

UCH-FC  
Biotecnología  
M491  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Desarrollo de un programa de mejoramiento genético  
para levaduras vínicas”**

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

***Daniel Alejandro Medina Salas***

Enero, 2009  
Santiago - Chile

**Director de Seminario de Título: Dr. Claudio Martínez Fernández**

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Desarrollo de un programa de mejoramiento genético para levaduras vínicas”**

*Daniel Alejandro Medina Salas*

Dr. Claudio Martínez Fernández  
**Director Seminario de título**

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán  
**Presidente Comisión**

Dr. Marcelo Baeza Cancino  
**Corrector**

Tres firmas manuscritas en tinta azul, cada una sobre una línea horizontal. Las firmas corresponden a los miembros de la comisión mencionados en el texto adyacente.



Enero, 2009  
Santiago - Chile

## Biografía



Nací un 12 de Septiembre de 1980 en Santiago de Chile. Cursé mis sus estudios de enseñanza media en el Colegio Nuestra Señora de Guadalupe en el año 1998. El año 1999 entré a estudiar Bachillerato en la Universidad de Chile, obteniendo la mención en Ciencias Naturales y Exactas el año 2001, año en el cual comencé a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Facultad de Ciencias de dicha universidad. Durante el 2006 comencé a trabajar en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago, con miras a desarrollar mí tesis de pregrado. El Año 2007 egresé como Licenciado en Biotecnología Molecular. Paralelamente entrené Artes Marciales en la misma Universidad donde me formé a partir del año 2000, obteniendo el cinto de categoría Dan en Tang Soo Do Mi Guk Kwan el año 2007. Finalicé mí tesis de pregrado el año 2008, con el objetivo de entrar a trabajar en Biotecnología dentro de Chile.



## Agradecimientos

Quiero partir agradeciendo a mi familia y su apoyo incondicional. A mi Madre por estar siempre preocupada y a mi Padre por entregarme sus valores. Además, agradecer a Carlos y Gloria por su confianza en que algún día sería un profesional, y a María José, quien llegó a compartir su vida en el momento preciso.

Tampoco puedo dejar de recordar a mis compañeros y amigos de Universidad, que en más de una ocasión fueron muy pacientes conmigo. Especialmente a Patricia Luz por su amistad y a Carolina Cortés por su cariño y preocupación para que siempre termináramos los trabajos a tiempo, sin dejar de estudiar todo para nuestras pruebas.

También agradecer al grupo de trabajo formado en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la Universidad de Santiago, en donde se desarrolló esta tesis. Fueron muchos los buenos momentos vividos en ese lugar, sin mencionar todo lo aprendido, tanto en el ámbito profesional como personal.

A los pocos amigos de la vida, pero buenos, que siempre han estado pendientes de mí y de mis logros, gracias a Gabriel Mancilla, Mauricio Gallardo, Álvaro y Daniel Garrido.

Finalmente quiero agradecer al Dr. Claudio Martínez, por su confianza y disposición para el buen término de este trabajo, el cual fue financiado gracias al proyecto Fondecyt 1070154, a su cargo.



## Tabla de Contenidos

	Página
Biografía	3
Agradecimientos	4
Tabla de Contenidos	5
Índice de Tablas y Figuras	7
Resumen	8
Abstract	9
Objetivos	26
<b>1. Introducción</b>	<b>10</b>
1.1 Breve reseña del uso de microorganismos en biotecnología.	11
1.2 Vino.	12
1.3 Participación de las levaduras y otros organismos en la elaboración del vino.	13
1.4 Biología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	13
1.5 Características de las cepas de laboratorio, nativas e industriales de <i>S. cerevisiae</i> .	16
1.6 Estrategias para el mejoramiento genético de levaduras vínicas.	17
1.7 Caracterización fenotípica y genotípica de cepas con aplicabilidad comercial.	22
<b>2. Materiales y métodos</b>	<b>27</b>
2.1 Cepas utilizadas.	28
2.2 Medios de cultivo e incubación.	29
2.3 Mosto sintético.	29
2.4 Selección de mutantes espontáneos y medios de selección.	30
2.5 Identificación y digestión de ascas.	32
2.6 Microfermentaciones y parámetros cinéticos.	32



	<b>Página</b>
2.7 Análisis de mosto fermentado.	33
2.8 Cruzamientos y generación de híbridos.	35
2.9 Extracción de DNA.	35
2.10 Análisis de RFLP mtDNA.	36
2.11 PCR "Interdelta Fingerprinting".	36
2.12 Análisis de cariotipo electroforético.	37
<b>3. Resultados</b>	<b>39</b>
3.1 Estudio de la biología de aislados nativos de <i>S. cerevisiae</i> .	40
3.2 Búsqueda de mutantes espontáneos y resistentes a antimetabolitos.	46
3.3 Obtención de híbridos por recombinación intraespecífica.	49
3.4 Evaluación fenotípica de híbridos para rasgos de interés enológicos.	53
<b>4. Discusión</b>	<b>57</b>
<b>5. Conclusiones</b>	<b>64</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>66</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>70</b>



## Índice de Tablas y Figuras.

	Página
<b>Tabla 1:</b> Cepas utilizadas.	28
<b>Tabla 2:</b> Antimetabolitos utilizados.	31
<b>Tabla 3:</b> Porcentaje de viabilidad de esporas.	41
<b>Tabla 4:</b> Tipo de apareamiento de aislados a partir de cepa L-1321.	42
<b>Tabla 5:</b> Esporas aisladas desde cepas de interés enológico.	43
<b>Tabla 6:</b> Cepas aisladas resistentes a antimetabolitos.	48
<b>Tabla 7:</b> Híbridos obtenidos por recombinación intraespecífica.	49
<b>Tabla 8:</b> Parámetros cinéticos fermentativos de los híbridos y las cepas parentales.	55
<b>Tabla 9:</b> Valores de azúcar residual, etanol producido y rendimiento obtenidos.	56
<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i> .	15
<b>Figura 2:</b> Observación de ascas bajo microscopio.	40
<b>Figura 3:</b> Perfiles de RFLP de mtDNA para las nuevas cepas y sus parentales.	45
<b>Figura 4:</b> Sobrevida a nistatina con respecto al tiempo.	47
<b>Figura 5:</b> Cultivos de cepas parentales e híbridos en mosto sintético.	50
<b>Figura 6:</b> Cariotipo electroforético de los híbridos obtenidos.	51
<b>Figura 7:</b> Patrón de bandeo de PCR "Interdelta Fingerprinting".	52
<b>Figura 9:</b> Perfil fermentativo de híbridos y cepas parentales.	54



## Resumen

Durante la producción del vino, el proceso que convierte los azúcares de la uva en etanol es realizado en su mayoría por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, hongo unicelular cuyo ciclo biológico presenta etapas haploides y diploides. En este sentido, la gran mayoría de las cepas utilizadas con fines industriales provienen de estudios de selección de aislados presentes en zonas de vinificación. Por otra parte, otros estudios se enfocan en mejorar genéticamente cepas vínicas por métodos de biología molecular para modificar sus características enológicas, sin embargo, tal aproximación aún tiene poca aplicabilidad comercial por las barreras interpuestas a la incorporación de organismos genéticamente modificados en la producción de alimentos.

El objetivo de nuestro trabajo fue sentar las bases para el desarrollo de un programa de mejoramiento genético para levaduras vínicas que evite el uso de técnicas de biología molecular, estableciendo las condiciones experimentales necesarias para la generación, selección y evaluación de híbridos.

Inicialmente, se caracterizó biológicamente aislados de *S. cerevisiae* con el fin de escoger líneas parentales que permitieran su cruzamiento. Gran parte de los aislados bajo estudio resultaron ser diploides, capaces de esporular y con un alto porcentaje de viabilidad de esporas. Posteriormente, y con la intención de generar marcadores para los posteriores cruzamientos, se seleccionaron mutantes auxótrofos espontáneos mediante su cultivo en presencia de antimetabolitos. Finalmente, se realizaron cruzamientos mediante micromanipulación, obteniéndose híbridos por recombinación intraespecífica, condición que fue confirmada mediante PCR de "Interdelta Fingerprinting" y cariotipo electroforético. Los híbridos y las cepas parentales, fueron caracterizados fenotípicamente, observándose diferencias entre estas a nivel cinético y enológico.



## Abstract

During the production of wine, the process that turns grape sugar into ethanol is made mostly by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, an unicellular fungus whose life cycle presents haploid and diploid stages. In this sense, the vast majority of strains used for industrial purposes come from studies of selection in winemaking areas. On the other hand, other studies focus on genetic improvement of wine strains by molecular biology methods to modify their oenological characteristics, however, that approach still has limited applicability because of the commercial barriers to the introduction of genetically modified organisms in food production.

The aim of our study was to develop a breeding program for wine yeast that avoids the use of molecular biology techniques, establishing the necessary experimental conditions for the generation, selection and evaluation of hybrids.

Initially, *S. cerevisiae* isolates were characterized biologically in order to choose parent strains that would allow their crossing. Most of the isolates under study were found to be diploid, capable to undergo sporulation and with a high percentage of viable spores. Subsequently, with the aim of generating markers for the subsequent crosses, spontaneous mutants were selected through growth in the presence of antimetabolites. Finally, crosses were made by micromanipulation, obtaining hybrids by intraspecific recombination, condition that was confirmed by PCR Interdelta Fingerprinting and electrophoretic karyotype. The hybrids and parental strains were characterized phenotypically, observing differences among them at the kinetic and enological parameters.

# 1. Introducción

## **1.1 Breve reseña del uso de microorganismos en biotecnología.**

Los microorganismos incluyen un extenso y variado grupo de organismos microscópicos que existen como células aisladas o agrupaciones celulares. La microbiología es la rama de la ciencia que se dedica a estudiarlos para determinar la naturaleza de los procesos característicos de estos, ya sea para entender su funcionamiento o para generar nuevas tecnologías biológicamente aplicables. Por ejemplo, en la industria alimentaria, mucho de los esfuerzos se enfocan en evitar el deterioro de los alimentos por parte de microorganismos, pero no siempre la presencia de éstos tiene efectos perjudiciales, ya que durante la producción de algunos alimentos y bebidas, intervienen otorgando características que sin ellos no podrían lograrse (Brock, 1999).

Un área de fuerte aplicación de la microbiología es la biotecnología, la cual contempla entre otras cosas, el uso de microorganismos a gran escala para producción industrial. Antiguamente se hablaba de biotecnología como la aplicación de procedimientos biológicos para generar o seleccionar microorganismos capaces de elaborar productos con aplicabilidad comercial (Brock, 1999). El Convenio sobre la Diversidad Biológica definió en 1992 a la biotecnología como "toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos". Sus aplicaciones y proyecciones son diversas en el campo de la investigación y desarrollo de nuevas tecnología utilizando herramientas de origen biológico.

## 1.2 Vino.

En Chile, se denomina vino al producto obtenido de la fermentación alcohólica del mosto de uvas frescas o asoleadas de la especie *Vitis vinifera* (Ley 18.455, Artículo 16). Esta denominación no se otorga a productos de la fermentación alcohólica de mostos de variedades híbridas u otras frutas, los que deben comercializarse bajo cualquiera otra denominación permitida por la ley. En España, por otro lado, se adoptan las normas de la Unión Europea, definiendo vino como el alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, de mosto de uva, detallando que las variedades destinadas a uva de vinificación deberán pertenecer a la especie *Vitis vinifera* (Ley 24, de la Viña y el Vino, España).

Los primeros indicios de la producción de vino en la historia del hombre datan de 6000 años antes de Cristo, en el período del Neolítico, en el cual las condiciones y herramientas necesarias para la preparación del vino hicieron sus primeras apariciones, pero la producción industrial de vino propiamente tal surgió en el valle del Nilo en Egipto, en donde se utilizaban cepas de vides exclusivamente para la producción del caldo que posteriormente se fermentaba en grandes jarros (McGovern, 1997).

El proceso de producción del vino puede ser dividido principalmente en 3 pasos. El primer paso consiste en extraer el zumo desde la uva mediante el prensado del fruto, obteniendo un caldo llamado mosto. El segundo paso es fermentar el mosto para transformarlo en vino. El tercer y último paso es el embotellado y almacenamiento del producto de la fermentación (Wilker, 2003).

### **1.3 Participación de las levaduras y otros organismos en la elaboración del vino.**

Durante el proceso de fermentación del mosto, el azúcar presente en este es transformado a etanol y CO<sub>2</sub> mediante un proceso denominado fermentación alcohólica, llevado a cabo por levaduras, principalmente por *S. cerevisiae*. En este proceso también se producen una cantidad de otros compuestos que contribuyen en gran medida al sabor y aroma final del vino. Los más significativos son el glicerol, que otorga suavidad, el acetaldehído, que le da un gusto a oxidado, el ácido acético, que en exceso le da el gusto a picado (Mesas y col, 1999).

Por otro lado, se han encontrado metabolitos formados por otras especies de microorganismos no-*Saccharomyces* que pueden contribuir a la calidad del vino. La especie *Candida stellata* está relacionada con la producción de glicerol, mientras que la especie *Candida pulcherrima* se ha relacionado con la producción de ésteres. Otras especies, como *Kloeckera apiculata*, están asociadas con la producción de ácido acético, que es perjudicial para la calidad del vino (Jolly y col, 2003).

### **1.4 Biología de *Saccharomyces cerevisiae*.**

Las levaduras son hongos unicelulares, de formas esféricas, ovals o casi cilíndricas, cuya división es mediante gemación, generándose una nueva célula hija a partir de la madre hasta separarse de ella. Su tamaño celular es mayor que el de las bacterias, lo que permite distinguirlos de estas bajo observación al microscopio, además, poseen sistemas membranosos intracitoplasmáticos, junto a un núcleo definido. Se les encuentra por lo general en lugares ricos en azúcares, como frutos, flores y cortezas de árboles.

Una de las levaduras más utilizadas a nivel industrial es *S. cerevisiae*, perteneciente al grupo de los *Ascomycetos*, con un diámetro promedio de 8 a 10  $\mu\text{m}$ . Se utiliza en la producción del pan y en la mayoría de las bebidas alcohólicas, por su capacidad de producir etanol y  $\text{CO}_2$ . Esta levadura puede llevar a cabo dos tipos de metabolismos quimiorganotróficos, por un lado puede realizar fermentación y por otro respiración, dependiendo de la ausencia o presencia de oxígeno respectivamente. Durante la respiración, las levaduras utilizan el oxígeno para reducir los azúcares, metabolizándolos para formar biomasa y  $\text{CO}_2$ . En ausencia de oxígeno, las levaduras cambian a un metabolismo anaeróbico que origina menor cantidad de biomasa, pero que produce una gran cantidad de alcohol y  $\text{CO}_2$ , proceso conocido como fermentación (Brock, 1999).

*S. cerevisiae* posee 16 cromosomas lineales. Su secuencia genómica indica que existen aproximadamente 6000 genes funcionales (Goffeau y col, 1996), de los cuales, dos tercios han sido asignados a funciones relacionadas con mutaciones fenotípicas y por homologías con proteínas de función conocida (Wu y col, 2002). Posee un ciclo celular con etapas de crecimiento vegetativo en estado haploide y diploide, además de una etapa de apareamiento sexual. En respuesta a cambios medioambientales, las células diploides son capaces de esporular, involucrando un proceso de meiosis, que produce generalmente 4 esporas haploides en el interior de una célula llamada asca. Por otro lado, las células haploides son capaces de aparearse, debido a que existen dos tipos de apareamiento para las células haploides, designados "a" y " $\alpha$ ", los cuales son especificados por la información codificada en el locus *MAT* (Bisson, 2004).

Las cepas haploides de *S. cerevisiae* pueden ser homotáticas o heterotáticas. Las cepas homotáticas son auto fértiles, siendo capaces de producir individuos diploides. Esto se debe a que las células que ya han dado a lo menos una descendencia (conocidas como células madres), tienen la capacidad de cambiar su tipo de apareamiento, lo que les confiere la capacidad de aparearse con su propia célula hija. Esto ocurre debido a la presencia del gen *HO*, el cual codifica para una endonucleasa específica que causa el cambio de información en el locus de apareamiento. Las cepas heterotáticas no poseen tal propiedad, se propagan como haploides y sólo son capaces de aparearse con una célula haploide de tipo de apareamiento opuesto (Herskowitz, 1988).

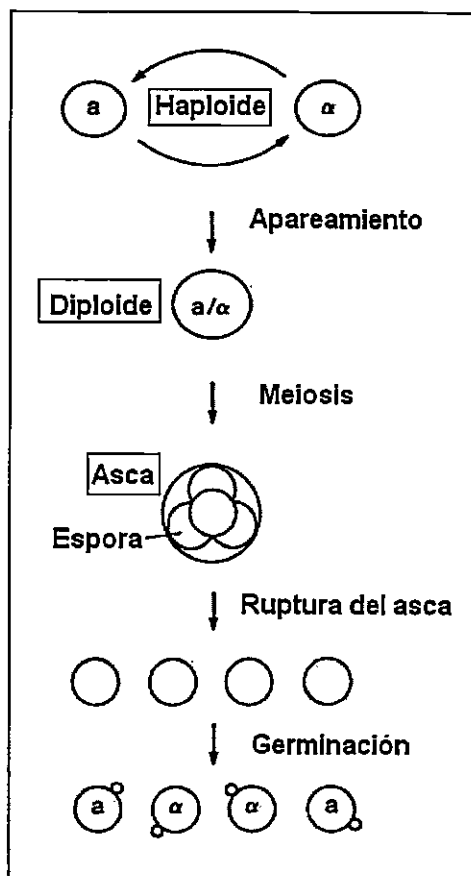


Figura 1. Ciclo de vida de *S. cerevisiae* (Modificado desde Herskowitz, 1988).

### 1.5 Características de las cepas de laboratorio, nativas e industriales de *S. cerevisiae*.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido extensamente estudiada como modelo fisiológico y genético de eucariontes, siendo el primer eucarionte con su genoma secuenciado. En general, las cepas utilizadas para estudio han sido seleccionadas por características que faciliten su manejo, como mutaciones estables, esporulación eficiente y crecimiento controlado bajo condiciones de laboratorio. Gran parte de éstas son haploides y heterotálicas, lo que facilita su cruzamiento (Bisson, 2004). Por otro lado, los aislados nativos de *Saccharomyces* son generalmente diploides, homotálicos y heterocigóticos, con eficiencia de esporulación variables, altas tasas de mutaciones espontáneas, las cuales se van acumulando durante su crecimiento (Puig y col, 2000; Bisson, 2004)

Gran parte de las cepas vínicas comerciales de *Saccharomyces* utilizadas industrialmente, han sido obtenidas mediante la caracterización fenotípica de aislados nativos de diferentes partes del mundo, seleccionándolas en base a atributos fisiológicos específicos que entreguen ventajas comparativas durante el proceso de fermentación, como tolerancia a etanol, tolerancia a dióxido de sulfuro, conducta fermentativa predecible, cantidad de azúcares residuales, producción de ésteres deseables y tolerancia a otros microorganismos (Puig y col, 2000; Bisson, 2004). Las levaduras vínicas de utilización industrial constituyen un grupo heterogéneo, con una gran variabilidad fenotípica entre cepas, siendo en su mayoría diploides y homotálicas (Mortimer y col, 1994), además, en su mayoría estas son aneuploides, con disomías, trisomías y menos frecuentemente con tetrasomías. Estas aneuploidias confieren ventajas selectivas al incrementar el número de copias de genes involucrados en procesos que son de interés enológico y al proteger a las levaduras contra mutaciones letales o deletorias (Bakalinsky y col, 1990).



Las cepas vínicas de *Saccharomyces* presentan una alta variabilidad en la viabilidad de sus esporas (Barre y col, 1993), siendo esta una característica hereditaria, que se correlaciona inversamente con el grado de heterocigocidad de cada cepa. En estado natural, estas cepas acumulan mutaciones heterocigotas recesivas, las cuales pueden cambiar a homocigotas mediante la esporulación y el cambio homotálico del tipo de apareamiento de individuos haploides, produciendo individuos diploides homocigotos que reemplazarían a los heterocigotos originales, proceso denominado *renovación génica*, lo que explicaría el alto grado de homocigosis encontrado naturalmente (Mortimer y col, 1994).

Por otro lado, se han estudiado los mecanismos de cambio génico durante fermentaciones vínicas mediante el análisis de la formación de homocigotos a partir de heterocigotos para el locus *URA3*, no encontrándose evidencias de procesos meióticos o presencia de ascas, lo que indica que el proceso de renovación génica antes descrito no explicaría la generación de homocigotos bajo estas condiciones. Una explicación a estos cambios genómicos durante los procesos de vitificación se basa en la *recombinación mitótica* entre secuencias homólogas, lo que sería responsable de la evolución genómica en levaduras vínicas (Puig y col, 2000).

### **1.6 Estrategias para el mejoramiento genético de levaduras vínicas.**

El desarrollo de técnicas que permiten determinar el perfil de expresión génica en conjunto a técnicas basadas en proteómica, han mostrado que los rasgos de interés enológico dependen de una multitud de genes, que aún no han sido bien caracterizados debido a que se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del genoma en *loci* que en ocasiones sólo son responsables de parte de una pequeña fracción de la variación fenotípica. Con el fin de mejorar este tipo de rasgos, es necesario conocer la naturaleza de estos, ya sean monogénicos o poligénicos, para definir la estrategia de mejoramiento a utilizar dependiendo de cuantos genes están involucrados dentro de los fenotipos buscados (Giudici y col, 2005).

Varias son las estrategias utilizadas para el mejoramiento genético y selección de levaduras vínicas que otorguen características deseables al producto final. Algunas de estas se basan en el apareamiento sexual de levaduras, pero estas técnicas tienen el inconveniente de no poseer marcadores que permitan seleccionar la descendencia, además la estructura génica de las levaduras vínicas limita la eficiencia de esporulación, disminuyendo la viabilidad de las esporas y la obtención de híbridos. A pesar de estas limitantes, Ramírez y colaboradores (1998), aislaron híbridos a partir del cruzamiento y selección de cepas homocigotas de fenotipo killer sensibles a cicloheximida ( $K^+$   $CYH^s$ ) y fenotipo sensible a killer resistente a cicloheximida ( $K^-$   $CYH^r$ ). El resultado fue una cepa de fenotipo  $K^+$   $CYH^r$  obtenida a partir de la conjugación de células haploides desde las esporas de las cepas parentales, indicando que este método de hibridización puede ser útil para la generación de nuevas cepas de utilización industrial.

Otra metodología utilizada para el mejoramiento de cepas vínicas es la generación de mutagénesis al azar utilizando radiación ultra violeta o por medio de agentes químicos como el etil metil sulfonato, pero este tipo de técnicas necesitan correlacionar la dosis correcta de mutágeno con los cambios necesarios para generar fenotipos interesantes, intentando no afectar genes comprometidos con otros fenotipos o características esenciales de la cepa bajo estudio (Cebollero y col, 2007). Mediante mutagénesis con radiación ultravioleta, Salmon y colaboradores (1998), obtuvieron mutantes resistentes a un análogo de amonio llamado metilamina, cuyo resultado fue el aislamiento de una cepa con mejor eficiencia en la asimilación de nitrógeno.

Las técnicas basadas en ingeniería genética entregan una amplia gama de posibilidades para el mejoramiento de cepas vínicas de *S. cerevisiae*. Debido a que esta levadura ha sido utilizada ampliamente como modelo de estudio biológico, se cuenta con un número considerable de herramientas que pueden utilizarse para generar nuevas características de interés industrial mediante la expresión heteróloga de genes o por la alteración de la dosis de expresión génica (Cebollero y col, 2007).

Un ejemplo de la aplicación de la ingeniería genética fue la utilizada por Michnick y colaboradores, en donde mediante la disrupción o sobre expresión de *GPD1*, una de las formas isogénicas de la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GPDH), alteraron la relación en la producción de glicerol y etanol, resultando en una modificación en el metabolismo de la levadura (Michnick y col, 1994). Trabajos como este son factibles cuando el rasgo bajo estudio depende de sólo un gen, pero gran parte de los rasgos de interés enológico son resultado de uno o varios *loci*, los cuales aún no están bien caracterizados debido a que se encuentran ampliamente distribuidos por el genoma, limitando las técnicas basadas en tecnologías de DNA recombinante cuyos blancos son genes individuales o rasgos monogénicos (Giudici y col, 2005).

Estas estrategias también son útiles cuando es necesario generar marcadores que permitan cruzar o seleccionar ciertas cepas. Marullo y colaboradores (2006), obtuvieron híbridos con una combinación de rasgos presentes en las cepas parentales, siendo estas homocigotas, haploides y heterotáticas, características que fueron generadas mediante la disrupción del gen *HO* por un "cassette" de integración *ho:KanMX4*, para obtener un clon haploide y así simplificar el cruzamiento de las cepas parentales junto a la selección de las cepas híbridas.

A pesar del atractivo de las tecnologías basadas en DNA recombinante, el uso de levaduras modificadas genéticamente (GMY), para la producción de bebidas alcohólicas representan un negativo impacto a nivel comercial (Giudici y col, 2005), debido principalmente a que el uso de organismos genéticamente modificados (GMO), para la producción de alimentos está estrictamente regulado en gran parte del mundo y sobre todo en la Unión Europea (Cebollero y col, 2007), debiéndose comprobar su seguridad tanto para el consumo humano como para el medio ambiente, además de superar la aceptación pública dentro el mercado como una alternativa más frente a los productos tradicionales (Schilter y col, 2002). Por otro lado, se debe asegurar que las modificaciones introducidas no alteren características esenciales del proceso de fermentación ni introduzcan marcadores génicos que las levaduras

industriales usualmente no poseen (Schuller y col, 2005).

Para evitar la introducción de marcadores genéticos mediante ingeniería genética, algunos autores han utilizado metodologías enfocadas en el enriquecimiento y selección de mutantes auxótrofos generados de manera espontánea en un cultivo celular, permitiendo el aislamiento de mutantes por sobre la presencia de células no mutadas. Estas técnicas se basan en la utilización de compuestos conocidos como antimetabolitos, los que generalmente corresponden a análogos estructurales de metabolitos, que al ser incluidos en una ruta metabólica son transformados en compuestos tóxicos para la célula. Las células que poseen mutaciones en parte de las rutas metabólicas involucradas en la transformación de algún antimetabolito, no producen el correspondiente derivado tóxico (Toyn y col, 2000).

Un antimetabolito ampliamente utilizado para el aislamiento de mutantes espontáneos es el ácido 5-fluoroantranilato (5-FAA, por sus siglas en inglés), que contra selecciona células que carecen de parte de las enzimas necesarias para la biosíntesis de triptófano a partir de ácido antranílico. El 5-FAA es metabolizado dentro de esta vía a 5-fluorotriptófano, compuesto tóxico para la célula. Toyn y colaboradores (2000), demostraron que deleciones en los genes *trp1*, *trp3*, *trp4* y *trp5* generan mutantes auxótrofos para triptófano que son resistentes a 5-FAA debido a que este no es transformado en su derivado tóxico.

De una manera similar al 5-FAA, se han utilizado otros antimetabolitos para contra seleccionar levaduras. Un ejemplo es el ácido  $\alpha$ -aminoadipato ( $\alpha$ -AA), el cual produce un intermediario tóxico que afecta a las células  $LYS2^+$  y  $LYS5^+$ , permitiendo sólo el crecimiento de células auxótrofas para lisina (Sikorski y col, 1991). Otro compuesto utilizado es el metil mercurio (MM), que previene el crecimiento de células  $MET2^+$  y  $MET5^+$ . Las células *met2* y *met5* requieren la presencia de metionina para crecer y además son resistentes al MM, debido a la sobreproducción de iones hidrosulfato ( $HS^-$ ), los cuales detoxifican al metil mercurio, disminuyendo su toxicidad. (Singh y col, 1974; Ono y col, 1991)

Boeke y colaboradores (1987), describieron al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), como un antimetabolito que previene el crecimiento de células  $URA3^+$ , gen que codifica la enzima orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, necesaria para la síntesis de uracilo y que metaboliza al 5-FOA en 5-fluorouracilo, compuesto tóxico para la célula. Las células *ura3* son resistentes a 5-FOA debido a que no generan el derivado tóxico, pero no son capaces de sintetizar uracilo, por lo que lo requieren para su crecimiento. La selección por 5-FOA es extremadamente útil ya que el gen  $URA3$  es ampliamente utilizado como marcador de selección específico debido a su pequeña secuencia y a la disponibilidad de vectores de clonamiento basado en él.

Por otro lado, Rincón y colaboradores (2001), utilizaron un análogo tóxico de glucosa conocido como 2-desoxi-d-glucosa (2-DOG), que permitió aislar levaduras mutantes resistentes a este antimetabolito, los cuales presentaron mejoras en las propiedades fermentativas de los azúcares.

Para aumentar la presencia de mutantes espontáneos en el cultivo, Snow y colaboradores (1966), utilizaron el antibiótico nistatina, el cual impide la correcta formación de la pared celular en células que presentan crecimiento vegetativo. Durante el cultivo en un medio mínimo (SD), nistatina mata a las células en crecimiento, mientras que las células mutantes que necesitan requerimientos nutricionales para su crecimiento, no se ven afectadas por el antibiótico al no dividirse, enriqueciendo así el cultivo en células auxótrofas.

### 1.7 Caracterización fenotípica y genotípica de cepas con aplicabilidad comercial.

Actualmente existe una alta demanda de cepas vínicas comerciales que entreguen características únicas y repetibles a los productos obtenidos de la fermentación. Entre los parámetros más importantes para generar vinos de calidad se pueden contar las propiedades fenotípicas fermentativas características de la cepa utilizada como inóculo, tales como tolerancia a etanol, menor cantidad de azúcares residuales en el fermentado, no producción de defectos organolépticos, además de parámetros cinéticos fermentativos propios de estas (Marullo y col, 2006).

Para caracterizar fenotípicamente cepas vínicas utilizadas como parentales para la formación de híbridos por recombinación intraespecífica, Marullo y colaboradores (2006), determinaron los parámetros cinéticos característicos de cada cepa midiendo la pérdida de peso con respecto al tiempo durante fermentaciones en "batch", observando diferencias para los parámetros entre los parentales e híbridos. Además, determinaron la concentración de etanol producida (% vol/vol) y la cantidad de azúcares residuales ( $\text{g L}^{-1}$ ) al finalizar las fermentaciones, observando nuevamente diferencias entre las cepas parentales y los híbridos aislados.

En la actualidad se utiliza una amplia gama de metodologías para el análisis de vinos y mosto fermentado. Entre estas cabe mencionar las técnicas químicas, fisicoquímicas y enzimáticas. Las primeras se basan principalmente en reacciones que producen o transforman un compuesto químico en otro cuantificable. Las segundas se basan en propiedades fisicoquímicas de los componentes a analizar que permiten su separación y análisis. Por último, las técnicas enzimáticas se basan en reacciones catalizadas por enzimas que producen o consumen compuestos capaces de ser medidos instrumentalmente (Bordeu y col, 2000).

Una técnica química utilizada para la determinación de etanol es la microdifusión, la cual se basa en la difusión a través del aire de un compuesto volátil como el etanol, desde una solución saturada de carbonato de potasio hacia una solución de dicromato de potasio. El etanol es oxidado a ácido acético en presencia de dicromato de potasio, transformando el cromo a  $\text{Cr}^{+3}$ , generando un cambio en el color de la solución desde amarillo a transparente, lo cual puede ser cuantificado por espectrofotometría a 450 nm.

Por otro lado, otra técnica ampliamente utilizada para la determinación de etanol en alimentos, es la cuantificación mediante reacciones enzimáticas. La técnica se basa en la oxidación del etanol en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenada en presencia de  $\text{NAD}^+$ , a su vez, el acetaldehído producido es oxidado a ácido acético por la enzima aldehído deshidrogenasa en presencia de  $\text{NAD}^+$ . El NADH producido en ambas reacciones es cuantificado por absorbancia a 340 nm.

Para analizar las cantidades de azúcares residuales al finalizar una fermentación, una metodología utilizada es la determinación de azúcares reductores, conocida como método de Nelson y Somoyi. Esta se basa en la capacidad de un azúcar para reducir el ión cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) a cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), el que posteriormente forma un complejo coloreado con arsenomolibdato de amonio. El complejo coloreado es cuantificado espectrofotométricamente a una absorbancia de 520 nm (Bordeu y col, 2000).

Otra metodología utilizada para la determinación de azúcares es la cuantificación de glucosa y fructosa mediante reacciones enzimáticas. Esta técnica se basa en la transformación de glucosa en glucosa-6-fosfato mediante la enzima hexoquinasa en presencia de ATP. A su vez, la glucosa-6-fosfato es oxidada a gluconato-6-fosfato por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada en presencia de  $\text{NADP}^+$ , produciéndose NADPH. Por otro lado, la fructosa es transformada a fructosa-6-fosfato por la enzima hexoquinasa y después transformada en glucosa-6-fosfato por la enzima fosfoglucoisomerasa para luego ser transformado en gluconato-6-fosfato y NADPH. EL NAPDH formado desde ambas reacciones es cuantificado espectrofotométricamente por medición de la absorbancia de 340 nm.

Desde hace un tiempo es de gran interés monitorear la dinámica poblacional microbiana durante los procesos de producción vínica, con el objetivo de mantener un control sobre la fermentación y la calidad del vino producido (Urso y col, 2008). De igual manera, el interés por estudiar la diversidad génica de microorganismos y su presencia en el medio ambiente, ha generado herramientas moleculares capaces de identificar y diferenciar levaduras a nivel de cepa. Schuller y colaboradores caracterizaron 100 aislados de *S. cerevisiae* correspondientes a la cepa comercial Zymaflore VL1, recuperados a partir de fermentaciones espontáneas de uvas recolectadas desde viñedos cercanos a bodegas vínicas donde la cepa comercial fue ampliamente utilizada durante los años previos al estudio. El objetivo de su trabajo fue evaluar si la permanencia de la levadura comercial en el ambiente indujo cambios génicos detectables por tipificación molecular. Para la caracterización de los aislados obtenidos se utilizaron metodologías como la tipificación de secuencias interdelta, RFLP de DNA mitocondrial (mtDNA), cariotipo electroforético y análisis por microsatélites. Mientras que el RFLP mtDNA permitió la identificación de los aislados relacionadas con la cepa Zymaflore VL1, las otras técnicas de tipificación indicaron variaciones genéticas en diferente grado para los perfiles moleculares de los aislados, siendo el cariotipo electroforético la técnica que arrojó mayores diferencias entre cepas. Schuller y colaboradores (2007), atribuyeron los cambios observados entre los aislados recuperados a mecanismos adaptativos como consecuencia de cambios medioambientales y a la alta plasticidad del genoma de *S. cerevisiae*.

EL RFLP de mtDNA es una de las técnicas más sencillas para la distinción entre cepas de *S. cerevisiae*. El mtDNA de levaduras es una molécula circular de aproximadamente 75 kb, con una presencia de alrededor de 35 copias por célula y con una alta variabilidad de secuencia, lo que permite su utilización para realizar perfiles polimórficos mediante la digestión de DNA total por enzimas de restricción que reconocen secuencias ricas en GC, las que se encuentran en alta presencia en el DNA nuclear, pero en baja cantidad en el mtDNA, causando una digestión completa del DNA nuclear pero parcial del mtDNA, generando fragmentos que pueden ser separados y visualizados por electroforesis (López y col, 2001).



La tipificación mediante secuencias interdelta fue diseñada exclusivamente para el análisis de levaduras, ya que se basa en la amplificación por PCR de las regiones que se encuentran entre los elementos *delta* que flanquean a los retrotransposones TY1 y TY2. Estos elementos deltas, también conocidos como "long terminal repeat" (LTR), pueden además encontrarse de forma solitaria dentro del genoma de las levaduras. La cepa de laboratorio S288C contiene alrededor de 300 de estos elementos en su genoma, por lo que estas regiones son blancos ideales para la identificación de polimorfismos (Legras y col, 2003).

La técnica de electroforesis en campo pulsado permite la separación de moléculas de DNA de alto peso molecular sometidas a un campo eléctrico de pulsos alternados orientados perpendicularmente. Schwartz y colaboradores (1984), utilizaron esta técnica para separar intactos gran parte de los cromosomas de *S. cerevisiae*, obteniendo un cariotipo electroforético que permitió la diferenciación de *S. cerevisiae* a nivel de cepa.

A partir de estos antecedentes, nosotros nos propusimos montar los procedimientos necesarios para desarrollar un programa de mejoramiento genético que permita a futuro seleccionar y caracterizar nuevas cepas con aplicabilidad comercial. Para ello nos basamos en la generación de marcadores mediante la selección de mutantes auxótrofos, sin la utilización de técnicas de DNA recombinante, que permitan la generación de híbridos por recombinación intraespecífica y que puedan ser caracterizados fenotípica y molecularmente.

### **Objetivo general**

Establecer las condiciones experimentales para el desarrollo de un programa de mejoramiento genético para levaduras vínicas.

### **Objetivos específicos**

1. Estudiar la biología y fenotipos de relevancia en aislados de *S. cerevisiae* para incluirlos en un programa de mejoramiento genético.
2. Obtener mutantes espontáneos auxótrofos, como marcadores de selección, para su posterior cruzamiento.
3. Generar híbridos por recombinación intraespecífica, mediante el cruzamiento de cepas auxótrofas.
4. Evaluar molecular y fenotípicamente los híbridos obtenidos.

## **2. Materiales y métodos**

## 2.1 Cepas utilizadas.

Durante el desarrollo del programa se utilizaron 35 cepas de la levadura *S. cerevisiae* pertenecientes al cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile, los que en su mayoría corresponden a aislados desde zonas vitivinícolas. Además, se utilizó la cepa comercial EC-1118 (L-1321) y la cepa de laboratorio SC288C. La tabla 2 muestra los aislados nativos utilizados durante el estudio.

Por otro lado, los cruzamientos fueron realizados utilizando la cepa L-2963 (Mat a, trp<sup>-</sup>), aislado obtenido desde la cepa L-1321, el que fue cruzado con las cepas de laboratorio L-1125 (BY4722, Mat  $\alpha$ , leu2<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup>) y L-1141 (BY4739, Mat  $\alpha$ , leu2<sup>-</sup>, lys2<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup>) con el fin de obtener híbridos por recombinación intraespecífica.

**Tabla 1.** Cepas utilizadas durante el estudio y origen geográfico de estas, según denominación de nuestro cepario. <sup>1\*</sup> Cepas de uso comercial.

País	Cepa
Chile	L-7, L-16 <sup>1*</sup> , L-20, L-21, L22
Chile	L-79, L-80, L-351, L-354
Chile	L-146, L-1374
Chile	L-165, L-169
Chile	L-494, L-531, L-532
Chile	L-1528
Chile	L-246, L-263
Chile	L-269
Chile	L-281, L-283
Chile	L-720, L-757, L-846
Chile	L-1054
Argentina	L-958, L-960, L-962, L-981, L-982, L-1005, L-1006
Francia	L-1321 <sup>1*</sup>
Chile	L-1333

## **2.2 Medios de cultivo e incubación.**

Para su crecimiento, las células fueron cultivadas en medio YPD (anexo 1.1), a 28 °C, mientras que para su mantención estas fueron almacenadas a 4 °C (Adams, 1997).

Las pruebas de requerimientos nutricionales fueron realizadas bajo medio mínimo SD (anexo 1.2) y medio mínimo SC (anexo 1.3), suplementado con los requerimientos nutricionales respectivos, tanto para la selección como para la selección. Una variante del medio mínimo SD para la mantención de las células es el SD-N (anexo 1.4), el cual no contiene base nitrogenada (Adams, 1997).

La esporulación de las levaduras fue inducida mediante el cultivo en medios deficientes en fuentes de nitrógeno, incubándolas durante 24 a 72 h a 28 °C y luego almacenadas a 4 °C. Para ello las células fueron cultivadas en medio de esporulación mínimo (MSM, anexo 1.5), y medio de esporulación (SM, anexo 1.6). Cuando las células necesitaron requerimientos nutricionales, se complementó estos medios con los respectivos suplementos necesarios, según las cantidades utilizadas para preparar el medio SC (Adams, 1997).

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados antes de su uso mediante autoclave a 15 psi por 15 min.

## **2.3 Mosto sintético.**

Para las fermentaciones en pequeña escala se utilizó un mosto sintético preparado según las cantidades indicadas en el anexo 1.7. Los reactivos fueron agregados en el orden indicado, disolviéndose uno a uno en agua destilada. El pH fue ajustado a 3,3 con NaOH 0,1 N para posteriormente autoclavar la solución.

Una mezcla de vitaminas fue agregada al mosto sintético antes de ser usado, preparándose según las cantidades indicadas en el anexo 1.8. Las vitaminas fueron diluidas una a una en 175 ml de agua destilada bajo agitación, junto a 0,35 ml de ácido sulfúrico 0,25 M. Luego de agregar todas las vitaminas se aforó a 250 ml con agua destilada. La solución fue filtrada bajo esterilidad con papel filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y almacenada a 4 °C en oscuridad.

El mosto, además, fue suplementado con aminoácidos según las concentraciones indicadas en el anexo 1.9.

## **2.4 Selección de mutantes espontáneos y medios de selección.**

### **2.4.1 Enriquecimiento de mutantes auxótrofos mediante nistatina.**

Las células fueron crecidas en 10 ml de YPD durante 12 h, para luego ser lavadas con agua estéril en dos ocasiones y resuspendidas en 10 ml de SD-N, incubándose durante otras 12 h. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados a 280 g (Universal 32R, Hettich) en tubos de 50 ml (Falcon) y resuspendidos en 10 ml de SD. Luego de 3 h de incubación, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de nistatina a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (anexo 1.10), agitándose durante 35 min a 28 °C. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas en YPD durante de 6 h, para posteriormente lavarlas e incubarlas en 10 ml de SD-N por 12 h. Finalmente el tratamiento con nistatina fue repetido y las células fueron resuspendidas en 10 ml de agua destilada estéril (Snow, 1966). Desde esta suspensión se tomó 100  $\mu\text{l}$  para sembrar en los medios de selección respectivos.

### 2.4.2 Selección de mutantes espontáneos.

Luego de la etapa de enriquecimiento, se tomaron 100 µl de suspensión celular y se sembraron en placas suplementadas con los antimetabolitos ácido 5-fluoroorótico (anexo 1.11), ácido 5-fluoroantranílico (anexo 1.12), cloruro de metil mercurio y 2-deoxiglucosa.

Para la selección con metil mercurio, 100 µL de la suspensión celular tratada con nistatina fueron sembrados en placas con medio SD en cuyo centro, luego de sembrar las células, se agregó un trozo de papel embebido en metil mercurio  $3 \times 10^{-4}$  M (Singh y col, 1974; Ono y col, 1991).

Previo a la selección con 2-deoxiglucosa, las células fueron crecidas durante una noche en YPD con 10% de glucosa. Posteriormente las células fueron lavadas con agua estéril y sembradas en SR-DOG (anexo 1.13).

Tabla 2. Antimetabolitos utilizados durante el desarrollo de nuestro estudio.

Antimetabolito	Selección	Enzima	Producto
5FOA	<i>ura3</i> <i>ura5</i>	Orotidina 5-fosfato descarboxilasa	5-fluoro uracil
5FAA	<i>trp1</i>	Fosofribosil antranilato	5-fluoro triptofano
$\alpha$ AA	<i>lys2</i>	$\alpha$ amino adipato reductasa	Intermediario tóxico de la ruta de lisina
Mm	<i>met5</i> <i>met2</i>	Sulfito reductasa. Homoserina acetiltransferasa	Posible sustancia difusible detoxificadora
2DOG	Resistencia otorgada por fosfatasa	Hexoquinasa	2DOG-6-P

## **2.5 Identificación y digestión de ascas.**

La identificación de la presencia de ascas en los cultivos sometidos a esporulación se realizó por observación bajo microscopio a un aumento total de 400 veces.

Para la separación de las ascoesporas, las ascas fueron digeridas y micromanipuladas utilizando un micromanipulador (Nikon, Eclipse 50i). Una cantidad de cultivo celular fue agregado a tubos ependorf de 1,5 ml que contenían una solución de 50  $\mu$ l de Sorbitol 1M (J.T. Baker), y 10  $\mu$ l de Zimoliaza (Seikagaku Corporation), a una concentración de 1 mg/ml. La suspensión se incubó a 37 °C por 1 h (Eppendorf, thermomixers). La reacción de digestión fue detenida por incubación en hielo durante 1 min para posteriormente extraer 10  $\mu$ l de la suspensión y diluirla en 300  $\mu$ l de Sorbitol 1M. De esta última solución se extrajeron 10  $\mu$ l, los que fueron sembrados sobre placas de YPD, para su posterior micromanipulación. El cultivo micromanipulado fue incubado por 48 h a 28°C, para luego contar la cantidad de esporas que formaron colonias, estableciendo el porcentaje de viabilidad de esporas (Evans, 1996).

## **2.6 Microfermentaciones y parámetros cinéticos.**

Para determinar los parámetros fermentativos de las cepas bajo estudio, se realizaron microfermentaciones en mosto sintético a 24 °C. Las levaduras a fermentar se crecieron en 5 ml de YPD líquido durante 12 h. Luego fueron lavadas e inoculadas en 40 ml de mosto sintético. Utilizando una cámara de Neubauer se contó bajo microscopio la cantidad total de células crecidas a las 72 h, para tomar un volumen de cultivo que contuviese una cantidad cercana a  $2 \times 10^8$  células, los que fueron inoculados a 180 ml de mosto sintético, completando hasta un volumen de 200 ml finales.



La cantidad de CO<sub>2</sub> liberada durante las microfermentaciones fue relacionada mediante la pérdida de peso de los matraces (Marullo, 2006; Suárez Lepe, 1997). Se utilizó una balanza electrónica (Electronic Balance LP 502A) para pesar los matraces 3 veces al día las primeras 48 h de la fermentación, 4 veces al día durante las siguientes 72 h y posteriormente 3 veces al día hasta finalizar la fermentación.

Los parámetros cinéticos determinados fueron:

- $A_{max}$ : Aceleración máxima de liberación de CO<sub>2</sub> (g/L<sup>-1</sup>h<sup>-2</sup>). Ocurre al inicio de la liberación de CO<sub>2</sub> y corresponde a la capacidad máxima fermentativa de una cepa, la que se relaciona con la actividad específica fermentativa y el ritmo de crecimiento de estas.
- $V_{max}$ : Velocidad máxima (g/L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>). Corresponde a la tasa de producción máxima de CO<sub>2</sub>. Este parámetro está fuertemente relacionado con la demanda de nitrógeno de la cepa y es alcanzado cuando las fuentes de nitrógeno son agotadas.
- $V_{50}/V_{max}$ : Corresponde a la caída relativa en la producción de CO<sub>2</sub> en la etapa media de la fermentación luego de haber agotado al fuente de nitrógeno, siendo un buen indicador de la segunda parte de la fermentación (Marullo, 2006).

## 2.7 Análisis de mosto fermentado.

Los análisis enzimáticos desarrollados tanto para la detección de etanol y como para la cantidad de azúcar residual en el mosto sintético fermentado fueron adaptados a partir de los métodos de detección comercializados por Boehringer Mannheim & R-Biopharm, que se basan en la detección de NADH y NADPH, a partir de etanol y glucosa-6-fosfato respectivamente, siendo estos detectados a una longitud de onda de 334 nm, 340 nm o 365 nm.

### **2.7.1 Detección de Etanol.**

Se tomaron 26  $\mu\text{L}$  de una solución de NAD 10 mg/ml, 11  $\mu\text{L}$  de aldehído deshidrogenasa 5 U/ml y se disolvieron en 142  $\mu\text{L}$  de un buffer de difosfato de potasio 100 mM, pH 9.0, previamente alicuotado en una placa de 96 posillos donde se llevó acabo la detección por medio de un lector de placa elisa (ELx808™ Absorbance Microplate Reader). Luego se agregaron 6  $\mu\text{L}$  de muestra a determinar, volumen que en el caso del "blanco" se reemplazó por agua destilada. La reacción se incubó por 5 min a 25 °C con agitación, para luego iniciar la reacción añadiendo 15  $\mu\text{L}$  de solución alcohol deshidrogenasa 1000 U/ml. La absorbancia a 340 nm fue medida luego de 10 min de incubación a 25 °C para posteriormente comparar los valores obtenidos mediante una curva estándar de concentraciones conocidas.

### **2.7.2 Detección de azúcares residuales.**

Para la detección de azúcares residuales en muestras de mosto sintético fermentado, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución de NADP 10 mg/ml, 20  $\mu\text{L}$  de una solución de ATP-Mg 20 mg/ml y se agregaron a 60  $\mu\text{L}$  de tampón de trietanol amina 100 mM, pH 7.6, previamente alicuotado en los posillos donde se llevará acabo la reacción. Luego se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de MgCl 100 mM y 20  $\mu\text{L}$  de muestra, volumen que en el caso del "blanco" fue reemplazado por agua destilada. La mezcla se incubó por 3 min a 22 °C. Posteriormente se dio inicio a la reacción agregando 20  $\mu\text{L}$  de hexoquinasa 20 U/ml y 20  $\mu\text{L}$  de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y se incubó durante 15 min con agitación a 22 °C, tiempo al cual se midió la absorbancia a 340 nm en un lector de placa de elisa y los valores obtenidos fueron comparados con una curva estándar generada a partir de concentraciones conocidas.

## 2.8 Cruzamientos y generación de híbridos.

Los cruzamientos fueron realizados mediante micromanipulación (Evans, 1996), aproximando las células parentales una a una, para permitir su apareamiento. Las colonias desarrolladas luego de 48 h fueron aisladas y traspasadas a medio SD, con el fin de seleccionar sólo las cepas híbridas que complementan las auxotrofías de las cepas parentales. Alternativamente se utilizó la técnica de apareo en masa (Nakazawa, 1999). Las cepas parentales fueron crecidas en YPD líquido durante 12 h, para posteriormente mezclar 2 ml de cada cultivo e incubar la suspensión nuevamente 12 h, para luego plaquear 1 ml del cultivo en medio SD, incubándose a 28 °C hasta la aparición de colonias.

## 2.9 Extracción de DNA.

La extracción de DNA de levaduras se realizó utilizando el sistema *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega), según las especificaciones entregadas por el fabricante. Las células fueron crecidas en YPD líquido durante 12 h, para luego ser colectadas por centrifugación a 13200 g por 5 min (Microcentrifuga 541D, Eppendorf). Las células fueron resuspendidas en 280 µL de EDTA 50 mM, agregándose 20 µL de zimoliasa 10 mg/ml. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a 37 °C, para posteriormente centrifugarlas a 13200 g por 5 min, eliminando el sobrenadante. Luego se agregó 400 µL de "*nuclei lysis solution*" y 133 µL de "*protein precipitation solution*", homogenizando enérgicamente durante 2 min. Las muestras fueron incubadas en frío durante 1 h y centrifugadas a 13200 g por 30 min a 4 °C, recuperando el sobrenadante y resuspendiéndolo en 300 µL de isopropanol. La suspensión fue centrifugada durante 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante. El DNA obtenido fue limpiado con 300 µL de etanol frío al 70%, para luego centrifugarlo a 13200 g. El etanol fue eliminado y las muestras fueron secadas a 37 °C. Finalmente el DNA obtenido fue rehidratado con 50 µL de TE pH 7,4, almacenándose a 4 °C hasta ser utilizado.

El DNA fue cuantificado espectrofotométricamente midiéndose la absorbancia a 260 nm, determinando la pureza del DNA con respecto al contenido de proteínas de la muestra mediante la razón de la absorbancia a 260 nm y 280 nm.

### **2.10 Análisis de RFLP mtDNA.**

El DNA extraído fue utilizado para analizar diferencias a nivel de DNA mitocondrial entre los clones monoespóricos aislados a partir de una misma cepa. Para esto, se realizó una digestión enzimática según López y colaboradores (2001). La digestión se realizó con una cantidad de 1,5 µg de DNA en un volumen final de 20 µL. Esta fue incubada a 37 °C durante 3 h para posteriormente analizar los patrones de digestión mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5%.

### **2.11 PCR "Interdelta Fingerprinting".**

Con el fin de buscar diferencias a nivel molecular entre las cepas parentales y los híbridos generados, se amplificaron las regiones delta del genoma de levaduras mediante PCR. La reacción fue preparada según las indicaciones de Legras y colaboradores (2003), utilizando 12 ng de DNA para un volumen final de reacción de 50 µl.

El programa utilizado para la amplificación por PCR constó de una etapa de denaturación inicial de 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos compuestos por una etapa de denaturación durante 30 s a 95 °C, luego de hibridación por 30 s a 46 °C y elongación durante 90 s a 72 °C. Al finalizar los ciclos se realizó una etapa de elongación durante 10 min a 72 °C.

## 2.12 Análisis de cariotipo electroforético.

Para la obtención del cariotipo electroforético de las cepas utilizadas durante el estudio, los cromosomas fueron preparados según el método utilizado por Schwartz y colaboradores (1984), modificado en nuestro laboratorio.

Las cepas fueron crecidas durante 15 h en 10 ml de YPD. Las células fueron precipitadas mediante centrifugación a 480 g (Universal 32R, Hettich), por 10 min a 15 °C en tubos Falcon, para posteriormente eliminar el sobrenadante. Las células obtenidas fueron lavadas con 5 ml de EDTA 50 mM pH 8.0 (preparado a partir de EDTA 0,5M pH 8,0, anexo 2.1), precipitando la suspensión celular de la manera especificada anteriormente. Las células fueron resuspendidas en 100 ml de EDTA 50 mM pH 8.0 y se agregaron 10 µl de Zimoliasa 10 ng/ml, incubándose la suspensión por 10 min a temperatura ambiente.

La reacción de digestión fue detenida al agregar 1,5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% preparada en EDTA 125 mM pH 8,0, previamente incubada a 42 °C en baño termoregulado. La suspensión fue traspasada rápidamente a moldes plásticos antes que se solidificara para formar los bloques de corrida. Los bloques fueron enfriados a 4 °C durante 10 minutos y luego traspasado a tubos Falcon que contenían 3 ml de solución LET (anexo 2.2) y 40 µl de Zimoliasa 10 ng/ml. Las células fueron incubadas a 37 °C durante 16 h, para posteriormente eliminar el LET y lavar los bloques con EDTA 50 mM dos veces. Los bloques fueron resuspendidos en 3 ml de NDS (anexo 2.3), junto a proteinasa K a una concentración de 1 mg/ml e incubados a 50 °C por 24 horas.

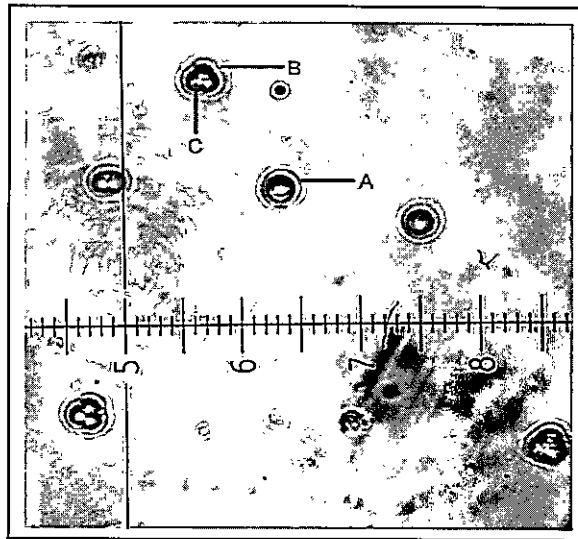
Luego de la incubación, los bloques fueron nuevamente lavados de la siguiente manera: 3 veces con TE (anexo 2.4), a 50 °C con intervalos de 30 min cada uno y 3 veces con TE a temperatura ambiente con iguales intervalos de tiempo. Finalmente, los bloques fueron almacenados en EDTA 50 mM a 4 °C hasta su uso.

Los bloques fueron cargados en geles de agarosa al 1% preparados con TBE 0,5X y los cromosomas separados mediante electroforesis de campo pulsado en un equipo CHEF DR III System (Bio-Rad), utilizando un programa de dos bloques: uno inicial de pulso 60 s por 12 h y uno final de 120 s por 12 h, ambos corridos a 6 V/cm, 14 °C y un ángulo de 120°. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, observados y fotografiados mediante transiluminación UV (Vilber Lourmat).

## **3. Resultados**

### 3.1 Estudio de la biología de aislados nativos de *S. cerevisiae*.

Cómo primera etapa del programa de mejoramiento genético se estudio la biología relacionada con los aislados nativos de *S. cerevisiae* obtenidos desde zonas de producción vínica. Se escogieron 35 cepas desde el cepario de LAMAP (tabla 1), las cuales fueron inducidas a esporulación por incubación en medio MSM durante 48 a 72 horas. Los cultivos fueron observados mediante microscopio a un aumento total de 400 para identificar la presencia de ascas (figura 2).



**Figura 2.** Observación de ascas en microscopio óptico. En A se muestra una célula vegetativa, mientras que en B y en C se indica un asca y una ascospora respectivamente. Aumento total de 400 veces.

De las 35 cepas bajo estudio, sólo la cepa L-1 no esporuló. Además, se observó que la mayoría de los aislados esporuló dentro de 72 horas de incubación, mientras que las cepas L-531, L-532, L-281, L-283, L-757, L-846 y L-958 les tomó entre una semana a un mes para esporular.



Las ascas fueron micromanipuladas para determinar el porcentaje de viabilidad de sus esporas. En general se observó que los aislados utilizados para el estudio presentan un alto porcentaje de viabilidad de sus esporas, ya que estas generan clones viables capaces de crecer y multiplicarse. La tabla 3 muestra los porcentajes de viabilidad estimados para cada cepa, además de la cantidad de nuevas cepas obtenidas a partir de los clones monoespóricos viables aislados.

**Tabla 3.** Porcentaje de viabilidad de esporas de las cepas bajo estudio. La tabla además indica el número de cepas almacenadas a partir de las esporas viables.

Cepa	% viabilidad	Cepas Almacenadas	Cepa	% viabilidad	Cepas Almacenadas
L-7	100	9	L-269	74	7
L-146	100	9	L-982	71	9
L-1374	100	8	L-80	71	8
L-720	100	8	L-20	72	6
L-846	94	12	L-80	71	8
L-263	93	9	L-79	70	7
L-962	93	7	L-22	57	8
L-169	92	8	L-354	53	3
L-1528	92	8	L-981	51	5
L-494	88	4	L-1333	42	9
L-16	85	9	L-283	39	5
L-21	85	9	L-531	36	6
L-757	83	9	L-960	22	4
L-1005	81	9	L-958	14	5
L-165	79	9	L-1321	7	1
L-281	76	11	L-351	6	1
L-1054	74	9	L-1006	4	1
L-246	74	9	L-532	4	1

Los clones derivados de las esporas disectadas fueron almacenados y rotulados según la cepa y el asca de la que provenían para identificar los productos meióticos respectivos. En general se rotularon como "número de espора", "letra de asca" y "número de micromanipulación", así la espора L-1321 1A1 hace referencia a la espора 1 del asca A de la primera micromanipulación a partir de la cepa L-1321.

Dada la condición heterocigota para el gen *HO* de la cepa L-1321, la cual posee uno de sus alelos mutantes (Nakazawa y col, 1999), se aisló esporas heterotáticas haploides mediante micromanipulación con el fin de utilizar sus clones como cepas parentales en la generación de híbridos por recombinación intraespecífica. Además, se determinó el tipo de apareamiento mediante el cruzamiento con cepas de laboratorio haploides de tipo de apareamiento conocido (L-1251, Mat a y L-1117, Mat  $\alpha$ ). Los cruzamientos fueron inducidos a esporulación para buscar la presencia de ascas como prueba del cruzamiento entre las cepas de tipo de apareamiento complementario. La tabla 4 muestra las esporas aisladas y el tipo de apareamiento determinado.

**Tabla 4.** Tipo de apareamiento de los clones monoespóricos aislados a partir de la cepa L-1321.

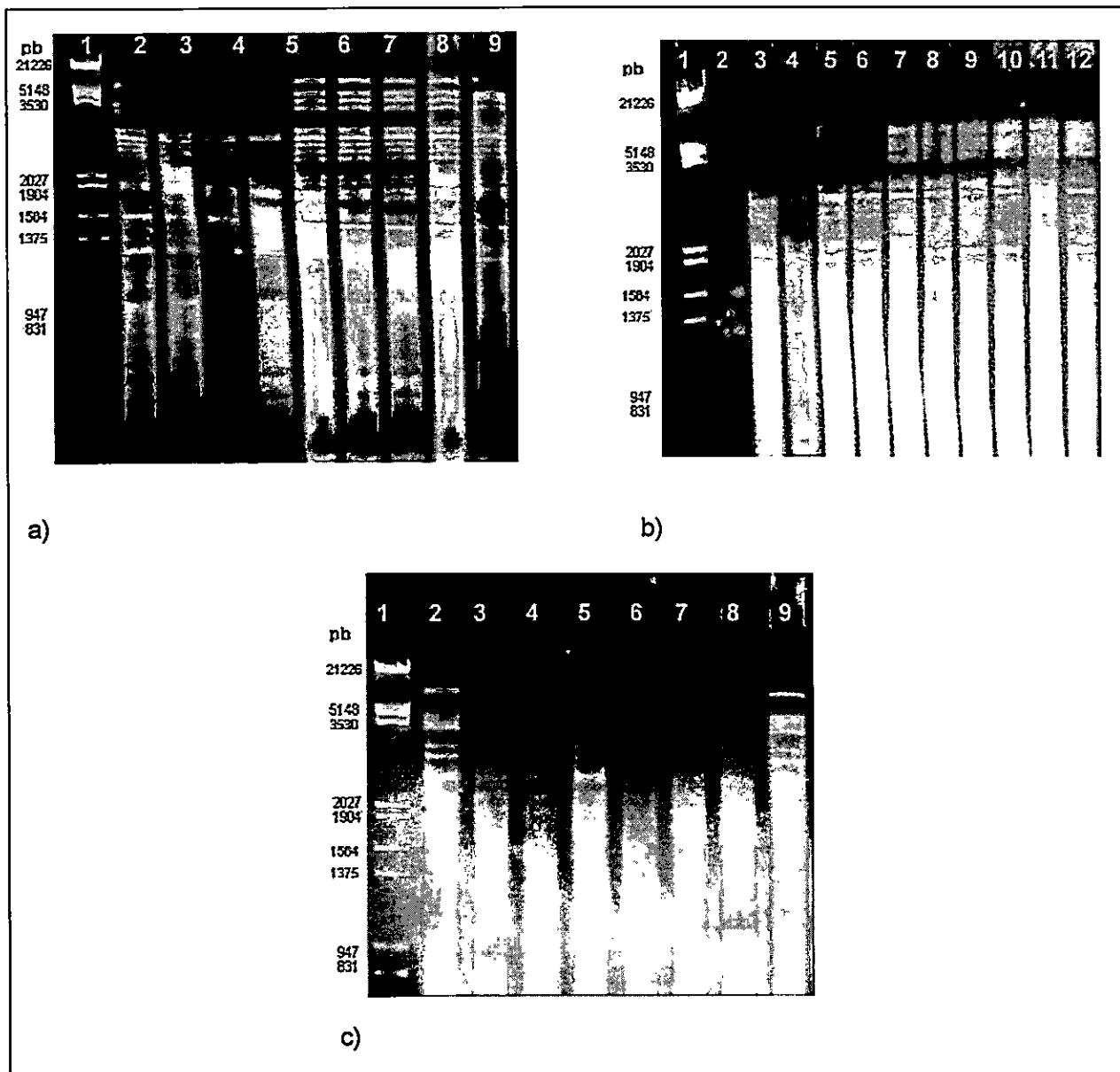
Cepa	Tipo de apareamiento
L1321 1A1	Mat $\alpha$
L1321 1A2	Mat a
L1321 2A1	Mat $\alpha$
L1321 1B1	Mat $\alpha$
L1321 1C1	Mat $\alpha$
L1321 1D1	Mat a
L1321 1E1	Mat a

Análisis fermentativos previamente realizados en nuestro laboratorio, mostraron que la cepa L-720 consume una mayor cantidad de azúcar durante una fermentación, mientras que la cepa L-846 produce una menor cantidad de etanol en el producto final. Estas características fueron consideradas para seleccionar los clones de las esporas aisladas desde estas cepas como candidatos para la generación de mutantes auxótrofos, junto a las cepas indicadas en la tabla 4. Los clones aislados a partir de las esporas de estas 3 cepas fueron incluidos dentro del cepario de LAMAP como nuevas cepas. En general, los clones obtenidos a partir de las cepas L-846 y L-720 esporulaban al igual que sus parentales, lo que fue un indicio de la autodiploidización de estas, mientras que los clones aislados desde la cepa L-1321 no esporularon, lo que confirma su carácter haploide. En ninguno de los aislados se encontró algún tipo de auxotrofia, ya que cada uno de los clones crece en medio mínimo sin necesidad de suplementos. La tabla 5 muestra la denominación asignada para cada una de ellas.

**Tabla 5.** Nuevas cepas aisladas desde cepas de interés enológico.

Cepa Parental	Espora	Denominación Cepario	Cepa Parental	Espora	Denominación Cepario
L-1321	1A2	L-2934	L-846	1C1	L-2947
L-1321	1B2	L-2935	L-846	2C1	L-2948
L-1321	1C2	L-2936	L-846	3C1	L-2949
L-1321	1D2	L-2937	L-846	1D1	L-2950
L-1321	1E2	L-2938	L-720	1A1	L-2951
L-1321	2A2	L-2939	L-720	2A1	L-2952
L-1321	1A1	L-2940	L-720	3A1	L-2953
L-846	1A1	L-2941	L-720	1B1	L-2954
L-846	2A1	L-2942	L-720	2B1	L-2955
L-846	3A1	L-2943	L-720	3B1	L-2956
L-846	1B1	L-2944	L-720	1C1	L-2957
L-846	2B1	L-2945	L-720	2C1	L-2958
L-846	3B1	L-2946			

Por otro lado, se extrajo DNA desde las nuevas cepas y este fue sometido a RFLP para mtDNA mediante digestión con la enzima *HinfI*. Los patrones de bandeo obtenidos para cada una de los clones monoespóricos fueron idénticos al patrón obtenido para la cepa parental correspondiente, confirmando molecularmente que los clones aislados a partir de las esporas son descendientes de las cepas escogidas. La figura 3 muestra los patrones de bandeo obtenido para cada RFLP.

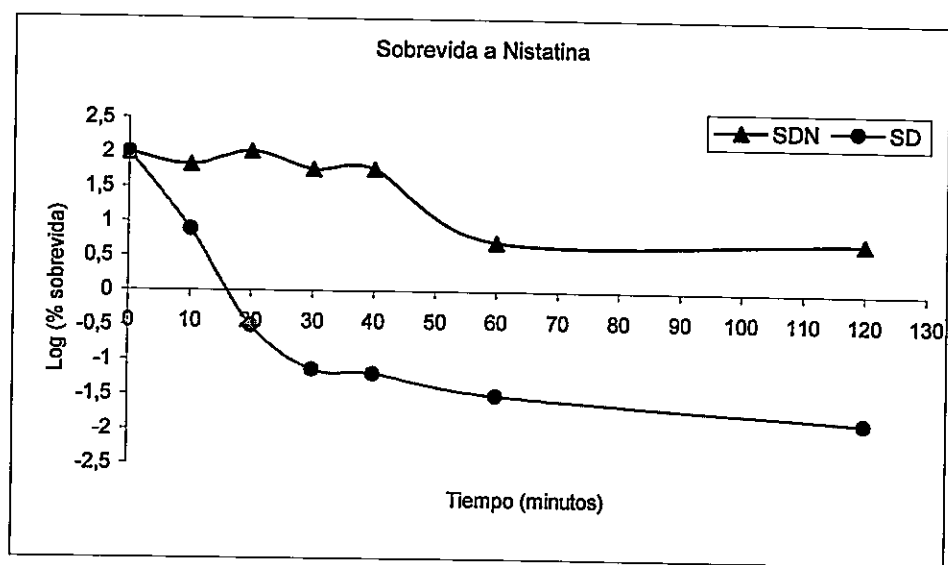


**Figura 3.** Perfiles de RFLP de DNA mitocondrial para las nuevas cepas y sus parentales. a) De izquierda a derecha los carriles 2 al 9 muestran el perfil de las nuevas cepas aisladas a partir de la cepa L-720, mientras el carril 10 muestra el perfil de la cepa parental. b) Los carriles 2 al 11 muestran el perfil de las nuevas cepas aisladas a partir de la cepa L-846, mientras el carril 12 muestra el perfil de la cepa parental. c) Los carriles 2 al 8 muestran el perfil de las nuevas cepas aisladas a partir de la cepa L-1321, mientras el carril 9 muestra el perfil de la cepa parental. En todos los casos en carril 1 corresponde al estándar de tamaño molecular  $\lambda$  digerido con HindIII y EcoRI.

### **3.2 Búsqueda de mutantes espontáneos y resistentes a antimetabolitos.**

Para superar la barrera relacionada con la utilización de marcadores moleculares introducidos por modificación genética, se optó por obtener y seleccionar cepas mutantes que de aparición espontánea. Para tales efectos las cepas bajo estudio fueron sometidas a dos procesos. Primero fue necesario aumentar la presencia de células mutantes que aparecen de manera espontánea en el cultivo, fenómeno que ocurre con baja frecuencia. Para esto se utilizó el antibiótico nistatina, el cual mata a las células vegetativas en división, no así a los mutantes auxótrofos, los que no crecen en medio mínimo.

Antes de comenzar el tratamiento con nistatina, fue necesario averiguar el tiempo de incubación que permitiese disminuir la población de células con crecimiento vegetativo. Para realizar el ensayo se utilizó la cepa L-2934, inoculando una cantidad de  $10^8$  células a 9 ml de medio SD y SD-N respectivamente, junto a 1 ml de nistatina a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Las suspensiones fueron incubadas a 30 °C, tomándose alícuotas de 0,1 ml cada 10 minutos durante 2 horas. Estas fueron diluidas de 1 a 6 veces y sembradas en YPD. Luego de 48 horas se contó el número de unidades formadoras de colonia (UFC), determinándose el porcentaje de sobrevivencia de estas. La figura 4 muestra los resultados de este ensayo. Se observó que las células en medio SD-N sobreviven hasta 40 minutos en presencia de nistatina, mientras que en presencia de SD, la sobrevivencia decae desde el inicio. Por tales razones se decidió utilizar un tiempo de incubación de 35 minutos para el enriquecimiento de mutantes frente a nistatina.



**Figura 4.** Sobrevida a nistatina con respecto al tiempo en medio SD y medio SD-N, ambos suplementados con nistatina.

Posteriormente, las células fueron cultivadas en medios suplementados con los antimetabolitos 5-FOA, 5-FAA, 2-DOG y metil mercurio. Luego de 7 a 10 días de incubación se observaron colonias resistentes a los antimetabolitos, las cuales fueron traspasadas e incubadas nuevamente en los medios de selección respectivos a modo de una segunda selección, para posteriormente ser analizadas y almacenadas. La tabla 6 muestra los aislados obtenidos luego de la selección con antimetabolitos.

A partir de los aislados resistentes a los antimetabolitos, se estudió la presencia de mutantes auxótrofos. Dentro de estos, un aislado a partir de la cepa L-2938 resistente a 5-FAA fue confirmado como mutante auxótrofo para triptófano, el cual fue denominado L-2963.

**Tabla 6.** Cepas aisladas resistentes a antimetabolitos. La tabla muestra la cepa parental, la resistencia obtenida y la denominación asignada para el cepario de LAMAP.

Cepa parental	Resistencia	Denominación para cepario
L-2938	5FAA	L-2963
L-1321	2DOG	L-2966
L-2935	2DOG	L-2967
L-2936	2DOG	L-2968
L-2938	2DOG	L-2969
L-2935	5FOA	L-2970
L-2951	5FOA	L-2971
L-2956	5FOA	L-2972
L-2942	5FOA	L-2973
L-16 1A1	5FOA	L-2974
L-2945	5FOA	L-2975
L-16 1B1	5FOA	L-2976
L-16 1C1	MM	L-2977
L-2935	5FAA	L-2978
L-2935	5FOA	L-2979
L-2935	5FAA	L-2980
L-2934	2DOG	L-2981
L-2951	2DOG	L-2982
L-2942	5FOA	L-2983
L-2945	5FOA	L-2984



### 3.3 Obtención de híbridos por recombinación intraespecífica.

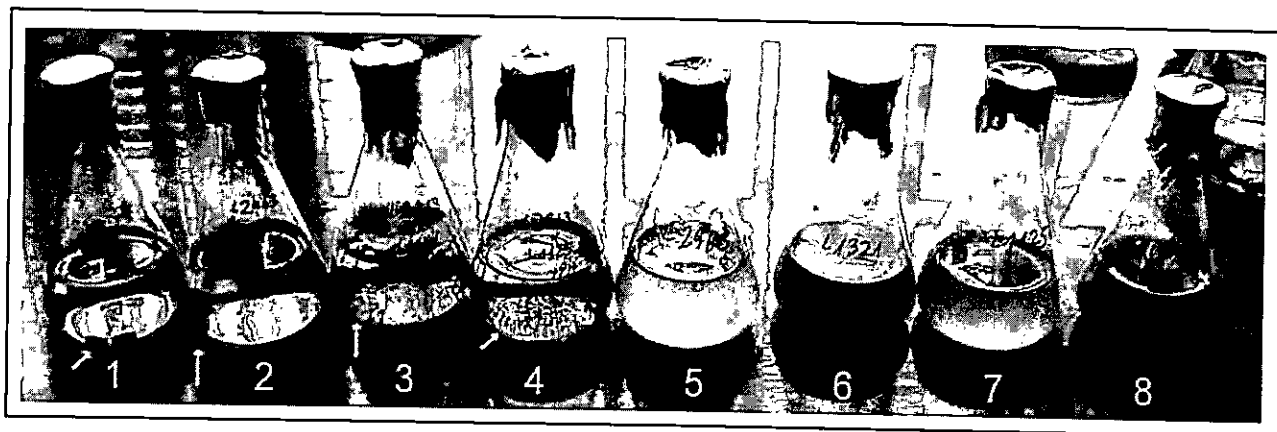
Para la obtención de híbridos por recombinación intraespecífica, se utilizó la cepa L-2963 (Mat a, trp<sup>-</sup>), debido a que fue nuestro primer mutante auxótrofo confirmado, el cual fue cruzado mediante micromanipulación con las cepas de laboratorio L-1125 (BY4722, Mat α, leu2<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup>) y L-1141 (BY4739, Mat α, leu2<sup>-</sup>, lys2<sup>-</sup>, ura3<sup>-</sup>). Las colonias aparecidas luego de 48 horas fueron aisladas y traspasadas a medio SD. Luego de 48 horas de incubación, se aislaron colonias que complementaron los requerimientos nutricionales de las cepas parentales, lo cual fue indicio de la obtención de híbridos. Alternativamente, se generaron híbridos mediante el apareo en masa de las cepas parentales, continuando bajo el mismo procedimiento para la selección de estos. Finalmente, se aislaron un total de 13 híbridos, 6 para el cruzamiento entre L-2963 y L-1125 y 7 para el cruzamiento entre L-2963 y L-1141.

Los híbridos obtenidos fueron observados bajo microscopio para descartar contaminación bacteriana, además fueron sometidos a esporulación, observándose la presencia de ascas tras 7 días de incubación en la mayoría de ellos. Posteriormente, se escogieron 3 híbridos de cada cruzamiento, los que fueron almacenados en el cepario de LAMAP para los siguientes estudios. La tabla 7 muestra los híbridos almacenados y la presencia de ascas.

Tabla 7. Híbridos obtenidos por recombinación intraespecífica.

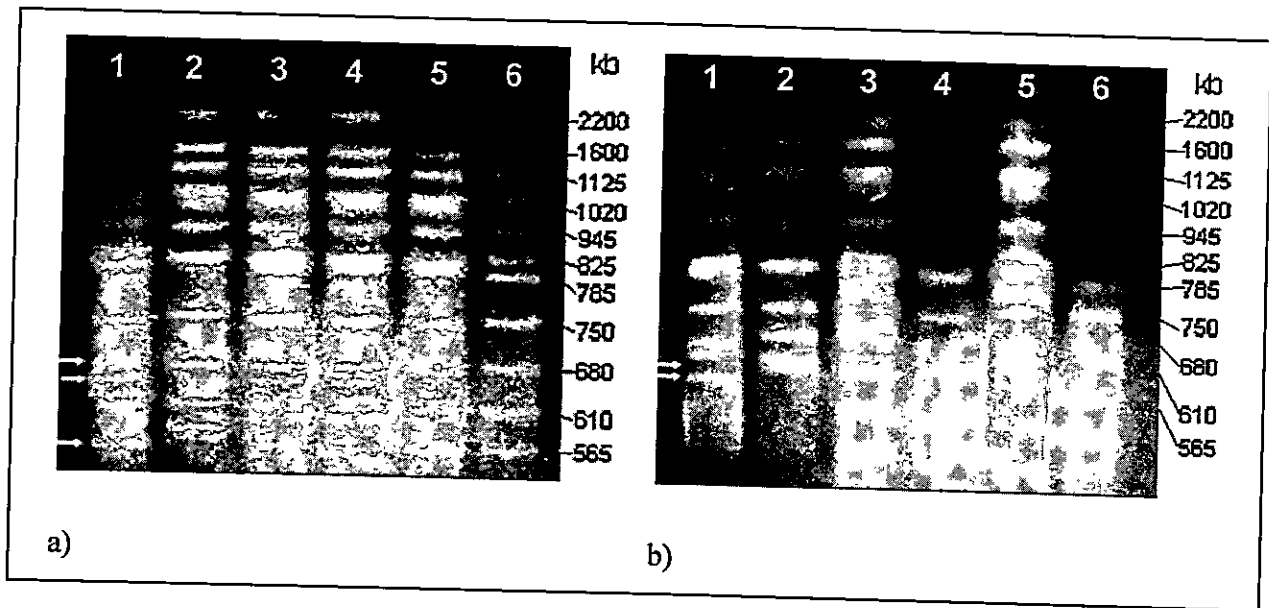
Cruzamiento	Cepa	Presencia de ascas (7 días)
L-2963 x L-1125	L-3027	Sí
L-2963 x L-1125	L-3028	No
L-2963 x L-1125	L-3029	Sí
L-2963 x L-1141	L-3030	Sí
L-2963 x L-1141	L-3031	Sí
L-2963 x L-1141	L-3032	Sí

La observación fenotípica de los híbridos bajo cultivo mostró que estos forman colonias similares a sus parentales, en cuanto a color y tamaño, pero al cultivarse en medio líquido se observó un nuevo fenotipo que no está presente en las cepas parentales, ya que los híbridos flocculan fuertemente. La figura 5 muestra cultivos en mosto sintético de los híbridos y las cepas parentales, observándose como los híbridos no se encuentran en suspensión como sus cepas parentales.



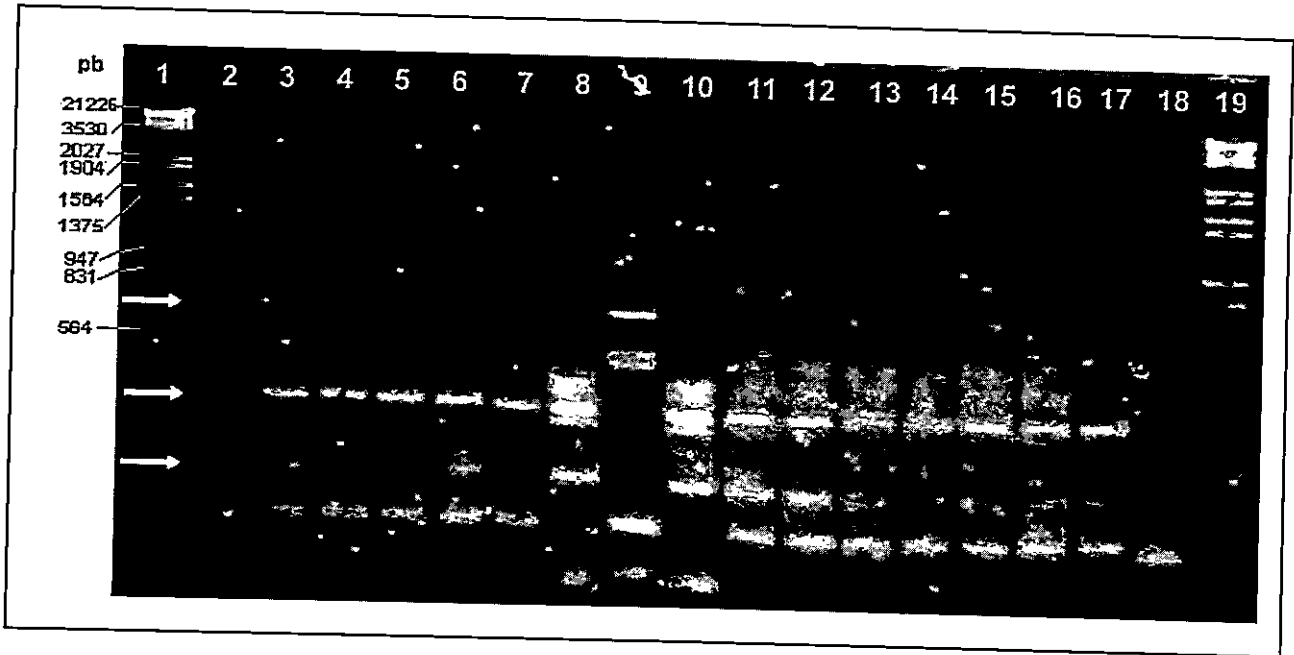
**Figura 5.** Cultivos de cepas parentales e híbridos en mosto sintético. En los matraces del 1 al 4 se muestra a los híbridos y sus flóculos indicados por flechas. Los matraces 5, 6, 7 y 8 corresponden a las cepas L-2963, L-1321, L-1125 y L-1141 respectivamente.

Para confirmar molecularmente la naturaleza híbrida a nivel cromosómico y que los híbridos obtenidos son descendientes de las cepas parentales cruzadas, se procedió a realizar un análisis de cariotipo electroforético entre las cepas parentales y los híbridos L-3027, L-3028, L-3029, L-3031 y L-3032. Los resultados mostraron la presencia de bandas presentes en las cepas parentales L-1125 y L-1141 que se heredaron en todos los híbridos, pero que no estaban presentes en la cepa parental L-2963. A su vez, la cepa parental L-2963 mostró la presencia de una banda que se conservó en todos los híbridos, pero que no estaba presente en las cepas parentales L-1125 y L-1141. Esto indica que los híbridos obtenidos descienden de las cepas parentales utilizadas y son el resultado directo de su cruzamiento. La figura 6 muestra el cariotipo electroforético obtenido para los híbridos y sus cepas parentales.



**Figura 6.** Cariotipo electroforético de los híbridos obtenidos y sus cepas parentales. Las flechas indican la presencia de polimorfismos entre las cepas parentales. a) El carril 1 corresponde a la cepa L-2963, el carril 2 a la cepa L-1125, mientras que los carriles 3, 4 y 5 corresponden a los híbridos L.3027, L-3028 y L.3029 respectivamente. b) Los carriles 1 y 2 muestran las cepas parentales L 2963 y L-1141, mientras que los carriles 3, 4 y 5 corresponden a los híbridos L-3030, L-3031 y L-3032. En ambos casos el carril 6 muestra a la cepa L-1143 (YNN295), utilizada como estándar de peso molecular.

Por otro lado, se realizó un PCR de "Interdelta Fingerprinting", con un fin similar con el que se realizó el cariotipo electroforético, pero a nivel de DNA. El patrón de bandeo obtenido mostró la presencia de una banda perteneciente a la cepa parental L-2963 que además se encuentra en todos los híbridos pero que no en las cepas parentales L-1125 y L-1141. De igual manera, se encontró dos bandas presentes en las cepas parentales L-1125 y L-1141, cuya presencia se conserva en los híbridos, pero estas no están presentes en la cepa parental L-2963. Esto indica que los híbridos heredaron marcadores moleculares desde ambos parentales. La figura 7 muestra el patrón de bandeo obtenido para los híbridos y los parentales.



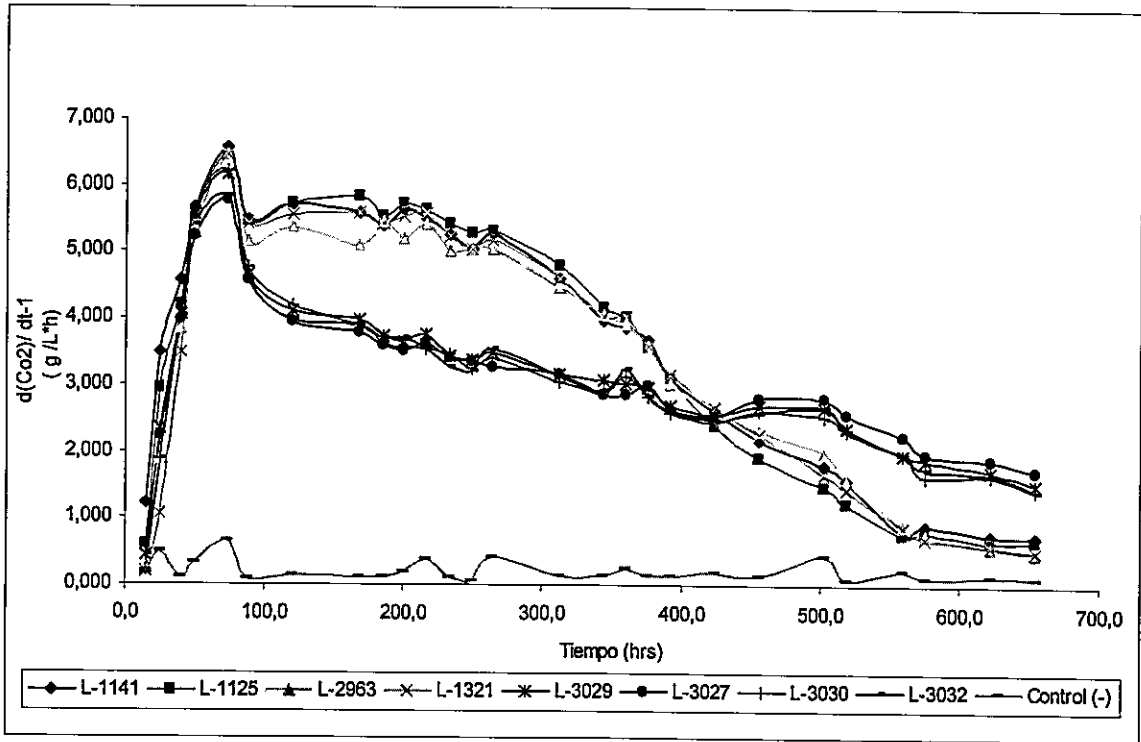
**Figura 7.** Patrón de bandeo de PCR "Interdelta Fingerprinting" para los híbridos y sus parentales. De izquierda a derecha los carriles 2 al 7 muestran el patrón de bandeo obtenido para los híbridos generados del cruzamiento de las cepas L-2963 y L-1141. Los carriles 8, 9 y 10 muestran el patrón de bandeo para las cepas L-1141, L-2963 y L-1125 respectivamente, mientras que los carriles 11 al 17 muestran el patrón obtenido para los híbridos aislados desde el cruzamiento de la cepa L-2963 y L-1125. Los carriles 1 y 19 muestran el estándar de tamaño molecular  $\lambda$  digerido con *Hind*III y *Eco*RI, mientras que el carril 18 muestra un control positivo para la reacción de PCR. Las flechas indican bandas presentes en uno de los parentales, pero no en el otro.

### 3.4 Evaluación fenotípica de híbridos para rasgos de interés enológico.

Con los híbridos aislados y confirmados molecularmente, se procedió a caracterizarlos fenotípicamente. Para tales efectos se realizaron microfermentaciones en mosto sintético para estudiar las propiedades cinéticas pertenecientes a las cepas parentales y sus híbridos, además de analizar las propiedades fermentativas al final de las fermentaciones. Se estimó la liberación de  $\text{CO}_2$  mediante la pérdida de peso con respecto al tiempo de los matraces en los cuales se realizaron las fermentaciones.

La figura 8 muestra la liberación de  $\text{CO}_2$  con respecto al tiempo, para las cepas parentales y los híbridos. En esta se observa que la velocidad máxima fermentativa se alcanzó a un tiempo cercano a las 73 horas para todas las cepas, el cual se relaciona con el consumo total de nitrógeno desde el medio. Además, se observa que luego de este tiempo hay una marcada diferencia en la tasa de producción de  $\text{CO}_2$  entre las cepas parentales y los híbridos, ya que las primeras muestran una mayor liberación de  $\text{CO}_2$  con respecto al tiempo, hasta alcanzar las 420 horas de fermentación, en donde la tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  de las cepas parentales disminuye, hasta finalizar la fermentación cerca de las 560 horas. Este punto se relaciona con el consumo total de los azúcares presentes en el mosto para las cepas parentales, lo que es consecuencia de la mayor tasa de liberación de  $\text{CO}_2$  en las etapas anteriores. Por otro lado, se observa que la cepa comercial L-1321 posee un perfil fermentativo similar a las cepas parentales.

Además del perfil fermentativo, se determinaron los parámetros cinéticos de velocidad máxima, aceleración máxima y velocidad media con respecto a la máxima. La tabla 8 muestra los valores de los parámetros obtenidos. En general se observó que las cepas parentales experimentaron una velocidad máxima fermentativa mayor que los híbridos, mientras que la aceleración máxima fermentativa entre ambos grupos fue similar, al igual que para la velocidad media con respecto a la máxima. En general se encontró que el grupo de las cepas parentales posee una mayor disminución en la producción de  $\text{CO}_2$  que las cepas híbridas.



**Figura 8.** Perfil fermentativo de híbridos y cepas parentales. Además se incluyó como control la cepa L-1321 de uso industrial.

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos fermentativos de los híbridos y las cepas parentales.

Cepa	V max (g/L*h)	A max (g/L*h <sup>2</sup> )	V 50/V max
L-1141	6,56	0,13	0,66
L-1125	6,50	0,14	0,69
L-2963	6,44	0,15	0,66
L-1321	6,44	0,14	0,67
L-3029	6,17	0,18	0,51
L-3027	5,78	0,14	0,52
L-3030	6,22	0,16	0,48
L-3032	5,83	0,15	0,52
t-student	0,0087	0,0761	0,0001

Ya finalizada la fermentación, se tomaron muestras del mosto fermentado para estimar la cantidad de azúcar residual y el porcentaje de etanol producido por cada cepa.

El azúcar residual resultante para el grupo de las cepas parentales y la cepa industrial osciló entre los 0,1 a 0,2 g/L. Para el grupo de los híbridos, los valores obtenidos oscilaron entre los 12,5 a 16,5 g/L. Los datos recopilados muestran que para el grupo de las cepas parentales y la cepa industrial, se obtuvo una menor cantidad de azúcar residual al finalizar la fermentación en comparación con el grupo de los híbridos, lo que indica que para el primer grupo el azúcar presente en el mosto fue consumido casi por completo. La tabla 9 muestra los datos obtenidos para las mediciones de azúcar residual.

El porcentaje de etanol producido por el grupo de las cepas parentales fue mayor que el producido por el grupo de los híbridos y la cepa de uso industrial. El análisis de etanol producido mostró que para el grupo de las cepas parentales el porcentaje fue mayor, se encontrándose este entre 12,2 a 14,3 % v/v, mientras que la cepa industrial y los híbridos arrojaron una cantidad de entre 8 a 9,9 % v/v. La tabla 9 muestra los datos obtenidos para el porcentaje de etanol producido por cada cepa.

La cantidad de azúcar necesaria para producir un grado alcohólico se conoce como rendimiento, el que está relacionado con la diferencia entre cantidad inicial de azúcar y la cantidad de azúcar residual al finalizar la fermentación, con respecto al porcentaje de etanol producido. Los híbridos presentaron un rendimiento similar a las cepas parentales, produciendo un grado alcohólico por cada 20,3 g de azúcar. La tabla 9 muestra los datos de rendimientos para todas las cepas.

A partir de los datos mostrados en la tabla 8 y 9, además, tomando a las cepas parentales como un grupo distinto del de las cepas híbridas, se procedió a realizar una prueba de t-student para determinar si existe diferencia entre las medias muestrales de ambos grupos. Un valor de P menor al 5% quiere decir que la probabilidad de que por azar al menos uno de los datos sea distinto es menor al 5%. Es así como se puede ver que existen diferencias estadísticas para, la velocidad máxima, velocidad media con respecto a la máxima, la cantidad de azúcar residual y el porcentaje de etanol producido, pero no así para la aceleración máxima fermentativa ni para el rendimiento entre ambos grupos.

**Tabla 9.** Valores de azúcar residual, etanol producido y rendimiento obtenidos desde las microfermentaciones realizadas.

Cepa	Azúcar residual (g/L)	Etanol (% v/v)	Rendimiento
L-1141	0,2	13,9	14,4
L-1125	0,1	14,3	14,0
L-2963	0,2	12,2	16,4
L-3029	12,5	9,6	19,5
L-3027	16,1	9,2	20,0
L-3030	12,5	9,9	18,9
L-3032	16,5	8,0	22,9
T-student	0,0005	0,0034	0,0033



## **4. Discusión**

Durante el estudio de la biología de los aislados se pudo observar que gran parte de éstos esporularon, siendo la cepa L-1 el único aislado que no esporuló. Esto concuerda con lo expuesto en literatura (Puig y col, 2000; Bisson, 2004), que indica que gran parte de los aislados nativos son diploides, condición necesaria para la esporulación. Por otro lado, no fue extraño encontrar un aislado que no esporulara, como la cepa L-1, la cual en estudios previos realizados en nuestro laboratorio mediante citometría de flujo, mostró tener un contenido de DNA cercano al de cepas haploides (Cubillos, 2007), además esta tampoco se apareo con cepas de laboratorio de ambos tipos de apareamiento, por lo que creemos que posiblemente presente algún tipo de aneuploidía, lo que concuerda con lo expuesto por Guijo y colaboradores (1997), quienes observaron que la poliploidia y aneuploidia es común en las cepas de uso industrial, y dado que parte de los aislados corresponden a cepas extraídas desde lugares de vitivinificación, es posible haber aislado una cepa con estas características.

Además, la mayoría de los aislados resultaron poseer una alta viabilidad de sus esporas (tabla 3). La viabilidad de esporas se define como la capacidad de formar una colonia visible entre 2 a 5 días de incubación a una temperatura cercana a los 30 °C (Johnston y col, 2000).

Estudios realizados en nuestro laboratorio correlacionaron la heterocigocidad de las cepas con la viabilidad de sus esporas, observando que a mayor número de *loci* heterocigotos, la viabilidad de las esporas disminuye (Cubillos, 2007), lo cual concuerda con lo expuesto por Barre y colaboradores (1993). Ahora bien, Mortimer y colaboradores (1994), explican bajo su teoría de renovación génica que mediante la esporulación y el cambio homotálico del tipo de apareamiento de los individuos haploides, se reemplazarían las heterocigocidades acumuladas naturalmente, dando paso a individuos diploides homocigotos. Esto puede explicar que los aislados nativos presenten una alta viabilidad de esporas, los cuales utilizarían la meiosis y la autofecundación como principal mecanismo de reproducción, mientras que los aislados que poseen una baja viabilidad de esporas estarían relacionados con altos niveles de heterocigocidad y se reproducirían generalmente de manera clonal (Cubillos, 2007).

Un aspecto importante observado por nosotros durante las micromanipulaciones fue que gran parte de las ascas disectadas presentaban 3 esporas, posiblemente debido a la pérdida de uno de los productos meióticos. Johnston y colaboradores (2000) al estudiar el genotipo de cepas de uso industrial mediante análisis de tétradas, observaron la presencia de ascas con una cantidad variable de entre 2 a 4 esporas, lo que puede estar relacionado con nuestra observación. Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron mediante citometría de flujo, que gran parte de los aislados nativos son diploides, presentando ascas de tres esporas como las observadas en nuestro trabajo (Cubillos, 2007). Además, cepas tetraploides presentaron ascas de 2 esporas. Estos antecedentes indican que los aislados nativos utilizados en nuestro estudio serían de carácter diploide, condición necesaria para la esporulación.

Luego de estudiar la biología de los aislados nativos se procedió a seleccionar las cepas para continuar con la implementación de un programa de mejoramiento. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que la cepa L-720 termina su fermentación con una menor cantidad de azúcares residuales, mientras que la cepa L-846 produce una menor cantidad de etanol en el producto final, siendo ambas cepas buenas candidatas para un programa de mejoramiento genético que pudiese combinar ambas características. Bajo estos antecedentes se tomaron esporas aisladas a partir de tales cepas, las que junto a esporas aisladas desde las cepas de uso industrial L-1321 y L-16, esta última seleccionada en nuestro laboratorio, se trataron con el fin de aislar mutantes espontáneos mediante selección con antimetabolitos. Además, todas estas cepas poseen en común una alta viabilidad de sus esporas (tabla 4).

Los clones de las esporas seleccionadas fueron sometidos a RFLP de mtDNA para comprobar molecularmente su parentesco (figura 3). López y colaboradores (2001), describieron esta metodología como útil para la diferenciación a nivel de cepa para *S. cerevisiae*. Los perfiles obtenidos mostraron que todos los clones monoespóricos aislados a partir de las esporas separadas estaban relacionados con su cepa parental.

A partir de la búsqueda de mutantes espontáneos se logró aislar una cepa mutante auxótrofa para triptófano (L-2963), mientras que se obtuvo una buena cantidad de cepas resistentes a antimetabolitos utilizados para la selección (tabla 7), los cuales fueron sometidos a esporulación para su posterior micromanipulación y cruzamiento con la cepa L-2963, pero ninguno de los aislados resistentes esporuló. Por tal motivo se decidió continuar el desarrollo del programa mediante el cruzamiento de la cepa L-2963 con cepas de laboratorio (L-1125 y L-1141), con el fin de establecer cada paso de este, sin buscar un mejoramiento de las cepas, dado que las cepas de laboratorio no entregan ninguna ventaja fermentativa.

Los híbridos obtenidos tanto por micromanipulación como por cultivo mixto (tabla 8), fueron analizados fenotípicamente. Las colonias formadas y el color de estas fueron muy similares a las observadas para las cepas parentales, mientras que la inducción a esporulación realizada mostró que gran parte de los híbridos obtenidos poseen la capacidad de esporular, lo que es indicio de su carácter diploide, resultante de la combinación de los genomas de sus cepas parentales. Por otro lado se observó un nuevo fenotipo que no está presente en las cepas parentales, lo que indica que ocurrió un re-arreglo de caracteres de los parentales que entregó un nuevo fenotipo. Durante el cultivo de los híbridos en medio líquido, estos se agregaron espontáneamente, formando masas compactas y sedimentando, fenómeno conocido como floculación. En este fenómeno están implicados diversos factores como la presencia de iones metálicos, mediante la formación de puentes salinos por  $Ca^{+2}$ , la presencia de proteínas de membrana de tipo lectina y factores ambientales como la privación de nutrientes, ya que se piensa que es un mecanismo para la formación de micromabientes ricos en nutrientes obtenidos mediante la lisis selectiva. Este fenotipo es controlado por un mecanismo genético complejo (genes *FLO1*, *FLO5* y *FLO8*), regulados a nivel transcripcional, además este fenómeno puede ser inhibido por la agregación de agentes quelantes como EDTA o enzimas de tipo proteasa (Domínguez y col, 2000).

Dependiendo de la etapa en que se presente puede ser beneficiosa o no para la fermentación vínica, ya que si se presenta al final de la fermentación, facilita la filtración del producto, mientras que si ocurre en el inicio de la fermentación puede detenerla, resultando en un producto más atenuado y dulce, lo cual puede explicar los resultados obtenidos para la caracterización fenotípica realizada al finalizar las fermentaciones, ya que los híbridos presentaban una mayor cantidad de azúcar residual, una menor producción de etanol y una menor tasa de liberación de CO<sub>2</sub> luego de alcanzar la velocidad máxima, en comparación a las cepas parentales (tabla 8, figura 8), lo cual puede solucionarse inoculando una mayor cantidad de células al comenzar la fermentación.

Muchas son las aplicaciones para las levaduras floculantes en otros procesos de producción, debido a que estas generan una mayor densidad de células por unidad de volumen, lo cual permite el uso de biorreactores de menor tamaño en procesos como la producción de bio-etanol, además, facilita el retiro celular desde el medio y minimiza el riesgo de contaminación al formar agregados compactos.

No está claro el por qué de este nuevo fenotipo en las cepas híbridas obtenidas, pero una posible explicación podría estar relacionada con que las cepas de laboratorio L-1125 y L-1141 son descendientes directos de la cepa S288C (Brachmann y colaboradores, 1998), la cual posee una mutación en el gen *FLO8*, factor de transcripción requerido para la floculación (Liu y colaboradores, 1996), por tales motivos las cepas de laboratorio son incapaces de flocular frente a la privación de nutrientes. Al cruzar estas cepas con un descendiente de la cepa L-1321 (EC-1118), entre cuyas características se encuentra ser un buen floculante según datos de su productor (LALVIN), posiblemente se complementó la mutación para *FLO8*, induciendo la floculación en las nuevas cepas generadas. Estudios enfocados con la expresión génica mediante microarreglos podrían entregarnos una idea de cuales son los procesos de expresión génica relacionados en esta diferencia fenotípica entre las cepas híbridas y parentales.

Por otra parte, fue necesario confirmar mediante herramientas moleculares el carácter híbrido de las cepas aisladas. Para tales efectos se utilizó en primera etapa la técnica de cariotipo electroforético para observar si existían diferencias a nivel cromosómico entre las cepas parentales y si estas se conservaban en los híbridos. Schwartz y colaboradores (1984), describieron este método para la separación del DNA cromosómico de gran tamaño molecular de manera intacta, mientras que Marullo y colaboradores (2006), confirmaron mediante esta técnica el carácter híbrido de cepas generadas desde el cruzamiento de dos cepas de uso industrial. Nuestros resultados mostraron diferencias cromosómicas entre las cepas parentales, las cuales se conservan en todos los híbridos (figura 6).

Con el mismo fin de identificar diferencias a nivel molecular, se realizó un PCR de "Interdelta Fingerprinting", las cuales son regiones que se encuentran entre las secuencias delta que flanquean a los retrotransposones TY1 y TY2. Legras y colaboradores (2003), optimizaron esta técnica para el análisis y caracterización a nivel de cepa de *S. cerevisiae*. Nuestros resultados mostraron diferencias entre las cepas parentales, las cuales estaban presentes y en combinación en todas las cepas híbridas (figura 7). Ahora bien, aunque ambos resultados, tanto del cariotipo electroforético como del PCR de "Interdelta Fingerprinting" permitieron confirmar el carácter híbrido de las cepas obtenidas, el PCR de "Interdelta Fingerprinting" resulta ser una técnica mucho más rápida y que necesita menos trabajo para su preparación.

Luego de la confirmación molecular de la naturaleza híbrida de las cepas aisladas se procedió a realizar microfermentaciones con los híbridos y sus cepas parentales. La curva construida en base a la pérdida de CO<sub>2</sub> (figura 8), mostró diferencias en la liberación de este entre las cepas parentales e híbridas luego de alcanzar la velocidad máxima fermentativa. Además, se observó que las cepas parentales tuvieron una tasa de liberación de CO<sub>2</sub> mayor que la de los híbridos (velocidad media con respecto a la máxima), lo cual causó que la fermentación de las cepas parentales finalizara antes que la de los híbridos (figura 8). Por otro lado, los parámetros cinéticos determinados a partir de la curva de liberación de CO<sub>2</sub> mostraron

diferencias significativas al realizar una prueba de T-student entre los grupos de las cepas parentales e híbridas, para la velocidad máxima y la velocidad media con respecto a la máxima. Las cepas parentales obtuvieron una velocidad máxima y una velocidad media con respecto a la máxima mayor en comparación con el grupo de los híbridos (tabla 8), lo cual se ve reflejado en la curva obtenida para la liberación de CO<sub>2</sub>. No se observó diferencias significativas para la aceleración máxima entre ambos grupos.

Los análisis fermentativos para azúcares residuales y producción de etanol mostraron que para el grupo de las cepas parentales se obtuvo una baja cantidad de azúcar residual y una mayor producción de etanol en comparación con el grupo de las cepas híbridas. El fenómeno de floculación afecta a la transferencia de masa hacia el interior de los flóculos (Domínguez, 2000), lo que puede explicar el lento consumo de azúcar por parte de los híbridos y consecuentemente la menor producción de etanol. Por otro lado, la utilización de cepas de laboratorio para la formación de los híbridos no entrega ventajas fermentativas a su descendencia.

Finalmente, podemos decir que cada paso del programa permitió obtener y caracterizar híbridos generados mediante recombinación intraespecífica, confirmando su carácter híbrido tanto molecular como fenotípicamente, y además, estos mostraron características distintas a sus parentales.

## **5. Conclusiones**



- Gran parte de los aislados nativos utilizado en este estudio poseen una alta viabilidad de esporas.
- La generación de marcadores e híbridos permitió obtener cepas con características fenotípicas distintas a sus parentales, confirmándose el carácter híbrido mediante técnicas basadas en biología molecular.
- A partir de las metodologías desarrolladas será posible generar y caracterizar nuevas cepas con aplicabilidad comercial.

## **6. Bibliografía**

- Adams, A., Gottschling, D., Kaiser, C., Stearns, T. 1997. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bakalinsky, A., Snow, R. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* Vol 6. pp. 367-382.
- Barre, P., F. Vezinhet, S. Dequin, and B. Blondin. 1993. Genetic improvement of wine yeast. *Wine microbiol. & biotechnol.* Harwood Academic Publisher, Newark, N.J. pp. 265-287.
- Bisson, L. 2004. The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnology*. Vol. 18, No 1, pp. 63-96.
- Boeke, J., Trueheart, J., Natsoulis, G., Fink, G. 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Method. Enzymol.* Vol. 154. pp. 164- 175.
- Bordeu, E., Scarpa, J. 2000. *Análisis químico del vino*. Segunda edición. Ediciones Universidad Católica. Santiago, Chile.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, D. 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. Vol. 14. pp. 115-132.
- Brock, 1999, *Biología de los Microorganismos 8ª Edición*, Madigan M. Martinko J. Parker J. Prentice Hall, Madrid, España.
- Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., Gonzalez, R. 2007. Transgenic wine yeast technology come of ages: is it time for transgenic wine?. *Biotechnol. Lett.* Vol. 29. pp. 191-200.
- Cubillos, F. 2007. Estudio genético en poblaciones de levaduras vínicas mediante microsatélites. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, Universidad de Chile.
- Domingues, L., Vicente, A., Lima, N., Teixeira J. 2000. Applications of yeast flocculation in biotechnological processes. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* Vol. 5. pp. 288-305.
- Evans, I. 1996. *Yeast Protocols*. Ed. Humana Press, NJ. USA.
- Goffeau, A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 247. pp. 546-547.
- Giudici, P., Solieri, L., Pulvirenti, A., Cassanelli, S. 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 66. pp. 622-628.
- Guijo, S., Mauricio J. C., Salmon, J. M., 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*. Vol. 13. pp. 101-117.

- Herskowitz, I. 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Rev. Vol 52. No 4. p. 536-553
- Johnston, J., Baccari, C., Mortimer, R. K. 2000. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. Res. Microbiol. Vol. 151. pp. 583-590.
- Jolly, N. P., Augustyn, O., Pretorius, I. 2003. The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape must from four production regions of the western cape, South Africa. S. Afr. J. Enol. Vitic. Vol 24. No 2. pp. 35-42.
- Legras, J. L., Karst, F. 2003. Optimization of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. Fems Microbiol. Lett. Vol. 221. pp. 249-255.
- Liu, H., Styles, C.A., Fink, G. R. 1996, *Saccharomyces cerevisiae* S288C Has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. Genetics. Vol 144. pp 967-978.
- López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, M. T. 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. Int. Jour. Food Microbiol. Vol. 68. pp. 75-81.
- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarède, I., Pons, M., Aigle, M., Durbourdieu, D. 2006. Breeding strategies for combining fermentative qualities and reducing off-flavor production in a wine yeast model. Fems Yeast Res. Vol. 6. pp. 268-279.
- McGovern, P. 1997. The Beginnings of wine making and viniculture in the ancient near east & Egypt. Expedition 9/1. pp. 3-21.
- Mesas, J., Alegre, M.T. 1999. EL Papel de los microorganismos en la elaboración del vino. Cient. Tecnol. Aliment. Vol. 2, No 4, pp. 174-183.
- Michnick, S., Roustan, J. L., Remize, F., Barre, P. 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strain overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. Yeast. Vol. 13. pp. 783-793.
- Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G., 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. Vol. 10. pp. 1543-1552.
- Nakazawa, N., Okawa, K., Sato, T., Einei, H., Harashima, S. 1999. Mass mating method in combination with *g418*- and aureobasidin *a*-resistance markers for efficient selection of hybrids from homothallic strains in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal Biosci. Bioeng. Vol. 88, No. 5. pp. 468-471.
- Ono, B., Ishi, N., Fujino, S., Aoyama, I. 1991. Role of hydrosulfide ions (HS-) in methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Env. Microbiol. Vol57. No. 11. pp. 3183-3186.
- Puig, S., Querol A., Barrio, E., Pérez-Ortín J. 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Applied Env. Microbiol. Vol. 66. No. 5. pp. 2057-2061.

- Ramírez, M., Pérez, F., Regodón, J. 1998. A Simple and reliable method for hybridization of homothallic wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Env. Microbiol.* Vol. 64. No. 12. pp. 5039-5041.
- Rincón, A., Codón, A., Castrejón, F., Benítez, T. 2001. Improved propicies of baker's yeast mutants resistant to 2-Deoxy-D-Glucose. *App. and Envi. Microbiol.* Vol. 67, No. 9. pp. 4279-4285.
- Salmon, J. M., Barre, P. 1998. Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by depression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in a industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied Env. Microbiol.* Vol. 64. No. 10. pp. 3831-3837.
- Schuller, D., Casal, M. 2005. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiol. Biotechnol.* Vol. 68. pp. 292-304.
- Schuller D., Pereira, L., Alves, H., Cambon, B., Dequin, S., Casal, M. 2007. Genetic characterization of comercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard enviroments. *Yeast.* (in press).
- Schilter, B., Constable, A. 2002. Regulatory control of genetically modified (GM) foods: likely developments. *Toxicology letters.* No 127. pp. 341-349.
- Schwartz, D., Cantor Ch. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* Vol. 37, pp. 67-75.
- Sikorski, R., Boeke, J. 1991. In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: from cloned gene to mutant yeast. *Mthead. Enzymol.* Vol. 194. pp. 302- 318.
- Singh, A., Sherman, F. 1974. Association of methionine requeriment with methyl mercury resistant of yeast. *Nature.* Vol. 247. pp. 227-229.
- Snow, R. 1966. An enrichment method for auxotrophic yeast mutants using the antibiotic nystatin. *Nature.* Vol. 211. pp. 206-207.
- Suárez Lepe, J.A., 1997. *Levaduras vínicas: Funcionalidad y uso en la bodega.* Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. pp. 24.
- Toyn, J., Gunyuzlu, P., Hunter, W., Thompson, L., Hollis, G. 2000. A counterselection for the tryptophan pathway. *Yeast.* Vol. 16. pp. 553-560.
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G., Cocolin, L. 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *Fems Yeast Res.* pp. 1-10.
- Wilker, K. 2003. *Making wine for home use.* State Fruit Experiment Station Southwest Missouri State University.
- Wu, L., Hughes, T., Davierwala, A. P., Robinson, M., Stoughton, R., Altschuler, S. 2002. Large-scale prediction of *S. cerevisiae* gene function using overlapping transcriptional clusters. *Nature genet.* 31. pp. 255-265.

## Anexo 1. Medios de cultivo.

### 1.1 YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

- Extracto de levadura 0,5% p/v
- Peptona 0,5% p/v
- Glucosa 2% p/v
- Estreptomicina 200 µg/Litro
- Agar 2% p/v
- Agua destilada 1 L

### 1.2 SD (Synthetic Dextrose Minimal Medium)

- Yeast Nitrogen Base without amino acids (YNB, SIGMA) 0,67% p/v
- Glucosa 2% p/v
- Agua destilada 1 L
- Agar 2% p/v \*

### 1.3 SC (Synthetic Complete Medium and Drop Out)

- Yeast Nitrogen Base without amino acids (SIGMA) 0,67% p/v
- Glucosa 2% p/v
- Agar 2% p/v
- Agua destilada 1 L
- Mezcla de Drop-Out 0,2% p/v

Drop Out: Se prepara según los aminoácidos que se indican en la tabla, eliminando el aminoácido para el cual se quiere comprobar auxotrofia.

Adenina	0.5 g	Leucina	10 g
Alanina	2.0 g	Lisina	2.0 g
Arginina	2.0 g	Metionina	2.0 g
Asparagina	2.0 g	Ácido <i>para</i> -Aminobenzoico	0.2 g
Ácido Aspártico	2.0 g	Fenilalanina	2.0 g
Cisteína	2.0 g	Prolina	2.0 g
Glutamina	2.0 g	Serina	2.0 g
Ácido Glutámico	2.0 g	Treonina	2.0 g
Glicina	2.0 g	Triptófano	2.0 g
Histidina	2.0 g	Tirosina	2.0 g
Inositol	2.0 g	Uracilo	2.0 g
Isoleucina	2.0 g	Valina	2.0 g

#### 1.4 SD-N (Synthetic Dextrose Minimal Medium Without Nitrogen Source)

- Glucosa 1% p/v
- L-histidina 1 mg/L
- L-metionina 2 mg/L
- L-triptófano 2 mg/L

#### 1.5 MSM ( Minimal Sporulation Medium)

- Acetato de potasio 1% p/v
- Agar 2% p/v

#### 1.6 SM (Sporulation Medium)

- Acetato de potasio 1% p/v
- Extracto de levadura 0,1% p/v
- Glucosa 0,05% p/v
- Agar 2% p/v

#### 1.7 Mosto sintético

Reactivos	Concentración (g/L)
Ácido Tartárico	5
Ácido Málico	5
Cloruro de calcio Dihidratado	0.3
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	1.3
Fosfato de Amonio	1.2
Fructosa	100
Sacarosa	5
Glucosa	100
Hidróxido de Potasio	2.5
Mezcla de Vitaminas	2 ml/L

#### 1.8 Mezcla de vitaminas.

Reactivos	Concentración (mg/250ml)
Tiamina	288
Biotina	1.2
Ácido Nicotínico	575
Piridoxina Hidrocloruro	57.5
Pantoteanato de Calcio	288
Ácido Sulfúrico 0.25M	0.35

### 1.9 Aminoácidos agregados al mosto sintético.

Aminoácidos	Concentración (mg/L)
Arginina	300
Ácido glutámico	100
Ácido aspártico	100
Licina	100
Treonina	100
Serina	100
Asparagina	50
Leucina	75
Glutamina	50

### 1.10 Nistatina

Preparada disolviendo 1 mg en 1 ml de etanol al 95%, para luego agregar agua estéril hasta un volumen final de 10 ml (Snow y col, 1966).

### 1.11 Ácido 5-fluoroorótico (5-FOA)

- Ácido 5-fluoroorótico 0,1g
- YNB 0,7g
- Uracilo 20 mg
- Glucosa 2 g
- Agua destilada estéril 50 ml

La solución fue homogeneizada y calentada hasta 50 °C, para luego mezclarla con 50 ml de agar al 4% p/v previamente autoclavados, para un volumen final de 100 ml. Luego se agregó el medio a placas plásticas de 5 cm de diámetro (Boeke y col, 1987).



### 1.12 Ácido 5-fluoroantranílico (5-FAA)

- Ácido 5-fluoroantranílico 0,5 ml al 10% p/v disuelto en etanol al 95%.
- YNB 0.7 g
- Triptófano 0,1 g/L
- Adenina 0.25 g/L
- Uracilo 0.25 g/L
- Metionina 0.25 g/L
- Histidina 0.25 g/L
- Lisina 0.6 g/L
- Agua destilada estéril 50 ml

La solución fue homogeneizada y calentada hasta 50 °C, para luego mezclarla con 50 ml de agar al 4% p/v y glucosa al 10% p/v previamente autoclavados, para un volumen final de 100 ml. Luego se agregó el medio a placas plásticas de 5 cm de diámetro (Toyn y col, 2000).

### 1.13 SR-DOG (Syntethic Raffinose Deoxiglucose Medium) (Rincón y col, 2001)

- Extracto de levadura 1% p/v
- Peptona 2% p/v
- Rafinosa 2%, p/v
- 2-Deoxiglucosa 0,05% p/v
- Agar 2% p/v

## Anexo 2. Soluciones.

### 2.1 EDTA 0,5 M pH 8.0

- Disodioetildiamintetraacetato x 2H<sub>2</sub>O 186 g
- Hidróxido de sodio en lentejas 20 g

Agregar 800 ml de agua destilada al EDTA y ajustar su pH a 8.0 con las lentejas de hidróxido de sodio, luego llevar a 1 litro con agua destilada y autoclavar.

### 2.2 LET

- Trisma base 0,375 g
- Beta-mercaptoetanol 18.75 ml

Llevar a 250 ml con EDTA 0,5 M pH 8,0. Uso baja campana de extracción.

### 2.3 NDS

- EDTA 0,5 M pH 8.0 50 ml
- N-laurosilsarcosina 5 g
- Tris HCl 1M pH 7.4 5 ml

Llevar a 500 ml con agua destilada.

### 2.4 TE

- Tris-HCl 1 M pH 7.4 10 ml
- EDTA 0,5 M pH 8.0 2 ml

Ajustar a 1 L con agua destilada.