

UCH-FC  
MAG-Microbiología  
C962  
C.1

**Estudio genético en poblaciones de levaduras vínicas  
mediante Microsatélites**

**Tesis  
Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Magister en Ciencias Biológicas con Mención en Microbiología**

**Facultad De Ciencias**



**Francisco Alberto Cubillos Riffo**

**Diciembre, 2008**

**Director de Tesis:  
Dr. Claudio Martínez Fernández**

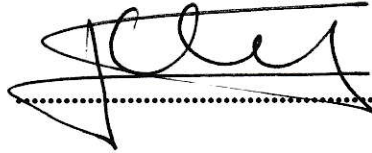
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

**Francisco Alberto Cubillos Riffo**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 12 de Agosto de 2008

Director de Tesis:  
Dr. Claudio Martínez



.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos



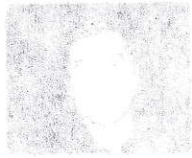
.....

Dr. Francisco Chavez



.....





*A mi madre y familia*



## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las cuales me gustaria agradecer por su apoyo durante todo el proceso de realizacion de mi tesis. Primero, me gustaria agradecer a mi madre, hermanas y familia por su constante apoyo y por siempre haber creido en mi, sin su constante ayuda esto no habria sido posible y es por eso que esta tesis esta dedicada a ellos. Segundo a mis compañeros de universidad los cuales fueron muchas veces un ejemplo para mi y una ayuda importantisima. Agradecer especialmente a mis mas cercanos, Ga-b y obviamente a mis partner del lab Dinka y Salinas quienes estuvieron junto a mi durante todo el desarrollo de esta tesis entregandome ayuda en todo sentido.

Me gustaria agradecer especialmente a toda la gente en LAMAP. Carola, tu ayuda es unica y ninguna de nosotros saldria adelante si no fuese por ti, muchas gracias por tu apoyo (y los chocolates).

Finalmente, al profesor Claudio Martínez, el cual desde el dia uno creyó en mi y me dio la posibilidad de realizar mi tesis en su laboratorio y posteriormente una oportunidad unica para continuar con mis estudios. Muchas gracias por su apoyo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS



ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	2
1.2. Estructura Poblacional.....	4
1.3. Diversidad de levaduras vínicas.....	5
1.4. Mecanismos de Reproducción.....	7
1.5. Microsatélites.....	9
1.6 Herramientas estadísticas.....	11
1.7 Descripción del Problema.....	13
2.- HIPOTESIS.....	15



2.1 Hipótesis.....	16
3.- OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo General.....	18
3.2. Objetivos Específicos.....	18
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 .Cepas.....	20
4.2. Citometría de Flujo.....	23
4.3. Cariotipo electroforético.....	24
4.4. Marcadores de Microsatélites.....	24
4.5. Viabilidad de Esporas.....	27
4.6. Análisis estadístico.....	28
5.-RESULTADOS.....	29
5.1. Ploidía de cepas vínicas.....	30
5.2. Descripción de marcadores.....	35



5.3. Diversidad de Poblaciones.....	40
5.4. Presencia de cepas comerciales en aislados de campo.....	44
5.5. Subestructura de Poblaciones.....	46
5.6. Mecanismos de Reproducción.....	49
5.7. Viabilidad de Esporas.....	51
6.- DISCUSIÓN.....	55
6.1. Ploidía de cepas vínicas <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	56
6.2. Descripción de Marcadores.....	58
6.3. Diversidad de Poblaciones.....	60
6.4. Presencia de Cepas Comerciales en aislados de campo.....	62
6.5. Subestructura de Poblaciones.....	64
6.6. Mecanismos de Reproducción.....	66
6.7. Viabilidad de Esporas.....	68
7.- CONCLUSIÓN.....	71
8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

## ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1a.</b> Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en los análisis estadísticos poblacionales.....	21
<b>Tabla 1b.</b> Cepas utilizadas para la búsqueda de genotipos comerciales en aislados de campo.....	22
<b>Tabla 2.</b> Secuencia de los partidores, tipo de repetido y su ubicación en el genoma de <i>S. cerevisiae</i> .....	26
<b>Tabla 3.</b> Número de genotipos, alelos y coeficiente de información de polimorfismo (PIC) obtenidos para los marcadores de microsatélites .....	37
<b>Tabla 4.</b> Frecuencias alélicas para alelos representados sobre 15% en cada una de las subpoblaciones.....	39
<b>Tabla 5.</b> Número de cepas homocigotas y heterocigotas para cada subpoblación en estudio.....	41
<b>Tabla 6.</b> Valores de Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), Heterocigosidad esperada bajo ( $H_e$ ) y $F_{is}$ para cada una de las subpoblaciones bajo estudio.....	43
<b>Tabla 7.</b> Valores de $F_{st}$ versus distancia geográfica para las subpoblaciones en estudio.....	47
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de resultados significativos para los valores de desequilibrio gamético.....	50
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias de Esporulación y Porcentaje de Viabilidad de esporas en poblaciones de Cauquenes y Valle de Ica.....	53





## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frecuencia relativa de contenido de DNA para cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i> .....	31
<b>Figura 2.</b> Cariotipo electroforético de cepas no-diploides.....	34
<b>Figura 3.</b> Perfil de amplificación de microsátélites para la cepa comercial L-1321 (EC 1118) y cepas idénticas colectadas en Mendoza.....	45
<b>Figura 4.</b> Relación entre viabilidad de esporas y número de loci heterocigotos para cepas de Cauquenes y Valle de Ica.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP:	adenosín trifosfato
RAPD:	DNA polimorfo aleatoriamente amplificado
RFLP:	polimorfismo de la longitud del fragmento de la restricción
SSR:	repetidos de secuencia corta
CHEF:	cariotipo electroforético
IAM:	modelo de alelo infinito
SSM:	modelo de mutación por etapas
AFLP:	polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado
PIC:	contenido de información polimórfica
H:	heterocigosidad
He:	heterocigosidad esperada
Ho:	heterocigosidad observada
rpm:	revoluciones por minuto
YPD:	medio de cultivo extracto de levaduras, peptona y glucosa
EDTA:	etilendiaminotetraacético
TE:	tris-EDTA
TAE:	tris-ácido acético-EDTA
TBE:	tris-ácido bórico-EDTA
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
dNTPs:	desoxinucleótidos

## RESUMEN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el microorganismo más importante en el proceso de elaboración del vino y por ello variadas estrategias dirigidas a optimizar la producción de vinos se basan en aspectos relacionados con esta levadura, como el uso de cepas de levaduras comerciales a modo de inóculos para la fermentación industrial. Esta práctica plantea la posibilidad que las levaduras comerciales se diseminen en el área geográfica donde son utilizadas e interaccionen con las poblaciones de las levaduras endémicas, posibilitando alteraciones a nivel de su estructura genética, en donde la magnitud de estos cambios dependerán en parte, del tipo de reproducción y de la capacidad que tengan estas levaduras para generar híbridos.

Con el objeto de determinar las consecuencias genéticas de la introducción de cepas comerciales y la utilización de prácticas industriales en áreas de producción vínica, nosotros estudiamos los mecanismos de reproducción de las levaduras vínicas y comparamos los niveles de diversidad en las subpoblaciones colectadas desde zonas con un amplio uso de agroquímicos y cepas comerciales, con respecto a las zonas artesanales en las cuales no existe uso de estos procedimientos.

Nuestros resultados sugieren que gran parte de las levaduras vínicas nativas serían diploides y esta condición se mantendría debido al carácter homotálico dominante en las poblaciones nativas. A su vez, las cepas con un contenido de DNA mayor que el diploide presentarían un cariotipo estable y una amplia similitud génica entre los

cromosomas homólogos al evidenciar una alta viabilidad en sus productos meióticos luego de varias generaciones.

Por otra parte, mediante el análisis por microsatélites logramos detectar una menor diversidad genética en las cepas nativas obtenidas a partir de las zonas con prácticas industriales en relación a las subpoblaciones ubicadas en las zonas artesanales. De la misma forma, el análisis mediante parámetros estadísticos sugiere que las subpoblaciones estudiadas presentarían estructuración génica, descartando así la presencia de flujo génico entre ellas. Consecuentemente, no fue posible encontrar correlación entre la distancia génica y la proximidad geográfica entre las poblaciones estudiadas.

Finalmente, detectamos menores valores de heterocigosidad en relación a lo esperado bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y valores positivos, en el rango de 0,4 a 0,75, para el estadístico  $F_{is}$  en las cinco poblaciones analizadas. Estos resultados, en conjunto con el bajo nivel de desequilibrio gamético detectado en cuatro de estas poblaciones, sugieren que los ciclos de autofecundación junto con clonalidad serían un importante mecanismo de reproducción en las cepas vínicas de levaduras *S. cerevisiae*.

## ABSTRACT

*Saccharomyces cerevisiae* is the most important organism in wine making and therefore, several strategies are based on yeast utilization in order to optimize wine production, i.e. the use of commercial yeast as starter cultures in industrial fermentations. This practice, might allow commercial yeast to disseminate and interact with native yeast in the employed areas, affecting their genetic structure. The changes magnitude will depend on their reproduction mechanism and ability to produce hybrids.

With the aim to determine the genetic consequences of industrial practices and commercial yeast introduction in wine making areas, we studied the reproduction mechanisms and compared diversity levels in subpopulations collected in areas with a wide use of fungicides and starter strains, against artisan areas where none of those procedures were used.

Our results suggest that most native wine yeast are diploids and this condition would be maintained because of the homothallic life cycle predominant in native populations. At the same time, strains with higher DNA content would have a stable karyotype and a wide genetic similitude between homologous chromosomes since they present high spore viability.

On the other hand, using microsatellites, a lower genetic diversity was detected in natives strains isolated from regions with industrial practices, compared to subpopulations in artisan regions. Statistical analysis suggests that studied subpopulations would present a clear genetic substructure, ruling out the gene flow

hypothesis between them. Subsequently, it was not possible to find a correlation between genetic distance and geographic distance.

Finally, lower heterocigosity values were detected compared to what is expected under Hardy-Weinberg equilibrium and positive  $F_{is}$  values, ranging from 0.4 to 0.7, were estimated in the five populations. These results and the low linkage disequilibrium detected suggest that cycles of self-fertilization along with clonality are the mains reproduction mechanisms in *S. cerevisiae* wine strains.



## **1.- INTRODUCCIÓN**



## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido por mucho tiempo considerada como un organismo unicelular domesticado distinto de cualquiera de sus similares en los ambientes naturales debido a que se ha utilizado durante siglos en diversos procesos de interés industrial, tales como la vinificación, destilación y panificación (Cianni y col, 2004; Landry y col, 2006). El proceso de generación del vino corresponde a la fermentación natural de los mostos de uva a cargo de diversas levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Kloeckera*, *Metschnikowia* y *Candida*, entre otras, las cuales crecen secuencialmente a través de las etapas de este proceso. Sin embargo, la levadura *S. cerevisiae* es la especie predominante en la mayor parte del proceso de fermentación y es universalmente conocida como la “levadura vínica” (Fleet y Heard, 1993). La fermentación ocurre en un plazo de 7 a 21 días en donde la glucosa es desdoblada a etanol con la consiguiente generación de ATP (Pfeiffer y col, 2001). Dentro de las principales características de *S. cerevisiae* se encuentra su capacidad para soportar altas concentraciones de etanol y sulfito presentes en el mosto, además de tolerar el estrés osmótico causado por la presencia de una gran cantidad de azúcares (Fleet y Heard, 1993).

El origen de *S. cerevisiae* es controversial, algunas líneas de investigación sugieren que esta levadura existiría como especie en los ambientes naturales mucho tiempo antes de ser utilizada en la producción de alimentos. Por otra parte, también ha sido postulado que esta levadura habría divergido de *Saccharomyces paradoxus*, que es la levadura

más cercana conocida a *S. cerevisiae* y debido a su asociación con el hombre habría sido “domesticada”. El análisis de las secuencias nucleotídicas de 81 cepas de diversos orígenes, tanto de *S. cerevisiae* como *S. paradoxus*, demostró que las cepas “domesticadas” derivarían de cepas naturales más que de forma opuesta (Fay y Benavides, 2005).

Actualmente, la mayoría de las cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae* son obtenidas directamente de las uvas, sin embargo es poco frecuente encontrarlas en las uvas sanas, siendo posible colectarlas desde uvas dañadas en una cantidad aproximada de  $10^5$  a  $10^6$  células/uva (Mortimer y Polsinelli, 1999). A su vez, otros estudios han explicado que la dispersión de las levaduras sería por medio de los pájaros e insectos (Phaff y Starmer, 1987; Landry y col, 2006).

*S. cerevisiae* es usualmente encontrada como un organismo unicelular diploide que se reproduce predominantemente de forma vegetativa mediante yemación. Las células diploides de esta levadura pueden realizar meiosis y producir una tétrada de 4 esporas haploides denominada asca. Estas esporas pueden ser de dos tipos de apareamiento, “ $\alpha$ ” o “a”. Las células haploides también pueden reproducirse a través de yemación. La generación de las células diploides se produce por la fusión de dos células haploides con tipo de apareamiento opuesto. Algunas cepas, conocidas como heterotálicas, poseen un tipo de apareamiento fijo y no pueden cambiar de a hacia  $\alpha$  o inversamente. Sin embargo, las esporas de la mayoría de las cepas vínicas son capaces de cambiar su tipo de apareamiento y han sido denominadas como cepas homotálicas (Herskowitz, 1988). Aunque los mecanismos moleculares involucrados en cada una de estas etapas han sido

ampliamente estudiados, su significancia ecológica y sus consecuencias en la estructura poblacional permanecen siendo una interrogante.

## 1.2 Estructura poblacional

El reciente desarrollo de métodos moleculares para la caracterización y el análisis de los aislados silvestres de *S. cerevisiae* ha permitido avanzar en el entendimiento de su dinámica poblacional (Landry y col, 2006). Mediante el análisis multilocus de secuencias génicas de las cepas nativas, Aa y col, (2006) encontraron evidencia de una estructura de población distinta en las cepas colectadas desde los bosques de roble en USA en comparación a las cepas colectadas desde viñas en Italia. Estudios similares, mediante el análisis de expresión génica y la variación fenotípica tanto en cepas aisladas de roble como de viñas, demostró que las primeras presentaban una menor resistencia al cobre y una mayor tolerancia al congelamiento que las cepas vínicas y de laboratorio (Fay y col, 2004). La diversidad genética encontrada en estos aislados, tanto para *S. cerevisiae* como *S. paradoxous* fue baja, tal como fue descrito anteriormente en el análisis del cariotipo electroforético de las cepas aisladas desde bosques de roble (Naumov y col, 1992). Al cruzar cepas de *S. cerevisiae* provenientes de Norteamérica con otras de origen europeo, se produjeron niveles normales de viabilidad de la progenie, no así en *S. paradoxous*, los cuales presentaron niveles de viabilidad considerablemente menores (Sniegowski y col, 2002). Estos antecedentes sugieren un ancestro común mas reciente para el caso de las cepas de *S. cerevisiae* en relación a *S. paradoxous* (Aa y col, 2006).

Diversos han sido los trabajos tendientes a determinar la correlación entre la distancia geográfica y génica de las cepas silvestres en esta levadura (Guillamón y col, 1996; Martínez y col, 2004; Schuller y Casal, 2007; Martínez y col, 2007). Uno de los primeros trabajos publicados en las levaduras vínicas mediante la técnica del RFLP del DNA mitocondrial (mtDNA RFLP) sobre 31 cepas de diversos orígenes geográficos dentro de España, destacó una alta correlación entre la distancia genética y el origen geográfico al realizar análisis de cluster (Guillamon y col, 1996). Esto fue posteriormente corroborado al realizar estudios similares con cepas de origen sudamericano, en donde se propuso que la caracterización genómica de las cepas nativas podría ser correlacionada con su origen geográfico (Martínez y col, 2004; Martínez y col, 2007). Sin embargo, mediante microsatélites, no se logró encontrar dicha relación, al observar que la distancia geográfica no se correlacionaba con la distancia genética entre las cepas analizadas (Schuller y Casal, 2007).

### 1.3 Diversidad de las levaduras vínicas

El aumento mundial del mercado del vino ha significado que muchos países con tradición vitivinícola hayan centrado su objetivo en mejorar sus prácticas enológicas para obtener vinos de mejor calidad. Esto ha significado que algunas de sus regiones de producción vitivinícola se hayan transformado desde prácticas artesanales a prácticas industriales, siendo estas últimas caracterizadas por el uso masivo de fungicidas, microbicidas y de cepas comerciales. Estas últimas corresponden a cepas colectadas desde el campo, las cuales entregan al vino cualidades deseadas y reproducibles. Sin

embargo, la escasa reglamentación sobre el tratamiento de los residuos industriales, ha hecho que estas cepas sean liberadas en las zonas geográficas a las cuales originalmente no pertenecían. Evidencia de esto fue presentada por Valero y col (2005), en donde a partir de las fermentaciones espontáneas lograron coleccionar cepas comerciales en las cercanías de las bodegas donde fueron utilizadas. Sin embargo, estos autores también plantearon que estas cepas no tendrían la capacidad de implantarse en las viñas y su permanencia estaría limitada a cortos períodos de tiempo. Por otra parte, la utilización de fungicidas también tendría consecuencias sobre las cepas de levaduras vínicas. Recientemente ha sido propuesto que el uso de sulfito como preservativo en la elaboración de vino ha conducido a una selección de las cepas vínicas con una mayor tolerancia a este compuesto (Park y Bakalinsky, 2000). Townsend y col (2003), detectaron en las cepas vínicas una gran variación en la expresión del gen *SSU1*, el cual es un transportador de sulfito perteneciente a la vía de detoxificación en *Saccharomyces*. Sin embargo, una de las evidencias más fuertes de selección sobre este producto génico se refiere al alto polimorfismo detectado en este gen, exclusivamente para levaduras vínicas y mas aún, un mayor polimorfismo en el gen que codifica por un factor de transcripción que regula la expresión de *SSU1* (Aa y col, 2006).

El efecto que las prácticas industriales en su conjunto tienen sobre las poblaciones nativas de las levaduras es aun desconocido, sin embargo, se ha descrito que en zonas de Chile con una alta actividad industrial, la diversidad, tanto en riqueza como abundancia de cepas no-*Saccharomyces*, es menor en comparación a zonas en las cuales no se utiliza este tipo de prácticas, sugiriéndose que esta diferencia de diversidad podría ser consecuencia del uso intensivo de cultivos iniciadores que luego serían liberados al

medio afectando a las poblaciones nativas (Ganga y Martínez, 2004). Otra de las consecuencias de la introducción de estas cepas comerciales, podría corresponder a un desplazamiento de las cepas nativas desde su ambiente natural por parte de las cepas introducidas, debido a una competencia por el sustrato ó por la generación de híbridos con mayor aptitud que los parentales.

Por el contrario, Valero y col, (2007) mediante la colecta de las cepas a partir de fermentaciones espontáneas y la detección de patrones únicos mediante cariotipo electroforético, encontraron una alta biodiversidad de cepas *Saccharomyces* en las zonas donde se utilizaban cepas comerciales. Estos autores atribuyeron las diferencias de diversidad observadas entre viñas a las condiciones climáticas y factores específicos de las viñas, tales como edad y tamaño, y no a la utilización de las cepas comerciales.

#### 1.4 Mecanismos de reproducción

Otro de los factores que afectaría el comportamiento de esta levadura en el ambiente y tendría una influencia sobre la estructura poblacional de las levaduras vínicas, es su mecanismo de reproducción (Freeland, 2005). Las levaduras vínicas serían en su mayoría homotálicas y diploides (Romano y col, 1988; Mortimer y col, 1994). Además, Mortimer y col, (1994) observaron un amplio grado de homocigosis en aislados silvestres lo que les permitió postular la hipótesis denominada “Renovación del Genoma”, la cual establece que, al esporular, las cepas que presentan una acumulación de mutaciones recesivas heterocigotas generan productos meióticos haploides que contienen todas las combinaciones posibles para el rasgo heterocigoto, pero al ser

homotáticas, cambiarían su tipo de apareamiento, se auto-aparearían y formarían los homocigotos diploide. De estos nuevos diploides, aquellos con mayor aptitud se reproducirán reemplazando a la cepa madre original y al resto de los diploides generados. En base a esto, diversos trabajos se han dedicado a determinar los mecanismos de reproducción utilizados por estas levaduras (Puig y col, 2000; Pérez-Ortín y col, 2002; Ruderfer y col, 2006; Schuller y Casal, 2007; Valero y col, 2007).

Estudios en fermentaciones consecutivas, a partir de las cepas heterocigotas para el locus *URA3*, atribuyeron la generación de homocigotos a los procesos de recombinación mitótica y una baja influencia de la meiosis, lo que cuestionaría la teoría planteada por Mortimer (Puig y col, 2000). Posteriormente, Pérez-Ortín y col, (2002) plantearon la posibilidad de la ocurrencia de eventos de reproducción sexual en las cepas naturales de las levaduras vínicas al evidenciar translocaciones heterocigotas con distintos alelos no-recombinantes. En este mismo sentido, mediante el análisis de las secuencias de 4 genomas completados (3 de *S. cerevisiae* y 1 de *S. paradoxus*) Ruderfer y col, 2006, se logró estimar que aunque cada cepa ha sufrido unos 16 millones de divisiones celulares desde su ancestro común más cercano, sólo se habrían registrado 314 eventos de reproducción sexual, demostrando la presencia de este mecanismo de reproducción en el ambiente (Ruderfer y col, 2006).

En los organismos relacionados a *S. cerevisiae*, como *S. paradoxus* y *Candida albicans*, ocurren mecanismos alternativos al clonal como medio de reproducción en las condiciones naturales. Para el caso de *S. paradoxus*, existen evidencias de eventos de recombinación, lo que sumado al alto número de individuos homocigotos sugiere la autofecundación como un mecanismo adicional de reproducción (Johnson y col, 2004).

Similarmente, el estudio de 50 cepas de *C. albicans* mediante el análisis de las secuencias de diversos locus entregó evidencia de segregación cromosomal y recombinación intracromosomal, sugiriendo como mecanismo primario de reproducción la clonalidad, con una pequeña pero importante contribución de la reproducción sexual (Tavanti y col, 2004).

Por otra parte mediante la utilización de microsatélites se determinó que las cepas triploides y tetraploides de *S. cerevisiae* se reproducieren de forma asexual, sin embargo, en las cepas diploides hay un alto número de cepas homocigotas por lo que la autofecundación es otro de los mecanismos de reproducción utilizado por éstas levaduras (Ezov y col, 2006). Finalmente, mediante el análisis por microsatélites en 371 cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae*, se determinó la existencia de una fuerte desviación de la ley de Hardy-Weinberg al encontrar una frecuencia de heterocigotos menor a la esperada, indicando que en la población hay una estructura clonal con ciclos de autofecundación (Schuller y Casal, 2007).

### 1.5 Microsatélites

Con el objetivo de realizar estudios genético-poblacionales en levaduras *S. cerevisiae*, durante los últimos años se han utilizado diversas técnicas moleculares tales como el cariotipo electroforético (Vezhinet y col, 1990), RFLP del mtDNA (Comi y col, 2000), RAPD (Cocolin y col, 2004) y AFLP (de Barros Lopes y col, 1999). Sin embargo, una de las técnicas con mayor polimorfismo y que permite responder las preguntas específicas acerca de las propiedades de las poblaciones, son los microsatélites (Gallego



y col, 2005). Estos se definen como las secuencias repetidas en tandem de 1 a 6 pares de bases, los cuales se encuentran en una alta frecuencia dentro del genoma nuclear en organismos de diversas taxas (Tautz y col, 1986). En eucariontes, el genoma se encuentra compuesto por un alto número de microsatélites, siendo el dinucleótido poli-(AC) el repetido más frecuente. Otros microsatélites comunes son poli-(TC) y poli-(CAC) (Tautz y Renz, 1984).

Los mecanismos de mutación que generan los distintos alelos de microsatélites no se encuentran claramente descritos, sin embargo se han propuesto dos modelos en base a errores de la enzima polimerasa y a procesos de recombinación. El primero de ellos es el SMM (del inglés Stepwise Mutation Model), en donde la generación de nuevos alelos sería causa de un incorrecto apareamiento durante la replicación en el lugar del repetido, el cual sería entonces reparado agregando bases o eliminando aquellas que no se encuentren apareadas (Levison y Gutman, 1987). El segundo modelo denominado IAM (del inglés Infinite Allele Model), plantea que los alelos serían generados debido a errores durante el proceso de recombinación en la meiosis y, por lo tanto, cada nuevo alelo no se encontraría presente previamente en la población (Kimura y Crow, 1964).

El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites y su capacidad de detectar ambos alelos (carácter co-dominante) la hace muy útil para identificaciones individuales, ya que es muy poco probable que 2 individuos elegidos al azar compartan alelos similares para varios marcadores.

En *S. cerevisiae* diversos loci polimórficos han sido descritos, demostrando el alto grado de variabilidad genética que es capaz de detectar la técnica de microsatélites. Uno de los trabajos más importantes realizados en este ámbito, fue publicado el año 2001. En este,

Pérez y col, (2001b) lograron identificar 6 loci altamente polimórficos los cuales permitieron discriminar inequívocamente 44 genotipos de 57 estudiados, demostrando de esta forma el alto poder de resolución de la técnica. Aplicaciones en levaduras vínicas comerciales llevaron a determinar que estas presentaban un genotipo, en su mayoría, diploide, siendo la mayoría de ellas homocigotas (Bradbury y col, 2006).

### 1.6 Herramientas estadísticas

La formación de sub-poblaciones ocurre de forma natural en muchas especies, lo que genera en la mayoría de los casos una diferenciación génica. Variadas son las herramientas estadísticas que permiten estudiar el comportamiento de las poblaciones y su utilización dependerá de las preguntas que el investigador desee responder. Uno de los estadísticos más importantes en el estudio de poblaciones es la Heterocigosidad (H), que corresponde a la frecuencia relativa de individuos heterocigotos en una muestra. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) se estima directamente calculando la frecuencia de heterocigotos con respecto al total de individuos. Por otra parte, la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) hace referencia a la probabilidad de encontrar, al azar, dos alelos distintos en la población bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, la cual establece que en una población suficientemente grande, con individuos diploides y reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación o migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes entre las generaciones.

La heterocigosidad, también conocida como diversidad de Nei (1977) se define como:

$$H = 1 - \sum p_i^2 \quad (1)$$

Donde  $p_i$  corresponde a la frecuencia del alelo  $i$ .

A partir del estadístico  $H$  es posible inferir mediante un parámetro derivado, las variaciones genéticas dentro y entre las poblaciones. El índice de fijación  $F_{is}$  (Wright, 1951) mide la correlación de genes entre individuos pertenecientes a una misma subpoblación y permite determinar el tipo de reproducción de la población en estudio. Por otra parte, la correlación entre dos alelos elegidos al azar entre subpoblaciones relativo a alelos muestreados al azar a partir de la población total, se denomina  $F_{st}$  y permite determinar relaciones entre subpoblaciones (Wright, 1951).

Wright en 1965 redefinió los índices de fijación antes descritos como:

$$F = (H_e - H_o) / H_e \quad (2)$$

Donde  $H_e$  = Heterocigosidad esperada;  $H_o$  = Heterocigosidad observada.

Con el objetivo de determinar el grado de polimorfismo de los marcadores se han descrito una serie de parámetros, entre ellos el contenido de información polimórfica (PIC, del inglés Polymorphic Information Content). Este parámetro es usualmente calculado para evaluar el valor informativo de un marcador en estudios de relaciones genéticas. Fue descrito por Botstein y col, (1980), y se define como la probabilidad de inferir en la descendencia el alelo transmitido por un parental heterocigoto.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n-1} p_i^2 - \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \quad (1)$$

donde  $p_i$  corresponde a la frecuencia en la población del alelo  $i$ .

## 1.7 Descripción del Problema

El uso de cepas comerciales como inóculos para fermentaciones industriales plantea la posibilidad que estas cepas se introduzcan en los ecosistemas de viñas y bodegas e interaccionen con las poblaciones de levaduras endémicas. Las consecuencias a nivel de la estructura genética de las poblaciones de levaduras nativas, dependerán en parte, del tipo de interacción que pueda ocurrir entre ellas y, por lo tanto, de la capacidad que tengan para generar híbridos. Una posible consecuencia de la introducción de estas cepas comerciales es la disminución de la diversidad de las poblaciones nativas, lo que podría generar a su vez, efectos significativos sobre la estructura poblacional de las levaduras endémicas.

Estos supuestos, sumados a la detección de cepas comerciales en áreas industriales observados por nosotros y otros grupos de investigación, sugieren que la utilización de prácticas industriales y, específicamente, la utilización de cepas comerciales, podrían tener un efecto negativo sobre las poblaciones de levaduras nativas.

Con el objeto de evaluar el efecto que tendrían las distintas prácticas enológicas sobre las poblaciones de levaduras endémicas nosotros caracterizamos y evaluamos cinco subpoblaciones nativas de levaduras mediante microsatélites. Para esto, inicialmente utilizamos herramientas tales como Heterocigosidad y F-estadísticos con el fin de estudiar las propiedades de cada una de las subpoblaciones. De la misma forma, realizamos un análisis de parámetros fisiológicos al estimar la viabilidad de sus esporas, lo que fue posteriormente correlacionado con los resultados obtenidos mediante

microsatélites para determinar los mecanismos de reproducción predominantes en estas levaduras. Finalmente, y con el objetivo de evaluar el flujo génico en levaduras vínicas, nosotros determinamos los niveles de diferenciación génica entre las subpoblaciones analizadas.

## **2.- HIPÓTESIS**

## 2.1 Hipótesis

La utilización de cepas comerciales como inóculos de fermentaciones industriales y su consiguiente diseminación en áreas vitivinícolas, tendría como consecuencia un desplazamiento de los genotipos endémicos disminuyendo la diversidad de las poblaciones nativas de *Saccharomyces cerevisiae*.

### **3.- OBJETIVOS**



### 3.1 Objetivo General

- Determinar los mecanismos de reproducción predominantes en las poblaciones nativas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante un análisis fisiológico y genético-poblacional basado en microsatélites.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la diversidad genética de las poblaciones de levaduras *S. cerevisiae* presentes en las zonas con alta actividad industrial y en regiones con actividad vitivinícola del tipo artesanal.
- Determinar la presencia de las cepas comerciales en las cepas colectadas a partir de las fermentaciones espontáneas.
- Determinar los mecanismos de reproducción predominantes asociados a cada una de las poblaciones en estudio a través de los parámetros fisiológicos y genético-poblacionales.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

#### 4.1 Cepas

Un total de 117 cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* pertenecientes a 6 poblaciones, fueron seleccionados para el análisis (Tablas 1a y 1b). Inicialmente, 98 cepas de 5 poblaciones fueron utilizadas para realizar los estudios de estructura de poblaciones y diversidad asociada a estas. La Tabla 1a indica las cepas utilizadas además de la localidad y el tipo de práctica utilizado en la zona de colecta. Posteriormente, 19 cepas colectadas en Mendoza, Argentina, fueron seleccionadas con el objetivo de buscar genotipos similares a cepas comerciales ampliamente utilizadas en dicha zona. La Tabla 1b indica las cepas utilizadas además de la localidad y el tipo de práctica utilizada en la zona de colecta. Todas las cepas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile. Las cepas de Mendoza fueron proporcionadas por el Instituto de Tecnología Agropecuaria, INTA, de Mendoza.

Las levaduras fueron crecidas en medio YPD (Extracto de Levadura 0,5%, Peptona 0,5%, Glucosa 2,0%, Agar 2,0%, Estreptomina 200 ug/ml) y luego colonias individuales fueron crecidas en medio YPD líquido. La extracción del DNA se realizó mediante el kit Wizard Genomic DNA purification (Promega). La cuantificación del DNA se realizó en geles de agarosa mediante una comparación con el DNA del fago Lambda digerido con *HindIII* y *EcoRI* previamente estandarizado.

**Tabla 1a.- Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los análisis estadísticos poblacionales.**

País	Localidad de Colecta	Cepa	Tipo de Actividad Enológica
Chile	Cauquenes	L-1; L-2; L-3; L-4; L-5; L-9; L-10; L-11; L-12; L-13; L-14; L-15; L-16; L-17; L-18; L-19; L-20; L-21; L-22	Industrial
	Maquehua, Curicó	L-281, L-282, L-283, L-284; L-285; L-286; L-287; L-288; L-289; L-290; L-291; L-292; L-576; L-577; L-578; L-579; L-580; L-581; L-582	Industrial
	Checura, Cauquenes	L-301; L-302; L-303; L-304; L-305; L-306; L-307; L-308; L-309; L-310; L-311; L-312; L-313; L-314; L-315; L-316; L-317; L-318; L-319	Artesanal
	Sauzal, Cauquenes	L-464; L-465; L-466; L-467; L-468; L-469; L-470; L-471; L-472; L-473; L-474; L-475; L-476; L-477; L-478; L-479; L-480; L-481; L-482	Artesanal
Perú	Valle del Ica, Ica	L-1188; L-1189; L-1190; L-1191; L-1192; L-1193; L-1194; L-1195; L-1196; L-1197; L-1198; L-1999; L-1200; L-1201; L-1202; L-1203; L-1205; L-1206; L-1207	Artesanal

**Tabla 1b.- Cepas utilizadas para la búsqueda de genotipos comerciales en aislados de campo.**

País	Localidad de Aislamiento	Cepas	Actividad
Argentina	Lujan de Cuyo, Mendoza	L-952; L-957; L-958; L-959; L-960; L-961; L-962	Industrial
	Región del Este, Mendoza	L-953; L-954; L-955; L-956; L-978; L-979; L-980; L-981; L-982; L-983; L-984; L-985	Industrial

Las cepas provenientes de Argentina fueron proporcionadas por el Instituto de Tecnología Agropecuaria, INTA, de Mendoza.

## 4.2 Citometría de Flujo

Las células fueron tratadas con un protocolo modificado a partir de Paulovich y Hartwell (1995). Brevemente, las células fueron crecidas durante 12 h. a 28 °C. Se tomaron aproximadamente  $5 \times 10^5$  células, las cuales fueron lavadas con 500  $\mu$ L de Citrato de Sodio 50 mM pH 7,5 y luego incubadas durante 1 h. a 37 °C en la misma solución más 10  $\mu$ g de Zymoliasa (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan). Las células fueron fijadas en etanol frío al 70% durante toda la noche. Posteriormente, las células fueron lavadas en Citrato de Sodio (50 mM, pH 7,5), incubadas durante 90 min. a 55 °C en la misma solución mas 100  $\mu$ g de RNAsa. Posteriormente, 100  $\mu$ g de Proteinasa K fue agregada y las células fueron incubadas durante otros 90 min. a 55 °C. Para teñir las células, se agregaron 50  $\mu$ g de Yoduro de Propidio y las células se dejaron a 4 °C durante toda la noche. El contenido de DNA de las levaduras fue determinado usando un BD FACScan analyzer (BD Bioscience). El nivel de ploidía fue calculado en base a la intensidad de fluorescencia comparada con cepas de referencia haploides (BY4706 y BY4726) y diploides (TSY481 y TSY800).

### 4.3 Cariotipo electroforético

Las muestras de cromosomas de levaduras fueron preparados siguiendo el protocolo de Schwartz y Cantor (1984) con la adición de tres lavados con TE pH 8.0 a 50 °C por 30 min., seguido por tres lavados con solución TE pH 8.0 a temperatura ambiente por 30 min. al final del proceso. Los cromosomas purificados contenidos en bloques de agarosa fueron luego almacenados a 4 °C en 0,005 M EDTA, pH 8,0 hasta su uso. Los cromosomas de levaduras fueron separados mediante campo pulsado usando un equipo CHEF-DR $III$  (Bio-Rad, San José, CA, USA). Los geles fueron preparados al 1% agarosa (Bio-Rad, San José, CA, USA) en 0,5 X TBE (4,45 mM Tris-Borato, 4,45 mM Ácido Bórico, 1mM EDTA pH 8,0). La electroforesis fue desarrollada con el siguiente programa: Sub-programa inicial con pulso-tiempo 60 seg por 12 h. y bloque final de pulso-tiempo 120 seg por 12 h. Cada sub-programa fue corrido a 14 °C, 6 V/cm y en un angulo de 120°. La cepa S288c fue utilizada como control de tamaño cromosomal.

### 4.4 Marcadores de Microsatélites

Se utilizaron 7 marcadores moleculares previamente descritos, YML091C, YPL009C, YDR10W, YBR058C, YLR013W, YGL184C, YKR014C (Tabla 2). La reacciones de PCR se realizaron en un termociclador PTC-100 Mj Research (GMI Inc, Minnesota, USA) y las condiciones utilizadas fueron descritas por Pérez y col, 2001, a excepción de la cantidad de DNA templado utilizado en la reacción (50 ng por reacción). Brevemente, los ciclos de amplificación fueron de 94°C por 4 min., 30 ciclos de 94°C por 30 seg.,

56°C por 30 seg., 72°C por 2 min., finalizando con 72°C por 10 min. Los productos de amplificación fueron inicialmente observados en geles de agarosa al 2% y el resto de la reacción fue posteriormente separada en geles de poliacrilamida al 6% (Acrilamida:Bisacrilamida 40%, Urea 7,5 M), utilizando una cámara secuenciadora KODAK BioMax STS 45i (KODAK, New York, USA). La visualización de las bandas se realizó mediante tinción de plata según el protocolo descrito (Bassam y col, 1991; Cubillos, 2007).



**Tabla 2. Secuencia de los partidores, tipo de repetido y su ubicación en el genoma de *S. cerevisiae*.**

Marcador	Secuencia*	Repetido	Cromosoma
YML091C	F: GTGTCTAAGCCTCTTCAAGCATGAC R: GTGTCTGGACAATTTTGCCACCTTA	(AAT) <sub>35</sub>	XIII
YPL009C	F: GTGTCTGGGTTTTGGATTTTTATGGA R: GTGTCTTTCAATTTTCTCTTTTACCAC	(GAA) <sub>16</sub>	XVI
YDR160W	F: GTGTCTGAGGAGGGAAATGGACAG R: GTGTCTGCTTCTTTGGCTTGCCTA	(AAT) <sub>23</sub>	IV
YBR058C	F: GTGTCTGGTTATATTTATTTCTATAACAAGATGC R: GTGTCTAGATCAAGTACCAAGCCAGC	(AC) <sub>13</sub> (AT) <sub>20</sub>	II
YLR013W	F: AATCATCACTGGAAATGTAAGA R: GTGTCTTAAATGATAGAAGCAACAGTC	(AT) <sub>16</sub>	XII
YGL184C	F: GTGTCTCTCATCGCATCTCAAAAAGTG R: GTGTCTTACCACAACGTATCTAATCTCT	(AT) <sub>14</sub>	VII
YKR014C	F: AACTGCTACTTTCCGATAATAA R: GTGTCTATGGTAAATAGGGTGAACGA	(AT) <sub>8</sub> TT(AT) <sub>9</sub>	XI

Pérez y col, (2001b), Bradbury y col, (2006)

#### 4.5 Viabilidad de las Esporas

Las cepas fueron crecidas en medio de esporulación (Agar 2% , Acetato de potasio ( $C_2H_3O_2K$ ) 1% durante 24 h. a 28 °C y luego almacenadas a 4 °C, donde se esperó que continuara el proceso de esporulación. Posteriormente se analizó la presencia de esporas mediante observación al microscopio. Para la disección de las ascas, las células esporuladas fueron tratadas con 10 µg de Zymoliasa en 50 µL de Sorbitol 1M y se incubaron a 37 °C durante una hora con agitación a 300 rpm. La solución fue enfriada en hielo durante 1 min. y luego diluida 30 veces para asegurar que las células se encontraran separadas. De esta dilución, 10 µL fueron depositados en placas Petri con medio YPD y las ascas presentes fueron micromanipuladas y sus esporas sembradas sobre la misma placa Petri e incubadas durante 48 – 72 h. a 28 °C.

#### 4.6 Análisis estadístico

Los Parámetros de diversidad genética tales como el número promedio de alelos, la heterocigosidad observada y esperada fue calculada basada en los resultados obtenidos mediante los microsatélites. La proporción del número promedio de alelos en zonas industriales y artesanales fue comparada mediante el test no-paramétrico Mann-Whitney usando MINITAB 14 (Minitab Inc, State College PA, USA). Heterocigosidad observada en ambas zonas fue comparada utilizando una ANOVA de dos vías, en los cuales regiones con distintas prácticas enológicas fueron separadas en dos grupos. Con el objetivo de determinar el sistema de reproducción en las poblaciones estudiadas, desviaciones del model Hardy-Weinberg fueron estimadas mediante  $F_{is}$  . Adicionalmente, desequilibrio gamético fue determinado utilizando el software GENETIX v.4.05.

Paramtro  $F_{st}$  fue estimado segun Weir & Cockerman (1984) utilizando GENETIX v4.05, así como también Mantel test (Mantel, 1967) para determinar la relación entre la distancia genética y la geográfica ( $F_{st}/(1-F_{st})$ ).

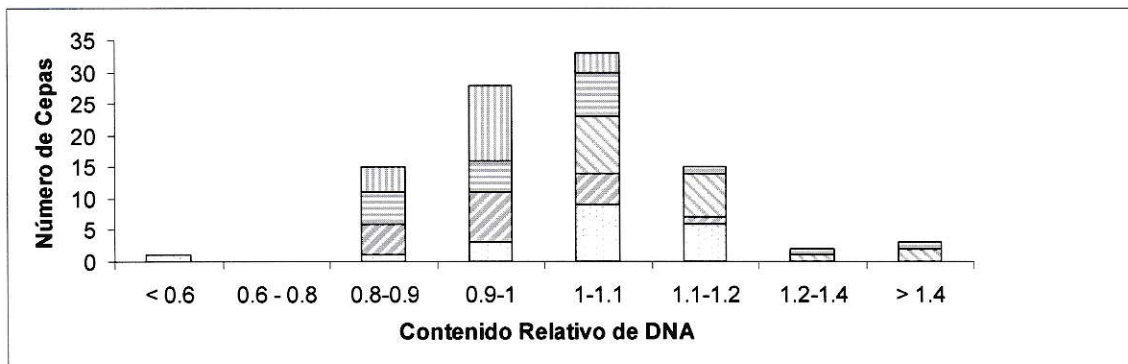
## **5.- RESULTADOS**

## 5.1 Ploidía de las cepas vónicas

Con el objeto de evitar incluir en el análisis cepas con distinto número de alelos por locus que alteraran los resultados estadísticos, inicialmente caracterizamos 98 aislados para el contenido de DNA mediante citometría de flujo (Tabla 1a). Las cepas haploides control utilizadas (BY4706 y BY4726) presentaron un valor promedio de fluorescencia de 19,5 mientras que los controles diploides (TSY481 y TSY800) mostraron un valor promedio de 39,6. Los resultados obtenidos fueron relativizados con respecto a estos controles, asignando un valor de fluorescencia relativa 0,5 para células haploides y 1,0 para diploides (Figura 1).

Del total analizado, un 96% de las cepas arrojaron un contenido de DNA cercano al obtenido para los controles diploides, lo que sugiere que la mayoría de las cepas analizadas serían diploides a excepción de la cepa L-1, la cual pertenece a la población de Cauquenes y que arrojó un valor de fluorescencia relativa de 0,58, el cual es similar al obtenido por las cepas haploides. Del total de cepas con un valor de fluorescencia relativa cercano al diploide, un 67% presentaron valores de fluorescencia relativa de 0,9 a 1,1 y sólo un 33% presentó valores entre 0,8 a 0,9 y 1,1 a 1,2 lo que nos permite suponer la presencia de aneuploidias o aberraciones cromosómicas que implican un exceso o deficiencia en contenido de DNA en estas cepas con respecto a las cepas control (Figura 1).

Por otra parte, tres cepas presentaron valores de contenido de DNA concordante con triploidías o tetraploidías al superar una fluorescencia relativa de 1,8. La cepa L-475, perteneciente a la población de Sauzal, presentó un contenido relativo de 1,81 y las



**Figura 1.- Frecuencia relativa de contenido de DNA para las cepas vínicas de *S. cerevisiae*.** El contenido de DNA fue obtenido mediante citometría de flujo. Los valores de fluorescencia relativa para los controles haploides fueron de 0,5 y para los diploides 1,0. Poblaciones en análisis: : Cauquenes, Maquehua, Checura, Sauzal y Valle de Ica

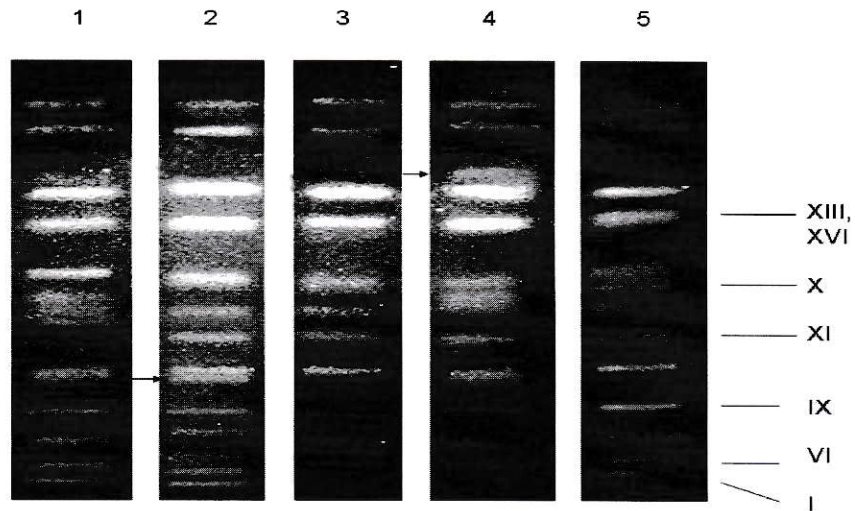
cepas L-304 y L-319, provenientes de la población de Checura, obtuvieron un valor de fluorescencia relativa de 2,2, el cual es doblemente superior al obtenido para el control diploide, lo que sugiere tetraploidía en estas cepas.

El grupo de cepas que presentó desviaciones significativas con respecto a los valores de fluorescencia relativa de los controles diploides, fueron además caracterizadas mediante cariotipo electroforético y se determinó la viabilidad de sus esporas. El análisis mediante cariotipo electroforético mostró en ellas un alto polimorfismo cromosómico (Figura 2). La cepa L-1 presentó un perfil cromosómico similar a la cepa S288c, sin embargo carece de una banda de 675 kb correspondiente al cromosoma XI. A su vez, la cepa L-1 presenta bandas de menor tamaño en el rango de los 450-250 kb con respecto a la cepa control. Por el contrario las cepas que poseen un mayor contenido de DNA con respecto a los controles diploides presentaron diferencias en su cariotipo electroforético con respecto a la cepa control. Así, por ejemplo, la cepa L-475 posee una banda de 1200 kb que no posee la cepa S288c. Similarmente, la cepa L-304 presenta una banda de 500 kb ausente en la cepa control. Finalmente, fue posible detectar en la cepa L-319 un mayor tamaño de los cromosomas I y VI con respecto a la cepa S288c, todo lo cual sugiere un perfil cromosómico más complejo en estas cepas (Figura 2).

Con el objeto de evaluar posibles consecuencias fisiológicas de los polimorfismos cromosómicos detectados, nosotros realizamos un análisis de la capacidad de esporulación de las cepas bajo estudio. Para la cepa L-1 no se observó el desarrollo de ascas que indicaran la presencia de eventos meióticos y, por lo tanto, esta cepa no tendría la capacidad para esporular bajo las condiciones ensayadas lo cual podría ser consecuencia de una condición haploide. Sin embargo, análisis de apareamiento con

cepas haploides heterotáticas a o  $\alpha$ , no permitieron obtener individuos diploides, por lo que el carácter haploide de esta cepa debe ser confirmado mediante métodos alternativos (Medina, 2007). Por el contrario, para las cepas L-304, L-319 y L-475 lograron esporular, obteniendo una viabilidad de esporas por sobre el 70%, lo que sugiere que estas cepas serían tetraploides y no presentarían aneuploidías severas que impidan una normal segregación cromosómica y formación de esporas viables.





**Figura 2.- Cariotipo electroforético de cepas no-diploides.** El análisis de cromosomas se realizó mediante electroforesis de campo pulsado en cepas no-diploides previamente analizadas mediante citometría de flujo. A la derecha se identifican los cromosomas correspondientes a la cepa S288c utilizada como control. Las flechas destacan los polimorfismos detectados y comentados en el texto. Carriles 1 a 5, cepas, L-1, L-304, L-319, L-475 y S288c, respectivamente

## 5.2 Descripción de los marcadores

En base al análisis realizado sobre 117 cepas de diversos orígenes geográficos (Tablas 1a y 1b) es que determinamos las propiedades de los marcadores utilizados en el estudio. A partir de los datos obtenidos fue posible identificar 99 alelos en los 7 marcadores, con un promedio de 14,1 alelos por marcador. Del total de estas cepas, y para no sobreestimar los parámetros estadísticos, fueron eliminadas del análisis todas aquellas cepas que presentaron genotipos similares y que pudieran corresponder a clones. De estos, solo fue posible encontrar 4 casos en los cuales ninguno de los marcadores tuvo la capacidad de discriminar entre los genotipos de las cepas L-7 y L-16; L-13 y L-15, pertenecientes a la población de Cauquenes, así como las cepas L-1198 y L-1199 colectadas en el Valle de Ica y las cepas L-957, L-958, L-959 y L-960 provenientes de Mendoza. Posteriormente, se estimaron en 111 cepas los parámetros del número de genotipos, alelos y PIC (Polymorphic Index Content) (Tabla 3). El marcador YML091C resultó ser el más polimórfico al arrojar un valor de PIC de 0,94 identificando un total de 27 alelos dentro de las poblaciones analizadas. Este valor resultó ser similar al encontrado por Bradbury y col, (2006) quienes identificaron 26 alelos para este marcador. Sin embargo, tanto el valor obtenido por ellos como por nosotros resultó ser considerablemente superior al obtenido por Pérez y col, (2001a) el cual detectó 19 alelos en 51 cepas analizadas con este mismo marcador.

El siguiente marcador más diverso, YBR058C, presentó un PIC de 0,87 y encontramos en éste un total de 15 alelos, valor levemente superior en comparación al marcador YDR160W en el cual se identificaron 14 alelos. A su vez, este último fue capaz de

detectar un número inferior de genotipos en relación al marcador YBR058C, al reconocer 24 genotipos en comparación a los 28 del marcador YBR058C. Ambos marcadores lograron identificar un número de alelos doblemente menor al detectado por YML091C y que demuestra el alto polimorfismo de éste último marcador como fue descrito recientemente (Bradbury y col, 2006; Schuller y col, 2004).

Por el contrario, los marcadores YKR014C e YLR013W presentaron los valores más bajos para todos los parámetros evaluados. Para el caso del marcador YKR014C, sólo se obtuvo un PIC de 0,60 siendo capaz de reconocer 10 diferentes genotipos, lo cual es directamente consecuencia del bajo número de alelos identificados por éste marcador. Por otra parte, el marcador YLR013W fue capaz de identificar 7 genotipos más en comparación a YKR014C y presentó un PIC superior de 0,72. En general, todos los marcadores resultaron ser altamente polimórficos al obtener valores de PIC superiores a 0,6.

Con el objeto de estudiar el polimorfismo y la variabilidad en cada uno de los marcadores, se analizaron las frecuencias alélicas de cada uno de ellos en todas las subpoblaciones. Las frecuencias observadas sugieren que en la mayoría de las subpoblaciones existe al menos un par de alelos predominantes representados sobre el 15% (Tabla 4). En este mismo sentido, el marcador YML091C fue el que presentó las frecuencias alélicas más bajas encontrando en el alelo "O" la mayor representación. Este alelo se encuentra altamente representado en la población del Valle de Ica con respecto al resto de las subpoblaciones, al presentarse en un 30% de las cepas. Esta baja representación de los alelos puede ser consecuencia del alto número de alelos que es capaz de detectar este marcador, así como también una alta dispersión de los datos.

**Tabla 3.- Número de genotipos, alelos y coeficiente de información de polimorfismo (PIC) obtenidos para los marcadores de microsatélites.**

Marcador	Genotipos	Alelos	PIC
YML091C	56	27	0,94
YPL009C	23	13	0,79
YDR160W	24	14	0,86
YBR058C	28	15	0,87
YLR013W	17	10	0,72
YGL184C	25	14	0,82
YKR014C	10	6	0,60

Se analizaron 111 cepas provenientes de 6 subpoblaciones y se estimaron los parámetros antes mencionados mediante GENETIX V 4.05. PIC (Polymorphic Index Content)

Por otra parte, los marcadores que presentaron bajos valores de PIC, YKR014C e YLR013W, exhibieron frecuencias alélicas altas en cada una de las subpoblaciones para un reducido número de alelos. Ejemplo de esto es lo observado con el marcador YKR014C el cual presentó un alelo en el 54% de las cepas analizadas, teniendo un máximo en la población de Maquehua en donde el 84% de las cepas contiene este mismo alelo. Esto explicaría la menor capacidad de resolución de estos marcadores con respecto al marcador YML091C.

**Tabla 4.- Frecuencias alélicas para los alelos representados sobre 15% en cada una de las subpoblaciones.**

	YML091C	YPL009C	YDR160W	YBR058C	YLR013W	YGL184C	YKR014C
	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI	IN MQ CC SZ VI
A			17	23	15 17	26	
B		29	18		21		19 44
C		65 65 38 29 19	18	28		18 17	38 84 50 41 55
D		18 18 29			22	17	22
E		15 25	47		15 25		15 25 22
F 21			16	22		17	41
G 20				32 29 19		21	
H 17			19 35 41 16	26 15 41 16		41 50 27 50	
I			24 53 31	15 29 16			
J 25		19 15					
K			26				
M						24	
O 20	17 30						
P	17						
S	17						
X	24						

En la tabla se indican las frecuencias alélicas obtenidas mediante microsatélites para cada uno de los marcadores en las subpoblaciones IN, MQ, CC, SZ y VI las cuales representan Cauquenes, Maquehua, Checura, Sauzal y Valle de Ica respectivamente. Los valores son informados en porcentaje. Las letras A-X indican el alelo en el marcador respectivo.

### 5.3 Diversidad de las poblaciones

A partir del análisis de las prácticas enológicas realizadas en las cercanías de los viñedos de donde fueron colectadas las levaduras, así como la morfología geográfica de la zona en relación a las bodegas cercanas y el registro histórico del uso de levadura comercial en estas bodegas, los lugares de colecta fueron clasificados como áreas artesanales o industriales (Vasquez, 2006). De esta forma, las zonas de Cauquenes y Maquehua, se clasificaron como industriales, mientras que las zonas de Checura, Sauzal y Valle de Ica como artesanales.

La zona de Cauquenes fue considerada como un área con una alta actividad industrial y en ésta fue posible encontrar un total de 11 individuos completamente homocigotos, de un total de 17 analizados. Contrario a esto, solo se logró encontrar 1 solo individuo completamente heterocigoto para los 7 marcadores utilizados. El resto de las poblaciones presentó un menor número de individuos completamente homocigotos, siendo el caso contrario al antes expuesto, el Valle del Ica, en donde el número de individuos completamente homocigotos fue de 4, mientras que el número de cepas completamente heterocigotas registrado fue de 3 (Tabla 5). Es interesante el caso de las subpoblaciones de Maquehua y Checura, las cuales pertenecen a las zonas con prácticas enológicas distintas, pero comparten gran parte de los parámetros calculados obteniendo valores similares de heterocigosidad y un número equivalente de individuos homocigotos en la población.

Los análisis de la diversidad genética realizados mediante microsatélites, muestra valores de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) menores para las subpoblaciones de las

**Tabla 5.- Número de cepas homocigotas y heterocigotas para cada subpoblación en estudio.**

Población	Cepas Homocigotas	Cepas Heterocigotas	Promedio de Loci Heterocigotos
Cauquenes	11	1	1,3
Maquehua	7	0	1,5
Checura	7	0	1,6
Sauzal	2	0	2,2
Valle de Ica	5	3	3,3



levaduras colectadas en las zonas clasificadas como industriales con respecto a aquellas levaduras colectadas en las zonas clasificadas como artesanales (Tabla 6). La diferencia más significativa se registra para las subpoblaciones Cauquenes y Valle de Ica, las cuales presentan una diferencia en sus valores de diversidad de 0,28 siendo ambas colectadas en zonas con prácticas agrícolas disímiles. La alta diversidad observada en Valle de Ica, puede deberse al mayor número de individuos completamente heterocigotos observados, caso que no es posible de apreciar en las otras poblaciones (a excepción de Cauquenes en donde existe un heterocigoto). A su vez, en esta población se observa un mayor número de individuos con una cierta proporción de loci heterocigotos en comparación al resto de las subpoblaciones (Tabla 5), lo que también se ve reflejado en una mayor diversidad, en donde se observa que a mayor número de loci heterocigotos, mayor es la heterocigosidad reflejada para la subpoblación.

Al realizar un análisis ANOVA de las dos subpoblaciones de levaduras colectadas de las áreas industriales se observó, en promedio, un  $H_o$  de  $0,21 \pm 0,03$ , el cual es un valor de heterocigosidad inferior al obtenido para las subpoblaciones de levaduras artesanales ( $0,34 \pm 0,11$ ) y esta diferencia resultó ser estadísticamente significativa (p-value 0,025). Los diferentes valores de diversidad genética entre las poblaciones colectadas de áreas industriales y artesanales evaluadas a nivel de heterocigosidad, sugerirían que en zonas donde existen prácticas enológicas de tipo industrial para la producción de vino la diversidad genética de las poblaciones de levaduras es menor.

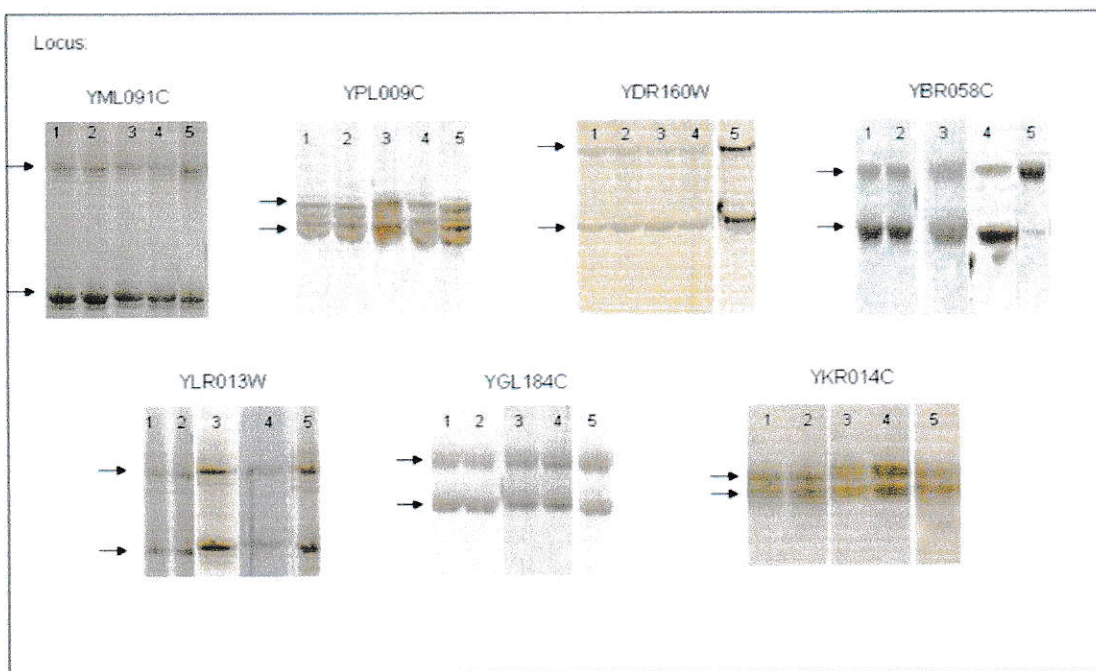
**Tabla 6.- Valores de Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), Heterocigosidad esperada bajo ( $H_e$ ) y  $F_{is}$  (Deficit de Heterocigosis )para cada una de las subpoblaciones bajo estudio.**

Población	Número de genotipos	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
Cauquenes	17	0.19	0.71	0.75
Maquehua	19	0.23	0.63	0.64
Chequra	18	0.23	0.76	0.70
Sauzal	19	0.32	0.76	0.59
Valle del Ica	19	0.47	0.75	0.40

#### 5.4 Presencia de cepas comerciales en aislados de campo

Con el objeto de identificar las cepas comerciales presentes dentro de las cepas colectadas y de esta forma encontrar evidencia acerca de la implantación de estas cepas comerciales en las distintas regiones geográficas a las de su origen, es que se analizaron las identidades de los genotipos pertenecientes a las poblaciones de Cauquenes y Maquehua con respecto a las cepas comerciales. En ninguno de los dos casos fue posible encontrar genotipos que coincidieran con los de las cepas comerciales. Frente a esto se procedió a seleccionar aislados provenientes de Mendoza para el análisis. La zona de Mendoza presenta una alta actividad industrial y existían antecedentes dentro de nuestro grupo de trabajo que dan cuenta de la posible presencia de las cepas comerciales en esta zona. Para esto, se seleccionaron 19 cepas, provenientes de las provincias Lujan de Cuyo y Región del Este, Mendoza, en donde se encuentran las instalaciones del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Mendoza.

Al realizar el análisis con los 7 marcadores, logramos encontrar 4 cepas que presentaron un genotipo idéntico a la cepa comercial EC1118 previamente caracterizada (Cubillos, 2007). Estas 4 cepas presentaron un patrón de bandas análogo, siendo característico en el aislado comercial su alto grado de heterocigosis, que también fue observado en el patrón de las cepas mendocinas (Figura 3). Estos resultados dan cuenta de la presencia de cepas comerciales en las cercanías a las bodegas donde son ampliamente utilizadas al ser inoculadas sobre los mostos de uva.



**Figura 3.- Perfil de amplificación de microsatélites para la cepa comercial L-1321 (EC 1118) y cepas idénticas colectadas en Mendoza.** De izquierda a derecha en parte superior marcadores YML091C, YPL009, YDR160W y YBR058C, inferior YLR013W, YGL184C e YKR014C. En todos los geles de izquierda a derecha cepa: L-957, L-958, L-959, L-960 y L-1321 (EC1118) respectivamente.

## 5.5 Subestructura de las poblaciones

Con el fin de determinar la estructuración de las subpoblaciones estudiadas y estimar la correlación entre la distancia genética y geográfica, evaluamos los valores del parámetro  $F_{st}$  (diferenciación genética) para las 5 subpoblaciones indicadas en la Tabla 1a. El grado de diferenciación génica observado entre estas poblaciones resultó ser moderado al obtener valores para  $F_{st}$  que fluctuaron entre 0,06 a 0,14 (Wright, 1978). El único caso observado en que las poblaciones presentaron un bajo valor de  $F_{st}$ , fue para Cauquenes y Sauzal, las cuales se encuentran separadas por una distancia de 10 km y arrojaron un valor de  $F_{st}$  de 0,037, lo que implicaría una pequeña diferenciación génica y, por lo tanto, una alta similitud en las frecuencias alélicas de las poblaciones de levaduras de estas localidades (Tabla 7). Por otra parte, las poblaciones que presentaron el mayor valor de  $F_{st}$  fueron Maquehua y Valle de Ica, al obtener un valor de 0,14, sin embargo, estas no son las 2 poblaciones más distantes geográficamente. En este mismo sentido, no fue posible observar una correlación entre la distancia geográfica de las zonas de colecta y la distancia génica de las poblaciones, a excepción del caso inicialmente descrito. La población de Sauzal, que se encuentra a una distancia geográfica similar de Checura y Maquehua, presenta una mayor similitud génica con la primera ( $F_{st} = 0,059$ ) en comparación a Maquehua ( $F_{st} = 0,1$ ). De la misma forma, Valle de Ica, presenta una mayor similitud génica con Checura ( $F_{st} = 0,1$ ) que ésta última con Maquehua ( $F_{st} = 0,11$ ). La evidencia más clara la presenta en todo su contexto Valle de Ica, que pese a la gran distancia geográfica con el resto de las subpoblaciones analizadas, no presenta los

**Tabla 7.- Valores de  $F_{st}$  versus distancia geográfica para las subpoblaciones en estudio.**

	Cauquenes	Maquehua	Checura	Sauzal	Valle de Ica
Cauquenes	0	0.062	0.083	0.037	0.096
Maquehua	111	0	0.109	0.1	0.141
Checura	99	181	0	0.059	0.1
Sauzal	10	101.8	100.3	0	0.075
Valle de Ica	3610	3500	3580	3600	0

p-value < 0,001 para todos los valores de  $F_{st}$

El estadístico  $F_{st}$  fue estimado para las subpoblaciones de Cauquenes, Maquehua, Checura, Sauzal y Valle de Ica. En la matriz superior se detallan los valores de  $F_{st}$  el cual fue determinado según Weir y Cockerham (1984), en la matriz inferior las distancias geográficas en Km.

valores mayores de  $F_{st}$ . Esto último demuestra la inconsistencia de la relación distancia geográfica con respecto a la distancia génica.

Por otra parte, los valores obtenidos de  $F_{st}$  demuestran la sub-estructuración de las poblaciones analizadas al ser estadísticamente significativas las diferencias observadas y, por lo tanto, el movimiento de las levaduras vínicas se encontraría acotado a cortas distancias geográficas.

## 5.6 Mecanismos de Reproducción

Con el objeto de determinar los tipos de reproducción asociados a cada subpoblación nosotros evaluamos el parámetro  $F_{is}$  el cual considera la heterocigosidad tanto observada ( $H_o$ ) como esperada ( $H_e$ ) dentro de la subpoblación. En general, para la mayoría de las subpoblaciones, el valor de  $H_o$  fue considerablemente menor al esperado bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, obteniendo valores 3 veces por debajo de lo esperado y, por lo tanto, es evidencia de un exceso de homocigotos (Tabla 6). Además, fue posible observar que todas las poblaciones, a excepción de Valle de Ica, presentaron valores elevados de  $F_{is}$  los cuales oscilaron entre 0,75 y 0,59. Estos valores detectados en las 4 poblaciones sugieren que la autofecundación estaría siendo utilizado como mecanismos de reproducción en levaduras vínicas. Esto fue posteriormente comprobado al realizar un análisis de desequilibrio gamético en donde encontramos una alta tasa de recombinación con un número significativo de los marcadores que evidenciaban procesos de recombinación (Tabla 8). La presencia de equilibrio gamético avala la hipótesis de que ciclos de autofecundación junto con clonalidad, serían los principales mecanismos de reproducción en este organismo,. Por otra parte, la población del Valle de Ica presentó un valor de  $F_{is}$  menor en comparación al resto de las poblaciones ( $F_{is} = 0,4$ ). El valor positivo de este resultado ratifica la existencia de un exceso de homocigotos y, por consecuencia, una reproducción autofecundativa. Sin embargo, en base al alto desequilibrio gamético detectado en esta población, la clonalidad sería su principal mecanismo reproductivo y la autofecundación tendría un nulo o menor impacto que en las otras poblaciones estudiadas (Tabla 8).



**Tabla 8.- Porcentaje de resultados significativos para los valores de desequilibrio gamético.**

Población	Porcentaje resultados significativos (Sin Bonferroni)	Porcentaje resultados significativos (Con Bonferroni)
Cauquenes	23,8	19
Maquehua	4,76	4,76
Checura	19,04	9,52
Sauzal	4,76	4,76
Valle de Ica	57,1	40

Utilizando la corrección de Bonferroni, se determinó el porcentaje de resultados estadísticamente significativos para el test de desequilibrio gamético ente los marcadores de microsatélites.

## 5.7 Viabilidad de las esporas

Para estimar si las diferencias en los valores de  $F_{is}$  obtenidos en el punto anterior para cada una de las subpoblaciones eran producto de los factores ambientales o de diferencias a nivel genético que permitieran la utilización de un determinado mecanismo de reproducción, es que estimamos la frecuencia de esporulación y la viabilidad de las esporas en las poblaciones de Cauquenes y Valle de Ica. Estas poblaciones fueron elegidas debido a que presentaron los valores extremos para el estadístico  $F_{is}$  calculado y, por lo tanto, presentarían distintos mecanismos de reproducción.

Al analizar la frecuencia de esporulación para la población de Cauquenes, logramos observar que en un 76,4% de las cepas existía una alta frecuencia de esporulación (Tabla 9), mientras que en el caso de Valle de Ica, un 66% de las cepas presentó una alta frecuencia de esporulación. En la población de Cauquenes sólo logramos encontrar que, además de la cepa L-1, la cepa L-18 no presentó la capacidad de esporulación. Cabe destacar que esta cepa presentó dos alelos para todos los marcadores analizados y fue considerada completamente heterocigota. Por otra parte, en el Valle de Ica, logramos encontrar dos cepas, L-1193 y L-1200, que fueron incapaces de esporular, sin embargo, estas presentaron un menor grado de heterocigosis en comparación a la cepa L-18, obteniendo la cepa L-1193 cinco loci heterocigotos, mientras que la cepa L-1200 sólo dos.

Con aquellas cepas que fueron capaces de esporular, procedimos a determinar la viabilidad de sus esporas. En el caso de la subpoblación Cauquenes, la viabilidad promedio fue de 80%, la cual es considerablemente alta debido posiblemente al

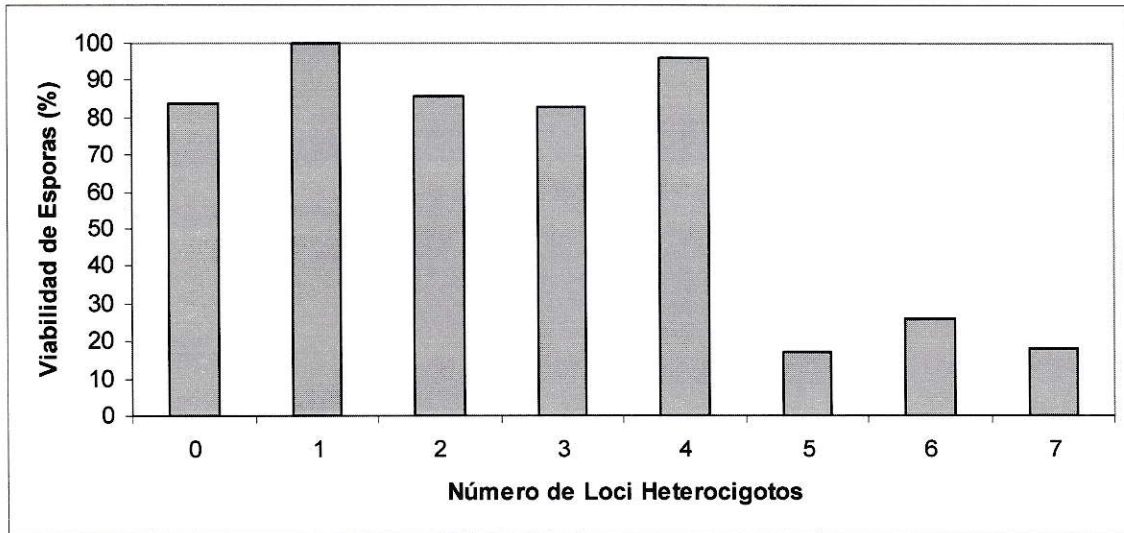
importante grado de homocigosis presentado en estas cepas, lo que avala la autofecundación como un mecanismo importante en esta subpoblación. Contrario a esto, la subpoblación de Valle de Ica presentó un mayor grado de heterocigosis en relación a Cauquenes, lo cual se vio reflejado a su vez, en un menor porcentaje de viabilidad de las esporas (63%).

Al estudiar la relación grado de heterocigosis versus inviabilidad de las esporas, observamos una correlación directa entre ambos parámetros (Figura 4). Es así como hasta un número de 4 loci heterocigotos, se observa una alta viabilidad de las esporas, sin embargo sobre este número de loci heterocigotos, la viabilidad disminuye considerablemente alcanzando valores cercanos al 10%. En base a esta alta correlación entre el número de loci heterocigotos y la inviabilidad de las esporas, es posible sugerir que en cepas con un alto grado de heterocigosis existiría una reproducción predominante del tipo clonal. Estas cepas estarían obligadas a usar este mecanismo debido al alto grado de divergencia entre sus cromosomas homólogos, lo que les impediría llevar a cabo una meiosis exitosa a diferencia de aquellas cepas con bajo grado de heterocigosis, las cuales realizarían meiosis y utilizarían la autofecundación como su principal mecanismo de reproducción. Por consecuencia, la subpoblación de Cauquenes, al tener un alto número de individuos homocigotos, utilizaría la autofecundación con una mayor frecuencia que las levaduras de Valle de Ica, las cuales presentan el mayor grado de heterocigosis dentro de la muestra.

**Tabla 9.- Frecuencias de esporulación y porcentaje de viabilidad de las esporas en poblaciones de Cauquenes y Valle de Ica.**

Cepa	Frecuencia de Esporulaci3n	L.H.	Viabilidad de esporas (%)
Cauquenes			
L-1	Nula	0	0
L-2	Alta	0	100
L-3	Alta	0	96
L-4	Baja	0	90
L-5	Alta	0	92
L-9	Alta	0	42
L-10	Baja	6	71
L-11	Alta	2	100
L-12	Alta	0	96
L-14	Alta	0	85
L-15	Alta	0	37
L-16	Alta	0	85
L-17	Baja	0	96
L-18	Nula	7	0
L-19	Alta	0	80
L-20	Alta	2	72
L-21	Alta	3	85
L-22	Alta	3	57
Perú			
L-1188	Alta	0	83
L-1189	Alta	6	25
L-1190	Alta	7	33
L-1191	Alta	0	96
L-1192	Alta	1	100
L-1193	Nula	5	0
L-1194	Alta	0	96
L-1195	Alta	0	93
L-1196	Alta	3	75
L-1197	Alta	4	83
L-1198	Baja	7	12
L-1200	Nula	2	0
L-1201	Alta	7	11
L-1202	Baja	6	28
L-1203	Alta	0	70
L-1205	Baja	5	17
L-1206	Baja	2	92
L-1207	Alta	4	100

La presencia de las esporas fue estimada mediante microscopía y las frecuencias de esporulaci3n expresadas como: Frecuencia Alta (++), Frecuencia Baja (+), Ausencia (-). L.H. hace referencia al n3mero de loci heterocigotos encontrados mediante SSR.



**Figura 4.- Relación entre la viabilidad de las esporas y el número de loci heterocigotos para cepas de Cauquenes y Valle de Ica.**

## **6.- DISCUSSION**

## 6.1 Ploidía de las cepas vínicas *Saccharomyces cerevisiae*

Los primeros estudios tendientes a estimar el nivel de ploidía en las levaduras vínicas *S. cerevisiae* sugieren un contenido de DNA del tipo diploide dado el carácter homotálico de estas levaduras (Romano y col, 1988). Las células homotálicas presentan una fase haploide inestable, ya que la célula madre al yemar tiene la capacidad de cambiar su tipo de apareamiento y, por lo tanto, aparearse con células hijas formando un organismo diploide. En base a estos antecedentes, Mortimer y col, (1994) realizaron una caracterización fenotípica de varios aislados confirmando el supuesto carácter diploide de las levaduras vínicas y la homocigosis para el gen *HO*, el cual confiere el carácter homotálico. Nosotros estimamos el contenido de DNA mediante citometría de flujo y determinamos que un 96% de las cepas silvestres analizadas presentan valores de contenido de DNA cercanos al obtenido por el control diploide, lo que confirma el supuesto planteado por Mortimer y col, (1994) (Figura 1).

En este mismo sentido Bradbury y col, (2006) al analizar 45 cepas de levaduras vínicas del tipo comercial, encontraron que el 88% de ellas presentaban valores de contenido de DNA cercanos al de cepas diploides, sin embargo, estudios en las cepas nativas no vínicas de *S. cerevisiae* obtenidas en Israel, mostraron que la mayoría serían poliploides (Ezov y col, 2006). Nosotros creemos que las levaduras vínicas serían del tipo diploides debido a las condiciones adversas del mosto que, por un lado, favorecen la presencia de más de una copia cromosómica pero al mismo tiempo un exceso de DNA afectaría negativamente la alta tasa de reproducción necesaria para dominar otras especies que crecen y compiten con las levaduras vínicas en este sustrato. Por otra parte, de las cepas

diploides detectadas, un 33% presentó valores de contenido de DNA alejados al control diploide. Esta diferencia puede ser resultado de la presencia de aneuploidías por un exceso o déficit en el número de cromosomas, los cuales alterarían el nivel diploide del contenido de DNA. Análisis mediante electroforesis de campo pulsado (PFGE) en cepas vínicas sugieren que la presencia de aneuploidías es un fenómeno recurrente y que existirían cromosomas que se encontrarían en un mayor número de copias al esperado (Guijo y col, 1997).

De las cepas que presentaron un contenido de DNA muy diferente al control diploide, la cepa L-1, colectada en Cauquenes, posee un contenido relativo de DNA cercano al haploide lo que sugiere en esta cepa un ciclo de vida heterotálico. Sin embargo, L-1 presenta una nula capacidad de apareamiento con cepas tanto  $\mathbf{a}$  como  $\alpha$ , indicando una diploidia en el cromosoma III de carácter heterocigoto para el locus *MAT* o la presencia de alguna mutación en un gen esencial para el cruzamiento con cepas que poseen un tipo de apareamiento contrario. Al analizar su patrón de cariotipo electroforético, notamos una alta similitud con el de la cepa control haploide S288c. Sin embargo, la cepa L-1 carece de la banda cercana a los 675 kb y presenta un menor tamaño en los cromosomas bajo los 450 kb, lo que sugiere además importantes aberraciones cromosómicas en esta cepa. De la misma forma, al realizar análisis mediante microsatélites observamos una sola banda para todos los amplificadores obtenidos, lo que sumado a su incapacidad para generar ascas en medio de esporulación, apoyaría el carácter cercano al haploide de la cepa L-1. Otros estudios también han identificado cepas haploides en colectas de levaduras vínicas. Así, por ejemplo,



Bradbury y col, (2006) lograron identificar 3 cepas que presentaron un valor de contenido de DNA cercano al haploide de un total de 45 analizadas, .

Los otros casos detectados en nuestro estudio de cepas con contenido de DNA diferente al diploide corresponderían a cepas triploides o tetraploides debido a sus altos valores en contenido de DNA. La cepa L-475, perteneciente a Sauzal, presenta un contenido relativo de DNA de 1,8, el cual sería cercano al tetraploide. El alto porcentaje de esporulación observado en estas cepas y la alta viabilidad de sus esporas, sugieren una alta estabilidad en el número de copias por cromosoma, descartando la presencia de aneuploidías severas que elevaran su contenido de DNA. En otro estudio similar, se observaron 5 cepas con un contenido de DNA mayor al diploide, sin embargo en este caso, las cepas fueron clasificadas como aneuploides (Bradbury y col, 2006).

## 6.2 Descripción de Marcadores

Los marcadores utilizados en este trabajo fueron seleccionados en base a los estudios previos en los cuales ya habían sido descritos y caracterizados por otros autores (Pérez y col, 2001b; Schuller y col; 2004, Bradbury y col, 2006). En este trabajo se consideró que los marcadores pertenecieran a cromosomas distintos, que fueran altamente polimórficos y a su vez, capaces de reconocer un alto número de alelos (superior a 6) considerando que el tamaño del amplificado se encontrara en el rango de 100 a 450 pb.

En este estudio logramos identificar un promedio de 14,1 alelos por marcador, obteniendo un total de 99 alelos entre los 7 marcadores. El marcador más polimórfico identificado, YML091C, registra un total de 27 alelos dentro de las 6 poblaciones

analizadas, valor similar al encontrado por Bradbury y col, 2006. Este marcador fue inicialmente descrito por Pérez y col, 2001b, los cuales describieron 19 alelos con la capacidad de discriminar 27 genotipos de un total de 51. En nuestro estudio, este marcador fue considerablemente superior al resto, al ser capaz de identificar un mayor número de genotipos y alelos, además de presentar un alto valor de PIC (Tabla 3).

Caso contrario fue el observado para el marcador YKR014C, el cual presenta el menor polimorfismo dentro de todos los marcadores analizados. Este mismo marcador fue descrito por Bradbury y col, (2006) sin embargo ellos lograron identificar 12 alelos obteniendo, por lo tanto, un alto un grado de discriminación.

El marcador YGL184C fue inicialmente descrito por Bradbury y col, 2006. En dicho estudio los autores describen un total de 13 alelos, los cuales les permiten discriminar 20 genotipos sobre 45 cepas analizadas. En nuestro estudio logramos identificar un total de 14 alelos para este marcador, sin embargo, solo 25 genotipos sobre 111 analizados. El bajo número de genotipos registrados sería consecuencia de la alta frecuencia observada en el alelo H (Tabla 4) y una baja frecuencia de un número considerable de alelos que se encontrarían en unos pocos individuos.

Al comparar la técnica de SSR con la de mtDNA RFLP, Schuller y col, 2004, demostraron que ambas presentan una capacidad similar en la identificación de genotipos. Del análisis realizado en nuestro estudio, detectamos sólo 3 casos en los cuales la técnica de SSR no fue capaz de discriminar entre pares de genotipos. Coincidentemente la técnica de mtDNA RFLP tampoco fue capaz de resolver entre estos y su identificación como genotipos únicos fue previamente realizada mediante otras metodologías como cariotipo electroforético y RAPD (Gac, 2002). Sin embargo, la

técnica de SSR es actualmente considerada como una de las más polimórficas, capaz de entregar una alta cantidad de información y así permitir desarrollar estudio a nivel genético-poblacionales. (Pérez y col, 2001a; Bradbury y col, 2006; Schuller y Casal, 2007). Otro de los casos en nuestro estudio donde fue posible encontrar genotipos similares, fue con las cepas mendocinas, sin embargo, estas cepas presentaron considerables similitudes con los genotipos comerciales y no con respecto a las cepas nativas (Ver más adelante).

### 6.3 Diversidad de las poblaciones

Escasos son los antecedentes acerca de la biodiversidad natural de la levadura vínica *S. cerevisiae*. Los resultados obtenidos mediante PFGE sugieren una alta biodiversidad de esta levadura en el ambiente, la cual sería dependiente de las condiciones climáticas y factores asociados a las viñas, tales como la edad y el tamaño de estas pero no al uso de cepas comerciales en las bodegas cercanas a las viñedos (Valero y col, 2007). Sin embargo, es posible suponer que las prácticas enológicas propias de la actividad industrial, tales como la utilización de fungicidas, microbicidas y uso de cepas comerciales podrían traer consecuencias importantes sobre la diversidad de la biota levaduriforme presente en estas zonas geográficas.

En base a esto nosotros clasificamos las áreas de colecta de las levaduras analizadas en este estudio en industriales y artesanales, dependiendo del tipo de práctica enológica que es utilizada en ellas. Así, en nuestro estudio, la subpoblación de Cauquenes, clasificada como industrial, presenta el menor valor de diversidad registrado, lo cual se correlaciona

con el alto número de las cepas homocigotas encontradas (Tabla 5). Además, la subpoblación de Maquehua, clasificada como industrial, presenta valores similares a Checura en la mayoría de los parámetros evaluados, sin embargo, esto no reduce el efecto que tendrían las prácticas enológicas por sobre las poblaciones como Cauquenes, la cual presenta considerables diferencias de diversidad con respecto a las subpoblaciones clasificadas como artesanales: Sauzal y Valle de Ica (Tabla 6). Esta última presenta el mayor valor de diversidad registrado, lo que es consecuencia del alto número de loci heterocigotos observados. De la misma forma, Sauzal presenta un alto valor de diversidad en relación a las poblaciones de Cauquenes y Maquehua.

Por otra parte, mediante un análisis de biodiversidad sobre levaduras del tipo no-*Saccharomyces* en monocultivos, Ganga y Martínez, 2004, sugieren una menor diversidad en zonas con prácticas industriales con respecto a artesanales, al observar una mayor cantidad de genotipos en esta última. A través de SSR, el nivel de la biodiversidad promedio ( $H_o$ ) encontrado en poblaciones industriales es un 35% menor con respecto al detectado en zonas artesanales (Tabla 6). Un análisis similar mediante mtDNA RFLP, determinó que en las zonas de Checura y Sauzal, es posible identificar un 50% de genotipos distintos contrario al 17% encontrado en las poblaciones de Cauquenes y Maquehua (Vásquez, 2006).

Estos datos sugieren un efecto negativo de las prácticas industriales sobre la biota levaduriforme, al observar una menor diversidad en subpoblaciones donde estas prácticas son utilizadas. En este mismo sentido, y como se indicó anteriormente, Valero y col, 2007, plantean que las diferencias en los niveles de diversidad entre viñas también se debería a la edad y el tamaño de las viñas, encontrando una mayor biodiversidad en

aquellos viñedos más antiguos y de mayor número de hectáreas. Sin embargo, nuestros datos indican una mayor diversidad en viñas artesanales, las cuales presentan un menor tamaño en comparación a las viñas industriales analizadas y, por lo tanto, creemos que los factores antes mencionados (fungicidas y cepas comerciales) tendrían un efecto importante sobre el equilibrio natural de las poblaciones al seleccionar genotipos en base a sus capacidades para resistir las condiciones impuestas al medio y de esta forma influir sobre su diversidad.

#### 6.4 Presencia de las Cepas Comerciales en los aislados de campo

Con el objetivo de determinar los efectos de levaduras comerciales sobre la diversidad y estructura poblacional en levaduras nativas, procedimos a buscar genotipos comerciales en aislados de campo. En Portugal encontraron cepas comerciales en diversas regiones y la recuperación de estas cepas ocurrió en zonas próximas a las bodegas en las cuales habían sido utilizadas (10-200 m) (Valero y col, 2005). Según los autores, la implantación permanente de estas cepas en campo parece no ocurrir y ellas sufrirían fluctuaciones estacionales de la misma forma que las levaduras nativas.

En Chile, la cepa EC1118 (L-1321) corresponde a una de las más utilizadas dentro de la industria vitivinícola y presenta una alta similitud genotípica con el aislado comercial chileno de Casablanca, Fermicru LVCB (L-1333). En base a esto, ha sido propuesto que esta última cepa se habría originado a partir de EC1118 debido a su liberación en campos chilenos y posteriormente re-aislada y comercializada (Cubillos, 2007).

El análisis de las subpoblaciones de Cauquenes y Maquehua no arrojó la presencia de genotipos idénticos a cepas comerciales y, por lo tanto, elegimos un nuevo grupo de cepas para realizar el análisis de comparación. La zona de Mendoza presenta una alta actividad del tipo industrial en la producción de vino y la mayor parte de las cepas de tipo comercial utilizadas en esas zonas, son usadas también en Chile (Combina, M. Comunicación personal).

Dentro del análisis, encontramos 4 cepas con un genotipo idéntico a la cepa EC1118. Con el fin de demostrar y confirmar lo observado a nivel genómico, realizamos un análisis mediante mtDNA RFLP (datos no mostrados), el cual arrojó un resultado similar, lo que indica una alta similitud génica entre las cepas de Mendoza y la cepa comercial EC1118. Datos de nuestro grupo de laboratorio sugieren que estas cepas presentarían diferencias solo nivel de secuencias sub-teloméricas (Sarmiento, 2007). En base a estos antecedentes, las cepas encontradas derivarían de la cepa comercial EC1118 y en el ambiente habrían sufrido cambios a nivel de las secuencias sub-teloméricas, pero no así en secuencias con una menor tasa de sustitución como lo son los SSR.

Estos resultados sugerirían la presencia de las cepas comerciales en las zonas cercanas a las bodegas en donde fueron inoculadas y, por lo tanto, su introducción podría traer consecuencias sobre las poblaciones de las levaduras nativas. Las cepas comerciales presentan fenotipos que son altamente deseados por los productores de vino, pues conceden a éste una serie de propiedades de carácter reproducible y preferido por los consumidores. La presencia de aislados comerciales en las viñas podría traer como consecuencia la generación de híbridos, entre cepas nativas y comerciales, con una mayor capacidad de adaptación y, por lo tanto, es necesario determinar los mecanismos

de reproducción utilizados por *S. cerevisiae* en el ambiente con el objetivo de estimar las consecuencias de su introducción.

### 6.5 Subestructura de las poblaciones

El comportamiento de la levadura *S. cerevisiae* en el ambiente ha sido escasamente estudiado. Debido a esto, pocos son los antecedentes que se encuentran disponibles acerca de las diferencias genéticas entre las subpoblaciones y los factores que generarían sus divergencias (Landry y col, 2006). Mediante la comparación de secuencias génicas entre cepas de diversos orígenes se dio cuenta de una subdivisión entre poblaciones de levaduras vínicas y de roble. Los autores sugieren que las causas de esta estructuración serían ecológicas más que geográficas, debido al fuerte uso de agroquímicos sobre las levaduras vínicas (Aa y col, 2006).

Al realizar la comparación entre las 5 poblaciones de levaduras vínicas mediante  $F_{st}$ , nosotros logramos encontrar valores en el rango de 0,04 a 0,14 los que pueden ser considerados como un grado de diferenciación moderado según la clasificación de Wright (1978), sugiriendo una sub-estructuración en estas poblaciones. Las divergencias a nivel genético detectadas en las subpoblaciones, podrían estar dadas por factores ecológicos propios de las zonas en las cuales se encuentran, sumado en el caso de las poblaciones industriales, a la intervención humana.

Las poblaciones más cercanas, Cauquenes y Sauzal que se encuentran a una distancia de 10 km, presentan el menor valor de  $F_{st}$ , sin embargo, en el resto de los casos analizados no se observó una correlación entre la distancia génica y la distancia geográfica (Tabla

7). Esto ya había sido antes propuesto por Schuller y Casal, 2007, los cuales mediante SSR encontraron que tal correlación no existiría. Por el contrario, mediante la utilización de mtDNA RFLP, se observó que cepas españolas con origen común eran capaces de agruparse dentro de un mismo cluster al realizar un análisis filogenético (Guillamón y col, 1996). Posteriormente esto fue comprobado mediante la utilización de cariotipo electroforético y RAPD sobre cepas de origen sudamericano. En estos trabajos los autores sugieren la agrupación de cepas según su origen geográfico (Martínez y col, 2004, Martínez y col, 2007). Nuestros resultados no apoyan lo antes descrito al observar que la población de Valle de Ica no presenta una mayor diferenciación genética con respecto al resto de las subpoblaciones (Tabla 7). Las diferencias entre estos trabajos podrían ser atribuidas al uso de distintos marcadores moleculares y, por lo tanto, diferencias en el grado de sensibilidad que cada uno de ellos presenta. La restricción del DNA mitocondrial, si bien es una técnica altamente resolutive (Vezinhet y col, 1990), no representa necesariamente las divergencias a nivel del DNA genómico que puedan presentar las cepas dadas sus distintas susceptibilidades a factores externos (Ibeas y Jiménez, 1997). Ha sido demostrado que el genoma mitocondrial se encontraría bajo una fuerte presión selectiva en levaduras vínicas, debido a la alta concentración de etanol y acetaldehído. Estos dos compuestos sumado a la falta de capacidad de corrección de la polimerasa del DNA mitocondrial, inducirían cambios irreversibles en el DNA mitocondrial obteniendo una mayor tasa de mutación en el genoma mitocondrial con respecto al nuclear (Ibeas y Jiménez, 1997; Castrejon y col, 2002). Estos factores sugieren que no existiría una relación directa entre las divergencias observadas a nivel



mitocondrial y nuclear, por lo que es esperable obtener, al utilizar distintos marcadores, resultados que no se correlacionen entre sí.

## 6.6 Mecanismos de Reproducción

Gran parte de los trabajos enfocados en el estudio de organismos eucariontes unicelulares como *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* o *Candida albicans* han descrito que estos utilizarían como mecanismos de reproducción el sistema clonal (Tybairnc y col, 1991). Sin embargo, durante los últimos años una serie de trabajos apuntan a mecanismos alternativos que serían utilizados por estos microorganismos como medios de propagación (Johnson y col, 2004, Tavanti y col, 2004, Ruderfer y col, 2006).

La teoría de la renovación del genoma fue planteada a principio de los años 90 y propone la hipótesis de un sistema de reproducción alternativo al clonal, en donde las levaduras vínicas no sólo se reproducirían de esta forma, sino también mediante autofecundación debido al carácter homotálico presente en ellas (Mortimer y col, 1994). Este sistema de autofecundación permitiría la selección y propagación de los genotipos homocigotos para una mutación en la descendencia, la cual podría conferir una mayor aptitud con respecto a los parentales, quienes serían desplazados.

Para determinar el tipo de reproducción asociado a cada una de las subpoblaciones, utilizamos el estadístico  $F_{is}$ . Las subpoblaciones de Cauquenes, Maquehua, Checura y Sauzal, presentan valores sobre 0,6, lo que sugiere en ellas un sistema de reproducción clonal con ciclos de autofecundación. Por el contrario, el valor de  $F_{is}$  para Valle de Ica

es menor ( $F_{is} = 0,4$ ) y en base al alto desequilibrio gamético detectado, esta subpoblación utilizaría un mecanismo clonal (Tabla 6).

El alto número de homocigotos observados en la subpoblación de Cauquenes es característico de poblaciones en las cuales la autofecundación es utilizada como sistema de reproducción, dado que este disminuye el número de heterocigotos en la población. El bajo número de loci heterocigotos observado en el resto de las poblaciones (a excepción de Valle de Ica) sería la causa del alto valor para el estadístico  $F_{is}$ , lo que provee evidencia del mecanismo sugerido en las subpoblaciones descritas. Estudios en *S. paradoxous* han logrado detectar un alto número de las cepas homocigotas, sugiriendo la autofecundación como mecanismo alternativo de reproducción en estas levaduras (Johnson y col, 2004). De la misma forma, estudios mediante SSR han clasificado un alto número de cepas nativas como diploides homocigotas, proponiendo en estas un mecanismo de reproducción clonal, sin embargo sugieren la presencia de un mecanismo alternativo debido al alto número de homocigotos encontrados (Ezov y col, 2006).

Análisis sobre cepas nativas de *S. paradoxous* y *C. albicans* permitió detectar eventos de recombinación sugiriendo mecanismos de reproducción alternativos al clonal (Johnson y col, 2004; Tavanti y col, 2004). *S. cerevisiae* utilizaría la recombinación como un mecanismo de evolución debido a la baja tasa de reproducción sexual en el ambiente. La dependencia del desequilibrio gamético con la distancia génica se extendería en el rango de las kilobases, teniendo *S. cerevisiae* una de las más altas tasas de recombinación por megabase (Johnson y col, 2004; Ruderfer y col, 2006). Dentro del grupo de las cepas analizadas, es posible detectar la presencia de un equilibrio gamético en las 4 poblaciones que presentan altos valores de  $F_{is}$ , esto confirma el supuesto antes planteado

en nuestro trabajo y refuerza los antecedentes presentados, en el sentido que la autofecundación sería un mecanismo de reproducción utilizado por las levaduras vínicas. Por el contrario, en Valle de Ica se observó un alto porcentaje de loci que no estarían recombinando y, por lo tanto, esta población presentaría un mecanismo de reproducción predominantemente clonal (Tabla 8).

### 6.7 Viabilidad de las Esporas

Las diferencias observadas mediante SSR con respecto a los mecanismos de reproducción entre las subpoblaciones estudiadas, podrían ser consecuencias de alteraciones en la expresión de los genes involucrados con un mecanismo u otro. Frente a esto, evaluamos la capacidad en cada una de las cepas de las subpoblaciones de Cauquenes y Valle de Ica, para generar ascas y posteriormente cuantificar la viabilidad de las esporas haploides generadas.

Mortimer y col, 1994, observaron en las cepas homocigotas una mayor proporción de las esporas viables, lo cual contrasta con cepas altamente heterocigotas que muestran un decrecimiento en la viabilidad de las esporas a medida que se incrementa el número de sitios heterocigotos. Las cepas vínicas presentarían una alta capacidad de esporulación, incluso en medios ricos en nutrientes y, por lo tanto, cepas homocigotas tendrían una mayor aptitud al presentar mayores tasas de crecimiento en comparación a otras heterocigotas (Mortimer y col, 2000).

Inicialmente, tanto en la subpoblación de Cauquenes como del Valle de Ica, observamos que gran parte de ellas presenta una alta capacidad de esporulación independiente del

grado de heterocigosis. Sin embargo, la población de Valle de Ica, presenta un promedio de loci heterocigotos de 3,3, y un porcentaje de alta capacidad de esporulación levemente inferior (63%) con respecto a la población de Cauquenes (76%), la cual a su vez, presenta un promedio de loci heterocigotos de 1,3.

Consecuente con los antecedentes presentados, la subpoblación de Cauquenes contiene un alto número de cepas homocigotas, y sólo 1 de 11 arrojó un valor inferior al 50% para viabilidad de esporas. De la misma forma, los individuos homocigotos de la población de Valle de Ica, presentan una alta viabilidad de sus esporas, sin embargo, lo contrario ocurre en cepas que presentan un alto grado de heterocigosis. Cepas con un número superior a 4 loci heterocigotos presentan un porcentaje de viabilidad que no supera el 25% tal como había sido previamente descrito (figura 4) (Mortimer y col, 1994). En la subpoblación de Cauquenes la cepa L-18 presenta, completa heterocigosis en todos los marcadores, siendo a su vez incapaz de generar tetradas, lo que se correlaciona con los resultados antes descritos.

En cepas triploides y tetraploides, ha sido descrito que estas presentarían una baja o nula capacidad de esporulación además de un alto nivel de heterociguidad, lo que es asociado al tipo de reproducción clonal utilizado (Ezov y col, 2006). Este tipo de reproducción soportaría aneuploidías y permitiría una mayor acumulación de mutaciones. Por el contrario, en la autofecundación, al existir aneuploidías o grandes divergencias de secuencias entre cromosomas homólogos, la viabilidad de los gametos se ve afectada y la división nuclear no se lleva a cabo (Liti y col, 2006).

Nuestros resultados sugieren que aquellas cepas con un alto número de loci heterocigotos estarían utilizando un mecanismo predominantemente clonal, debido a la

acumulación de mutaciones y a la baja viabilidad de sus esporas, tal como fue observado en las cepas nativas de Valle de Ica. Por el contrario, aquellas cepas con un bajo número de loci heterocigotos, estarían utilizando además de la clonalidad, la autofecundación, lo que sería demostrado al encontrar una alta viabilidad de las esporas en gran parte de los individuos estudiados de Cauquenes. Estas cepas tendrían un comportamiento que seguiría lo descrito por Mortimer y col, (1994) en su teoría de renovación del genoma.

## **7.- CONCLUSIONES**

En base a los resultados antes expuestos podemos concluir que:

- Las cepas de levaduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* serían en su mayoría diploides tal como fue observado mediante citometría de flujo. El carácter diploide sería consecuencia de la presencia del gen *HO* en su forma dominante, lo que impediría la presencia de cepas haploides estables. Cepas con un mayor contenido de DNA presentarían un cariotipo estable ya que exhibieron una alta viabilidad en sus productos meóticos.
- Los marcadores utilizados fueron clasificados como altamente polimórficos al presentar valores de PIC sobre 0,6 según la categorización de Bolstein y col, (1980). De estos, el marcador YML091C, registró el mayor número de alelos, identificando inclusive un número superior al descrito en la literatura. La utilización de este grupo de marcadores permitió obtener una resolución similar a la técnica de RFLP de DNA mitocondrial al lograr discriminar un número equivalente de genotipos.
- Las subpoblaciones pertenecientes a las zonas clasificadas como industriales presentarían niveles de diversidad menor en comparación a las zonas artesanales. Esto sería consecuencia de la utilización de agroquímicos que afectarían la biota levaduriforme, además de un uso intensivo de cepas comerciales la cuales podrían alterar el equilibrio natural de las levaduras nativas, al encontrarse en zonas cercanas a las bodegas en las cuales fueron inicialmente utilizadas.

- Las subpoblaciones de levaduras vínicas presentarían una estructuración al encontrar valores  $F_{st}$  que así lo demuestran. Esta se debería primordialmente a los factores ecológicos y a la intervención humana sobre el ambiente en el cual se desarrollan. En este mismo sentido, no fue posible encontrar una correlación entre la distancia génica y geográfica entre las subpoblaciones, lo que permite descartar el flujo génico entre las subpoblaciones.
- Las levaduras vínicas en las subpoblaciones de Cauquenes, Maquehua, Checura y Sauzal utilizarían un mecanismo de reproducción predominantemente clonal, con ciclos de autofecundación. Por el contrario, en la subpoblación de Valle de Ica, existiría un menor número de cepas capaces de utilizar autofecundación como mecanismo de reproducción y gran parte de ellas se reproduciría únicamente mediante clonación.
- Dado el mecanismo de reproducción observado en levaduras vínicas y la débil propagación de cepas comerciales en viñas industriales, sería posible descartar la formación de híbridos entre cepas nativas y comerciales en el medio ambiente.



## **8.- REFERENCIAS**

- Aa, E., Townsend, J., Adams, R., Nielsen, K. y Taylor, J. 2006. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. **6**: 702-715.
- Bassam, B., Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. Analytical Biochemistry. **196**: 80-83.
- Bonferroni, C. 1935. The calculation of the assurances on groups of witness. pp. 13-60 in Study in Honor of Proffesor Salvatore Ortu Carboni, Roma
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. y Davis, R. 1980. Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. The American Journal of Human Genetics. **32**: 314-331.
- Bradbury, J., Richards, K., Niederer, H., Lee, S., Dunbar, P. y Gardner, C. 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. Antonie van Leeuwenhock. **11**: 27-37.
- Castrejon, F., Codón, A., Cubero, B. y Benitez, T. 2002. Acetaldehyde and Ethanol are Responsible for Mitochondrial DNA (mtDNA) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Flor yeast. System and Applied Microbiology. **25**: 464-467.
- Cianni, M., Manaus I., Marinangeli P., Clementi F. y Martini A. 2004. Contribution of winery resistance *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leewenhoek **85**: 263-270
- Cockerham, C. y Weir, B. 1977. Digenic descent measures for finite populations. Genetics Research **30**: 121-147.
- Cocolin, L., Pepe, V., Comotini, F., Comi, G. y Ciani, M. 2004. Enological and genetic traits of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from former and modern wineries. FEMS Yeast Research. **5**: 237-245
- Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C. y Cocolin, N. 2000. Mitochondrial DNA restriction enzyme análisis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio. International Journal of Food Microbiology. **58** : 117-121.
- Cubillos, F. 2007. Analisis por microsátélites de cepas vínicas *Saccharomyces cerevisiae* Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile
- De Barros Lopes, M., Rainieri, S., Henschke, P. y Langridge, P. 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. International Journal of Systematic Bacteriology. **49**: 915-924.

Ezov, T., Boger-Nadjar, E., Frenkel, Z., Katsperovsky, I., Kemeny, S., Nevo, E., Korol, A. y Kashi, Y. 2006. Molecular-genetic biodiversity in natural population of yeast *S. cerevisiae* from "Evolution Canyon": Microsatellite polymorphism, ploidy, and controversial sexual status. *Genetics* **174**: 1455-1468

Fay, J. y Benavides, J. 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics* **1(1)**: 66-71.

Fay, J., McCullogh, H., Sniegowski, P. y Eisen, M. 2004. Population genetic variation in gene expresión is associated with phenotypic variation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology*. 5: R26.

Fleet, G., Heard, G. 1993. Yeast-growth during fermentation. En Fleet, G. (ed) *Wine microbiology and Biotechnology*. Pp 27-57. Hardwood Academic Publishers, Switzerland.

Freeland, J. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. England. 2005.

Gac, S. 2002. Evaluación Molecular del carácter autóctono en aislados silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* para uso vitivinícola. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile

Gallego, F., Perez, M.A., Nuñez, Y. e Hidalgo P. 2005. Comparison of RAPDs, AFLPs, and SSR markes for the gentic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. **22**: 561-568.

Ganga, M. y Martínez, C. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of *non-Saccharomyces* yeast. *Journal of Applied Microbiology*. **96**: 76-83.

Gonzalez Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M. y Gaggero, C. 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Letters in Applied Microbiology*. **33**: 71-75.

Guijo, S., Mauricio, J., Salmon, J. y Ortega, J.M. 1997. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines . *Yeast*. **13**: 101-117

Guillamon, JM., Barrio, E., Querol, A. 1996. Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers; relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology*. **19**: 122-132.

Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology Reviews* **52**: 536-553.

- Ibeas, J. y Jiménez, J. 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeast. *Applied Environmental Microbiology*. **63**: 7-12.
- Johnson, L., Koufopanou, V., Goddard, M., Hetherington, R., Schafer, S y Burt A. 2004. Population Genetics of the wild Yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*. **166**: 43-52.
- Kimura, M. y Crow JF. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* **49**: 725-738.
- Landry, C., Townsend, J., Hartl, D. y Cavallieri, D. 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology*. **15**: 575-591.
- Levison, G. y Gutman, G. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology Evolution*. **4**:203-221
- Liti, G., Barton, D. y Louis, E. 2006. Sequence diversity, reproductive isolation and species concept in *Saccharomyces*. *Genetics*. **174**: 839-850.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*. **27**: 209-220.
- Martinez, C., Gac, S., Lavin, A. y Ganga, M. 2004. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *Journal of Applied Microbiology*. **96**: 1161-1168.
- Martínez, C., Cosgaya, P., Vásquez, C., Gac, S. y Ganga, A. 2007. High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. *Journal of Applied Microbiology*. DOI. 10.1111.
- Medina, D. 2007. Desarrollo de un Programa de Mejoramiento Genético de *S. cerevisiae*. Tesis para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile
- Mortimer, R. 2000. Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*). *Genome Research*. **10**: 403-409.
- Mortimer, R., y Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Research Microbiology*. **150**: 199-204.
- Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G. y Polsinelli, M. 1994. Genome Renewal: A new Phenomenon Revealed From a Genetic Study of 43 Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Derived From Natural Fermentation of Grape Must. *Yeast*. **10**: 1543-1552

- Naumov, G., Naumova, E. y Korhola, M. 1992. Genetic identification of natural *Saccharomyces sensu stricto* yeast from Finland, Holland and Slovakia. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **61**: 237-243
- Nei, M. 1977. F-Statistics and analysis of gene Diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*. **41**: 225-233
- Park, H. y Bakalinsky, A. 2000. SSU1 mediates sulphite efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. **16**: 881-888.
- Paulovich, A. y Hartwell, L. 1995. A checkpoint regulates the rate of Progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* **82**: 841-847.
- Pérez, MA., Gallego, F. y Hidalgo, P. 2001a. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*. **205**: 375-378.
- Pérez, M.A., Gallego, F., Martínez, I. e Hidalgo, P. 2001b. Detection, distribution and Selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*. **33**: 461-466
- Pérez-Ortín, J., Querol, A., Puig, S. y Barrio, E. 2002. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involve in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Research*. **12**: 1533-1539.
- Pfeiffer, T., Schuster, W., Bonhoeffer, S., 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. **292**: 504-507.
- Phaff, HJ., Starmer, WT. 1987. Yeast associated with plants, insects and soil. En Rose A., Harrison J. (eds). *The Yeast* pp 123-179. Academic Press, London.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. y Perez-Ortin, J. 2000. Mitotic Recombination and Genetic Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Applied and Enviromental Microbiology*. **66**: 2057-2061.
- Romano, P., Soli, M., y Zambonelli, C. 1988. Physiological characteristics of single spore cultures of wine yeast for Industrial purpose. *Annals of Microbiology*. **38**: 123-129
- Ruderfer, D., Pratt, S., Seidel, H. y Kruglyak, L. 2006. Population genomic análisis of outcrossing and recombination in yeast. *Nature Genetics* **38**: 1177-1181.
- Sarmiento, F. 2007. Estudio molecular de la diversidad genotípica de poblaciones nativas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obter al Titulo de Bioquímico. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile

- Schuller D. y Casal, M. 2007. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. **91**: 137-150.
- Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. y Casal, M. 2004. Survey of Molecular Methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiology Letters*. 231: 19-36.
- Schuller, D., Pereira, L., Alves, H., Cambon, B., Dequin, S. y Casal, M. 2007. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast* **25**: 625-36.
- Schwartz, D. y Cantor, C. 1984. Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*. **37**: 67-75.
- Sniegowski, P., Dombrowski, P., Fingerman, E. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research*. **1**: 299-306.
- Tauzt, D. y Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. En *Tools for Developing Molecular Markers*. University of Florida
- Tauzt, D., Trick, M., Dover, GA. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a mayor source of genetic variation. En *Tools for Developing Molecular Markers*. University of Florida.
- Tavanti, A., Gow, N., Maiden, M., Odds, F. y Shaw, D. 2004. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. *Fungal Genetics and Biology*. **41**: 553-562.
- Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S., Dardé, ML. y Ayala, F. 1991. Are eukaryotic microorganism clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**: 5129-5133.
- Townsend, J., Cavalieri, D. y Hartl, D. 2003. Population genetic variation in genome-wide gene expression. *Molecular Biology Evolution*. **20**: 955-963.
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. y Dequin, S. 2007. Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter comercial yeasts. *FEMS Yeast Research*. **7**: 317-329.
- Valero, E., Schuller, D., Gambon, B., Casal, M., Dequin, S. 2005. Dissemination and survival of comercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three years study. *FEMS Yeast Research*. **5**: 959-969.

Vasquez, C. 2006. Estudio Molecular de la biodiversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* colectadas en localidades productoras de vino de la zona central de Chile. Tesis para optar al Título de Bioquímico. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

Vezinhet, F., Blondin, B. y Hallet, J. 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **32**: 1637-1680.

Weir, B.S. y Crockerham C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. **38**: 1358-1370.

Wright, S. 1951. The Genetic Structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**: 323-354.

Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*. **19**: 395-420.

Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Population, Experimental Results and Evolutionary Deductions. En Balloux, F. y Lugon-Moulin, N. (ed) , The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. **11**: 155-165.