto ambiental negativo ha llevado a la vid silvestre a figurar como especie amenazada en la lista roja publicada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 1997) [9].

En la Península Ibérica, los hábitats que albergan todavía un mayor número de parras silvestres son los bosques de ribera (Sierra Norte de Sevilla, Huelva y Parque Nacional de Doñana), ya que las parras son hidrófilas y toman árboles y arbustos como tutor, dado su carácter heliófilo. Los principales tutores corresponden a diversas especies de los géneros: *Acer*, *Alnus*, *Crataegus*, *Ficus*, *Fraxinus*, *Olea*, *Populus*, *Quercus*, *Retama*, *Rubus*, *Ulmus*, *Rubus*, entre otros. Asimismo, aparecen en diversas zonas coluviales de clima húmedo, como es el caso de la costa cantábrica. Hay refugios de vid silvestre en el Norte y en el Sur de la Península Ibérica. La supervivencia de esta subespecie se ve también expuesta a las actividades agrícolas, aves (especialmente alcedinos) y otros factores humanos, además de la filoxera [7]. Según Böhm [10], la vid silvestre que alberga la Península Ibérica también presenta particularidades genéticas diferentes a otras de su misma especie en otras regiones de la cuenca Mediterránea. Este autor denomina a las vides presentes en la península Ibérica (España y Portugal) como vides del “polo ibérico” y a las presentes en la península Itálica como vides del “polo italo-etrusco”. En Italia se distribuyen por diferentes regiones siendo las principales Piemonte, Lombardía, Cerdeña, Calabria, Basilicata y Sicilia [11].

Aparte de los usos tradicionales citados, la vid silvestre constituye un importante recurso fitogenético que alberga una importantísima diversidad fitogenética, con la que hay que contar para futuros programas de mejora de viníferas y portainjertos, así como para la reforestación de ecosistemas naturales. Actualmente, mediante marcadores moleculares, se abordan estudios sobre la contribución genética de las vides silvestres a las variedades de cultivo características de algunos puntos de la región Mediterránea. Sin embargo, bajo nuestro conocimiento, aún no existen estudios que determinen la ecología de microorganismos asociados a la uva de vides silvestres, siendo de especial relevancia aquellos microorganismos implicados en la fermentación vínica y maloláctica, levaduras, bacterias lácticas o bacterias productoras de vinagre (bacterias acéticas). Por ello, pensamos que preservar la vid salvaje y su consecuente biodiversidad de especies microbianas es de enorme importancia no

solo por su interés actual para la industria enológica y vinagrera tan importante en los países del Mediterráneo así como en otros del Mundo, sino también para asegurar la conservación de un *pool* de genes de gran importancia tecnológica para la industria alimentaria en general y mantener estos recursos genéticos microbianos ante la inminente amenaza de extinción de la vid silvestre y crear nuevos estilos de vinos y vinagres que coloquen a España e Italia de nuevo a la cabeza en innovación enológica. En este sentido se hacen necesarios estudios que ayuden a cubrir ese “vacío de conocimiento”. La extinción de las pocas poblaciones de vid silvestre en Europa supondría una pérdida irreversible de la biodiversidad, no sólo de la propia liana que nos ocupa, sino también los microorganismos asociados a la misma. El objetivo fundamental evaluar la biodiversidad de microorganismos de interés biotecnológico asociadas a la uva de vides silvestres y proveer datos que refuercen la importancia de la protección de *Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi “*in situ*”. Además de aportar nuevas cepas de levaduras capaces de hacer frente a problemas comunes entre países dónde la vitivinicultura es una importante fuente económica y social.

2. Material y métodos

La recogida de uvas de vid silvestre se llevó a cabo en diferentes muestreos por triplicado en las diferentes regiones de estudio (Tabla 1) durante los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre (según latitud y maduración de la uva) en el periodo del 2015 al 2017 la experiencia nos indica que en sistemas abiertos (campo) es importante hacer el muestro a larga escala (mínimo 2 años) para minimizar la influencia de las condiciones climáticas que afectan a las poblaciones de microorganismos presentes en la vid silvestre. Se emplearon bolsas asépticas para la recogida de bayas de uvas como muestra la metodología descrita por Cordero- Bueso et al. (2011). Se realizó un estudio ampelográfico para determinar que las uvas recogidas pertenecía a *V. vinifera* ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi siguiendo el protocolo de la O.I.V. También se llevaron a cabo fermentaciones a pequeña escala para aislar microorganismos al inicio, mitad y final del proceso fermentativo tal como se propone en Cordero-Bueso et al. [12]. Además, se aislaron los microorganismos directamente del hollejo de las uvas mediante lavados con cloruro sódico al 0,9% y con la ayuda de un sonicador y mediante rotura de las células vegetales por criogenización y con la ayuda de un bisturí para aislar levaduras endofíticas.

El aislamiento se realizó siguiendo protocolos de Microbiología Clásica. Los medios de cultivo utilizados fueron: medio YPD (2% glucosa, 2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% agar) y medio WL-agar (Oxoid). Para su conservación y posteriores estudios de identificación y caracterización se utilizaron los siguientes métodos de conservación: a) en placas Petri, conservándose a 4°C y b) en glicerizados (glicerol 40%), conservadas a -80°C [12].

La identificación de los aislados se hizo mediante la obtención de los diferentes perfiles moleculares del ADN total y mitocondrial previamente extraído mediante protocolos estándares. Las cepas aisladas se identificaron por las técnicas de biología molecular PCR de la

Tabla 1. Puntos de muestreo de uvas de vid silvestre en las diferentes localizaciones de la región Euroasiática.

País	Localización	Provincia	Coordenadas (Latitud, Longitud)	Altitud (m)
Azerbaiyán	Guruchay 1	Quba	41.38564 N, 48.38264 E	953
	Guruchay 2	Quba	41.32566 N, 48.37580 E	880
Georgia	Tsminda, Gveleti	Gori	42.66244 N, 44.62045 E	1100
	Tsitsamuri, Mtsjeta	Kartli	41.52383 N, 44.43574 E	524
	Zhinvali 03, Dusheti 03	Kartli	42.08784 N, 44.45843 E	986
	Shirikhevi 06, Dusheti	Kartli	41.98121 N, 44.72292 E	978
	Nakhiduri 24, Marnueli	Kartli	41.29143 N, 44.41201 E	429
	Shirikhevi 02, Dusheti	Kartli	41.57850 N, 44.43076 E	1348
	Nakhiduri23, Marneuli	Kartli	41.29140 N, 44.41206 E	437
	Bagichala03, Dusheti	Kartli	42.02226 N, 44.44558 E	644
Italia	Barisakmos, Gadasakmuevi 01	Dusheti	42.08769 N, 44.45849 E	738
	Monte Fenera, Borgosesia	Vercelli	45.71000 N, 08.31600 E	886
	Montalto	Pavia	44.97940 N, 09.20941 E	381
	Ortuabis, Laconi	Oristano	39.85120 N, 09.05184 E	504
	Bau Sa Mela, Nurallao	Cagliari	39.83981 N, 09.12157 E	735
	Santa Sofia, Laconi	Oristano	39.85948 N, 09.12417 E	783
	Ristalu, Aritzo	Nuoro	39.95258 N, 09.19497 E	816
	Fluminimaggiore Nera	Carbonia-Iglesias	39.43689 N, 08.49750 E	62
	Fluminimaggiore Bianca	Carbonia-Iglesias	39.43689 N, 08.48871 E	71
	Gutturu Mannu 1	Cagliari	39.17276 N, 08.91511 E	116
Rumania	Gutturu Mannu 2	Cagliari	39.17276 N, 08.90545 E	116
	Turcul river, Bran	Brasov	45.51731 N, 25.36404 E	763
España	Hueznar, San Nicolás del Puerto	Seville	37.99448 N, 05.66693 W	565
	La Rocina, Doñana	Huelva	37.12380 N, 06.49654 W	8
	El Bosque, Benamahoma	Cádiz	36.77323 N, 05.48759 W	419
	Algeciras, Gran Capitán	Cádiz	36.12112 N, 05.52705 W	406
	La Algaida, Sanlúcar de Barrameda	Cádiz	36.83204 N, 06.31994 W	4
	Guadalupe	Cáceres	39.45132 N, 05.32724 W	637
	Tui	Pontevedra	42.04915 N, 08.64661 W	41

región ITS del ADN ribosómico y RFLP utilizando las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI* [12].

En el caso de las levaduras identificadas como *Saccharomyces cerevisiae*, se aplicó la técnica del análisis de los microsatélites multiplex o SSR con el objetivo de encontrar distintos perfiles a nivel de cepa [12]. Los amplificadores se sometieron a electroforesis en geles de agarosa o en secuenciador automático. Y el análisis de las imágenes en una cámara equipada con un transiluminador UV (BioRad). Se seleccionaron aquellas que presentaron un perfil distinto y se tomaron al menos dos representantes de la misma especie para ser secuenciadas.

La secuenciación se llevó a cabo a través de los servicios de secuenciación MACROGEN Inc. Korea (<http://www.macrogen.com>). La alineación de secuencias se realizó con programas de bioinformática online (CLUSTAL W, In-silico, etc.). Las secuencias fueron comprobadas y depositadas en bases de datos electrónicas de colecciones de microorganismos (CECT, GenBank, NCI, etc.).

Una vez bien identificados mediante las técnicas señaladas anteriormente, los microorganismos con diferentes perfiles moleculares fueron sometidos a caracterización mediante pruebas bioquímicas y físico-químicas para conocer su capacidad de asimilación y fermentación de azúcares, resistencia al etanol y temperatura (curvas de crecimiento en lector de microplaca y fenotipo en placa medio-agar), al anhídrido sulfuroso, stress osmótico (curvas de crecimiento en lector de microplacas) y capacidad enzimática, se atenderá especialmente a las

actividades glucosidasa, esterasa, proteasa y pectinasa (uso de kits enzimáticos y medios de cultivos específicos), ya que son de interés en la enología por aportar complejidad a los vinos. Se siguieron protocolos similares a los descritos en Rodríguez et al. [13]. También se obtuvieron las curvas de crecimiento de las cepas de levaduras de géneros *Saccharomyces* y con propiedades enológicas de interés mediante el uso un lector de placas multipocillos (96 pocillos) en mosto estéril natural obtenido a partir de vides silvestres, mosto obtenido de la variedad tempranillo, mosto sintético y en medio YPD como control durante 72 horas a 28°C y obteniendo medidas de lectura de concentración de células por mililitro a una Densidad Óptica de 600 nm e inoculando a un O.D = 0,2–0,4. Una vez recogidos los datos se trataron en Excel para obtener las curvas de crecimiento y se ajustaron de acuerdo al modelo de de cinética de Gompertz descrito por Buchanan et al. [14]. Estas curvas de crecimiento nos proporcionaron información para determinar el momento exacto (horas de crecimiento) de la fase exponencial de estas cepas y conocer el comportamiento en mosto natural de *V. vinifera* ssp. *Sylvestris* al que están adaptadas, de este modo conoceremos el momento óptimo de inoculación de las cepas posteriores experimentos de fermentación.

Los datos obtenidos en todos los objetivos se analizaron a través de XSTAT. Además, se usaron programas específicos para los análisis filogenético (PAUP v4b10 y Modeltest 3.06), análisis Bayesianos (MRBAYES v3.0b4), análisis de parsimonia heurística y árboles filogenéticos (MAXTREES, PAUP v4b10).

3. Resultados y discusión

El número de cepas muestreadas durante el periodo 2013–2016 asciende a 29 puntos de muestreo (2 en Azerbaijan, 9 en Georgia, 10 en Italia, 1 en Rumanía y 7 en España) en los cuales al menos se tomaron muestras de uva de entre 3 y 5 cepas de vid silvestre. La cantidad de uvas recolectadas fue variable, entre 100 g y 2,5 kg. El grado de maduración de la uva siempre fue óptimo para poder llevar a cabo microvinificaciones como método de autoenriquecimiento con objeto de aislar el número máximo de especies. De todas la muestras tomadas y analizadas se obtuvo un total de 3180 colonias de las cuales, una vez identificadas mediante los métodos moleculares mencionados en la sección de Materiales y Métodos se identificó un total de 50 especies pertenecientes a 10 géneros. La Tabla 2 muestra la frecuencia y distribución de las especies identificadas en la región Euroasiática. Entre los aislados, 5 cepas no fueron identificadas mediante los métodos moleculares conocidos hasta ahora, no obstante fueron caracterizados mediante técnicas clásicas de microscopía y a través de pruebas bioquímicas de fermentación y asimilación de azúcares (datos no mostrados). Adicionalmente, se aislaron levaduras viables pero no cultivables e igualmente fueron caracterizadas siguiendo los procedimientos mencionados anteriormente. La especie mayoritaria aislada fue *Saccharomyces cerevisiae*, esto es debido al procedimiento experimental empleado de autoenriquecimiento, no obstante, esta especie también fue aislada directamente del hollejo de las uvas recolectadas, aunque en una baja proporción. Todos los aislados pertenecientes al género *Saccharomyces* fueron sometidos a posteriores análisis específicos para obtener diferentes perfiles a nivel de cepa (genotipos). Respecto a levaduras de géneros No-*Saccharomyces*, las especies *Hanseniaspora uvarum* y *Pichia kluyvery* fueron las especies mayoritarias, pero no se aislaron en todas las regiones muestreadas (Tabla 2). Algunas especies fueron exclusivas de cada área, como por ejemplo *Aureobasidium proteae* que solamente fue aislada en Italia, al igual que sucede con especies de los géneros *Cryptococcus*, *Curvibasidium* y algunas de *Hanseniaspora*. Las especies *Clavispora lusitanae*, *Hanseniaspora meyeri*, *Issatchenkia terricola* y *Xanthophyllomyces dendrorhous* solo se aislaron en Georgia, al igual que sucede con *Saccharomycodes ludwigii* en Azerbaijan. Rumanía solo mostró una especie exclusiva entre los aislados, *Pichia fermentans*. En el caso de España cabe destacar que fue la región donde más especies diferentes se aislaron, podría venir motivado por haber muestreado un año más que en el resto de países, sin embargo, también se identificaron numerosas especies no aisladas en otras áreas del Mediterráneo tales como *Candida ethanolica*, *Candida sake*, *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Lachancea thermotolerans*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *Rhodospodium palidugenum*, *Rhodotorula glutinis*, *Scheffersomyces stipitis*, *Schwanniomyces polymorphus*, *Torulaspora delbrueckii* y *Wickerhamomyces anomalus*. Pese a que ninguna de las especies identificadas en los diferentes países donde se realizó el muestreo aparece en todos los países, a excepción de *Saccharomyces cerevisiae*, cabe destacar que la especie *Pichia manshurica* fue aislada en Italia y España pero a la misma latitud (Monte Fenera y Tui).

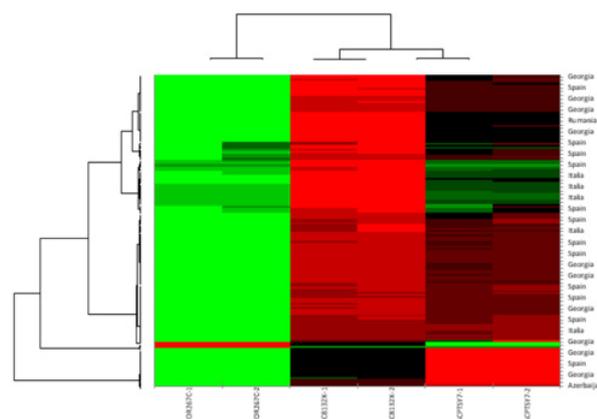


Figura 1. Mapa de calor (Heatmap) de los diferentes genotipos obtenidos mediante PCR-Multiplex de Microsatélites en los diferentes países de la región Euroasiática muestreados.

Aquellos aislados que fueron identificados como pertenecientes al género *Saccharomyces*, dado el interés que suscita en la industria enológica, fueron posteriormente sometidos análisis de PCR Multiplex de microsatélites. Entre los aislados de *S. cerevisiae* se obtuvieron un total de 169 genotipos diferentes, siendo 80 de España, 56 de Georgia, 24 de Italia, 6 de Azerbaijan y 3 de Rumanía. Se observó cierta relación entre los genotipos de todas la regiones pero sólo para algunos alelos. A continuación se explican los resultados obtenidos.

En la Fig. 1 se muestra el de mapa de calor obtenido a partir del análisis genómico (en base al tamaño en pares de bases del amplificado) por PCR multiplex de microsatélites con las tres parejas de primers. Los alelos se agrupan en filas y las cepas en columnas. Si se observamos individualmente los alelos y las cepas según su origen (Azerbaián, Georgia, Italia, Rumanía y España) vemos claramente que los se dividen en tres grupos que corresponden a los tres genes amplificados.

Según el cluster de la izquierda (dendrograma) se observa que las diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas de uvas y microvinificaciones de uvas silvestres recogidas en las 5 áreas estudiadas se agrupan de acuerdo al tamaño de los alelos amplificados.

Si nos centramos en los patrones rectángulo/cuadrado dentro del mapa, los rectángulos grandes verdes de la izquierda muestran que para los alelos (YOR267) tenemos una coincidencia relativamente alta entre las cepas aisladas en los diferentes países, fijándonos en la parte central del mapa se muestra un rectángulo rojo grande que aún a coincidencias entre los alelos (SC8132) de los diferentes países, pero con una menor frecuencia que en el primer patrón y además se alejan bastante los aislados en Azerbaijan (restángulo marrón oscuro) del resto de países. En el caso del tercer patrón de colores más oscuros (marrón-negro) es completamente inverso, en comparación con los dos anteriores, así como el rectángulo verde intenso correspondiente a algunos genotipos aislados en Georgia demuestran la variabilidad y exclusividad de algunos genotipos al área Caucásica. Curiosamente se observa que algunos genotipos encontrados en España comparten varios alelos con aquéllos de los países caucásicos (cuadros verdes, negro y rojo del de la parte inferior del mapa de calor) agrupados en un cuarto cluster (dendrograma de la izquierda). Con estos resultados se

Especies	Azerbaiján	Georgia	Italia	Rumanía	España
<i>Aureobasidium proteae</i>			2		
<i>Aureobasidium pullulans</i>			7		18
<i>Candida ethanolica</i>					1
<i>Candida sake</i>					11
<i>Candida stellata</i>					25
<i>Candida zemplinina</i>					4
<i>Clavispora lusitaniae</i>		32			
<i>Cryptococcus flavescens</i>			9		
<i>Cryptococcus wieringae</i>			10		
<i>Curvibasidium cygneicollum</i>			2		
<i>Curvibasidium pallidocorallinum</i>			15		
<i>Hanseniaspora sp</i>			2		
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>			9		
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>			18		54
<i>Hanseniaspora meyeri</i>		13			
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>			32		120
<i>Hanseniaspora osmophila</i>					
<i>Haseniaspora uvarum</i>		67	158	34	137
<i>Hyphopichia pseudoburtonii</i>			8		
<i>Issatchenkia siamensis</i>		27	5		
<i>Issatchenkia terricola</i>		17			
<i>Lachancea thermotolerans</i>					185
<i>Martiniozyma asiatica</i>			13		
<i>Metschnikowia sp.</i>		21	15		
<i>Metschnikowia fructicola</i>			69	15	
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>			36		19
<i>Metschnikowia viticola</i>		18	23		
<i>Meyerozyma caribbica</i>					88
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>			30		107
<i>Naganishia diffluens</i>			9		
<i>Pichia fermentans</i>				10	
<i>Pichia kluyveri</i>			43		230
<i>Pichia kudriavzevii</i>					130
<i>Pichia Manshurica</i>			4		24
<i>Rhodospiridium paludigenum</i>					4
<i>Rhodotorula fujisanensis</i>			21		
<i>Rhodotorula glutinis</i>					34
<i>Rhodotorula mucilaginoso</i>		34	1		22
<i>Rhodotorula nothofagi</i>			27		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50	296	249	31	517
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	10				
<i>Scheffersomyces stipitis</i>					14
<i>Schwanniomyces polymorphus</i>					2
<i>Torulaspora delbrueckii</i>					67
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>					42
<i>Xanthophyllomyces dendrorhou</i>		2			
<i>Zygosaccharomyces sp</i>			2		
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>					6
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>					41
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>			2		6
<i>Viables pero no cultivables</i>			30		
<i>No identificada</i>		3			2

podría afirmar que existen tres regiones, áreas o ejes definidos en cuanto a genotipos de levaduras, serían el eje oriental (Azerbaijan y Georgia), el eje central (Rumanía e Italia) y el eje occidental (España, pese a que comparte algunos genotipos con el eje oriental).

4. Conclusiones

Este estudio destaca el potencial de biodiversidad de entornos prístinos que aún representan una fuente fascinante para enfrentar problemas comunes en la

elaboración del vino. Se están llevando a cabo estudios de evaluación del potencial biotecnológico de las diferentes especies aisladas, así como estudios para determinar si las cepas no identificadas son posibles nuevas especies.

Referencias

- [1] D. Maghradze, O. Failla, R. Bacilieri, S. Imazio, I. Vashkidze, R. Chipashvili, I. Mdinardze, N. Chkhartishvili, P. This, A. Scienza, *Georgian vitis germplasm : usage, conservation and investigation*

- (Bulletin oiv, vol. 83, octobre-novembre-décembre n° 956-957-958, 2010)
- [2] R. Stevenson, *J. Biogeography* **12**, 293–314 (1985)
- [3] F. Florschütz, J. Menéndez Amor, T.A. Wijmstra, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol* **10**, 233–264 (1971)
- [4] Rivera-Núñez, Walker, *Rev Paleobot. Palynol.* **61**, 205–237 (1998)
- [5] C. Arnold, A. Schnitzler, A. Douard, R. Peter, F. Gillet, *Biodiversity and Conservation* **14**, 1507–1523 (2005)
- [6] R. Arroyo-García, L. Ruíz-García, L. Bolling, R. Ocete, A. López, C Arnold, A. Ergul, *Mol. Ecol.* **15**, 3707–3714 (2006)
- [7] R. Ocete, C. Arnold, O. Failla, G. Lovicu, B. Biagini, S. Imazio, D. Maghradze, M.A. López, *Vitis* **50**(2), 97–98 (2011)
- [8] Forni. *La vite e l'uomo* (EDP Ersa, Gorizia, Italia, 2006)
- [9] IUCN red list of threatened plants (EDP, K.S. Walter, H.J. Gillett, South Africa, 1997)
- [10] J. Böhm, *Portugal Viticola, O Grande Livro das Castas* (EDP, C. Ferreiras, Lisboa, Portugal, 2007)
- [11] B. Biagini, G. De Lorenzis, A. Scienza, O. Failla, S. Imazio, D. Maghradze, *D. Act. Horticult.* **948**, 211–216 (2012)
- [12] G. Cordero-Bueso, T. Arroyo, A. Serrano, J. Tello, I. Aporta, M.D. Vélez, E. Valero, *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 132-139 (2011)
- [13] M.E. Rodríguez, J.J. Infante, M. Molina, M. Domínguez, L. Rebordinos, J.M. Cantoral, *J. Appl. Microbiol.* **108**, 1292–1302 (2010)
- [14] R.L. Buchanan, R.C. Whiting, W.C. Damert, *Food Microbiol* **14**, 313–326 (1997)