

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTIMACIÓN DE LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN PARA  
RASGOS DE IMPORTANCIA ENOLÓGICA EN *Saccharomyces  
cerevisiae* COLECTADAS EN CHILE Y ARGENTINA (Mendoza)**

**FERNANDA CEPEDA ÁLVAREZ**

**SANTIAGO - CHILE**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**ESTIMACIÓN DE LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN PARA  
RASGOS DE IMPORTANCIA ENOLÓGICA EN *Saccharomyces  
cerevisiae* COLECTADAS EN CHILE Y ARGENTINA (Mendoza)**

**ESTIMATION OF THE RESPONSE TO THE SELECTION FOR  
THE FEATURES OF THE ENOLOGICAL IMPORTANCE OF  
*Saccharomyces cerevisiae* COLLECTED IN CHILE AND  
ARGENTINA (Mendoza)**

**FERNANDA CEPEDA ÁLVAREZ**

**SANTIAGO - CHILE**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**ESTIMACIÓN DE LA RESPUESTA A LA SELECCIÓN PARA  
RASGOS DE IMPORTANCIA ENOLÓGICA EN *Saccharomyces  
cerevisiae* COLECTADAS EN CHILE Y ARGENTINA (Mendoza)**

**Memoria para optar al Título**  
Profesional de Ingeniero Agrónomo

**FERNANDA CEPEDA ÁLVAREZ**

<b>PROFESOR GUÍA</b>	<b>Calificaciones</b>
<b>Sr. Cristian Araneda T. Licenciado en Ciencias Biológica, Dr.</b>	<b>7,0</b>
<b>PROFESORES EVALUADORES</b>	
<b>Sr. Roberto Neira R. Ingeniero Agrónomo, Dr.</b>	<b>6,0</b>
<b>Sr. Jaime Rodríguez M. Ingeniero Agrónomo, Mg.</b>	<b>6,8</b>
<b>COLABORADOR</b>	
<b>Sr. Elías Obreque S. Ingeniero Agrónomo, Dr.</b>	

**SANTIAGO – CHILE**

**2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en una primera instancia a mi familia: Julio Cepeda, Alejandra Álvarez y a mi hermanita Almendra Cepeda por el apoyo y fuerza incondicional que me entregaron para que no me rindiera en el camino que es esta vida.

También agradezco el apoyo constante de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, sobre todo el año 2011, año del fallecimiento de David Jara, en especial a la Secretaría de Estudios, SEMDA y Asistente Social, sin olvidar además, la comprensión y apoyo de muchos profesores, como la orientadora Sra. Eliana Muñoz y el profesor Juan Manuel Uribe quienes fueron mis guías en relación a la toma de decisiones con respecto a continuar la carrera y a la manera cómo sobrellevar la fuerte carga emocional. Por otro lado, no puedo olvidar a mi profesor guía Cristian Araneda, quien tuvo la deferencia de guardarme y asignarme el tema y, además, por haberse transformado en un amigo que entregaba sabios y graciosos consejos. Agradezco a los académicos de la Universidad de Santiago: Dra. Verónica García y Dr. Claudio Martínez por facilitarme los datos e información para el desarrollo de esta memoria y al profesor colaborador Elías Obreque.

A Franco Arias, mi mejor amigo, por la ayuda intelectual y moral, gracias.

No puedo dejar de agradecer a todos mis compañeros y compañeras, quienes me acompañaron y apoyaron día a día para lograr el objetivo propuesto. A mis amigos y amigas que siempre me dieron su apoyo y sabios consejos cuando los necesitaba.

Finalmente, agradezco a mis tías: Coty, Paula, Claudia y Yoly; a mis abuelos y bisabuela: Pita, Tata Lucho y bisabuela Eliana -quien nos dejó el 2014- porque enviaron su apoyo constante a través de oraciones.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Hipótesis .....	8
Objetivo General .....	8
Objetivos Específicos .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Lugar de estudio .....	9
Material de estudio .....	9
Métodos .....	12
Análisis Estadístico .....	12
Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas.....	12
Evaluaciones .....	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	14
Estimación de Heredabilidad .....	17
Correlación.....	19
Respuesta a la selección .....	22
CONCLUSIONES .....	25
BIBLIOGRAFÍA .....	26

## RESUMEN

El uso de las levaduras comerciales en la industria del vino, ha mejorado y facilitado los manejos asociados a su elaboración, aportando mayor calidad sensorial. Hay diferentes tipos de levaduras que participan en las etapas de la vinificación, dentro de las cuales cabe destacar la encargada de la fermentación alcohólica (*Saccharomyces cerevisiae*), la que transformará en su última etapa los azúcares de la uva en vino.

En este estudio se analizaron por medio de métodos genético cuantitativos siete rasgos o variables enológicas producidas en la fermentación alcohólica por parte de *S. cerevisiae*: uso de nitrógeno asimilable por las levaduras (YAN), producción de CO<sub>2</sub>, azúcares residuales tales como glucosa y fructosa, producción de glicerol y producción de etanol; a partir de 51 familias experimentales y 195 progenies. El objetivo principal fue estimar la heredabilidad, correlaciones genéticas y fenotípicas, de los siete rasgos de interés, y conocer las respuestas esperadas directas y correlacionadas a la selección con la finalidad de poder seleccionar cepas de *S. cerevisiae* que usen más eficientemente el YAN.

Se estimaron las correlaciones fenotípicas por medio del coeficiente de correlación de Pearson o Spearman. Las estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas se hicieron con el programa MTDFREML, utilizando el modelo Mixto o modelo Animal que incluyó como efecto fijo el origen geográfico de las levaduras evaluadas.

Las heredabilidades fueron extremadamente altas para todas las variables analizadas ( $h^2 > 0,71$ ). YAN presentó una respuesta ( $R_v$ ) de un 21,9%, este valor es alto en comparación al obtenido para especies de peces de cultivo y animales de granja, por lo que se recomienda hacer una selección para el rasgo del uso de YAN usando registros fenotípicos, dado lo alto de la heredabilidad para este carácter ( $h^2 = 0,99$ ).

Palabras clave: levadura vínica; YAN (nitrógeno asimilable por la levadura), heredabilidad.

## SUMMARY

The use of commercial yeasts in the wine industry, has improved and facilitated handling associated with its development, providing greater sensory quality. There are different types of yeast involved in the stages of winemaking, within which include the charge of the alcoholic fermentation (*Saccharomyces cerevisiae*), which in its final stage transform sugars of the grape into wine.

In this study we were analyzed by oenological variables produced by alcohol fermentation by *S. cerevisiae* quantitative genetic methods seven features or: use of assimilable nitrogen by yeasts (YAN), production of CO<sub>2</sub>, residual sugars such as glucose and fructose, glycerol and ethanol production; from 51 experimental families and 195 progenies. The main objective was to estimate the heritability, genetic and phenotypic correlations of the seven features of interest, and expected meet direct and correlated responses to selection in order to be able to select strains of *S. cerevisiae* to use more efficiently the YAN.

Phenotypic correlations by the Pearson correlation coefficient or Spearman of estimated. Estimates of heritability and genetic correlations were made with the MTDFREML program using the Mixed Animal model or model that included as a fixed effect the geographical origin of yeasts evaluated.

The heritability were extremely high for all the analyzed variables ( $h^2 > 0.71$ ). YAN filed a response (Rx) of 21.9 %, this value is high compared to that obtained for farmed fish species and farm animals, so it is recommended to make a selection for the trait of using YAN using phenotypic records, given the high heritability for this trait ( $h^2 = 0.99$ ).

Key words: wine yeast; YAN (yeast assimilable nitrogen), heritability.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de Chile, desde la conquista, la vitivinicultura ha ido adquiriendo una gran importancia y reconocimiento tanto a nivel nacional como internacional. A partir del año 1980 comienza una nueva etapa para la vitivinicultura nacional con la llegada de las bodegas de Miguel Torres, las que incorporan nuevas técnicas de vinificación (Pérez, 2014). Estos avances junto con el desarrollo de otras viñas, han permitido que el país en la actualidad produzca el 6% de la producción mundial de vino (OIV, 2014), alcanzando el 2015 una producción de 1.286.707.393 L (SAG, 2015).

El vino se produce a partir de la uva de *Vitis vinifera*, es por ello que la denominación vino se refiere al producto resultante de la fermentación del jugo de uva (Hills, 2005). Todas las operaciones, mediante las cuales se transforma la uva en vino, se denominan "vinificación". En términos generales, aunque los sistemas difieren de un lugar a otro y según se trate de uvas blancas o tintas, consta de las siguientes etapas según Reynier (2012):

1. Estrujado o prensado
2. Fermentación alcohólica
3. Separación del vino, Clarificación, Filtración, Estabilización
4. Maduración
5. Embotellado

El vino es esencialmente el producto de la fermentación alcohólica, proceso mediante el cual los azúcares de la uva se transforman en etanol y otros productos secundarios debido a la acción de las levaduras. La fermentación espontánea del mosto de uva se lleva a cabo por la biota indígena de levaduras que acompaña a la vendimia y la existente en el ecosistema de la bodega. En este proceso está implicada la acción secuencial de diferentes géneros y especies de levaduras (Zamora, 2000).

Durante las primeras etapas de la fermentación se desarrollan levaduras silvestres con bajo poder fermentativo de los géneros: *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida* y *Pichia*. En estos primeros estadios hay presencia de aire en el líquido, favoreciendo un rápido crecimiento aeróbico de las levaduras. Una vez que el aire es consumido, comienzan las condiciones anaeróbicas y con ellas la producción de alcohol (Ocón, 2014).

Un parámetro muy importante durante la fermentación es la temperatura, ya que el calor producido durante la fermentación puede impedir el crecimiento de las levaduras. Por esto, la temperatura debe mantenerse por debajo de los 29°C y eso se logra mediante el uso de tanques a través de los cuales se hace circular agua fría. Cuando la concentración de etanol se va incrementando, se imponen levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (se denominan organismos anaeróbicos facultativos, es decir que pueden



desarrollar sus funciones biológicas sin oxígeno), más resistentes al etanol y que son las responsables del final de la fermentación (Romano *et al.*, 2003).

Por otra parte, la composición de la biota de levaduras puede variar con las condiciones climáticas (Parrish *et al.*, 1985), la variedad de uva (Schütz *et al.*, 1994) y la tecnología de vinificación (Epifanio, 2005).

Dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* existe una gran diversidad genética, clones distintos con una capacidad fermentativa diferente (Vezinhet *et al.*, 1990; Guillamón *et al.*, 1996), cuya constancia se ha puesto en evidencia en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de biología molecular que permiten diferenciar levaduras a nivel clonal cepa (Vezinhet y Pineau, 1990; Guillamón *et al.*, 1996).

Desde hace algún tiempo se han realizado numerosos estudios sobre la ecología de las levaduras vínicas, con el fin de estudiar si la fermentación espontánea está conducida por un alto o por un bajo número de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y si estas cepas permanecen estables en una bodega de un año a otro y si los resultados obtenidos, según las zonas geográficas, son diferentes (Briones *et al.*, 1996).

Estos estudios son de gran interés en el orden de establecer la existencia de cepas pertenecientes a un ecosistema concreto (zona, bodega, denominación de origen) y también para llevar a cabo programas de selección de levaduras autóctonas que podrían usarse como inóculos en las vinificaciones realizadas en una zona determinada (Briones *et al.*, 1996).

Para poder seleccionar estas levaduras, se puede llevar a cabo un mejoramiento genético, el cual consiste en el uso de herramientas biológicas y matemáticas tendientes a aumentar la frecuencia de aquellos alelos relacionados con caracteres que consideremos favorables para el productor o el consumidor (en este caso, rasgos de las levaduras) (INIA, 2009).

Existen pocos programas de cruzamiento que han trabajado con levaduras vínicas y, cada uno de ellos, han estudiado sólo unos pocos parámetros. Esto se debe a la naturaleza cuantitativa de la mayoría de las características enológicas y la dificultad asociada con la manipulación genética de las cepas, ya que pueden ser tanto homotéticas como aneuploides (Marullo *et al.*, 2006).

*S. cerevisiae* se reproduce comúnmente por esporas (contenido genómico  $n$ ) que generan clones de los parentales ( $n$ ) o también por medio de la autoconjugación de estas cepas, produciendo un individuo doble haploide ( $2n$ ) 100% homocigoto. Además, en condiciones de laboratorio, estas levaduras pueden reproducirse sexualmente y es posible realizar cruzamientos dirigidos para producir individuos  $F_1$  ( $2n$ ),  $F_2$ , etc, (Rodríguez, 1994). Los rasgos de interés enológico son fenotípicamente cuantitativos y una alternativa para mejorarlos es la utilización de estrategias de mejoramiento genético que han sido desarrolladas para plantas y animales, ya que las levaduras son eucariontes

con un comportamiento genético Mendeliano, por lo que se pueden utilizar cruces y análisis de progenie para la obtención de genotipos con mejores propiedades tecnológicas (Marullo *et al.*, 2004).

Hay dos parámetros importantes para predecir la respuesta a la selección artificial: la heredabilidad ( $h^2$ ) y la correlación genética ( $r_g$ ).

La heredabilidad puede ser definida como la fracción de la variación fenotípica que es producto de diferencias genéticas transmisibles, varía entre 0 a 1. Una baja heredabilidad ( $h^2 \leq 0,1$ ) es uno de los factores que limitan la mejora genética de una característica. Altos valores ( $h^2 \geq 0,3$ ) están relacionados con un rápido avance genético ( $\Delta G$ ) o respuesta a la selección cuando se aplica una alta intensidad de selección ( $i$ ) (Bavera, 2001). La intensidad de selección se refiere a la proporción de individuos que son seleccionados como progenitores en la población y mientras menor es esta proporción mayor es el valor de  $i$  (Falconer y Mackay, 1996).

En cuanto a la correlación genética, puede definirse como la asociación entre los valores genéticos aditivos o valores cría de dos rasgos de un mismo individuo. Las correlaciones genéticas altas permiten seleccionar más de una característica en forma simultánea, ya sea en forma directamente proporcional ( $r_g > 0$ ) o inversamente proporcional ( $r_g < 0$ ). Los valores de correlación genética varían de -1 a +1. Cuanto más cercana sea una correlación a -1 o a +1, está indicando una fuerte relación lineal inversa o directa entre los valores de cría de ambas características, respectivamente.

La correlación fenotípica ( $r_p$ ) mide el grado de asociación entre el desempeño (o medida fenotípica) en una característica y el desempeño en otra. Las causas de la correlación fenotípica observada entre dos caracteres no es necesariamente genética, aunque haya una  $r_p$  positiva entre ambos rasgos la selección por uno de ellos no necesariamente es una respuesta o ganancia genética en el otro (Ossa *et al.*, 2005).

Los azúcares del mosto, glucosa y fructosa son metabolizados por las levaduras y convertidos en alcohol donde en 1 litro de mosto 17g de azúcar se convierten en 1% de grado de alcohol en volumen. En este proceso se producen diferentes tipos de alcoholes, el principal es el etanol, y en menor cantidad, el glicerol y el metanol (Ingraham *et al.*, 1998).

Los rasgos o variables de rendimiento al ser evaluados en las levaduras vínicas son: uso de nitrógeno asimilable por la levadura (YAN, “yeast assimilable nitrogen”), producción de CO<sub>2</sub>, producción de ácido acético, uso de glucosa, uso de fructosa, producción de glicerol y producción de etanol (Araneda *et al.*, 2012). Una breve descripción de estos rasgos de importancia enológica se presenta a continuación:

Nitrógeno asimilable por levadura (YAN). El nitrógeno es el principal elemento limitante en el desarrollo celular de las levaduras. Las levaduras utilizan el nitrógeno para construir sus células, así como para la producción de proteínas y enzimas,

incluyendo aquellas necesarias para el transporte de azúcares durante la fermentación. Los análisis de nitrógeno son, por lo tanto, de suma importancia en vendimia, ya que los niveles de nitrógeno en el mosto varían de acuerdo al cultivar, su madurez, al estrés hídrico, a las condiciones climatológicas, enfermedades y, también, debido a la clarificación de mostos, entre otros. Los efectos generados por adiciones inadecuadas de nitrógeno tienden a promover fermentaciones rápidas, azufradas, elevando la temperatura y también con residuos de arginina, el cual es precursor de etil carbamato considerado como carcinogénico. El YAN está compuesto de tres componentes: a) iones libres de amonio, b) amino nitrógeno primario (proveniente de amino ácidos libres) y c) la contribución de cadenas laterales de L-arginina (después de hidrólisis por arginasa que genera ornitina y urea) (VINOTEC, 2005).

Producción de CO<sub>2</sub>. Según la ecuación de Gay-Lussac, se puede decir que 100g de azúcar (glucosa o fructosa) producen aproximadamente 50g de etanol y 50g de dióxido de carbono o CO<sub>2</sub>, otro compuesto químico obtenido de la fermentación (Blouin y Peynaud, 2006). El CO<sub>2</sub> provoca burbujeo y un aroma característico durante la fermentación y su liberación puede ser a veces "tumultuosa", dando la sensación de ebullición, de ahí proviene el nombre de fermentación, palabra que en castellano tiene por etimología el latín *fervere* (Puerta, 2002).

Producción de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH). El ácido acético surge cuando se oxida el etanol. Las vías de formación del ácido acético son: a) la fermentación alcohólica, todos los vinos tienen acidez volátil ya que el ácido acético es un producto secundario normal de la fermentación de los azúcares, b) la fermentación maloláctica que siempre va acompañada de una pequeña formación de acidez volátil que proviene, sobre todo, de la fermentación del ácido cítrico y las pentosas, y c) las alteraciones bacterianas, colonias de bacterias acéticas (*Acetobacter*) al entrar en contacto con el oxígeno son capaces de oxidar el alcohol a ácido acético (Hills, 2005).

Uso de glucosa y fructosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Los hidratos de carbono presentes en la baya están representados por los monosacáridos glucosa y fructosa, los que difieren químicamente por poseer la glucosa una aldosa (con doble enlace C=O en el primer carbono) y la fructosa una cetosa (con doble enlace C=O en el segundo carbono). Ambos monosacáridos se encuentran en el mosto en concentraciones comprendidas entre 150 y 250 g·L<sup>-1</sup> y son fermentables, ya que las levaduras los transforman en alcohol. La relación glucosa/fructosa (G/F) disminuye regularmente durante la fermentación, como consecuencia de la mayor actividad de las levaduras en la degradación de la glucosa (% Mosto: G/F = 0.9-1.0 y % Vino: G/F < 1.0). El contenido en azúcar se traduce en el vino en contenido en alcohol etílico: Por cada 17 gramos de azúcar se producirá durante la fermentación alcohólica un grado de alcohol (Marcilla, 1922).

Producción de glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>). Es un compuesto no volátil sin propiedades aromáticas, pero que contribuye fuertemente a la calidad del vino al proporcionarle

dulzor y cuerpo (Zoecklein, 2012). Es el subproducto más importante de la fermentación alcohólica en cantidad, después del etanol y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La producción de glicerol también es muy importante para mantener el potencial redox de la levadura, que es vital durante la fermentación. Las levaduras son el factor que más influye en la producción de glicerol, pero esta producción por parte de las levaduras se ve influida por muchos factores del desarrollo y ambientales (Arora, 2003; Remize, 1999). La cantidad de glicerol formada habitualmente por la *Saccharomyces cerevisiae* en el vino, oscila entre los 2 y los 11 g·L<sup>-1</sup>, pero las concentraciones normales se encuentran en el rango de los 4–9 g·L<sup>-1</sup> (Dequin, 2013).

Producción de etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O). El alcohol etílico es el producto más importante de la fermentación alcohólica, ya que es el que será consumido por el humano. Éste es un líquido transparente e incoloro. En el vino el contenido de alcohol varía entre un 12-15%. El término graduación es una medida del contenido en alcohol de una bebida, y corresponde al doble del porcentaje; así, una botella de whisky de graduación 86 contiene un 43% de alcohol (Williams, 2002).

Técnicamente el alcohol se puede clasificar como un alimento dado que proporciona energía (7 kilocalorías por cada gramo de alcohol). Aunque su valor nutritivo es prácticamente nulo (Williams, 2002). Para la formación de este etanol, ocurre una glicólisis ( $C_6H_{12}O_6 + 2 PO_4H_3 + 2 ADP \rightarrow 2 CH_3-CH_2OH + 2 CO_2 + 2 ATP + 25.5 \text{ kcal} + H_2O$ ). Este rendimiento puede verse afectado por las condiciones del medio (pH, temperatura, concentración de glucosa, concentración de etanol y concentración de nutrientes (uso de YAN para la levadura)). Esta sustancia no se acumula en el citoplasma de la levadura, sino que por simple difusión la abandona al exterior, gracias a la gran permeabilidad que presentan las membranas celulares frente a las moléculas hidrófilas como el etanol (Hidalgo, 2011).

En este proyecto se plantea estimar parámetros genéticos ( $h^2$ ,  $r_g$ ) y correlación fenotípica ( $r_p$ ) para los siete rasgos o variables de rendimiento descritas anteriormente. Con esta información se obtendrá la respuesta esperada a la selección o ganancia genética ( $\Delta G$ ) para el rasgo de uso de YAN y los otros seis rasgos de interés enológico en las levaduras del género *S. cerevisiae* al fermentar en el mosto.

Actualmente el interés de la industria es poder seleccionar una cepa de levadura que pueda ocupar todo el nitrógeno asimilable (YAN) que se obtiene de las uvas cosechadas del campo (biota nativa) sin necesidad de aplicar un excedente de nitrógeno en bodega como fuente energética para finalizar la fermentación. A largo plazo, la industria nacional pretende obtener una nueva variedad o cepa de levaduras más eficiente, y así evitar la posible presencia de microorganismos a los cuales el mosto se vería expuesto, producto de una mala aplicación de nitrógeno, lo cual bajaría la calidad del vino.

Al estimar la respuesta esperada al seleccionar el uso de YAN, es importante también conocer las otras variables enológicas, para considerar si estas están correlacionadas, y

esta selección no perjudicaría la calidad del vino en el proceso fermentativo. En la actualidad no se han realizado estudios de mejoramiento genético en relación al uso del nitrógeno por parte de la levadura, por lo cual estos datos servirán de base de investigación para próximos análisis.

### **Hipótesis**

Al seleccionar *Saccharomyces cerevisiae* que usan más eficientemente el nitrógeno asimilable su respuesta esperada directa y correlacionada sea alta.

### **Objetivo General**

Estimar heredabilidad y correlaciones genéticas y fenotípicas de siete rasgos de interés enológico, para predecir asociación con la variable de interés YAN.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Estimar la respuesta esperada al seleccionar sobre la base de su mérito genético cepas de levaduras como progenitores que utilicen eficientemente el nitrógeno asimilable (disminución del consumo de YAN).
- 2) Obtener la respuesta correlacionada esperada para seis variables de interés enológico al seleccionar para YAN.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de estudio

Laboratorios de Genética y Biotecnología en Acuicultura, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.

### Material de estudio

#### Población Base, Variables y Cruzamientos

Los registros fenotípicos para los siete rasgos de interés enológico y registros genealógicos de las levaduras pertenecientes a la población base (Cuadro 1) y 195 descendientes F<sub>1</sub>, se obtuvieron del banco de levaduras silvestres del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología de la Universidad de Santiago de Chile. Éstas fueron recolectadas en distintas zonas vitivinícolas de Chile: Cauquenes, Curicó, Santiago y en Argentina, Mendoza (Cuadro 1).

Cuadro 1. Origen de levaduras parentales usadas en este estudio (n = 70).

Parentales	Origen geográfico (ciudad)	Localidad	Institución de Procedencia
L323	Cauquenes	Checura	
L370	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L351	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L84	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	INIA
L15	Cauquenes	INIA	INIA
L9	Cauquenes	INIA	
L530	Cauquenes	Pocilla	
L514	Cauquenes	Pocilla	
L1060		Isla de Maipo	Viña Terra Matter
L1006	Mendoza		INTA-Mendoza
L505	Cauquenes	Pocilla	
L536	Cauquenes	Pocilla	
L462	Cauquenes	Pichihuerque	
L508	Cauquenes	Pocilla	
L517	Cauquenes	Pocilla	
L960	Mendoza		INTA-Mendoza
L373	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L160	Cauquenes	Panguillemu	INIA
L333	Cauquenes	La Leonera	

L19	Cauquenes	INIA	INIA
L1233		Isla de Maipo	Viña Terra Matter
L3	Cauquenes	INIA	INIA
L168	Cauquenes	Panguillemu	INIA
L17	Cauquenes	INIA	INIA
L171	Cauquenes	Panguillemu	INIA
L254	Curicó	Rincón de Mella	
L290	Curicó	Maquehua	Viña Miguel Torres
L270	Curicó	Entre Ríos	
L323	Cauquenes	Checura	
L370	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L351	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L402	Cauquenes	El Durazno	
L6	Cauquenes	INIA	INIA
L518	Cauquenes	Pocilla	
L80	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	INIA
L523	Cauquenes	Pocilla	
L84	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	INIA
L499	Cauquenes	Molco	INIA
L274	Curicó	Entre Ríos	
L957	Mendoza		INTA-Mendoza
L1053	Isla de Maipo		Viña Terra Matter
L12	Cauquenes	Isla de Maipo	INIA
L20	Cauquenes	INIA	INIA
L7	Cauquenes	INIA	INIA
L17	Cauquenes	INIA	INIA
L983	Mendoza	INIA	INTA-Mendoza
L297	Cauquenes		
L326	Cauquenes	LA Leonera	
L298	Cauquenes	La Leonera	
L321	Cauquenes	La Leonera	
L274	Curicó	Checura	
L295	Cauquenes	Entre Ríos	
L348	Cauquenes	La Loenera	
L956	Mendoza	Coronel del Maule-Quinche	INTA-Mendoza
L300	Cauquenes		
L77	Cauquenes	Checura	INIA
L505	Cauquenes	Coronel del Maule-Quinche	
L471	Cauquenes	Pocilla	
L962	Mendoza	Sauzal	INTA-Mendoza
L494	Cauquenes		
L957	Mendoza	Pocilla	INTA-Mendoza
L269	Curicó		
L167	Cauquenes	Entre Ríos	INIA
L21	Cauquenes	Panguillemu	INIA
L313	Cauquenes	INIA	
L503	Cauquenes	Checura	
L507	Cauquenes	Pocilla	

L277	Curicó	Pocilla	
L720	Santiago	Entre Ríos	Viña Carmen
L720		Alto Jahuel	

Condiciones de Cultivo. La fermentación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología de la Universidad de Santiago de Chile. Las condiciones de fermentación fueron 28 °C por 20 días y con una población de levaduras inicial de  $1 \times 10^6$  cel·mL<sup>-1</sup> en un volumen de 12 mL. Las variables analizadas fueron:

**Uso de YAN (yeast assimilable nitrogen)**. El YAN corresponde a la cantidad de nitrógeno aportado por cada aminoácido. Para ello, del consumo de cada aminoácido, se calcula la porción (por peso molecular) que corresponde al nitrógeno alfa. No se considera prolina porque no es consumido en condiciones de fermentación. Esta variable fue medida en mg·L<sup>-1</sup> (miligramos de nitrógeno alfa por litro de mosto).

**Producción de CO<sub>2</sub>**. Esta variable se midió en g·L<sup>-1</sup> (gramos de CO<sub>2</sub> por litro de mosto).

**Producción de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH)**. Esta variable se midió g·L<sup>-1</sup> (gramos de ácido acético por litro de mosto).

**Uso de glucosa y Uso de fructosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>)**. Ambas variables se midieron en g·L<sup>-1</sup> (gramos de glucosa o fructosa por litro de mosto).

**Producción de glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>)**. Esta variable se midió g·L<sup>-1</sup> (gramos de glicerol por litro de mosto).

**Producción de etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)**. Esta variable se midió % v/v (porcentaje volumen-volumen de etanol por 100mL de mosto).

La medición del consumo de YAN total de cada una de las cepas fue estimado a través del método de titulación por formaldehído descrito por Gump *et al.* (2002).

Al cabo de 20 días de fermentación se tomó una muestra de 1 mL de mosto y se centrifugó a 9.000 g por 5 min. El sobrenadante fue rescatado y se utilizaron 50 L para ser inyectados en un equipo de HPLC "Shimadzu Prominence" (Shimadzu, USA) usando una columna Bio-Rad HPX-87H (Nissen *et al.*, 1997). El análisis de HPLC permitió medir la concentración de glucosa, fructosa, ácido acético y glicerol.

El progreso de la fermentación fue estimado pesando periódicamente la pérdida de CO<sub>2</sub> de cada tubo.

En el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología de la Universidad de Santiago de Chile, se desarrolló un cruzamiento jerárquico de una levadura "macho"



con dos “hembras” mediante micromanipulación. Así se generaron 51 familias de hermanos completos y medios hermanos.

Los F<sub>1</sub> verdaderos fueron detectadas por identificación molecular mediante “interdelta fingerprinting” (Contreras *et al.*, 2012) en el Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología de la Universidad de Santiago de Chile o mediante prueba de exclusión de paternidad, usando marcadores microsátélites en el Laboratorio de Biotecnología en Acuicultura de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (Molinet, 2013).

## **Métodos**

### **Análisis Estadístico**

Se comprobó la normalidad de las siete variables de interés enológico incluidas en los análisis (uso de nitrógeno asimilable por la levadura YAN, producción de CO<sub>2</sub>, producción de ácido acético, uso de glucosa, uso de fructosa, producción de glicerol y producción de etanol) mediante una prueba de bondad de ajuste de Shapiro Wilks (Zar, 1979). Se estimaron correlaciones fenotípicas por medio del coeficiente de correlación paramétrico de Pearson o no-paramétrico de Spearman (Steel y Torrie, 1960) dependiendo si las variables presentaron o no distribución normal. Todos los análisis fenotípicos se realizaron usando el programa de Infostat versión 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008), y Excel 2007 (Carrascal, 2007).

### **Estimación de heredabilidad y correlaciones genéticas**

Los métodos de estimación de heredabilidad y de correlaciones genéticas que se utilizaron, se basaron en la aplicación de modelos mixtos o modelos animales usando un algoritmo derivativo libre de máxima verosimilitud restringida (Elvingson y Johansson, 1993). Estos permitieron introducir en la ecuación de estimación, efectos fijos y aleatorios a la vez, junto con la información genealógica de todos los individuos de la población. Esto permite obtener mayor precisión en la predicción de los valores genéticos aditivos y en la estimación de componentes de varianza (Cuello, 2012). Las estimaciones de heredabilidad y correlaciones genéticas se hicieron con el programa y MTDFREML (USDA, 1993).

Modelo Mixto o animal utilizado fue el siguiente:

$$Y = Xb + Za + e$$

Donde:

$Y$ , es el vector de observaciones cada variable enológica.

$b$ , es el vector de efectos fijos (sexo y origen geográfico).

$a$ , es el vector de efectos genéticos aditivos (valores de cría).

$e$ , es el vector de efectos residuales.

$X$  y  $Z$ , son matrices de diseño.

### Evaluaciones

Con los componentes de varianza estimados ( $\sigma_A^2$  y  $\sigma_E^2$ ), según el modelo animal, se estimó la heredabilidad:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_p^2}$$

Sobre la base de la heredabilidad, se estimaron las respuestas esperadas directas y correlacionadas a la selección, con las siguientes fórmulas:

Respuesta directa:

$$R = i \sigma_p h^2$$

Respuesta correlacionada:

$$RC_Y = i_x h_x r_{xy} \sigma_{xy}$$

Donde:

$i$ , es la intensidad de selección

$h$ , es precisión de la estimación (correlación entre los valor fenotípico y de cría).

$r_{Axy}$ , corresponde a la correlación genética aditiva entre las variables enológicas  $X$  e  $Y$ .

$\sigma_{Ax}$  y  $\sigma_{Ay}$ , desviaciones estándar genética aditiva para las variables enológicas  $X$  e  $Y$ .

La intensidad de selección utilizada en este estudio fue de  $i=1,318$  correspondiente a seleccionar un 23%, de la población base (dato de tabla) (Pearson, 1914).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados de las evaluaciones fenotípicas para las siete variables enológicas se muestran en el Cuadro 2 a continuación. Donde se observa el promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el mínimo y máximo.

Cuadro 2. Estadísticas básicas para los siete rasgos de interés enológico en *Saccharomyces cerevisiae*.

VARIABLE	Promedio	S	CV	Mínimo	Máximo
Uso de YAN ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	187,05	44,70	23,90	49,50	287,30
Producción de $\text{CO}_2$ ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	177,30	25,72	21,92	21,50	183,80
Prod. de Ácido acético ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	2,297	0,434	18,90	0,70	3,60
Uso de Glucosa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	19,93	18,38	92,24	0,50	100,20
Uso de Fructosa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	53,85	22,38	41,56	7,10	115,00
Producción de Glicerol ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	10,04	1,85	18,40	3,10	14,50
Producción de Etanol (%v/v)	11,30	2,66	23,51	2,00	15,50

S: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variación.

Marullo *et al.* (2006) estudió algunas de las variables incluidas en esta memoria en una población de 51 levaduras vínicas donde reportó los siguientes promedios y rangos (valor mínimo – valor máximo): producción de ácido acético ( $0,37 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 0,15 – 0,79), azúcar residual (glucosa) ( $17,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 0,5–51,5) y producción de etanol (16,2 %v/v, 4,5 – 17,2). Pudiéndose observar que los valores reportados en este estudio están dentro del rango antes descrito por Marullo *et al.* (2006).

En cuanto a la variable de interés de este estudio (uso de YAN), se observa un promedio de  $187,05 \pm 44,70$  miligramos de nitrógeno alfa por litro de mosto. Dato que puede servir para el momento de aplicar nitrógeno (como fosfato diamónico por ejemplo) al mosto, se puedan aplicar dosis más específicas. Evitando así errores en la vinificación producto de exceso de nitrógeno y la formación de etil carbamato (compuesto tóxico procedente de la arginina) (Hidalgo, 2011). Además se muestra un coeficiente de variación de 23,9% el cual muestra una variabilidad relativa alta ( $> 10\%$ ), pero que es baja respecto a otras variables estudiadas tales como el uso de monosacáridos (Cuadro 2).

Se puede observar en el Cuadro 2, que el más bajo coeficiente de variación fue para la producción de la producción de glicerol (18,4%), teniendo esta variable aún una variabilidad relativa alta. Este valor indica datos más homogéneos en relación a los otros rasgos, pero igualmente variables.

Por otra parte el uso de glucosa mostró un coeficiente de variación sobre 90%, observándose una gran variación u heterogeneidad entre las distintas levaduras. Concluyéndose que las levaduras usan de forma variada y diferente el uso de la glucosa disponible.

Todos los coeficientes de variación fueron mayores al 10% siendo más bajo para la producción de glicerol, indicando que las levaduras de diferentes orígenes producen y usan de forma heterogénea las variables en estudio, esto se explica porque es primera vez que se ha hecho selección para estos rasgos.

### **Estimación de Heredabilidad**

En el Cuadro 3 a continuación, se muestran los resultados del cociente entre la varianza genética aditiva y la varianza fenotípica (heredabilidad) para las siete variables de interés enológico. Como se mencionó previamente, la  $h^2$  puede tomar valores que van desde 0 a 1, considerándose que rasgos altamente heredables presentan  $h^2$  sobre 0,4 y aquellas poco heredables presentan valores inferiores a 0,15 (Casell, 2008).

Cuadro 3. Heredabilidades uni-variadas (en la diagonal), bi-variadas fuera de la diagonal y promedio para siete rasgos de interés en *Saccharomyces cerevisiae*.

Variable	YAN	CO <sub>2</sub>	Ácido acético	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol
YAN	0,9707	0,9057	0,8007	0,9597	0,2909	N.D.	0,8886
CO <sub>2</sub>	0,9926	0,9247	0,8134	0,8023	0,9075	0,9998	0,8638
Ácido acético	0,9995	0,9575	0,9297	0,9936	0,9999	0,9610	1
Glucosa	0,9965	0,9996	0,9825	0,7278	0,0794	0,9969	0,7947
Fructosa	0,9888	0,75352	0,9998	0,0249	0,7225	1	0,9375
Glicerol	0,9999	N.D.	0,9959	0,9288	0,9996	0,8627	0,0268
Etanol	0,9999	0,9693	0,9661	0,6314	0,9858	0,3866	0,7540
<b>PROMEDIO</b>	<b>0,9926</b>	<b>0,9184</b>	<b>0,9269</b>	<b>0,7241</b>	<b>0,7122</b>	<b>0,8678</b>	<b>0,7522</b>

\*N.D. No determinada

Los resultados muestran que hay una muy alta heredabilidad para las siete variables estudiadas, destacando la producción de CO<sub>2</sub>, uso de YAN, producción de ácido acético, las que muestran un valor >90% con YAN con una heredabilidad 99,26%; así le sigue la producción de glicerol con un 86,78%; y la producción de etanol 75,22% y con aproximadamente un 70% para los azúcares residuales (72,41% glucosa y 71,22% fructosa).

Estos valores son extremadamente altos y puede deberse a que nunca se han seleccionado estas cepas silvestres de levaduras para estos caracteres o que no se ha considerado alguna fuente de variación de origen ambiental al hacer la estimación y se está sobreestimado la varianza aditiva. Sin embargo, según el estudio realizado por Marullo *et al.* (2004), la heredabilidad tanto para las producciones de etanol y ácido acético alcanzó el 0,8; valores cercanos a los obtenidos en este trabajo (0,92 para producción de ácido acético y 0,75 producción de etanol) (Cuadro 3).

Estos valores de heredabilidad indican que es altamente factible realizar mejoramiento genético para las características estudiadas. Si bien estos valores son extremadamente altos, están en el rango de los descritos por Marullo *et al.* (2006) para producción de Etanol (0,74), uso de azúcares (0,88) y producción de ácido acético (0,86). Lo que indicaría un fuerte control genético sobre la variabilidad de estos rasgos en las levaduras analizadas.

Dado que estos altos valores de heredabilidad indican una alta correlación entre los valores de cría y valores fenotípicos, bastará con este registro del fenotipo para la selección de levaduras con una mayor asimilación de nitrógeno, lo cual concluiría una mayor eficiencia en su uso. Por lo tanto, las condiciones del ambiente (condiciones de fermentación, origen, temperatura, pH, etc.) no están afectando al fenotipo y la variabilidad fenotípica, es principalmente producto de la variabilidad genética.

### **Correlación**

A continuación en el Cuadro 4 se muestran las correlaciones fenotípicas y genéticas.

El valor obtenido del coeficiente de correlación indica la relación matemática lineal entre los caracteres, que puede variar entre -1,0 y +1,0, es alta y positiva cuando varía entre 0,5 a 1,0 es alta y negativa al variar entre -0,5 a -1,0; media entre 0,26 a 0,49; y baja entre 0,00 a 0,25. Donde cero implica que los rasgos no están asociados (Ossa, 2002).



Cuadro 4. Correlaciones fenotípicas  $r_p$  (sobre la diagonal) y correlaciones genéticas  $r_g$  (bajo la diagonal) para siete rasgos de interés enológico en *Saccharomyces cerevisiae*.

<b>Variable</b>	<b>YAN</b>	<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Ácido acético</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Fructosa</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Etanol</b>
<b>YAN</b>		-0,0456	0,0291	0,2510	-0,0016	-0,0174	-0,2551
<b>CO<sub>2</sub></b>	0,0013		0,4172	-0,1330	-0,5841	N.D.	0,2406
<b>Ácido acético</b>	0,0421	0,3714		-0,6822	-0,5950	0,8395	0,5915
<b>Glucosa</b>	0,3099	-0,1394	-0,6798		0,9028	-0,7310	-0,9229
<b>Fructosa</b>	0,2089	-0,3546	-0,5951	-0,9999		-0,0235	-0,9283
<b>Glicerol</b>	-0,0174	N.D.	0,8708	-0,7748	-0,3546		0,6530
<b>Etanol</b>	-0,2753	0,1963	0,6018	-0,9232	-0,9347	-1,0000	

\*N.D. No determinadas

El objetivo principal de este estudio es estimar la respuesta esperada al seleccionar *Saccharomyces cerevisiae* que usen más eficientemente el nitrógeno, pero es interesante conocer que otros rasgos se están seleccionando en forma indirecta, con este objetivo de mejoramiento.

Como se observa en el Cuadro 4, para uso de YAN con uso glucosa hay una correlación fenotípica media a baja de 0,2510, siendo esta la correlación fenotípica de más alta magnitud junto con uso de YAN y la producción de etanol con un -0,2551. Para el uso de glucosa, se puede hacer mención que en el nivel fenotípico a medida que aumente el uso de YAN, el consumo de la glucosa también aumentará, obteniendo vinos menos dulces. Para la producción de etanol, a medida que el uso de YAN aumenta, la producción de etanol se verá disminuida (-0,2) mostrando una correlación tanto fenotípica como genética baja, lo cual no es significativo, por lo tanto se podría decir que no hay correlación entre ambos.

Fenotípicamente el consumo de fructosa tiene una correlación de -0,001 la cual es cero, es decir, no hay correlación con el uso YAN, sin embargo para la siguiente generación (en F<sub>2</sub>), entre estas variables genéticamente hay una correlación baja directa de 0,2089. Por tanto, se podría interpretar como que a medida que aumentara el uso de nitrógeno, habría más fructosa residual en el mosto, coincidiendo también con que la levadura consumiría más glucosa, y menos fructosa (Stanier y Villanueva, 1996).

Por su parte, glucosa y fructosa presentan una correlación genética muy alta e inversa de -0,9999. Lo cual indica que a medida que el consumo de glucosa aumenta, el consumo de fructosa disminuye. Lo contrario se observa a nivel fenotípico, mostrando una alta y fuerte relación lineal directa entre ambos azúcares residuales de 0,9028. Lo cual se explicaría, que hay algún factor ambiental que hace que esta relación sea inversa.

Las correlaciones, genética y fenotípica entre el uso de glucosa y la producción de etanol, son altas e inversas ( $r_g = r_p = -0,92$ ). A medida que aumenta la producción de etanol, disminuye el azúcar residual, después de la fermentación. Como dice Hills (2005), la proporción de azúcares disponibles que una levadura puede transformar en alcohol, depende de la cantidad inicial de azúcar a fermentar, más azúcar, más etanol.

Tal como se muestra en el estudio de Rodicio *et al.* (2009), las concentraciones de azúcares al comienzo de la fermentación son similares, tanto para glucosa como para fructosa (entre 100 y 125 g·L<sup>-1</sup>), *Saccharomyces cerevisiae* consume más rápidamente la glucosa que la fructosa, en cinco días ya consumió prácticamente toda la glucosa. Mientras que hasta que no finaliza la fermentación al día siete, la fructosa sigue siendo consumida, y se observa una disminución del consumo de glucosa por parte de las levaduras, la que fue utilizada para su crecimiento celular y

mantenimiento. Por lo cual se esperaría una graduación alcohólica entre 13-14% v/v aproximado. Donde la producción de etanol se incrementa de forma exponencial en los primeros días (tercer al cuarto día) y luego se va manteniendo su concentración.

En cuanto a la relación producción de glicerol - producción de etanol, la correlación genética fue máxima e inversa ( $r_g = -1.0$ ), indicando que a medida que aumentaría el glicerol el etanol iría disminuyendo, tal y como se muestra en la cinética de la fermentación de 24 a 72 horas (Fernández *et al.*, 2012). En esta última investigación se estudiaron diferentes cepas comerciales de levaduras, en las cuales las más competentes para el mercado fueron las que produjeron mayor glicerol y menor etanol (Fernández *et al.*, 2012).

El glicerol es el mayor y más importante compuesto no volátil producido por las levaduras en el vino y contribuye significativamente en la calidad de los vinos, proporcionando cuerpo y un ligero dulzor. Por lo que está considerado como el tercer producto mayoritario de la fermentación, después del etanol y el CO<sub>2</sub>. La formación de glicerol es el resultado del balance redox y de la respuesta al estrés, y las diferencias de concentración observada entre las distintas cepas de levadura puede ser debido a diferentes respuestas al shock osmótico (Fernández *et al.*, 2012).

### **Respuesta a la selección**

A continuación se muestra el Cuadro 5 con la respuesta estimada directa a la selección ( $R_x$ ) y estimación de la respuesta correlacionada ( $RC_y$ ), para el rasgo uso de YAN.

Cuadro 5. Respuesta estimada directa a la selección ( $R_x$ ) y estimación de la respuesta correlacionada ( $RC_y$ ), para el rasgo uso de YAN.

<b>Variable</b>	<b>YAN</b>
<b>YAN</b>	41,0581
<b>CO<sub>2</sub></b>	0,0424
<b>Ácido Acético</b>	0,0227
<b>Glucosa</b>	5,9769
<b>Fructosa</b>	4,8842
<b>Glicerol</b>	-0,0389
<b>Etanol</b>	-0,7869

Se observa que hubo  $RC_y$  negativa para dos variables, producción de glicerol y producción de etanol, lo cual significaría que estas variables disminuirían en  $-0,039 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $-0,79 \text{ \% v/v}$ , respectivamente. Para la producción etanol estaría bien una disminución de este producto de la fermentación, pues en la actualidad se está buscando hacer vinos menos alcohólicos como fue mencionado por Fernández *et al.*, (2012), aunque la disminución sería en menos de un uno  $\text{ \% v/v}$  de producción de etanol por cada  $\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$  de YAN usado por la levadura. Por otro lado, la disminución de producción de glicerol no es algo favorable, pero dado que esta disminución es muy baja tampoco afectaría la calidad sensorial del vino como se mostró en el estudio de Fernández *et al.*, (2012).

Por otro lado, los azúcares, los cuales aumentarían  $5,98 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para la glucosa y  $4,88 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  para fructosa, obteniendo un vino más dulce, estos valores coinciden con la disminución de etanol producido, si bien no son realmente considerables para afectar la calidad del vino, es necesario mencionarlo para conocer los efectos que tendría este mejoramiento genético.

En cuanto al ácido acético, este se vería aumentado  $0,023 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , lo cual implicaría un aumento leve en la acidez volátil del vino, al ser bajo tampoco estaría afectando la calidad sensorial del vino (Gallego, 2012).

Al seleccionar *Saccharomyces cerevisiae*, que usan más eficientemente el nitrógeno asimilable, la respuesta directa al seleccionar con la intensidad de selección de 1,318 fue de un 21,9% para uso YAN, este valor es muy alto al compararlo, por ejemplo, con estudios de selección en animales. En salmón Coho se ha observado una ganancia genética entre 9 y 10% al seleccionar para la tasa de crecimiento (Neira *et al.*, 2014). Por su parte, para la selección de vacas lecheras los resultados de ganancia genética anual son del orden de un 0,26% aproximado (López *et al.*, 2000). Por lo tanto, de todas formas un programa de selección para este rasgo a largo plazo será efectivo al reducir el uso de YAN.

## CONCLUSIONES

1. Se acepta la hipótesis al seleccionar *Saccharomyces cerevisiae* que usan más eficientemente el nitrógeno asimilable, dado que su respuesta directa fue de 21,9% (alta), lo que significa que al realizar selección para este rasgo sería efectivo para que usen más eficientemente el nitrógeno.
2. En cuanto a la heredabilidad obtenida para el uso YAN, la variable enológica de interés, ésta fue extremadamente alta, lo que facilitará la selección directa para este rasgo a partir del valor fenotípico haciendo innecesaria las estimaciones del valores de cría y por lo mismo simplificando el proceso de selección.
3. Para el caso de las correlaciones fenotípicas y su relación con el uso de YAN, todas las variables obtuvieron valores negativos o cercanos a cero, por lo tanto, no muestran una relación lineal con el rasgo bajo selección.
4. Para el uso de YAN se muestra una baja, casi nula correlación genética, con valores cercanos a cero, siendo las más altas y positivas para el uso de azúcares. Por lo tanto, la variable de interés al ser seleccionada, no afecta a las otras variables enológicas que también muestran las respuestas correlacionadas más altas.
5. Es importante mencionar que no hay mayores estudios con respecto al mejoramiento genético y respuesta a la selección para *Saccharomyces cerevisiae* y el uso de YAN, y estas son las primeras aproximaciones, para que otras personas sigan con el estudio y pueda así ser comparado, tomando en cuenta datos como fuentes de variación y la varianza.

## BIBLIOGRAFÍA

- Araneda, C., García, V., Aguilera, O., and Martínez, C. 2012. Estimación preliminar de parámetros genéticos para rasgos de interés enológico en levaduras vínicas. *Journal of Basic & Applied Genetics*. Vol XXIII suppl, 220-221p.
- Arora, D. 2003. *Handbook of fungal Biotechnology*. Mycology second edition. Marcel Dekker, INC. New York. Basel. 386p.
- Bavera, G. 2001. Heredabilidad y correlaciones genéticas. (en línea) Disponible en el WWW: [http://www.produccion-animal.com.ar/genetica\\_seleccion\\_cruzamientos/bovinos\\_de\\_carne/06-heredabilidad\\_y\\_correlaciones\\_geneticas.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/genetica_seleccion_cruzamientos/bovinos_de_carne/06-heredabilidad_y_correlaciones_geneticas.pdf). Citado 10 enero 2016.
- Blouin, J. y Peynaud, É. 2006. *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino*. 4ta edición. MP Mundi Prensa capítulo 3, Fermentación alcohólica. 390p.
- Briones A., Ubeda, J., y Grando, M. 1996. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *International Journal of Food Microbiology*, 28(3), 369-377p.
- Carrascal, U. 2007. *Estadística descriptiva con Microsoft Excel 2007*. Ed. Rama, 264p.
- Casell, B. 2008. *Using Heritability for Genetic Improvement*. Virginia Cooperation Extension. 404- 084.
- Contreras, A., García, V., Salinas, F., Urzúa, U., Ganga, M., and Martínez, C. 2012. Identification of genes related to nitrogen uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28, 1107-1113p.
- Cuello, C. 2012. Estimaciones de la heredabilidad, correlaciones genéticas y fenotípicas, para el carácter de longitud del ciclo reproductivo en una cepa de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*), con doble ciclo reproductivo anual. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Escuela de Pregrado. 29p.
- Dequin, S. 2013. Glicerol y Vinificación. Lallemand the wine expert. (en línea). Disponible en WWW: [http://www.proenol.com/files/editorials/WE\\_1SPAINV2LR-Glicerol.pdf](http://www.proenol.com/files/editorials/WE_1SPAINV2LR-Glicerol.pdf). Citado 5 de noviembre de 2015.

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, C. 2008. InfoStat, versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 334p.
- Epifanio, S. 2005. La influencia de la tecnología de la vinificación en la microbiología y el desarrollo de la fermentación alcohólica. Universidad de La Rioja. Servicio de publicaciones. España. 238p.
- Fernández-González., Barrajon, N., Díaz-Hellín, P., Úbeda, J. 2012. Comparación de la cinética de fermentación de 27 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* vínicas en mostos muy azucarados. M Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada (IRICA), Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM). (en línea). Disponible en el WWW: <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/5-GLO/GLO-P04T.pdf>. Citado 10 de diciembre 2015.
- Falconer, D. y Mackay, T. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Essex, Longman. Agricultural Research Council's. Unit of Animal Genetics. Universidad de Edinburgh. Escocia. 33p.
- Fundamentos de enología. 2013. La Maduración de la uva y la vendimia. (en línea) Disponible en el WWW: <https://fundamentosdeenologia.wordpress.com/2013/02/20/la-maduracion-de-la-uva-y-la-vendimia/>. Citado 7 octubre de 2015.
- Gallego, J. 2012. Maridaje, enología y cata de vinos. Innovación y cualificación ediciones. Málaga, España. 410p.
- Guillamón, J., Beltran, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Rozes, N., Mas, A. 1996. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48: 339-344p.
- Gump, B., Zoecklein, B., Fugelsang, K., Whiton, R. 2002. Comparison of analytical methods for prediction of prefermentation nutritional status of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic* 53, 325-329.
- Hidalgo, T. 2011. Tratado de enología, tomo I. 2da edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. 573p.



- Hills, P. 2005. Degustar El Vino: El Sabor Del Vino Explicado. Editorial Albatros, capítulo Orígenes del sabor: la uva y capítulo Orígenes del sabor. 123p.
- Ingraham, L., Ingraham, A. 1998. Introducción a la microbiología. Volumen II. Editorial Reverté S.A. capítulo 29. Biotecnología microbiana. 737p.
- INIA. 2009. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Herramientas de última generación para mejoramiento genético animal, INIA Tierra adentro, ganadería y praderas. Ministerio de Agricultura. 42, 4p.
- López, N., Garrick, D., Blair, H. 2000. Possible Effects of 25 Years of Selection and Crossbreeding on the Genetic Merit and Productivity of New Zealand Dairy Cattle. Article in journal of dairy science. Institute of Veterinary, Animal and Biomedical Sciences, Massey University, Pamerston North, New Zealand. 8p.
- Marcilla, J. 1922. Vinificación en países cálidos. Calpe. Madrid. 76p.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M. y Dubourdieu, D. 2004. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *Ferms Yeast Research*. Elsevier. Francia. 9p.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomare, I., Pons, M., Aigle M. y Dubourdieu, D. 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. *Ferms Yeast research*. Elsevier. Francia. 12p.
- Molinet, J. 2013. Identificación de híbridos de *Saccharomyces cerevisiae* para la implementación de un programa de mejoramiento genético. Universidad de Santiago. Facultad de ingeniería. Escuela de pregrado. 56p.
- Neira, R. 2014. Evolution of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Breeding Programs. Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production. University of Chile., Aquainnovo S.A., Genus plc. 6p.
- Nissen, T., Schulze, U., Nielsen, J., Villadsen, J. 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 143 203-218.
- Ocón, M. 2014. Diversidad de levaduras no-*Saccharomyces* en diferentes ecosistemas vitivinícolas. Universidad de la Rioja. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática. Departamento de Agricultura y Alimentación. 159p.

- OIV. 2014. Organización Internacional de la viña y el vino. Publicaciones estadísticas. Balance de la OIV sobre la situación vitivinícola mundial. (en línea) Disponible en el WWW: <http://www.oiv.int/oiv/info/espublicationsstatistiques>. Citado: 7 de septiembre 2015.
- Ossa, G., Suárez Tronco, M., y Pérez, J. 2005. Efectos del medio y la herencia sobre el peso al destete de terneros de la raza Romosinuano. Revista MVZ Córdoba 10. 122-268p.
- Ossa, S. G., Moreno, O. F., Manrique, P. C., Tobón, Y. C., Perez, G. J., Tarazona, L., Onofre R. G., Cipagauta H. M. y Maldonado, V.C. 2002. Mejoramiento genético como instrumento de eficiencia en la empresa de producción bovina. Corpoica. 8p.
- Parrish, M. y Carroll, D. 1985. Indigenous Yeasts Associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) Grapes and Musts. American journal of enology and viticulture. (en línea). Disponible en el WWW: <http://www.ajevonline.org/content/36/2/165>. Citado: 20 de agosto de 2015.
- Pearson, K. 1914. Tables for statisticians and biometricians. Unversity College London. Cambridge. 171p
- Pérez, F. 2014. Evolución de la estrategia de la Viña Miguel Torres y su apertura al mercado internacional. Universidad de Chile Facultad de Economía y Negocios Escuela de Administración y Economía. (en línea). Disponible en el WWW: <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129793/Evoluci%C3%B3n%20de%20la%20estrategia%20de%20la%20vi%C3%B1a%20Miguel%20To.pdf?sequence=1>. Citado: 20 de agosto de 2015.
- Puerta, A. 2002. Elaboración de vino. Proyecto San Martín ITDG-Perú, CEPCO. Fermentación alcohólica. 14 -20p.
- Remize, F. 1999. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. Dequin Laboratoire de Microbiologie et Technologie des Fermentations, INRA-IPV, Montpellier, France. (en línea). Disponible en el WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2000.00964.x/pdf>. Citado: 10 de enero 2016.
- Reynier, A. 2002. Manual de viticultura: guía técnica de viticultura. Edición 6ta revisada. Ediciones Mundi-Prensa. Capítulo 5, Vides cultivadas. 81p.

- Rodicio, R., Heinisch, J. 2009. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer. Universidad Johannes Gutenberg. Alemania. Chapter 6. Sugar Metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Yeasts. 113-134p.
- Rodríguez, A. 1994. Micromanipulación Análisis genético de las levaduras. Facultad de Ciencias. Universidad de La Coruña, España. (en línea) Disponible en el WWW: [http://ruc.udc.es/bitstream/2183/9314/1/CC-011\\_art\\_11.pdf](http://ruc.udc.es/bitstream/2183/9314/1/CC-011_art_11.pdf). Citado: 14 de marzo de 2015.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M. Caruso, M. y Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor, Dipartimento di Biologia, Difesa e Biotecnologie Agro-Forestali, Università degli Studi della Basilicata, Campus di Macchia Romana, Italia. 12p.
- SAG. 2015. Servicio Agrícola Ganadero, Producción de vino 2015 Informe ejecutivo. (en línea). Disponible en el WWW: [http://svyv.sag.gob.cl/dec\\_cos/inf\\_ej/INFORME\\_EJECUTIVO\\_PRODUCION\\_DE\\_VINOS\\_2015.pdf](http://svyv.sag.gob.cl/dec_cos/inf_ej/INFORME_EJECUTIVO_PRODUCION_DE_VINOS_2015.pdf). Citado 16 de marzo 2016.
- Schütz, M. y Gafner, J. 1994. Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. Letters in Applied Microbiology. Volume 19, Issue 4. 253–257p.
- Stanier, R. y Villanueva, J. 1996. Microbiología, segunda edición. Editorial Reverté. España, Barcelona. 756p.
- Steel, R. G., y Torrie, J. H. 1960. Principles and procedures of statistics. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, London. 99-117p.
- USDA. 1993. A Manual for Use of MTDFREML. A Set of Programs to Obtain Estimates of Variances and Covariances. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service.
- Veizinh, F. y Pineau, J. 1990. La levurage. Progrés Agricole et Viticole 107: Sydney. Australia. 219-221p.
- Vinotec. 2005. Centro Tecnológico del Vino. Análisis del nitrógeno en el mosto (en línea). Disponible en el WWW: <http://vinotec.com/2014/02/28/analisis-de-nitrogeno-en-mostos/>. Citado: 23 abril 2015.

- Williams, M. H. 2002. Nutrición para la salud, la condición física y el deporte. Universidad Old Dominion. 5ta edición. Editorial Paidotribo. Barcelona, España. 123p.
- Zamora, J.A. 2000. La vid y el vino en Ugarit. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid. 764p.
- Zar, J. 1979. Biostatistical analysis. Englewood Cliffs, NJ, 1974. Prentice-Hall, Inc. Wackers FJ, Berger HJ, Johnstone DE: Multiple gated cardiac blood pool imaging for left ventricular ejection fraction: Validation of the technique and assessment of variability. Am. J. Cardiol 43. 1159p.
- Zoecklein, B. W. 2012. An AVI book. Production wine analysis. Published by Van Nostrand Reinhol. New York. 238p.