

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



**DESARROLLO DE MARCADORES MOLECULARES PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS VÍNICAS DE LEVADURAS
Saccharomyces cerevisiae.**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

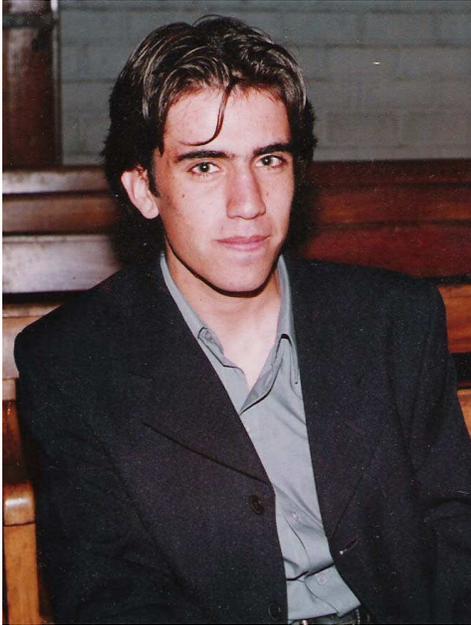
Ingeniero en Biotecnología Molecular

FELIPE ANTONIO GUEVARA PEZOA

Julio, 2006

Santiago-Chile

Director: Dr. Claudio Martínez Fernández



“Dejamos de temer aquello que se ha aprendido a entender” (Marie Curie).

Hace cinco años temía de la ciencia, y aún conservo algo de temor de lo que será la ciencia para mí en mi futuro. Creo entender más que el primer día de Universidad, pero aún es el principio del camino. El primer paso ya está dado, y se que elegí bien donde comenzar el rumbo del entender, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Felipe Guevara Pezoa.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Las cosas más pequeñas a veces se tornan las más difíciles de realizar, y acá está una de ellas, y no saben cuanto me ha costado escribir este apartado de la tesis!!!!. Primero, porque será una de las partes más leídas, y segundo, porque de seguro olvidaré mencionar a más de alguien que me lo reprochará y lo lamentaré para siempre. Así que si tu estás entre estos últimos, va para ti el primer GRACIAS!!!!.

A quien aceptó darme un espacio de trabajo y dirigir mi tesis, el Dr. Claudio Martínez. Gracias por la confianza depositada en mí y en mi trabajo, por todo el apoyo tanto en lo académico como en lo personal, y por su amistad entregada en todo este tiempo. Gracias por aquellos “empujones” para seguir avanzando.

A la Dra. Angélica Ganga, por su compañía y apoyo en el trabajo, y a todos los del LAMAP!!!. Gracias por la compañía, las risas, los momentos compartidos, por la amistad entregada. Gracias Caro por tus retos, por enseñarme los primeros pasos en el manejo del lab, por enseñarme lo que es el orden!!!. Gracias Berna por tu compañerismo y buena onda. Gracias a ambas simplemente por estar. A mis compañeros tesistas, Claudia, Lily, Héctor y Felipe Sarmiento, gracias por haberme hecho sentir que siempre hay un amigo cerca. Olguis, por tu alegría. A Daniel por su compañía biotecnológica para contrarrestar a los bioquímicos del laboratorio.

Ruthy, gracias por los consejos, por tu silencio para escucharme, por entregarme tanta confianza sin tener porqué, y que esa confianza se haya traducido en una amistad tan linda. Gracias AMIGA!!!!.

Armando, David, Juan, Christian (tati), Joaquín, cada uno con su tema, pero eso aporta a que en los asados tengamos de que hablar. Gracias por tanto tiempo de amistad (más de 15 años), acá estamos más viejos, pero amigos.

A mis compañeros de U, con quienes compartí también la amistad y tantos momentos de estudio para pasar esos exámenes que alguna vez costaron. Gracias por todo y a todos.

Jocy, aquí está mi excusa de siempre. Gracias por acompañarme desde que empecé el camino en la universidad, gracias por creer y confiar en mí, gracias por todo lo que has sido, eres y significas para mí.

A mi familia, por el apoyo siempre, por creerme al querer estudiar algo que en un principio no conocían (¿Biotecnología?), y que aún no estoy seguro si entiendan bien, pero aquí estoy, terminando. Gracias Papá, Mamá por haberme permitido existir!!! Hermanita, no odies la biología, es linda, igual que tú.

GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDOS	v
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Levaduras en la industria vitivinícola	1
1.2. Microbiología enológica	1
1.3. Diferenciación de cepas	3
1.4. DNA repetitivo	5
2. HIPÓTESIS	8
2.1. Hipótesis de investigación	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo general	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	10
4.1. Cepas	10
4.3. Aislamiento de DNA	13
4.3.1. Extracción de DNA total	13
4.3.2. Aislamiento DNA de levadura de alto peso molecular	14
4.4. Construcción de librería genómica	15
4.4.1. Establecimiento de las condiciones de digestión parcial	16

4.4.2. Escalamiento y purificación de fragmentos de digestión parcial.....	16
4.4.3. Clonamiento de fragmentos en el vector	17
4.4.4. Empaquetamiento de DNA ligado	17
4.4.5. Título viral.....	17
4.4.6. Transferencia de fagos a membranas	18
4.4.7. Preparación de lisado para aislamiento de DNA viral	19
4.4.8. Aislamiento de DNA recombinante.....	19
4.5. Digestión DNA.....	20
4.5.1. Digestión DNA total	20
4.5.2. Digestión del DNA mitocondrial.....	21
4.6. Obtención de sondas mediante bioinformática.....	21
4.7. Marcaje de sondas.....	21
4.8.1. Transferencia de DNA a membrana para Southern Blot.....	24
4.8.2. Hibridización.....	24
4.8.3. Detección inmunológica	25
4.9. Cariotipo electroforético	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1. Obtención de sondas compuestas de DNA a través del desarrollo de una librería genómica de una cepa autóctona de <i>S.cerevisiae</i>	27
5.1.1. Construcción de librería genómica de la cepa autóctona de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-16.....	27
5.1.2. Identificación de clones de rRNA.....	32
5.1.3. Identificación de clones de DNA repetido	35
5.1.4. Análisis de la sonda Rep3 mediante hibridización.....	42
5.2. Obtención y análisis de secuencias de DNA repetitivo que puedan ser utilizadas como sondas en experimentos de RFLP.....	44

5.3. Evaluación de las sondas para la diferenciación de cepas genéticamente similares.....	47
6. DISCUSIÓN.....	59
6.1. Análisis de polimorfismos mediante sondas de hibridización.....	59
6.2. Análisis mediante sondas de DNA repetitivo	60
6.3. Análisis de polimorfismos a través de sondas compuestas.....	64
7. CONCLUSIÓN	67
8. REFERENCIAS.....	68
9. ANEXO 1: SOLUCIONES Y MEDIOS	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Determinación de condiciones de digestión parcial de DNA de la cepa autóctona de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L-16.	28
Figura 2. Evaluación del tamaño promedio de los insertos	31
Figura 3. Verificación de sonda 26S mediante secuenciación.....	33
Figura 4. Identificación de clones portadores de secuencias repetitivas de DNA..	34
Figura 5. Alineamiento de las secuencias parciales de clones repetitivos Rep2, Rep5, Rep6, Rep7, Rep8 y Rep9.....	36
Figura 6. Análisis de secuencias de clon Rep2.....	37
Figura 7. Alineamiento de las secuencias parciales de clones repetitivos Rep1, Rep3 y Rep4.....	40
Figura 8. Esquema de la región cromosómica homóloga a la sonda Rep3 obtenida desde la librería genómica.	41
Figura 9. Análisis Southern del cariotipo electroforético de cepas vínicas con la sonda Rep3.....	43
Figura 10. Análisis de la secuencia de la región amplificada por el partidor X'.....	45
Figura 11. Análisis de perfiles de hibridización de aislados altamente relacionados de acuerdo a su perfil de restricción del DNA mitocondrial.....	48
Figura 12. Análisis de perfiles de hibridización de aislados altamente relacionados acorde a su cariotipo electroforético.....	51
Figura 13. Análisis RFLP de cepas comerciales.	54
DNA de seis.....	54
Figura 14. Patrones de hibridización de la Cepa autóctona L-16 comparada con otros aislados nativos.....	57
Figura 15. Análisis de 10 cepas de distinto origen con la sonda Rep3.....	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio.....	11
Tabla 2. Sondas utilizadas en el estudio	23

ABREVIATURAS

CHEF	Electroforésis de campo pulsado. Del inglés, Clamped Homogeneous Electric Fields.
CSPD	Sustrato para fosfatasa alcalina. Del inglés, Chemiluminescent Substrates for alkaline Phosphatase Detection.
DIG	Digoxigenina.
mtDNA	DNA mitocondrial.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa. Del inglés, Polimerase Chain Reaction.
pfu	Unidades formadoras de placas de lisis.
rDNA	DNA ribosomal.
REP	Secuencia repetitiva.
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Del inglés, Restriction Fragment Length Polimorfism.
T _m	Temperatura de desnaturalación térmica.

RESUMEN

Las levaduras presentan gran importancia en procesos industriales, específicamente en la elaboración de alimentos y bebidas alcohólicas, siendo *Saccharomyces cerevisiae* una de las más importantes.

El uso de técnicas moleculares ha permitido la caracterización del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, empleándose como herramientas de identificación, diferenciación e incluso en el establecimiento de relaciones de distancia genética entre aislados relacionados geográficamente. Dentro de estas técnicas, las más utilizadas han sido el cariotipo electroforético y el RFLP del mtDNA. Sin embargo, en algunos casos, el poder de diferenciación de estas técnicas es incapaz de resolver variaciones dadas por pequeños cambios en la estructura genómica.

El análisis de secuencias repetidas y dispersas dentro del genoma blanco permite diferenciar cepas genéticamente relacionadas, analizando los cambios ocurridos dentro de estas secuencias o sus alrededores. Con el objeto de contar con secuencias de DNA a ser utilizados como sondas de análisis en experimentos de RFLP, se construyó una biblioteca de DNA de la cepa autóctona de L-16 y, mediante experimentos de hibridación con DNA total, se obtuvo una sonda de DNA medianamente repetitivo aplicable para estudios de RFLP de diferenciación de cepas. Además, mediante el análisis bioinformático del genoma de *S.cerevisiae*, se diseñaron dos sondas cuyos blancos corresponden a secuencias repetitivas y dispersas a través del genoma (X' y δ). El empleo de estas sondas, junto con otras obtenidas por literatura (pEL50, pRED552 y pRED556) permitió obtener patrones complejos de diferenciación, logrando diferenciar incluso cepas que el RFLP del mtDNA o el cariotipo electroforético nos presentaban como idénticas.

El uso de secuencias de DNA repetitivo como marcadores moleculares se presenta como una herramienta útil en el análisis de aislados estrechamente relacionados y nos permitirían reconocer fenómenos de microevolución que comprenden pequeñas variaciones en la estructura genómica de éstos.

ABSTRACT

The yeasts have a great importance in industrial processes, specifically in the elaboration of foods and alcoholic beverages, with *Saccharomyces cerevisiae* being one of the most important strains.

The use of molecular techniques has allowed the characterization of the *S. cerevisiae* yeast genome. These are used as identification and differentiation tools and also in the establishment of genetic distance relationships between geographically related isolates. One of the most used techniques is that of electrophoretic karyotyping (CHEF) and the mtDNA RFLP, however in some cases they are unable to resolve variations due to small changes in the genomic structure.

The analysis of repeated and disperse sequences inside the target genome allows the differentiation of closely related strains by analyzing the changes occurring within or around the sequence. In order to obtain more resolutive markers, a genomic library of an autochthonous strain L-16 was elaborated from where a probe of repetitive DNA was obtained to evaluate their differentiation power. At the same time, using a bioinformatic analysis of the *S.cerevisiae* genome, two probes were designed whose targets corresponded to the repeated and dispersed sequences throughout the genome (X' and δ). The use of these probes, together with others described in the literature (pEL50, pRED552 and pRED556) allowed the obtention of complex patterns of differentiation as well as the differentiation of strains that the mtDNA RFLP and CHEF techniques showed as identical.

The use of repetitive DNA sequences as molecular markers is presented as a useful tool in the analysis of closely related isolates allowing the recognition of microevolution phenomena that are explained by small variations in the genomic structure.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Levaduras en la industria vitivinícola

Las levaduras (hongos unicelulares) han sido utilizadas para beneficio comercial por cientos de años en la producción de diversos alimentos y bebidas alcohólicas. Registros y evidencias muestran que la elaboración del vino comenzó en Asia Menor y el Cercano Oriente, alrededor del 6.000 A. de C., y en el nuevo mundo fue conocido recién en el siglo XVI, gracias a los exploradores europeos, quienes hacia el 1530 establecieron las primeras viñas de *Vitis vinifera* en México, Colombia, Perú y Chile (Saber de vinos, 2005).

El por qué ocurría espontáneamente la fermentación del mosto de uva permaneció totalmente desconocido, y no fue hasta que, en 1863, gracias al trabajo de Louis Pasteur, se reconoce por primera vez la importancia de la actividad de los microorganismos en el proceso de fermentación vínica, específicamente de las levaduras, quienes son responsables de la transformación de los azúcares de la uva en alcohol y dióxido de carbono (Feldmann, 2005).

1.2. Microbiología enológica

El proceso de transformación del mosto en vino involucra un complejo fenómeno microbiológico en el que participan bacterias, hongos filamentosos y levaduras del género *Saccharomyces*, así como también otro grupo denominado no-*Saccharomyces* (Mills y cols, 2002). Estos microorganismos se suceden secuencialmente a través del proceso de fermentación, y las levaduras son quienes

juegan el rol fundamental. Estas llegan hasta el proceso fermentativo provenientes desde la uva, donde predominan los géneros *Kloeckera* y *Hanseniaspora*, quienes también dominan las primeras etapas de fermentación junto a *Candida*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* y *Pichia*. En la última etapa fermentativa, donde los niveles de etanol alcanzan 3-4%, se da paso a levaduras más tolerantes a estos niveles de alcohol como es el género *Saccharomyces*, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*.

Sin duda, toda la dinámica microbiológica que ocurre dentro del proceso de fermentación puede afectar la producción vinica. Si bien, la mayoría de las especies mencionadas son benéficas para la obtención de un buen producto, otras pueden desfavorecer la calidad de éste. Esto dependerá de la diversidad de especies presentes en el mosto, de la interacción entre estas y de la contribución individual de cada especie. La diversidad en la composición de poblaciones de estas levaduras, entre distintas localidades geográficas, es un factor importante en la generación de características distintivas entre los vinos que estas zonas producen, además de la variedad de la Vid, condiciones climáticas y factores químicos y físicos que afecten a la fermentación.

Con el fin de obtener vinos de mejor calidad y características reproducibles, ha sido necesaria la búsqueda de cepas adecuadas para cada tipo de vino, lo que ha derivado en la utilización de cepas comerciales, con su consiguiente liberación en zonas geográficas distintas a las de su origen. En este contexto, surge la interrogante del efecto del uso y liberación de estas cepas sobre la diversidad de las poblaciones de levaduras nativas. Estas poblaciones son importantes en aspectos claves para el mantenimiento y desarrollo de la industria vinícola nacional

como identidad, calidad y diferenciación. El estudio actual del conocimiento del área no ha permitido definir si existe en el largo plazo un efecto indirecto, negativo o positivo, del uso de levaduras comerciales en esta industria, sin embargo, se ha sugerido un efecto negativo sobre la diversidad de la biota levaduriforme autóctona (Ganga y Martínez, 2004). Análisis taxonómicos de poblaciones de levaduras presentes en localidades de producción vitivinícola de la zona central de Chile, sugieren que en aquellas áreas de producción enológica industrial, con un amplio uso de levaduras importadas, la biodiversidad de levaduras no-*Saccharomyces* es menor que en zonas de producción enológica artesanal (Martínez y col, 2004). Otros estudios realizados en España (Esteve-Zarzoso y col, 1998), demuestran que levaduras nativas de las regiones en estudio se encuentran mejor adaptadas a las condiciones de fermentación locales que las levaduras comerciales. En conjunto, estos trabajos hacen plantearnos la interrogante sobre el efecto que tiene el uso intensivo de levaduras comerciales sobre las poblaciones de levaduras nativas, y por ende, sobre el potencial de mejoramiento de la calidad y diferenciación de los vinos elaborados en estas áreas.

1.3. Diferenciación de cepas

Para deducir relaciones de parentesco entre cepas de una misma especie, se requiere contar con marcadores genéticos que nos permitan discriminar entre distintos aislados no relacionados, desarrollándose varias técnicas, aunque no todas con la misma eficiencia.

Saccharomyces cerevisiae fue el primer organismo eucarionte cuyo genoma fue completamente secuenciado (Goffeau A., 1996), el cual tiene un tamaño de 12

megabases en su dotación haploide, distribuidos en 16 cromosomas, de tamaños entre los 200 y 2200 kb. Aunque este número de cromosomas es prácticamente constante, en la mayoría de las levaduras de uso industrial se observan fenómenos de aneuploidia y poliploidia. Se debe tomar en cuenta que las cepas de uso industrial se encuentran expuestas constantemente a condiciones de *stress*, como son temperatura, altas concentraciones de azúcar y etanol y bajo pH, que pueden derivar en la selección de cepas mejor adaptadas a estas condiciones debido a pequeños cambios en la estructura del genoma, dando origen a nuevas cepas.

Varios estudios coinciden en que la técnica de PCR es adecuada para su uso como herramienta de identificación en levaduras silvestres (Baleiras y col., 1996., Ibeas y col, 1996., Arias y col, 2002), además de la metodología de electroforesis de campo pulsado y restricción del mtDNA (RFLP-mtDNA). Esta última técnica consiste en la digestión de DNA total de la levadura con enzimas de restricción, las cuales digieren en fragmentos de pequeño tamaño el DNA nuclear, mientras el DNA mitocondrial es digerido en fragmentos discretos que son visualizados por electroforesis en geles de agarosa. Haciendo uso de estas técnicas se ha encontrado que la información entregada por ambas no es equivalente (Esteve-Zarzoso, 2001), y además la técnica cariotípica presenta un mayor poder resolutivo que la técnica mitocondrial (Martinez y col, 2004). A su vez, otra técnica, RAPD (del inglés *Random Amplification of Polymorphic DNA*, amplificación aleatoria de DNA polimórfico), entrega una mayor correlación de parentesco entre distintos aislados, por sobre la técnica cariotípica (Martínez y col, 2004), pero presenta una baja reproducibilidad.

1.4. DNA repetitivo

Mutaciones en ciertas regiones del genoma no esenciales pueden ser silenciosas, es decir, no intervenir en procesos de selección, pero pueden afectar el espaciamiento de sitios blanco para enzimas de restricción (sitios de restricción), crear nuevos, o afectar otros ya existentes. Estas diferencias dan origen a polimorfismos en los patrones de corte de una enzima, que pueden ser visualizados por medio de sondas de hibridización por la metodología de RFLP (del inglés *Restricción Fragment Length Polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción). Para este fin, una buena sonda de hibridización debe tener como blanco secuencias de DNA repetidas a través del genoma, conservadas, y no estar asociada a secuencias esenciales, lo que nos permite analizar todas las secuencias de DNA que rodean al blanco de la sonda. *Saccharomyces cerevisiae* posee en su genoma varias secuencias de DNA repetitivo que son candidatos para ser usadas en análisis de diferenciación de aislados.

Como en todos los organismos eucariontes, en *S.cerevisiae* los genes que codifican para RNA ribosomal (rRNA) se encuentran en alto numero de copias y distribuidos en uno o 2 cromosomas. En esta especie existen alrededor de 150 copias de estos genes distribuidos en tándem en el cromosoma XII (Petes, 1979). Estas secuencias son altamente conservadas, y por el hecho de estar codificadas en solo una región del genoma, no son de gran utilidad a la hora de realizar análisis de diferenciación.

Elementos extracromosomales como el plásmido de 2 micras (2 μ), también se encuentran en un alto número de copias, pero el nivel de variación de su

secuencia es muy bajo como para ser utilizados como herramienta de discriminación entre aislados. Una excepción a esto lo representa el genoma mitocondrial, cuyo análisis ha sido ampliamente utilizado (Guillamón y cols.,1994; Querol y cols., 1992).

Varias secuencias de DNA repetido a través del genoma de levaduras pueden ser utilizadas en análisis de diferenciación. La familia de elementos transponibles Ty representa cerca del 3% del genoma de *S.cerevisiae* (Kim *et al.*,1998) , y se encuentran flanqueados por repetidos directos o LTRs (del inglés, *Long Terminal Repeats*). Estos elementos tienen una variada distribución a través de todo el complejo *Sensu stricto* presentándose como un eficiente blanco de diferenciación tanto intra como inter específica.

Las secuencias de las regiones subteloméricas o asociadas a los telómeros presentan elementos medianamente repetidos. Estos genes no son esenciales, pero están involucrados en mecanismos de adaptación a nuevas condiciones ambientales. Este es el caso de los elementos X' e Y', cuya función se ha postulado que sería intervenir en el silenciamiento de ciertos genes (Craven y cols., 1999; Fourel y cols., 1999; Pryde y cols., 1999; Lebrun y cols., 2001).

Recientemente, otra metodología que ha tenido bastante éxito en diferenciar levaduras patógenas es el RFLP de DNA genómico con el uso de sondas moleculares compuestas (Lockhart y col, 1997., Enger y col, 2001., Joly y col, 1999). Estas sondas se encuentran conformadas por regiones de DNA repetitivo y disperso a través del genoma, y además por secuencias menos variables. El alto nivel de sensibilidad de esta metodología ha permitido incluso detectar fenómenos de microevolución en cepas de *Candida albicans* y otras levaduras (Franzot y col,

1998., Gee y col, 2002).

En el presente trabajo se desarrolló una metodología de alta sensibilidad para la caracterización del genoma de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* que permitiría identificar y estudiar fenómenos de microevolución dentro de esta especie, a través de la utilización de secuencias de DNA repetitivo como sondas de hibridización en experimentos de RFLP.

2. HIPÓTESIS

2.1. Hipótesis de investigación

Mediante el uso de RFLP, utilizando sondas compuestas por secuencias repetidas y dispersas a través del genoma blanco sería posible diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estrechamente relacionadas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Establecimiento y evaluación de marcadores moleculares que permitan diferenciar cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2. Objetivos específicos

1. Obtención de sondas compuestas de DNA a través del desarrollo de una librería genómica de una cepa autóctona de *S.cerevisiae*.
2. Obtención y análisis de secuencias de DNA repetitivo que puedan ser utilizadas como sondas en experimentos de RFLP.
3. Evaluación de las sondas para la diferenciación de cepas genéticamente similares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas

Un total de 17 cepas de levaduras vínicas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* fueron utilizadas para el estudio, 10 de ellas seleccionadas por similitudes en sus patrones de restricción del DNA mitocondrial (RFLP del mtDNA) y otras 4 (una de ellas también en el grupo anterior) por la similitud de sus patrones de cariotipo electroforético, CHEF (Vásquez C., 2005). Se incluyeron además 2 cepas de uso comercial tomadas al azar desde el cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile, y la cepa autóctona L-16. Se incluyó además la cepa tipo YNN295 como control de *Saccharomyces cerevisiae*.

Todas las cepas utilizadas se listan en la tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio

Cepas con idéntico patrón de RFLP del mtDNA			
Cepa ^a	Nombre comercial	Origen	Localidad de aislamiento
L-20		Chile	INIA, Cauquenes
L-22		Chile	INIA, Cauquenes
L-79		Chile	Coronel Maule, Cauquenes
L-80		Chile	Coronel Maule, Cauquenes
L-531		Chile	Pocilla, Cauquenes
L-532		Chile	Pocilla, Cauquenes
L-1321	EC-1118, Lallemand	Francia	Champagne
L-1333	LV-CB, DSM Food Specialties	Chile	Casablanca
L-1334	NºLW05, DSM Food Specialties	Francia	Champagne
L-1335	Up30Y5, DSM Food Specialties	Francia	Bourgonia
Cepas con similitud en patrón de cariotipo electroforético, CHEF			
L-165		Chile	Panguillemu, Cauquenes
L-169		Chile	Panguillemu, Cauquenes
L-494		Chile	Panguillemu, Cauquenes
L-531		Chile	Pocilla, Cauquenes

Cepas control			
L-1323	ALG 804, DSM Food Specialties	Francia	Champagne
L-1343	ALG 100, Golondrina (DSM Food)	Francia	
L-16		Chile	Cauquenes
L-1143	YNN295 ^b	Cepa tipo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

- a) Nombre en el cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP), Universidad de Santiago de Chile.
- b) Cepa de laboratorio

4.2. Medio de cultivo

Todas las cepas del punto 4.1 fueron cultivadas en medio YPD a 27° C por 15-18 h. La composición del medio puede ser revisada en el anexo 1.

4.3. Aislamiento de DNA

4.3.1. Extracción de DNA total

La extracción de DNA genómico de levaduras fue realizado a través del *Wizard® genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con algunas modificaciones. Para esto, cada cepa fue crecida en 5ml de medio líquido YPD por 15-18 h a 27° con agitación (Multitron, Infors AG). Las células fueron colectadas por centrifugación a 13000rpm por 2 min (microcentrifuga 5415D, Eppendorf) en microtubos de 1,5ml (Axigen), y posteriormente resuspendidas en 300 ul de EDTA 50mM. La suspensión se trató con 10 ul de zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation) a 20 mg/ml por 60 min a 37°C con agitación a 400rpm (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf). Los esferoplastos fueron colectados por centrifugación a 13000rpm por 2 min y resuspendidos en 400ul de la solución *nuclei lysis solution* y 133ul de la solución *protein precipitation solution*. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex por 1 min e inmediatamente puesta en hielo. Luego de 30 min se centrifugó a 13000rpm por 15 min a 4°C (Universal 32 R, Hettich; rotor 1653) y el sobrenadante que contiene el DNA fue traspasado a un microtubo limpio que contenía 300ul de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión hasta observar la precipitación del DNA. Los tubos fueron centrifugados a 13000rpm por 2 min con el fin de colectar el DNA precipitado, descartando el sobrenadante y el precipitado fue lavado 2 veces

con 300 μ l de etanol frío al 70%. El DNA fue secado y rehidratado con 50 μ l de TE pH 7,4.

Las muestras de DNA fueron cuantificadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5x a 80 volt (cámara Bio Rad), utilizando como marcador de peso molecular DNA de fago lambda digerido con la enzima *HindIII* (Promega), y guardadas a 4°C.

La concentración de DNA obtenida por esta metodología fue aproximadamente de 100 ng/ μ l.

4.3.2. Aislamiento DNA de levadura de alto peso molecular

Se procedió de acuerdo al método descrito por Piper P., 1996, con algunas modificaciones.

Se inoculó 1L de YPD (2 matraces de 1L con 500ml de YPD cada uno) con la cepa *S.cerevisiae* L-16 y se creció hasta obtener una OD₆₀₀: 0.6-0.8. Posteriormente, las levaduras fueron colectadas en tubos de 80 ml (NalGene), por centrifugación a 1500g por 5 min. El precipitado colectado se resuspendió en 20ml de TE y se colectó por centrifugación a 1500g por 5 min. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas en 15 ml de tampón SC (ver anexo 1) e incubadas a 30°C con agitación por aproximadamente 60 min. La calidad de los esferoplastos fue chequeada cada 15 min por observación microscópica, hasta obtener lisis con la adición de agua destilada. Los esferoplastos se colectaron centrifugando a 2000 rpm por 5 min, y lavados 2 veces en tampón Sorbitol-Tris-HCl (anexo 1). La solución obtenida se centrifugó por 5 min a 2000rpm y el precipitado fue resuspendido en tampón TES (anexo 1) e incubado a 37°C por 60 min, luego 15 min a 65°C. Se enfrió a temperatura ambiente La solución fue

transferida a tubos de ultracentrifuga de 15ml (COREX) (7.5 ml por cada tubo COREX). Se añadió 1 volumen fenol:cloroformo 1:1, mezclando por inversión hasta formar solución blanca. Se centrifugó 15 min a 6000g (rotor Hettich 1620A). La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio COREX y extraída nuevamente con 1 volumen de fenol:cloroformo 1:1, tal como antes. La fase acuosa nuevamente fue transferida a un tubo limpio y re-extraída con cloroformo, centrifugando 15 min a 6000g. El sobrenadante se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto, y se mantuvo en hielo por 30 min. El DNA precipitado se colectó con espátula y se transfirió a un tubo limpio de 1.5ml con 500ul TE: RNAsa A (1 ug/ml), incubando a 37°C por 30 min. Se extrajo nuevamente con fenol:cloroformo y luego con Cloroformo. A continuación, se precipitó el DNA con 0.04 volúmenes 2M Acetato de Sodio y 2 volúmenes de etanol absoluto, manteniendo la solución en hielo por 30 min. EL DNA precipitado se colectó centrifugando a máxima velocidad (13.200 rpm) por 10 min, eliminado el sobrenadante completamente. El secado del DNA fue realizado a 50°C por 15 min, y finalmente resuspendido en 1.5 ml de TE por cada tubo.

4.4. Construcción de librería genómica

La librería se construyó empleando el sistema LambdaGEM[®]-11 *Bam*H I Arms/Packagene[®] System (Promega) de acuerdo a sus instrucciones.

4.4.1. Establecimiento de las condiciones de digestión parcial

Se realizó una digestión parcial del DNA de la cepa *S.cerevisiae* L-16 obtenido en el punto 4.3.2 con la enzima de corte frecuente *Bsp143I*, la cual deja extremos compatibles con *Bam*HI. En este paso, 10 tubos conteniendo 1ug de DNA fueron tratados con diluciones seriadas de enzima entre 0 y 1 unidades por 1 hora a 37°C. Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se detuvo la reacción agregando EDTA pH 8.0 a una concentración final de 20mM.

Las muestras se analizaron mediante electroforésis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE, y se compararon los tamaños de los fragmentos de restricción con el marcador de peso molecular Lambda DNA/*Hind*III (Promega), y se seleccionó la concentración de enzima que proporcionaba los tamaños de fragmentos deseados.

4.4.2. Escalamiento y purificación de fragmentos de digestión parcial.

El procedimiento descrito en el punto anterior se escaló para ser realizado con una cantidad de 10ug de DNA, manteniendo las proporciones de todos los reactivos. La digestión se realizó por 1 hora a 37°C y se comprobó el resultado mediante electroforésis en gel de agarosa, tal como en el punto anterior. El rango de fragmentos de DNA deseados se escindió del gel de agarosa con ayuda de un bisturí y se purificó como fue descrito por Boyle (1995). Para esto el fragmento de gel escindido fue solubilizado a 55°C en presencia de 2 volúmenes de NaI 3M. Luego se agregó 20 ul de sílica (Sigma), se mezcló en vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La solución se centrifugó a 13.000 rpm por 2

min, y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 20 ul de agua bidestilada y centrifugada a 13.000 rpm por 2 min. El sobrenadante fue recuperado y almacenado a 4°C hasta su uso.

4.4.3. Clonamiento de fragmentos en el vector

La librería fue construida utilizando el LambdaGEM[®]-11 *Bam*H I Arms/Packagene[®] System (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para esto 1ug de DNA de vector fue mezclado con 1ug de DNA proveniente de la digestión parcial (punto 4.4.1.) en presencia de 1ul de tampón ligasa 10X. 3 unidades Weiss fueron empleadas para la reacción de ligamiento en un volumen de 10ul. La incubación fue realizada durante toda la noche a 4°C.

4.4.4. Empaquetamiento de DNA ligado

Extracto viral congelado a -86°C fue descongelado lentamente en hielo. Tan pronto como el extracto se descongeló 5ul de la reacción de ligamiento del punto 4.4.2 fueron agregados y mezclados por inversión. La mezcla se incubó a 22°C por 3 h. Una vez transcurrido el tiempo se añadió 445 ul de tampón de fago y 25 ul de cloroformo. Se homogeneizó por inversión.

4.4.5. Titulo viral

Se realizaron diluciones de la reacción de empaquetamiento desde 10^{-1} hasta 10^{-4} . A cada una de estas diluciones se añadió 100 ul de *E.coli* KW251. Se incubó por 30 min a 37°C y se añadió 3ml de agaros a top (fundida a 45°C), se

mezcló por inversión y se agregó sobre placas de petri de 9.5 cm de diámetro con medio LB (suplementadas con 10mM MgSO₄). Se incubó por 12-15 h a 37°C.

Como control de empaquetamiento se utilizó el vector Lambda cl857 Sam7, y como control de ligamiento el plásmido pTI11. Estos controles se titularon usando como huésped la cepa de *E.coli* LE392.

Las cepas de *E.coli* se crecieron en medio LB (suplementado con 0.2% de maltosa y 10mM MgSO₄) a partir de una colonia aislada, hasta una OD₆₀₀: 0.6-0.8. La cepa KW251 fue crecida y mantenida en presencia de tetraciclina (15ug/ml).

4.4.6. Transferencia de fagos a membranas

Sobre la placa de petri a transferir fue colocada una membrana de Nylon (Immobilon-Ny+ Charged Nylon Transfer Membrane, Millipore) por 5 min, marcando con una aguja puntos asimétricos para recordar la orientación. Una vez removida la membrana se dejó secar a temperatura ambiente por 20 min.

Se dispusieron 3 recipientes con papel filtro saturado conteniendo:

- a. Recipiente 1: 0.2M NaOH, 1.5M NaCl
- b. Recipiente 2: 0.4M Tris-HCl (pH 7.6), 2X SSC
- c. Recipiente 3: 2X SSC

Se colocó la membrana en el recipiente 1 por 2 min. Se transfirió la membrana al recipiente 2 por 2 min. La membrana se traspasó al recipiente 3 y se mantuvo en el por 2 min. Se dejó secar al aire por 5 min y se fijó por exposición a luz UV (TCP-20.M, Vilber Lourmat) por 1 min.

4.4.7. Preparación de lisado para aislamiento de DNA viral

La amplificación viral para extracción de DNA se realizó mediante el método de placa de lisis. Con una punta de micropipeta recortada se aisló la placa de lisis de interés depositándola en un microtubo de 1.5ml (Axigen) con 100ul de tampón fago y se incubó durante toda la noche a 4°C. 50ul del virus eluido fueron mezclados con 100ul de *E.coli* KW251 e incubados 30 min a 37°C, luego de lo cual se agregó a un tubo de ensayo con 3ml de agarosa top y esta mezcla sobre una placa de petri con medio LB. La placa se incubó a 37°C hasta que las placas de lisis fueran confluentes. La placa se cubrió con 3ml de tampón SM y con una espátula se removió la agarosa Top (cuidando de no sacar agar inferior) y se transfirió a un tubo de 50 ml (Nalgene). La agarosa Top se incubó a temperatura ambiente con agitación esporádica por 30 min y se centrifugó a 9000 rpm (rotor Hettich 1620A) por 10 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se traspasó a tubos limpios de 1.5 ml (1 ml por tubo) con 0.3% v/v de cloroformo en cada tubo. El lisado fue guardado a 4°C hasta su utilización.

4.4.8. Aislamiento de DNA recombinante

A cada tubo se agregó DNAsa y RNAsa a una concentración final de 1ug/ml y se incubó a 37°C por 1 hora. Por cada ml de lisado se añadió 0.06g NaCl y 0.09g de polietilenglicol, mezclando en Vortex hasta disolver totalmente. Esta solución se incubó por 1 hora en hielo. El precipitado fue recuperado por centrifugación a 13200rpm (Hettich Universal 32R, rotor 1653) por 20 min. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el tubo sobre papel absorbente de forma invertida durante 10 min. El precipitado se resuspendió en 100ul de tampón fago y se mezcló en

vortex. Por centrifugación a 8000g por 2 min a 4°C se eliminó el sedimento y el sobrenadante fue traspasado a un tubo nuevo con 1ul SDS 10% y 1ul EDTA 0.5M (pH 8) e incubado a 68°C por 15 min.

Para extraer el DNA se añadió 1 volumen fenol:cloroformo 1:1 saturado con TE a pH 8 y se centrifugó a 13200 rpm por 5 min. La fase superior se traspasó a un tubo nuevo y se repitió el procedimiento. Luego se agregó un volumen de cloroformo y se centrifugó a 13200 rpm por 5 min. La fase acuosa se traspasó a un tubo limpio y el DNA se precipitó con un volumen de isopropanol por una hora a -20°C. EL DNA precipitado fue recuperado por centrifugación a 13200 rpm por 10 min a 4°C. Cuidadosamente se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 100ul de etanol 70% y recuperado nuevamente por centrifugación, el sobrenadante fue eliminado, el precipitado secado por 15 min a temperatura ambiente y rehidratado en 50ul de TE pH 8.0.

4.5. Digestión DNA

4.5.1. Digestión DNA total

DNA de cada cepa obtenido en el punto 4.3.1 fue sometido a digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I (Promega). Para este efecto, una mezcla de reacción fue preparada conteniendo 1ug de DNA, 2ul de tampón de enzima, 1 unidad de enzima y agua hasta completar un volumen final de 20 ul. La reacción se llevó a cabo por incubación a 37°C por 3 h (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf).

El resultado de la reacción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa en TBE 0.5x a 80 volt de una alícuota de 2ul de reacción.

4.5.2. Digestión del DNA mitocondrial

Los datos de digestión de DNA mitocondrial fueron obtenidos de los trabajos realizados por Gac S., (2004) y Vásquez C., (2005).

1ug de DNA de cada cepa fue incubado por 3 hrs. a 37°C en presencia de 1U de enzima *Hinf*I. Luego de la incubación, el resultado de la digestión fue chequeado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE, y visualizado mediante tinción en bromuro de etidio.

4.6. Obtención de sondas mediante bioinformática.

Las secuencias empleadas fueron obtenidas desde la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (www.yeastgenome.org). El análisis de las secuencias, alineamientos y comparación de secuencias fueron realizados a través del programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>). A partir de estos análisis se diseñaron partidores para ser empleados en reacciones de PCR.

Las reacciones de PCR fueron desarrolladas con los partidores listados en la tabla 2. Para esto se realizó una denaturación inicial del DNA a 95°C por 5min, seguido de 35 ciclos de amplificación con denaturación a 95°C por 5min, apareamiento de partidores a 55°C por 5min y elongación de 2min a 72°C. Luego de los 35 ciclos se realizó una elongación final a 72°C por 10min.

Las sondas empleadas en este trabajo son listadas en la tabla 2.

4.7. Marcaje de sondas

DNA a ser utilizado como sonda fue marcado con digoxigenina de acuerdo al kit *DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II* (Roche).

1ug de DNA templado fue diluido a un volumen final de 16ul con agua

bidestilada estéril. El DNA fue desnaturado por ebullición por 10 min y enfriado en hielo. 4ul de la solución Dig-High Prime fueron agregados al DNA denaturado. Se centrifugó por 15 s (microcentrifuga 5415D, Eppendorf) y se incubó toda la noche a 37°C. La reacción se detuvo calentando por 10 min a 65°C (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf).

Tabla 2. Sondas utilizadas en el estudio

Nombre	Gen	Notas y referencias
pEL50	ERR1	Enolase-related repeat (Liti y cols, 2005) ^b
pRED552	PAU6	(Liti y cols, 2005) ^b
pRED556	YCLW 01	(Liti y cols, 2005) ^b
X ^a	Core X	Amplificada por PCR FX01 5'-atattggggccgccgaat-3' RX01 5'-catacgcacaccggatgcttc-3'
Delta ^a	delta	Amplificada por PCR DeltaF1 5'-tgttgaataaaaaatccac-3' DeltaR1 5'-aattgttgggattccattg-3'
25SrDNA ^a	25SrDNA	Amplificada por PCR RDNA25-F 5'gcatatcaataagcggagga3' RDNA25-R 5'-gctatcggtctctcgccaat-3'.
REP3 ^a	15kb cromosoma VIII	Obtenida desde librería genómica, cepa L-16 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .

a) Sonda obtenida en este trabajo.

b) Sondas amplificadas por PCR desde el plasmidio de la referencia con los partidores M13F y M13R.

4.8. Southern Blot

4.8.1. Transferencia de DNA a membrana para Southern Blot

DNA digerido en el punto 4.5.1 fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 0.8% en tampón TAE a 100volt. EL gel fue depurinado por 15 min en HCl 0.25N con agitación constante, lavado dos veces con agua y denaturado por 30 min en NaOH 0.5N.

El gel fue transferido a una membrana de nylon mediante vacío utilizando el Vacuum Blotter Model 785 (BioRad) por 90 min a 5" Hg de presión en tampón SSC 10x. El DNA fue fijado por exposición luz UV por 1 min (TCP-20.M, Vilber Lourmat).

4.8.2. Hibridizacion

Las hibridizaciones se realizaron de acuerdo al protocolo del kit DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche).

La temperatura de hibridización se calculó de acuerdo al porcentaje de homología de la sonda con el blanco, además de su contenido GC de acuerdo con

$$T_m = 49.82 + 0.41(\%GC) - (600/l) \quad (l = \text{longitud de sonda en pares de bases})$$

$$T_{opt} = T_m - 25^\circ\text{C}$$

Se precalentó un volumen apropiado de DIG Easy Hyb (10ml/100 cm² de membrana) a la temperatura de hibridización. La membrana fue prehibridizada por 30 min con agitación constante a la temperatura de hibridización (HB-500 Minidizer, UVP). 25 ng de sonda por cada ml de Dig Easy Hyb fueron denaturados por

ebullición durante 5 min y enfriados en hielo. La sonda así denaturada fue agregada a un volumen apropiado de Dig Easy Hyb (3.5ml/100 cm² de membrana) precalentado a la temperatura de hibridización. La solución de prehibridización fue eliminada y agregada la mezcla de hibridización. Se incubó toda la noche a la temperatura de hibridización.

4.8.3. Detección inmunológica

Luego del proceso de hibridización se realizaron dos lavados de 15 min cada uno a 65°C en presencia de SSC 2X y 1% de SDS. Todo el proceso de detección es descrito para una membrana de 100 cms² y se realizó a una temperatura de 35°C en agitación (HB-500 Minidizer, UVP). Luego de lo anterior se lavó la membrana durante 1 min en tampón de lavado. La membrana fue bloqueada durante 30 min en 100 de solución de bloqueo. Posteriormente se descartó esta solución y se trató la membrana con 20 ml de solución de anticuerpo durante 30 min, después de lo cual se lavó la membrana 2 veces por 15 min con 50 ml de tampón de lavado. La membrana se equilibró en tampón de detección durante 5 min. Posteriormente, la membrana se colocó sobre una lámina de plástico transparente con el lado del DNA hacia arriba; sobre ésta cara se agregó 1 ml de *CSPD ready-to-use* (ROCHE) e inmediatamente se cubrió con otra lámina de plástico, esparciendo el exceso de líquido y eliminando la formación de burbujas. La membrana se dejó entre 15-25°C por 5 min y luego se sellaron los bordes de las láminas de plástico. De esta forma se incubó la membrana a 37°C durante 15 min para aumentar la reacción de luminiscencia. La membrana fue expuesta durante 20 min a una placa radiográfica CP-BU New (AGFA) o durante 45 min en una placa CP-GL (AGFA)

4.9. Cariotipo electroforético

Los datos de cariotipo electroforético fueron obtenidos desde los trabajos realizados por Gac S., (2004) y Vásquez C., (2005), a excepción del análisis de presencia cromosomal de la sonda Rep3. Para esto, cultivos de 50 ml en YPD fueron crecidos a 27°C toda la noche. Las células se colectaron por centrifugación a 3000 rpm por 5 min (Hettich Universal 32R, rotor 1620A) y se lavaron dos veces con EDTA 50mM pH 8,0. Luego, las células se resuspendieron en 1 ml de EDTA 50 mM pH 8,0 y se incubaron con 2,5 mg de zimoliasa 20T (Seikagaku Corp.) por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se mezclaron con 3ml de agarosa de bajo punto de fusión al 1% en EDTA 125 mM previamente fundida y mantenida a 42°C y rápidamente la mezcla se vertió en moldes para generar así bloques de agarosa que contendrán los cromosomas intactos de levadura. Estos bloques se mantuvieron sumergidos en solución LET con 2 mg de zimoliasa 20T por 16 h a 37°C. Luego se lavaron los bloques dos veces con EDTA 50mM y se incubaron durante 24 h a 50°C en solución NDS conteniendo 0,5mg/ml de proteinasa K (Invitrogen). Finalmente, se realizaron seis lavados con TE a intervalos de 30 min, tres a 50°C y tres a temperatura ambiente. Los bloques fueron conservados en EDTA 50 mM pH 8,0 a 4°C.

La separación de las bandas cromosómicas se realizó mediante electroforesis de campo pulsado en un gel de agarosa al 1% en TBE 0,5x, utilizando un aparato CHEF DRIII (Bio-Rad), con el siguiente programa: el primer bloque con un pulso de 60 s por 12 h y el segundo de 120 s por 12 h, ambos a 6 V/cm, 14 °C, y un ángulo de 120°.

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de sondas compuestas de DNA a través del desarrollo de una librería genómica de una cepa autóctona de *S.cerevisiae*.

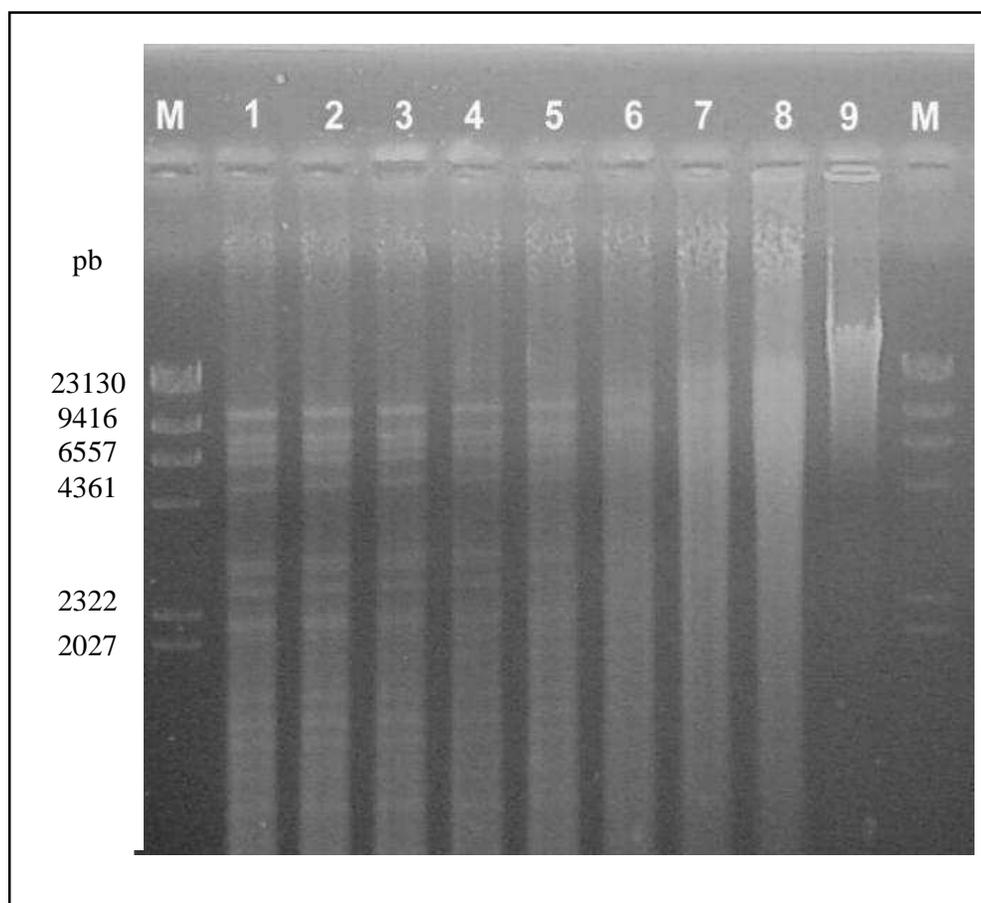
5.1.1. Construcción de librería genómica de la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae* L-16.

Con el fin de obtener fragmentos de DNA repetitivo directamente desde DNA genómico de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* se construyó una librería genómica. Esta librería fue construida en el vector LambdaGem a partir de DNA de la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae* L-16.

Para evitar la clonación de una secuencia más de una vez dentro de un mismo clon, se seleccionaron fragmentos de digestión sobre los 9 kb y bajo los 20 kb que es el límite de clonamiento del vector utilizado. Para esto se establecieron las condiciones óptimas de reacción con una enzima de corte frecuente, en este caso *Bsp143I*, variando la concentración de ésta entre 0 y 1 unidad por ug de DNA (Figura 1). La concentración óptima seleccionada fue de 0.0075 U/ug de DNA. Posteriormente, la reacción fue escalada a 10ug de DNA, manteniendo las proporciones del resto de los componentes. Esta reacción fue verificada por electroforesis y el rango de fragmentos de DNA requerido fue escindido del gel y purificado.

Figura 1. Determinación de condiciones de digestión parcial de DNA de la cepa autóctona de *Saccharomyces cerevisiae* L-16.

Electroforésis en gel de agarosa al 1% visualizado por tinción en Bromuro de etidio. La digestión del DNA se llevó a cabo utilizando concentraciones desde 0 hasta 1 unidades (U) de la enzima *Bsp143I* por μg de DNA, por 3h a 37°C. Carril 1, 1U; carril 2, 0.5U; carril 3, 0.25U; carril 4, 0.125U; carril5, 0.06U; carril 6, 0.03U; carril 7, 0.015U; carril 8, 0.0075U; carril 9, 0U. M, DNA de fago Lambda digerido con enzima *HindIII* como marcador de peso molecular, cuyos tamaños de fragmentos en pares de bases (pb) se indican a la izquierda de la figura.



En primera instancia se utilizó como huésped para amplificar la librería genómica la cepa de *E.coli* LE392, con la cual se observó una baja eficiencia de clonación (1×10^2 pfu/ml). Debido a que se ha reportado que ciertos clones con DNA recombinante eucarionte son incapaces de replicarse en huéspedes de genotipo *rec+*, como es la cepa LE392 (Nader y cols., 1985), nosotros empleamos como segunda alternativa para amplificar la librería, la cepa KW251, obteniendo un título viral de 2×10^6 pfu/ml. El control de empaquetamiento se amplificó en la cepa LE392 con un título viral de 1×10^8 pfu/ml.

Con el fin de verificar el tamaño de inserto, nueve clones generados del proceso de titulación fueron tomados al azar, incluyendo uno de la placa control, extraído su DNA y digerido con la enzima *Bam*HI (Figura 2). Luego de la digestión se obtuvieron 2 fragmentos de 20kb y 9kb correspondientes a los brazos izquierdo y derecho, respectivamente, del fago lambda utilizado como vector de clonamiento. El fragmento intermedio, correspondiente a los fragmentos de DNA clonado de *S. cerevisiae*, mostró un tamaño promedio de 15kb.

La probabilidad de encontrar una secuencia de DNA representada en la librería puede ser calculada por la ecuación: $\ln(1-P)/\ln(1-f)=N$, donde
N= número necesario de recombinantes.
P=probabilidad de que la secuencia se encuentre en la librería.
f= proporción del genoma representado en un recombinante.

El tamaño del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* es de 12 Mb, sin embargo, la cepa L-16 empleada para construir la librería ha mostrado evidencias de ser diploide. Estas evidencias se basan en resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo en los cuales se han obtenido esporas con una viabilidad que supera el 90%, por lo que el tamaño del genoma diploide sería de 24 Mb.

Con un tamaño de inserto promedio de 15kb y un 99% de encontrar una

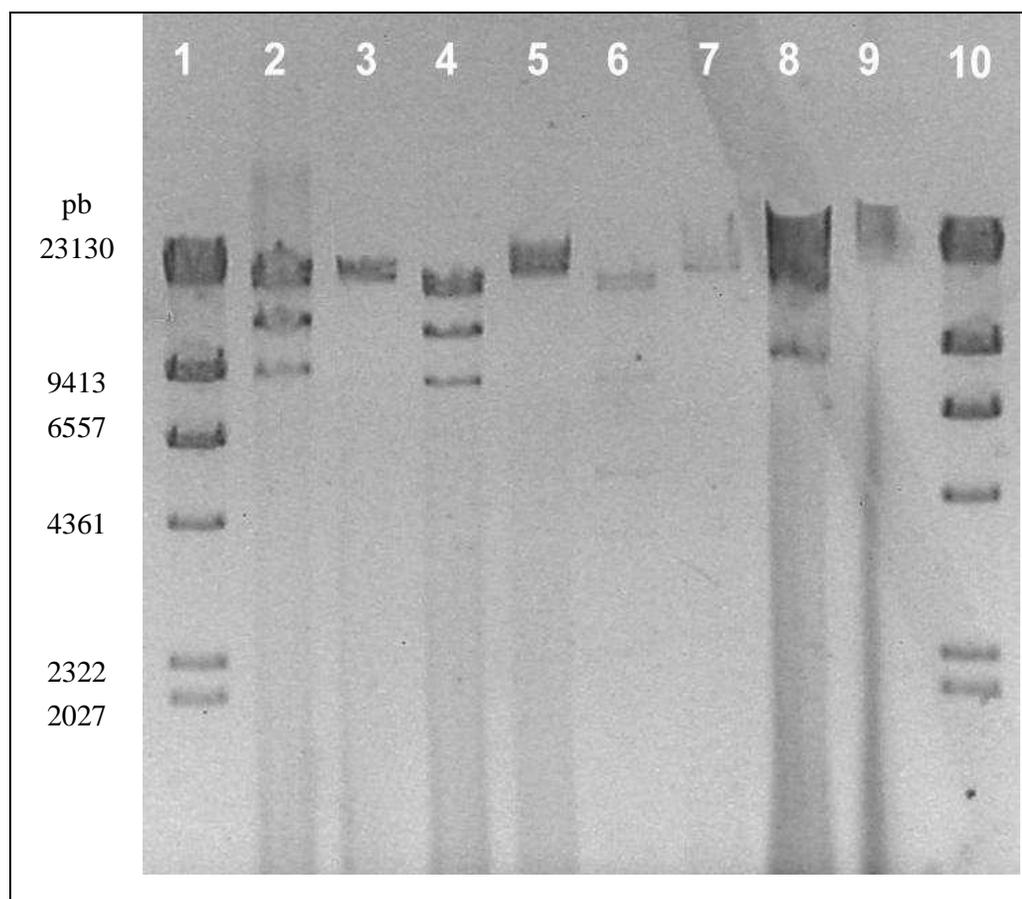
secuencia en la librería, el tamaño de la genoteca debe ser de:

$$\ln(1-0.99)/\ln(1-(1.5 \times 10^4 / 2.4 \times 10^7)) = 7.4 \times 10^3 \text{ recombinantes.}$$

Un total de 30 placas de petri fueron generadas, con una densidad de aproximadamente 400 placas de lisis cada una, obteniendo una genoteca de aproximadamente 12000 clones, lo que representaría 1.6 veces el genoma diploide de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 2. Evaluación del tamaño promedio de los insertos

Electroforésis en gel de agarosa al 1% de un ejemplo de análisis de restricción de tres clones recombinantes de la librería genómica en fago lambda de la cepa L-16. Carril 1 y 10: DNA fago λ digerido con la enzima *Hind*III como marcador de peso molecular. Carriles 3, 5 y 7: DNA obtenido a partir de placas de lisis, sin digerir. Carriles 2, 4 y 6: DNA obtenido a partir de placas de lisis digerido con la enzima *Bam*HI. Carril 8: DNA control de fago lambda digerido con *Bam*HI Carril 9: DNA control de fago λ sin digerir.



5.1.2. Identificación de clones de rRNA.

Todos los genomas eucariontes contienen genes repetitivos que codifican para RNA ribosomal (rRNA), con secuencias de alta homología y regiones intergénicas, agrupados en uno o dos cromosomas. El genoma de *Saccharomyces cerevisiae* posee aproximadamente 150 copias del gen para rRNA, que se encuentran repetidos en tándem en el cromosoma XII. Por este motivo es necesario descartar a los clones portadores de secuencias ribosomales quienes no aportan gran información para diferenciar aislados estrechamente relacionados.

Con este fin se diseñaron un par de partidores para la amplificación por PCR de una región de 300 pb de la secuencia que codifica para rRNA 26S (tabla 2). El producto de la reacción de PCR fue secuenciado y comparado mediante BLAST obteniéndose un 95% de identidad en 243pb con el gen de rRNA 26S de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 3). Este producto fue hibridizado contra las placas de lisis obtenidas en el punto 5.1.1 transferidas previamente a una membrana de nylon, descartándose todos aquellos clones que presentaron señal con esta sonda (figura 4).

Figura 3. Verificación de sonda 26S mediante secuenciación.

Alineamiento de la secuencia amplificada con los partidores diseñados (sbjct) con la secuencia de rDNA 26S de *Saccharomyces cerevisiae* (26S) mediante el programa Blast.

```

>gb|AY601161.1| Saccharomyces cerevisiae strain 25760 26S ribosomal RNA
gene,
      partial sequence
      Length = 559

Score = 349 bits (176), Expect = 3e-093
Identities = 233/243 (95%), Gaps = 3/243 (1%)
Strand = Plus / Minus

26S  : 42  gcggcaaaagctcaaatttgaatctggtcccttcggtgcccgagttgtcatttggcgtc 101
      |||
Sbjct: 524 gcggcaaaagctcaaatttgaatctggtaccttcggtgcccgagttgtaattggaga- 466

26S  : 102 gggcaactttggggcggttccttgtctctggttccttggaacaggccgtcatagtcgggtg 161
      |||
Sbjct: 465 gggcaactttggggcggttccttgtctatggttccttggaacaggacgtcataga-ggggtg 407

26S  : 162 agaatcccg-gtggcgaggagtgcggttctttgtaaagtgccttcgaagagtcgagttgt 220
      |||
Sbjct: 406 agaatcccggtggtggcgaggagtgcggttctttgtaaagtgccttcgaagagtcgagttgt 347

26S  : 221 ttgggaatgcagctctaagtgggtggtaaattccatctaagctaaatattggcgagaga 280
      |||
Sbjct: 346 ttgggaatgcagctctaagtgggtggtaaattccatctaagctaaatattggcgagaga 287

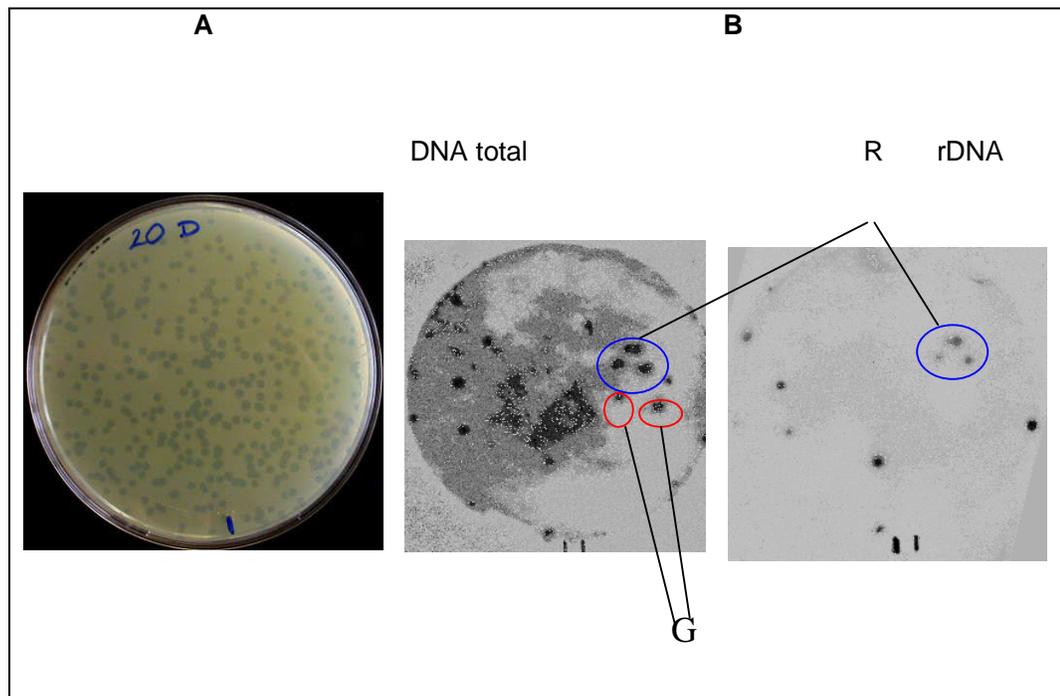
26S  : 281 ccg 283
      |||
Sbjct: 286 ccg 284

```

Figura 4. Identificación de clones portadores de secuencias repetitivas de DNA.

Hibridización de clones de la genoteca de L-16 con sondas de DNA repetitivo.

(A), fotografía de placa Petri conteniendo placas de lisis de la genoteca construida en fago lambda. (B), placas bioluminiscentes de duplicados de membranas de nylon conteniendo placas de lisis de la genoteca de L-16, e hibridizadas con DNA total y rDNA. R, clones ribosomales; G, clones de DNA genómico repetitivo.



5.1.3. Identificación de clones de DNA repetido

Una vez identificados los clones portadores de secuencias de DNA ribosomal se procedió a identificar aquellos clones portadores de secuencias genómicas repetidas. Para esto se hibridizó una réplica de la membrana de Nylon empleada en el punto anterior con DNA genómico total.

Nueve clones de la genoteca, denominados Rep1 a Rep9, presentaron altas señales de hibridización contra DNA genómico total y no presentaron homología con DNA ribosomal (figura 4).

Con el fin de caracterizar los clones aislados de la librería genómica se procedió a la secuenciación de cada clon, y las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron comparadas entre ellas y mediante BLAST con las bases de datos disponibles.

De estos resultados se descartaron los clones Rep2, Rep5, Rep6, Rep7, Rep8 y Rep9 por ser homólogos entre ellos (figura 5) y con el plásmido 2 μ de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6). Este plásmido de 6.3kb presenta cerca de 60 copias por célula con una maquinaria compleja de replicación, con una alta fidelidad en la propagación, por esto último su utilidad en estudios de diferenciación de cepas es muy baja, por lo que se decidió descartar estos clones del estudio.

Figura 5. Alineamiento de las secuencias parciales de clones repetitivos Rep2, Rep5, Rep6, Rep7, Rep8 y Rep9.

Alineamiento de las secuencias parciales de los clones Rep2, Rep5, Rep6, Rep7, Rep8 y Rep9 correspondientes a los primeros 400pb de los extremos 5' de cada inserto.

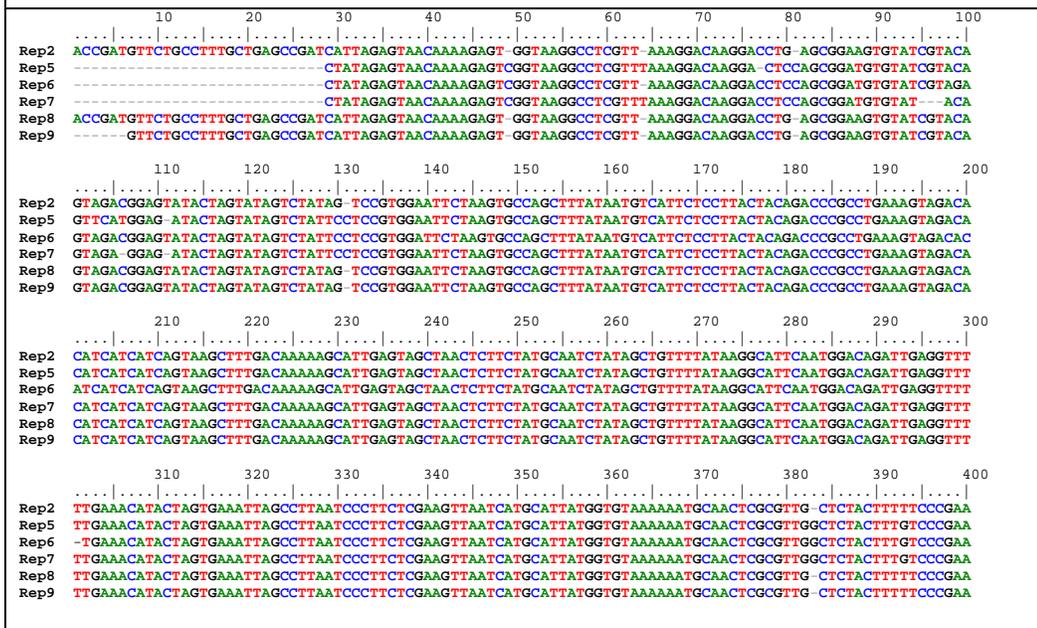


Figura 6. Análisis de secuencias de clon Rep2

Alineamiento de la secuencia parcial del clon Rep2 con secuencia del plásmido 2 μ de *Saccharomyces cerevisiae*. Rep2, secuencia del clon Rep2; 2 μ , secuencia dada por la base de datos correspondiente al plásmido 2 micras.

```

>gb|J01347.1|YSCPLASM Saccharomyces cerevisiae 2 micron circle plasmid,
complete sequence
      Length = 6318
Score = 1283 bits (647), Expect = 0.0
Identities = 735/756 (97%), Gaps = 3/756 (0%)
Strand = Plus / Minus
Rep2 : 10  ctgcctttgctgagc-cgatcattagagtaacaaaagagtggaaggcctcgtaaagga 68
      |||
2 $\mu$  : 2537 ctgcctttgctgagctggatcaatagagtaacaaaagagtggaaggcctcgtaaagga 2478
Rep2 : 69  caaggacctgagcggagtgatcgtacagtagacggagtatactagtatagtctatagt 128
      |||
2 $\mu$  : 2477 caaggacctgagcggagtgatcgtacagtagacggagtatactagtatagtctatagt 2418
Rep2 : 129 ccgtggaattctaagtgccagctttataatgtcattctccttactacagaccgcctgaa 188
      |||
2 $\mu$  : 2417 ccgtggaattctaagtgccagctttataatgtcattctccttactacagaccgcctgaa 2358
Rep2 : 189 agtagacacatcatcatcagtaagccttgacaaaagcattgagtagctaactcttctat 248
      |||
2 $\mu$  : 2357 agtagacacatcatcatcagtaagccttgacaaaagcattgagtagctaactcttctat 2298
Rep2 : 249  gcaatctatagctgttttataaggcattcaatggacagattgaggtttttgaaacatact 308
      |||
2 $\mu$  : 2297 gcaatctatagctgttttataaggcattcaatggacagattgaggtttttgaaacatact 2238
Rep2 : 309  agtgaaattagccttaatcccttctcgaagttaatcatgcattatggtgtaaaaaatgca 368
      |||
2 $\mu$  : 2237 agtgaaattagccttaatcccttctcgaagttaatcatgcattatggtgtaaaaaatgca 2178
Rep2 : 369  actcgcgttgctctactttttcccgaatttccaataacgcagctggggtgattgctcgat 428
      |||
2 $\mu$  : 2177 actcgcgttgctctactttttcccgaatttccaataacgcagctggggtgattgctcgat 2118
Rep2 : 429  ttcgtaacgaaagttttgttttgtaaaaaaccgcgaaaaccttctgtaacagatagatttt 488
      |||
2 $\mu$  : 2117 ttcgtaacgaaagttttg-tttataaaaaaccgcgaaaaccttctgtaacagatagatttt 2059
Rep2 : 489  tacagcgtgatatacaatgacatcagctgtaatggaaaataactgaaatatgaatggcg 548
      |||
2 $\mu$  : 2058 tacagcgtgatatacaatgacatcagctgtaatggaaaataactgaaatatgaatggcg 1999

```


El alineamiento de las secuencias parciales de los restantes tres clones (Rep1, Rep3 y Rep4) mostró un alto grado de similitud entre ellos (figura 7). Según la comparación de estas secuencias con la secuencia del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* disponible en www.yeastgenome.org, esta secuencia correspondería a una región que comprende 15 kb del cromosoma VIII (Figura 8). En ésta se encuentran 4 genes de función conocida (KEL1, PEX18, DNA2, SOL3), los cuales también presentan homología con otras regiones del genoma, específicamente en el cromosoma VII, ampliando el número de blancos posibles de la sonda.

Figura 7. Alineamiento de las secuencias parciales de clones repetitivos Rep1, Rep3 y Rep4.

Alineamiento de las secuencias parciales de los clones Rep1, Rep3 y Rep4 correspondientes a los primeros 400pb de los extremos 5' de cada inserto.

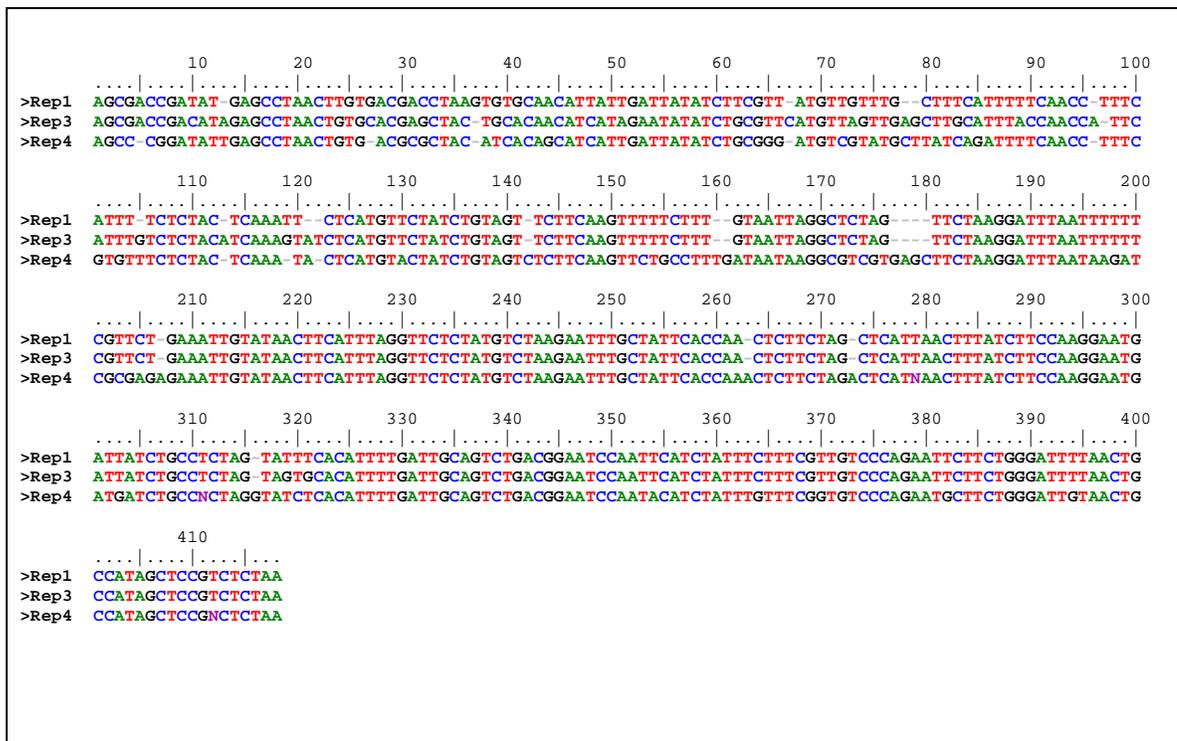
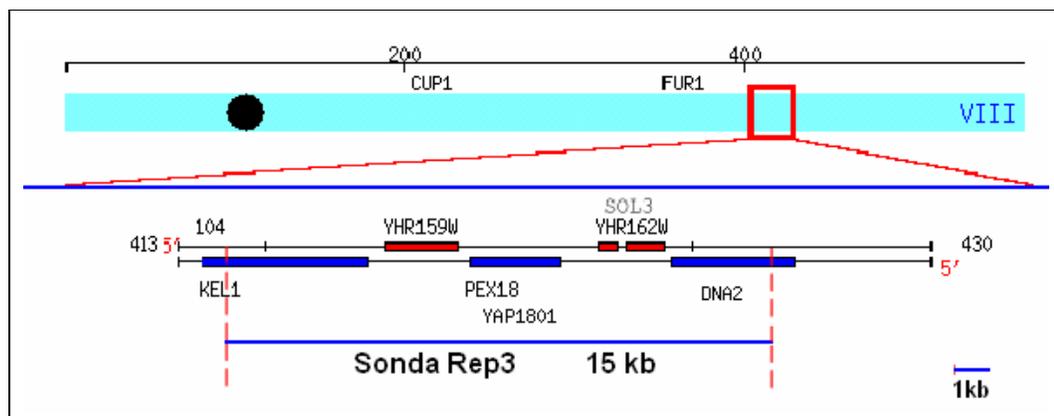


Figura 8. Esquema de la región cromosómica homóloga a la sonda Rep3 obtenida desde la librería genómica.

Diagrama de la región del brazo R del cromosoma VIII de *Saccharomyces cerevisiae* donde se encuentra ubicada la región que abarca la sonda Rep3. Demarcada en un recuadro rojo se encuentra la zona correspondiente a los 15kb homólogos a la sonda Rep3, que son mostrados en aumento en la parte inferior de la figura.



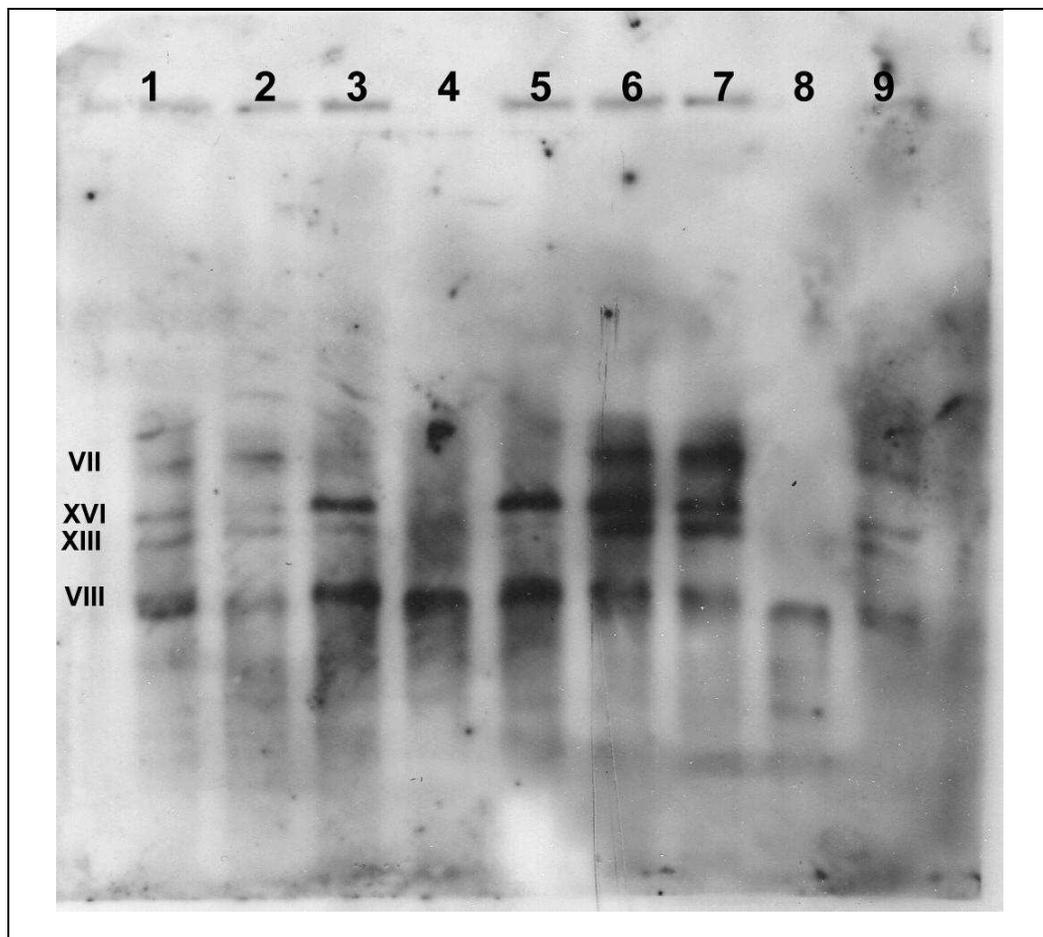
5.1.4. Análisis de la sonda Rep3 mediante hibridización.

Con el fin de corroborar la presencia de la sonda Rep3 en los cromosomas descritos en la base de datos se realizó un análisis de cariotipo electroforético a 9 cepas de distinto origen geográfico.

La hibridización de la sonda Rep3 sobre el cariotipo de estas cepas reveló homología de esta secuencia con los cromosomas VII, VIII, XIII y XVI. Estos dos últimos cromosomas no eran esperados a partir de los análisis realizados mediante Blast en la base de datos, lo que indica la posibilidad de ocurrencia de otras secuencias homologas en estos cromosomas además de las existentes en los cromosomas VII y VIII. Este análisis de hibridización reveló, además, diferencias en la distribución de las secuencias homólogas entre distintas cepas analizadas. Cinco cepas mostraron un idéntico perfil de hibridización, y únicamente la señal correspondiente al cromosoma VIII se encontró presente en todos los aislados (figura 9).

Figura 9. Análisis Southern del cariotipo electroforético de cepas vínicas con la sonda Rep3.

Placa bioluminiscente del cariotipo electroforético de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* hibridizadas con la sonda Rep3. Los cromosomas de las cepas analizadas fueron separados en gel de agarosa al 1% durante 24h a 6V/cm, transferidos a una membrana de Nylon e hibridizados con la sonda Rep3. Carriles 1, L-16; 2, L-20; 3, L-22; 4, L-531; 5, L-532; 6, L-1321; 7, L-1333; 8, L-1334; 9, L-1143. A la izquierda de la figura se indica el número del cromosoma correspondiente a cada señal.



5.2. Obtención y análisis de secuencias de DNA repetitivo que puedan ser utilizadas como sondas en experimentos de RFLP.

Mediante el análisis de la secuencia completa del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, a través de la base de datos de esta levadura (www.yeastgenome.org), se estudiaron posibles secuencias candidatas a ser utilizadas como sondas de DNA repetitivo. De este análisis se obtuvieron 3 secuencias repetitivas a través del genoma de la levadura, una correspondiente al repetido terminal que flanquea los transposones Ty1 y Ty2, δ (delta), y otras 2 correspondientes a repetidos subteloméricos X' e Y'. Para cada una de estas secuencias se diseñaron partidores específicos para su amplificación por PCR.

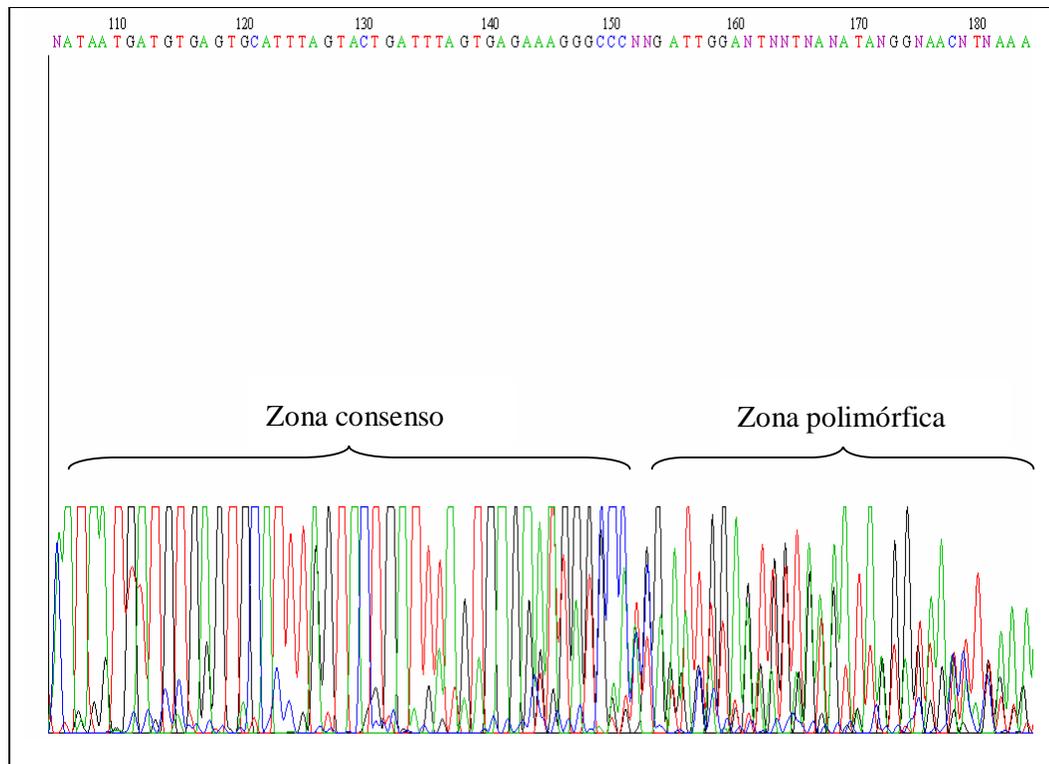
Los partidores para la amplificación de la sonda δ fueron diseñados luego de un alineamiento múltiple de secuencias para obtener una sonda representativa del elemento δ distribuido en todo el genoma, el que presenta cerca de 200 copias.

Para conseguir la amplificación de la región X' también fue necesario realizar un alineamiento de las distintas secuencias y establecer una región consenso sobre la cual construir los partidores. Esto se debe a que la composición nucleotídica de esta región presenta variaciones de un cromosoma a otro. Por este motivo, era de esperar que el producto de PCR a obtener estaría compuesto de todos los tipos de secuencias X' del genoma, lo que se comprobó al secuenciar el producto de PCR y analizar el cromatograma de secuenciación (figura 10).

La región Y' ha sido descrita en *S.cerevisiae* (Louis y cols., 1990, Louis y cols., 1992, Louis y cols., 1994), sin embargo ninguno de estos estudios ha sido realizado sobre levaduras de interés enológico. En el presente trabajó, no fue posible obtener amplificadas de esta región a través de PCR con los partidores diseñados.

Figura 10. Análisis de la secuencia de la región amplificada por el partidor X'.

Extracto del cromatograma de la secuencia nucleotídica de la sonda X' amplificada por PCR, compuesta por zonas consenso y zonas polimórficas.



Otras secuencias repetitivas presentes a través del genoma de *S.cerevisiae* incluyen a familias de multigenes y transposones.

Se emplearon dos sondas cuyo blanco son genes repetitivos (PAU6 y ERR1) y una secuencia con blanco hacia el LTR ω 1 del transposón Ty5. Estas tres sondas han sido clonadas y utilizadas en análisis de inferencia evolutiva a través del complejo *sensu stricto* (Liti y cols, 2005), y en el presente trabajo fueron amplificadas por PCR desde los plásmidos de clonamiento.

5.3. Evaluación de las sondas para la diferenciación de cepas genéticamente similares.

17 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (tabla 1), fueron analizadas de acuerdo a su patrón de RFLP dado por las distintas sondas utilizadas (tabla 2). Algunos de estos aislados que presentaron alta similitud en sus perfiles de DNA fingerprinting, ya sea por electroforesis de campo pulsado o digestión de su DNA mitocondrial, fueron diferenciados mediante el uso de sondas de DNA repetitivo (figuras 11 y 12), como se describe más adelante.

Entre las cepas con similar patrón de digestión del DNA mitocondrial (figura 11A), las cepas L-20 y L-22 mostraron igual patrón de hibridización con todas las sondas empleadas, corroborando el resultado obtenido a través de RFLP del DNA mitocondrial. Lo mismo se observó con las cepas L-79 y L-80. Otras dos cepas analizadas, L-531 y L-532, presentaron diferencias en sus patrones de hibridización, contrastando con el resultado del RFLP del DNA mitocondrial, donde se presentaban como idénticas. La hibridización con la sonda pEL50 (figura 11B) mostró un promedio de tres señales de hibridización por cada aislado. Si bien, esto representa una muy baja complejidad para análisis de similitud, se logró diferenciar los distintos aislados estudiados. Una mayor complejidad se observó con la sonda X', aunque solo se diferenció las cepas L-531 y L-532 (figura 11C) al igual que con el resto de las sondas.

Figura 11. Análisis de perfiles de hibridación de aislados altamente relacionados de acuerdo a su perfil de restricción del DNA mitocondrial.

Comparación de los patrones de RFLP del mtDNA (A) y RFLP con distintas sondas (B a F) de tres pares de cepas vínicas similares. En A, electroforésis en gel de agarosa al 1% de productos de la digestión con *HinfI*. B a F, análisis Southern con pEL50 (B), X' (C), pRED552 digerido con *BamHI*(D), pRED556 (E), y delta (F). Para los análisis Southern el DNA fue digerido con *BamHI* y *XbaI* (B y C), *BamHI* (D) y *XbaI* (E y F). Carril 1, L-20; Carril 2, L-22, Carril 3, L-79, Carril 4, L-80, Carril 5, L-531, Carril 6, L-532.

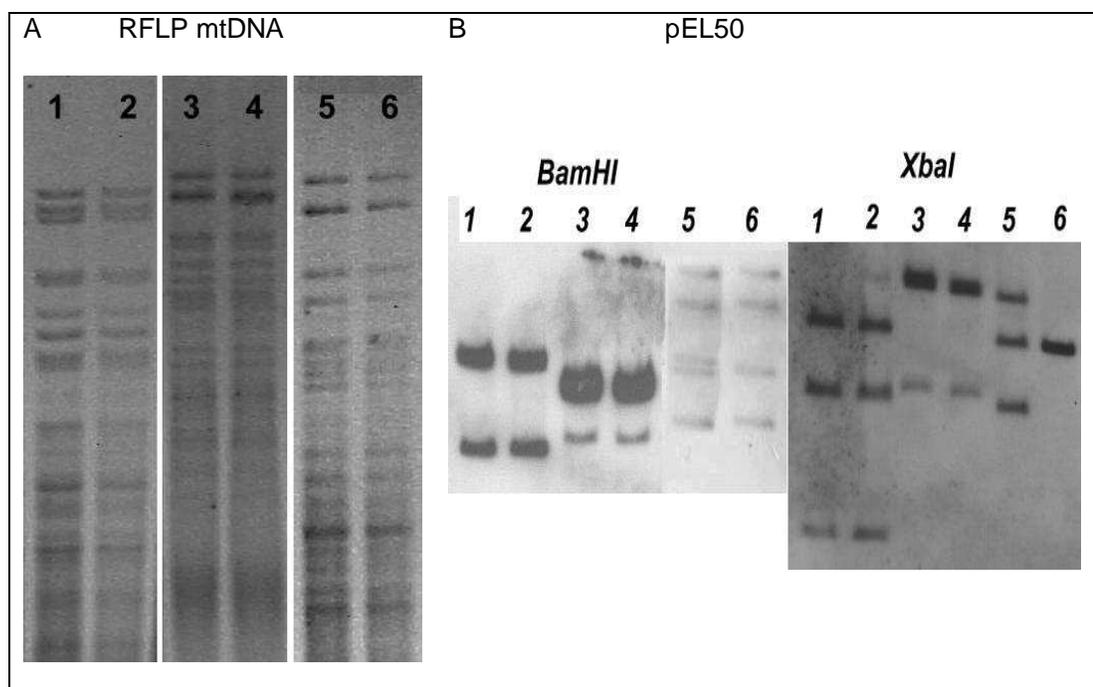
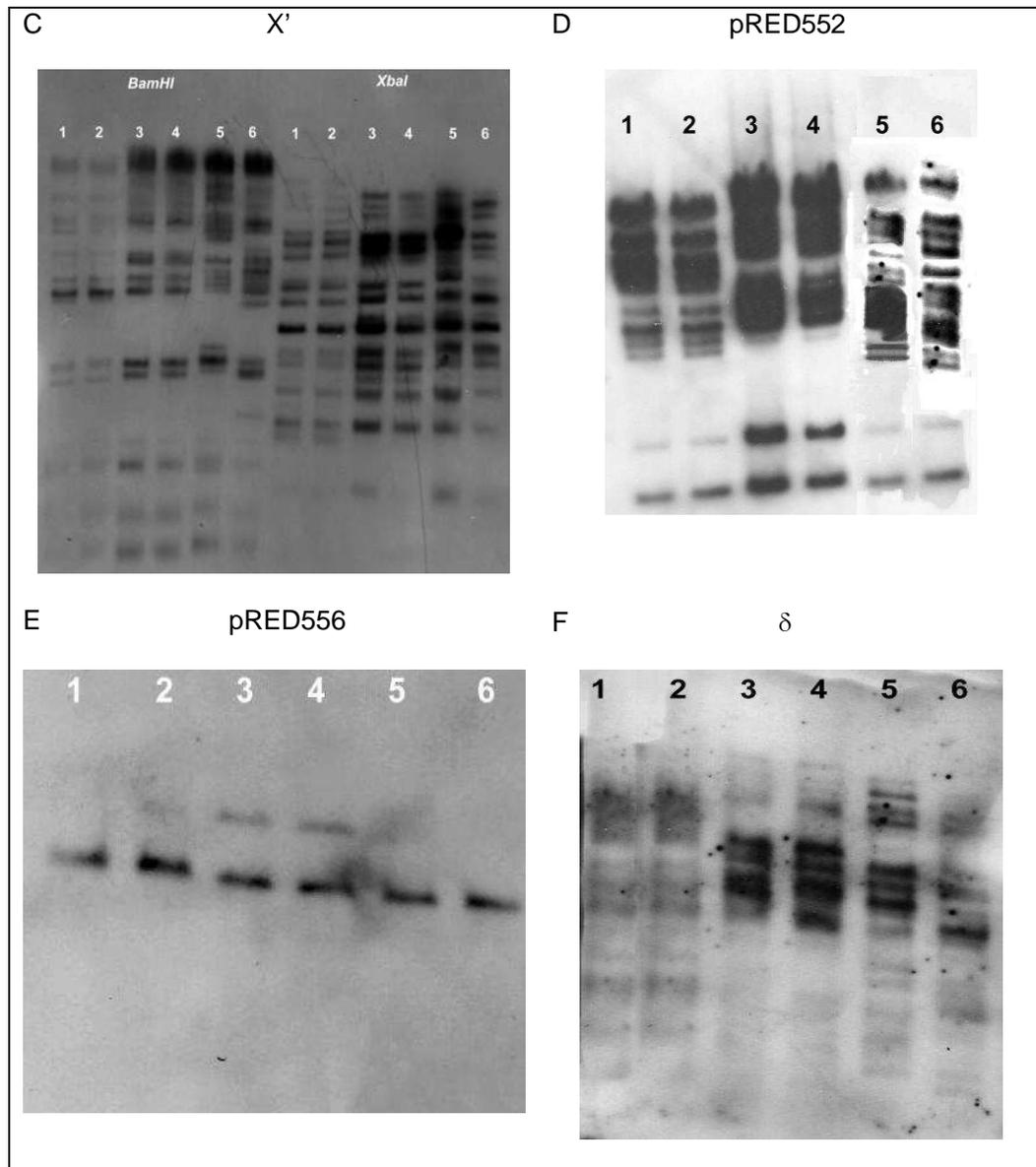


Figura 11.- (Continuación) Análisis de perfiles de hibridación de aislados altamente relacionados acorde a su perfil de restricción mitocondrial.



La hibridización de cuatro cepas con similar cariotipo electroforético (figura 12A) con la sonda pEL50 generó 2 patrones idénticos correspondientes a las cepas L-169 y L-494, mientras que las restantes dos cepas (L-165 y L-531) presentaron patrones distintos (figura 12B). Donde se logró un mayor poder resolutivo fue con la sonda X', donde se obtuvieron cuatro patrones distintos para las cuatro cepas analizadas (figura 12C), resultado que se repite con las sonda pRED552 (figura 12D) y delta (figura 12F).

La sonda pRED556 presentó la más baja complejidad dentro de los análisis y también el menor poder resolutivo, presentando patrones idénticos para la mayoría de los aislados estudiados (figuras 11E y 12E) incluso para aquéllos que a través las sondas anteriores se mostraban como distintos.

Figura 12. Análisis de perfiles de hibridación de aislados altamente relacionados acorde a su cariotipo electroforético.

Comparación de los patrones de cariotipo electroforético (A) y RFLP con distintas sondas (B a F) de cuatro cepas vínicas similares. En A, electroforesis de campo pulsado de los cromosomas de cuatro cepas vínicas. B a F, análisis Southern con pEL50 (B), X' (C), pRED552 digerido con *Bam*HI(D), pRED556 (E), y delta (F). Para los análisis Southern el DNA fue digerido con *Xba*I (B, C, E y F), *Bam*HI (D). Carril 1, cepa L-165; carril 2, cepa L-169; carril 3, cepa L-494; carril 4, cepa L-531.

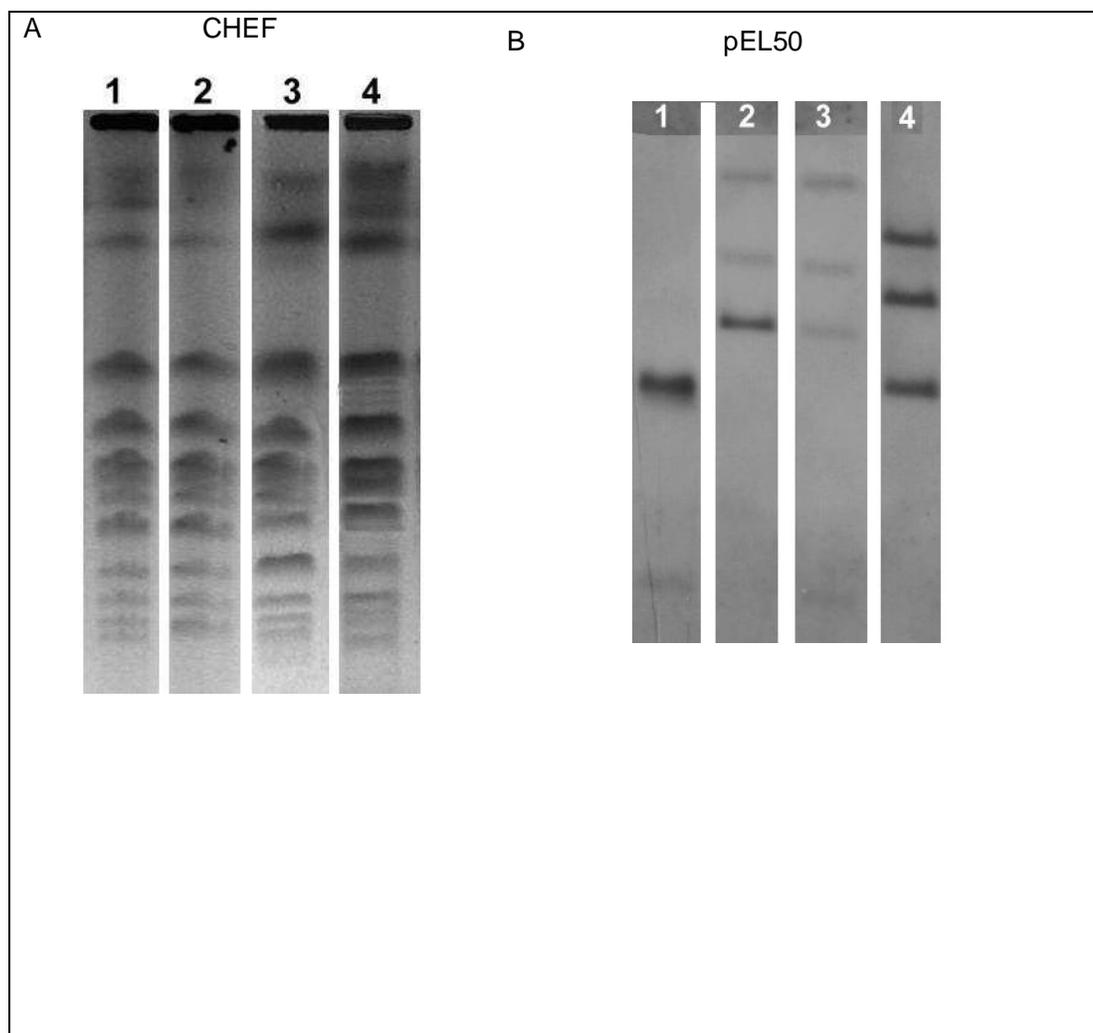
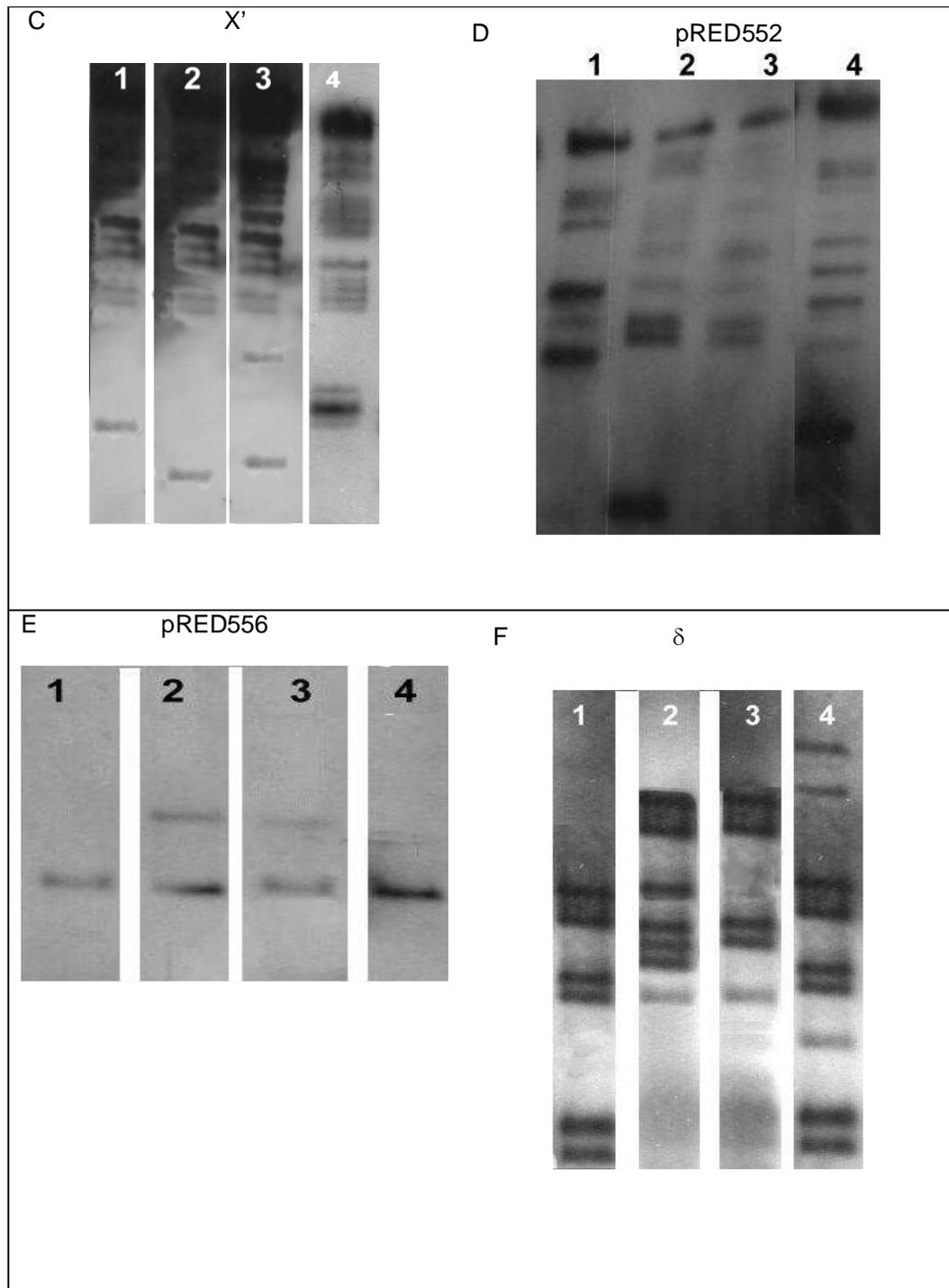


Figura 12.- (Continuación) Análisis de perfiles de hibridación de aislados altamente relacionados acorde a su cariotipo electroforético.



La figura 13A muestra el patrón de hibridización de la sonda pEL50 con 6 cepas de uso comercial y una cepa argentina. Esta hibridización generó tres patrones idénticos correspondientes a las cepas L-1323, L-1334 y L-1335, siendo los dos primeros de la misma localidad (Champagne). Sin embargo, otras dos cepas (L-1333 y L-1321) presentan el mismo patrón de hibridización aunque su lugar de aislamiento dista en muchos kilómetros; mientras la cepa L-1321 fue aislada en la localidad de Champagne, Francia, la cepa L-1333 fue aislada en el valle de Casablanca, Chile, y ha sido destacada comercialmente como una cepa nativa de Chile. La cepa L-1321, además, se encuentra clasificada como *Saccharomyces bayanus*, y estudios a través del complejo *sensu stricto* no han encontrado en el grupo *bayanus* el gen ERR1 que es el blanco de la sonda pEL50 (Liti y cols, 2005), por lo que nuestro resultado apoyaría que existe una clasificación errónea.

El resultado anterior se confirma con la sonda X' que también se encuentra ausente en la especie *bayanus*, y también se obtuvo hibridización por las dos cepas comerciales antes mencionadas (figura 13B). Esta sonda presentó el mayor grado de complejidad dentro de las sondas estudiadas, pero el grado de diferenciación fue prácticamente el mismo.

A través de estos análisis, fue posible diferenciar todas las cepas que las metodologías de cariotipo electroforético y RFLP del mtDNA presentaban como distintas, es decir, no se encontraron incongruencias entre los resultados obtenidos en trabajos anteriores (Gac S., 2004; Vásquez C., 2005) y los realizados en el presente estudio.

Figura 13. Análisis RFLP de cepas comerciales.

DNA de seis cepas de uso comercial digerido con la enzima *Bam*HI y una cepa aislada en Argentina fue hibridizado con las sondas pEL50 (A), X' (B), pRED552 (C), pRED556 (D) y δ (E). Carril 1, cepa L-1321; carril 2, cepa L-1323; carril 3, cepa L-1333; carril 4, cepa L-1334; carril 5, cepa L-1335; carril 6, cepa L-1343; carril 7, cepa L-981.

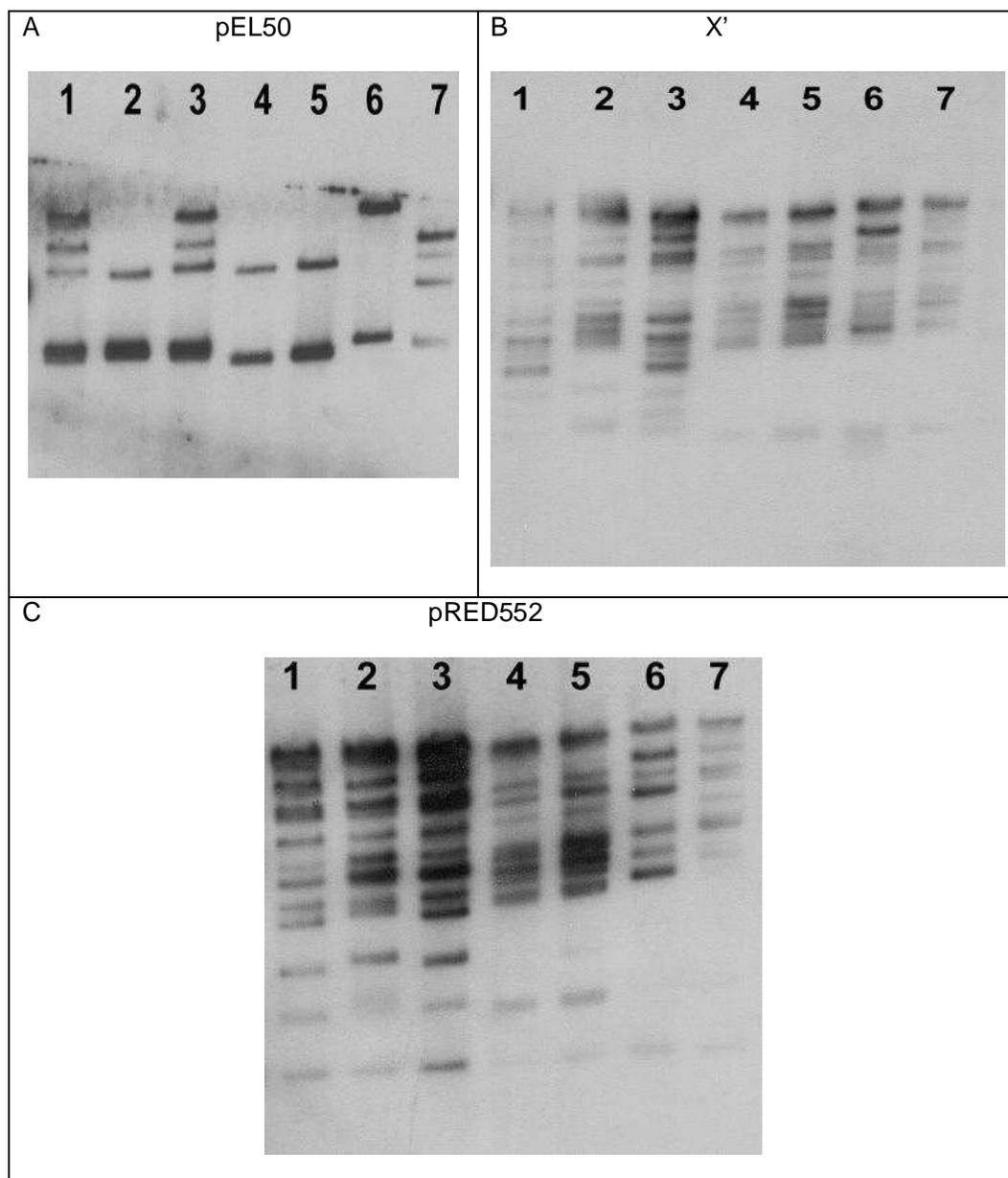
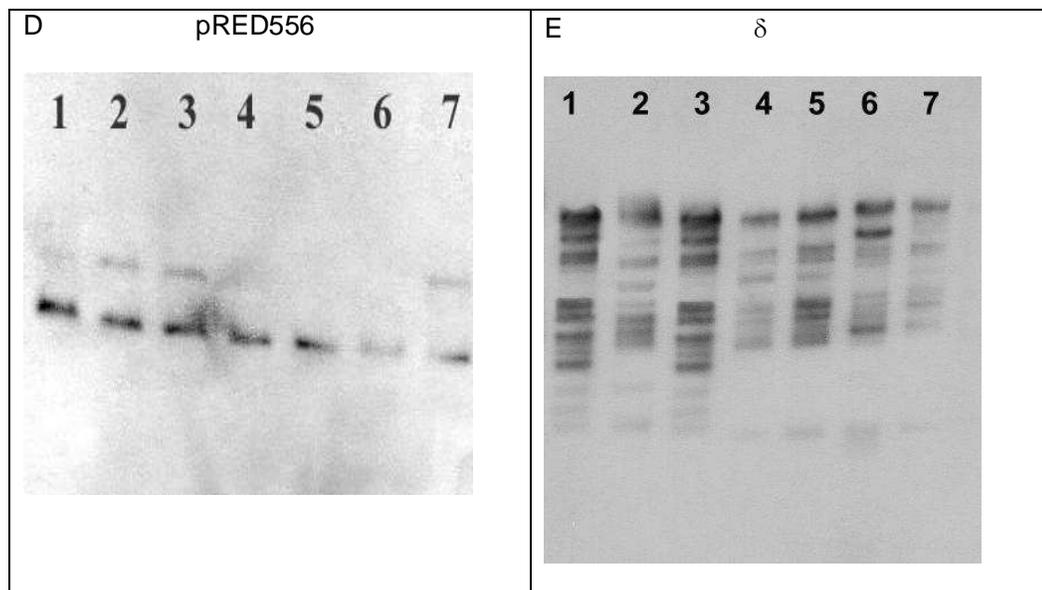


Figura 13. (Continuación) Comparación de patrones e hibridación de cepas de uso comercial.



La comparación del aislado autóctono L-16 con otros aislados nativos mostró claras diferencias en su patrón de hibridización (figura 14), incluso con la sonda pRED556, con la cual el resto de los aislados mostraban el mismo perfil (figura 14C).

Finalmente, el análisis con la sonda compuesta obtenida desde la librería genómica (figura 15) mostró un buen grado de diferenciación, aunque algo menor que con las sondas de mayor complejidad. Esta sonda además generó tres bandas comunes para todos los aislados, a excepción de la cepa de laboratorio YNN295 que solo presentó dos señales de hibridización. Este resultado contrasta con el obtenido en el análisis cromosomal de la sonda (figura 9), donde se encontró la presencia de la sonda Rep3 en 4 cromosomas distintos.

Figura 14. Patrones de hibridación de la Cepa autóctona L-16 comparada con otros aislados nativos.

La cepa autóctona L-16 fue analizada de acuerdo a su perfil de hibridación luego de ser digerida con *Bam*HI (carril 3) y *Xba*I (carril 4) y se comparó con dos aislados nativos; L-20 (carril 1) y L-79 (carril 2) digeridos con *Xba*I. A, sonda pEL50; B, sonda delta; C, sonda pRED556.

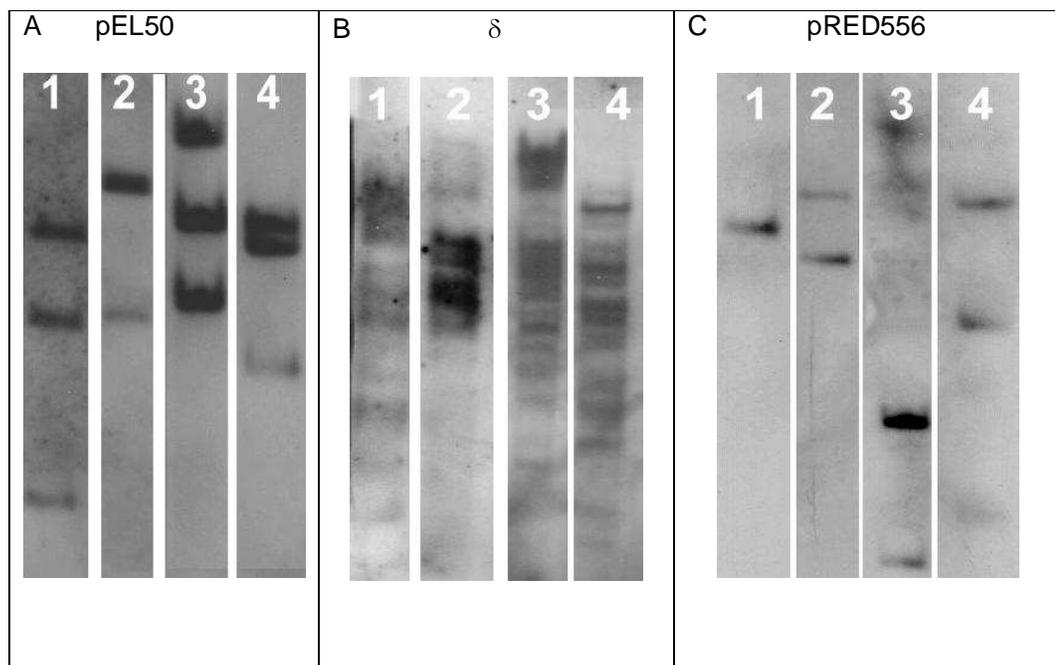
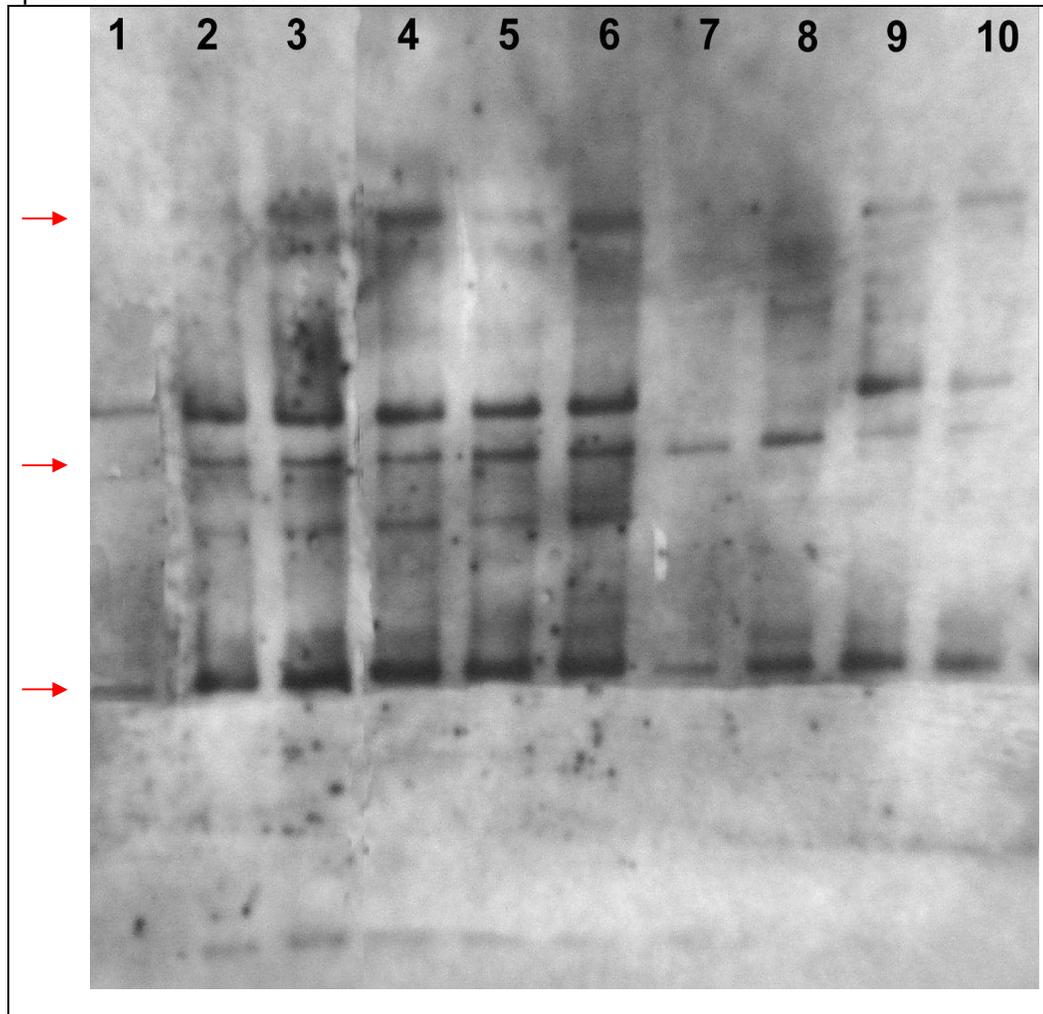


Figura 15. Análisis de 10 cepas de distinto origen con la sonda Rep3.

DNA de diez aislados fue digerido con la enzima *Bam*HI e hibridizado con la sonda Rep3. Carril 1, YNN 295; 2, L-20; 3, L-22; 4, L-1321; 5, L-1323; 6, L-1333; 7, L-1334; 8, L-1335; 9, L-1343; 10, L-981. Las flechas indican las bandas comunes para los distintos aislados.



6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis de polimorfismos mediante sondas de hibridización

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* involucradas en procesos industriales se ven constantemente sometidas a condiciones de *stress*, que pueden resultar en procesos de recombinación, transposición y arreglos cromosomales. Estos cambios a nivel del genoma pueden afectar el número y posición de secuencias de DNA repetitivo, las cuales son potenciales blancos en tipificación mediante RFLP. Dado lo anterior, la diferenciación entre distintos aislados dependerá del nivel de los cambios producidos, dado que pequeñas variaciones pueden ser indetectables para la mayoría de las metodologías de *fingerprinting*.

El corte de una enzima de restricción en sitios específicos del genoma generará un conjunto de bandas, las cuales difieren en tamaño de un aislado a otro dado por las diferencias en las distancias entre los sitios de corte de la enzima, que reflejan el polimorfismo de secuencias entre estas cepas. Sin embargo, dado el poder de resolución que presentan los geles de agarosa, no es posible analizar las diferencias existentes, dado que todos los fragmentos de restricción son visualizados por la tinción empleada. Es por esto que se debe emplear una secuencia de DNA como sonda para que hibridice sobre la o las secuencias en particular que deseamos estudiar.

El tipo de secuencia a utilizar como sonda dependerá del tipo de información que deseemos obtener. Si la sonda utilizada tiene como blanco una secuencia única dentro del genoma, el patrón generado será simple, pudiéndose conseguir algún grado de diferenciación basado en polimorfismos alélicos. Al utilizar, en cambio, una sonda que hibridice en secuencias repetitivas y dispersas a

través del genoma, se podrá identificar variabilidad en distintos aislados en una variedad de *loci* dispersos en el genoma.

6.2. Análisis mediante sondas de DNA repetitivo

Varias son las secuencias candidatas a ser utilizadas como blanco de hibridización de sondas de DNA repetitivo para el análisis en *S.cerevisiae*. Como una primera estrategia de búsqueda investigamos en la base de datos del genoma de *Saccharomyces*, centrándonos en las regiones subteloméricas de cada cromosoma, que se caracterizan por ser zonas altamente variables. De éstas, 2 secuencias X' e Y' han sido ampliamente caracterizadas, encontrándose prácticamente en todos los extremos cromosómicos participando en fenómenos de silenciamiento génico en los telómeros.

El diseño de los partidores para amplificar la sonda X' mediante PCR se realizó sobre la búsqueda de zonas consenso dentro de la secuencia de la región X', dado que la secuencia nucleotídica de ésta región varía de un cromosoma a otro. Si bien, luego de la amplificación se puede realizar el clonamiento del amplificado para obtener una sonda de secuencia única, se optó por trabajar directamente con el producto de PCR, el que nos proporciona un *pool* de distintas secuencias homologas (figura 10) de la región X' que pueden hibridizar con todos los posibles blancos dentro del genoma en estudio. De esta forma se ahorra el tiempo del proceso de clonación, selección y comprobación de la sonda, y se obtiene una alta complejidad en los patrones de hibridización (figuras 11 y 12).

Un proceso similar se diseñó para amplificar la región Y'. Aunque esta región comparte un mayor grado de homología entre los distintos cromosomas, puede estar ausente en algunos de ellos, por lo que el número de blancos posibles es menor. Los estudios de caracterización de la zona Y' han mostrado su presencia dentro de la mayoría de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, pero se ha encontrado que las cepas vínicas pueden carecer de ésta región o estar solo presente en pocos cromosomas, al contrario de otras cepas de uso industrial, como son las cepas de uso panadero, donde pueden presentar copias en prácticamente todos los cromosomas (Codón y cols., 1998). Nuestros resultados avalarían los obtenidos en el trabajo de Codón y cols., pues la amplificación mediante PCR para la zona Y' resultó negativa.

Las dos secuencias terminales de elementos transponibles LTRs δ y ω 1 presentaron distinto poder resolutivo para discriminar entre los distintos aislados analizados (figuras 11E, 11F, 12E y 12F). El mayor grado de complejidad obtenido por δ se debe a que éste LTR corresponde a todos los repetidos terminales de los transposones Ty1 y Ty2, con más de 200 copias descritas en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que ω (LTR de Ty5) solo presenta 8 copias. La diferencia también recae en el diseño de la sonda, dado que la sonda para ω (pRED 556) ha sido construida a partir de la secuencia ω 1, correspondiente a la copia del cromosoma III del transposón Ty5 (Liti y cols, 2005), mientras que la sonda δ fue diseñada en el presente estudio a través de un alineamiento múltiple de secuencias para obtener una sonda representativa del elemento δ distribuido en todo el genoma. Esto convierte a la sonda δ en una mejor herramienta en análisis de *fingerprinting* que la sonda ω 1, con más blancos posibles, generando un patrón de mayor complejidad, capaz de entregar mayor información para estudios de relaciones genéticas.

Nuestros resultados sugieren, entonces, que la sonda pRED556 no es útil en estudios de relaciones genéticas, pues no fue capaz de diferenciar ningún aislado, presentando patrones comunes para la mayoría de los aislados, al contrario de la sonda δ , mediante la cual si se logró diferenciar distintos aislados, incluso aquellos que presentaban iguales patrones de cariotipo electroforético y RFLP del mtDNA (figuras 11 y 12).

Las sondas que tienen como blanco las secuencias ERR1 y PAU6, aunque fueron descritas anteriormente (Liti y cols, 2005), solo han sido aplicadas en estudios de inferencia evolutiva y variaciones de estructura cromosomal a través del complejo *sensu stricto*, y no en estudios de variaciones intraespecíficas. ERR presenta 3 copias en el genoma (ERR1, ERR2 y ERR3) y homología con 2 genes (ENO1 y ENO2) generando un patrón de baja complejidad (figuras 11B, 12B, 13A, y 14A). EL gen PAU6, por otro lado, pertenece a una familia de genes de 23 miembros y se encuentra ubicado en la región subtelomérica del brazo derecho del cromosoma XIV, región altamente variable, generando un patrón altamente complejo (figura 11D, 12D, 13C). La utilidad de ambas secuencias como blanco de hibridización varía dependiendo del objetivo que se desee conseguir. En este sentido, ERR1 es útil en estudios de diferenciación simple entre aislados relacionados, mientras que en la construcción de relaciones filogenéticas de aislados altamente relacionados, PAU6 se presenta como una mejor herramienta. Además de estas características, PAU6 se encuentra distribuido a través de todas las especies del complejo *sensu stricto*, no así ERR1 que solo se ha encontrado en *Saccharomyces paradoxus*, *S. cariocanus* y *S. cerevisiae*. Esto último se presenta como posible herramienta de discriminación de especies. Sobre esto, las cepas de

uso comercial L-1321 y L-1333 analizadas en este trabajo han sido clasificadas anteriormente dentro de la especie *bayanus*, sin embargo, fuimos capaces de obtener patrones de hibridación con la sonda ERR1, lo que implicaría una clasificación taxonómica errónea. La secuencia de la zona X' también se ha encontrado ausente en *Saccharomyces bayanus*, y de la misma forma que con ERR1, encontramos hibridación de ambas cepas con esta sonda. Estos resultados sugieren entonces, que ambas cepas corresponderían a *Saccharomyces cerevisiae* y no a *Saccharomyces bayanus*. En la actualidad la cepa L-1333 ha sido recatalogada y se comercializa como *Saccharomyces cerevisiae* variedad *bayanus*, pero la cepa L-1321 sigue comercialmente bajo la designación de especie *bayanus*.

La cepa L-1333 ha sido aislada en el valle de Casablanca, Chile, y ha sido destacada comercialmente como una cepa nativa, mientras que la cepa L-1321 ha sido aislada en Champagne, Francia y es una de las cepas comerciales más ampliamente utilizadas en el mundo. Pese a que los lugares de aislamiento distan en muchos kilómetros, ambas cepas presentaron el mismo patrón de hibridación con todas las sondas empleadas (figura 13). En estudios anteriores (Gac, S. 2004) también han presentado coincidencia en sus perfiles de RFLP del mtDNA y cariotipo electroforético. Esto indicaría que la cepa L-1333 no presentaría un carácter netamente autóctono y estaría altamente relacionada con la cepa francesa L-1321, reafirmando los resultados del trabajo anteriormente mencionado.

Los análisis con las distintas sondas, a excepción de la sonda pRED556, permitió diferenciar las cepas L-531 y L-532 que mediante análisis anteriores (RFLP del DNA mitocondrial) se presentaban como idénticas. Ambos aislados corresponden a aislados nativos de la misma localidad (Pocilla, en Cauquenes) por lo que su idéntico patrón de RFLP del mtDNA haría suponer que corresponden a la

misma cepa, hecho que quedó descartado con nuestros resultados, lo que no ocurrió con los aislados L-20, L-22, L-79 y L-80 que siguieron presentando los mismos patrones en los distintos análisis. Por otro lado, cuatro aislados de similar cariotipo electroforético (L-165, L-169, L-494 y L-531), presentaron distinto perfil de hibridización con todas las sondas, aunque dos de éstos aislados (L-169 y L-494) no fueron diferenciados por las sondas pEL50, pRED552 y pRED556. Esta última sonda, además, presentó la menor complejidad, con un patrón idéntico para prácticamente todas las cepas analizadas.

6.3. Análisis de polimorfismos a través de sondas compuestas.

El uso de sondas de DNA compuestas, en parte por secuencias de DNA repetitivo y disperso a través del genoma y secuencias únicas, ha sido de gran utilidad en la diferenciación de levaduras patógenas del género *Candida*. Esta metodología tiene la particularidad de analizar distintas zonas del genoma simultáneamente, ya que puede hibridizar en zonas de DNA repetitivo dispersas detectando variaciones en múltiples *loci*, también puede hibridizar zonas menos variables del genoma y finalmente puede hibridizar en regiones que se aprecian como bandas constantes a través de todas las cepas estudiadas. Estas últimas son de utilidad en los análisis computacionales, facilitando la normalización de los tamaños de las bandas de acuerdo a un patrón de peso molecular, especialmente si la migración electroforética no ha sido pareja.

Aunque la secuencia que codifica para RNA ribosomal presenta un alto número de copias, en la construcción de la librería genómica se decidió descartar aquellos clones portadores de secuencias ribosomales (figura 4). Las 150 copias

de estos genes se encuentran solo en un cromosoma (cromosoma XII), en repetidos en tándem y la digestión de estos repetidos separados por secuencias espaciadoras, generará fragmentos de similar tamaño, por lo que el patrón de *Southern blot* será poco complejo, y por ende la resolución del análisis será bajo.

El plásmido 2 μ posee un tamaño de 6.3kb con 18 sitios de corte para la enzima *Bsp143I*. Sin embargo, la realización de una digestión parcial de DNA genómico total con esta enzima puede resultar en la obtención de plásmidos digeridos parcialmente, y que su movilidad electroforética sea menor, migrando por sobre su peso molecular. Esta digestión parcial puede generar también el ligamiento de dos plásmidos distintos, lo que genera una molécula de DNA de mayor tamaño. Esto podría explicar el clonamiento de estas secuencias en la librería genómica y su posterior selección como secuencia repetitiva dado su alto número de copia por célula.

El análisis de la secuencia de las sondas de DNA compuestas obtenidas desde la librería genómica reveló la presencia de 4 genes (KEL1, PEX18, DNA2 y Sol3) con secuencias homologas en otros cromosomas (figura 8).

El gen KEL1 (YHR158C, GeneID: 856563) codifica para la proteína Kel1p la cual es requerida para un correcto proceso de fusión y mantenimiento de la morfología celular. La secuencia nucleotídica de KEI1 presenta homología con KEL2 (YGR238C, GeneID: 853153) del cromosoma VII. PEX18 (YHR160C, GeneID: 856565), es uno de los 2 miembros de la familia de peroxinas, junto con PEX21, que son requeridos para el *targeting* peroxisomal de Pex7 PTS2. La secuencia del gen DNA2 (YHR164C, GeneID: 856569) codifica para factor de replicación de DNA. El producto de SOL3 cataliza el segundo paso de la vía de las pentosas-fosfato, y es homologo a Sol2p y Sol1p. La región contigua a SOL3 (YHR162W)

aún no ha sido caracterizada, presentando homología con la secuencia del gen *FMP43* del cromosoma VII, que tampoco tiene función conocida.

En total, la secuencia de la sonda Rep3 obtenida desde la librería genómica tendría 10 blancos posibles, en 2 cromosomas distintos (VII y VIII), en una cepa haploide. Este número de blancos, no permitiría lograr un alto grado de diferenciación, por lo que la búsqueda de nuevas secuencias candidatas en la librería genómica se sugiere como alternativa de futuros estudios.

Al analizar la presencia de las secuencias que componen la sonda Rep3 en los cromosomas de distintos aislados, obtuvimos hibridización en cuatro cromosomas (VII, VIII, XIII y XVI), lo que contrasta con lo encontrado en la base de datos (figura 9). Esto implicaría que la zona central de la sonda Rep3 que no fue secuenciada presentaría secuencias no descritas en la base de datos y que estarían presentes en las distintas cepas. La distribución de secuencias homólogas de la sonda Rep3 en los cromosomas de esta levadura, además, variaría entre las cepas pues el análisis de hibridización contra el cariotipo electroforético mostró diferencias entre ellas.

El uso de sondas de DNA repetitivo o sondas de DNA compuestas dependerá del análisis que deseemos hacer de los aislados. Las sondas de DNA repetitivo disperso generará un patrón demasiado complejo como para agrupar aislados relativamente relacionados, pero puede ser útil para estudiar fenómenos de microevolución. Por otro lado, las sondas compuestas en parte por DNA repetitivo y DNA poco variable, establecerá diferencias entre los aislados dadas por las secuencias repetitivas, a la vez que agrupará a todos los aislados de acuerdo a los patrones estables dados por las secuencias no-variables.

7. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- El análisis de la librería genómica mediante hibridación con DNA genómico marcado constituye una buena aproximación en la búsqueda de secuencias de DNA repetitivo que puedan ser utilizadas como sondas en experimentos de RFLP.
- El uso de secuencias repetitivas en el genoma de *S.cerevisiae* como marcadores moleculares permiten una buena diferenciación entre aislados similares.
- Una mayor complejidad en los patrones, dada por un mayor número de blancos a hibridizar, aumenta el poder resolutivo del análisis, dado por la detección de pequeños cambios en la estructura genómica que rodea a las secuencias repetitivas.
- La combinación de secuencias repetitivas con regiones menos variables (sondas compuestas) podría presentarse como una herramienta útil en el establecimiento de relaciones genéticas entre aislados estrechamente relacionados, permitiendo una normalización de los patrones, obteniendo mejores resultados en análisis de agrupamientos filogenéticos.

8. REFERENCIAS

Antunovics Z, Irinyi L, Sipiczki M. 2005. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J. Appl. Microbiol.* 98(4):971-9.

Arias, C.R., Burns, J.K., Friedrich, L.M., Goodrich, R.M., Parish, M.E. 2002. Yeast species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1955-61.

Baleiras Couto, M.M., Eijmsa, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H., van der Vossen, J.M. 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(1):41-6.

Baleiras Couto, M.M., Reizinho, R.G., Duarte, F.L. 2005. Partial 26S rDNA restriction analysis as a tool to characterise non-*Saccharomyces* yeasts present during red wine fermentations. *Int. J. Food. Microbiol.* 102(1):49-56.

Boyle, J.S., Lew, A.M. 1995. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends. Genet.* 11(1):8.

Cappello, M.S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio F., Zacheo, G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J. Appl. Microbiol.* 97:1274–1280.

Ceopan, 2005. La historia del pan. [en línea] <<http://www.ceopan.es/historia/lahistoria.htm>> [consulta: 15 Noviembre, 2005]

Craven, R.J., Petes, T.D. 1999. Dependence of the regulation of telomere length on the type of subtelomeric repeat in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 152(4):1531-41.

Codón, A., Benítez, T., Korhola, M. 1998. Chromosomal polymorphism adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 154-163.

Enger, L., Joly, S., Pujol, C., Simonson, P., Pfaller, M., Soll, D.R. 2001. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 39(2):658-69.

Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D., Querol, A. 1998. The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *Internatl. Microbiol.* 1:143–148.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M.J., Garcia-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(5):2056-61.

Feldmann, H. 2005. Yeast molecular biology, a short compendium on basic features and novel aspects. Introduction - Yeast as a Versatile Model System: Yeast history. [en línea] <http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/01%20Introduction.pdf> [consulta: 15 Noviembre 2005].

Fourel, G., Revardel, E., Koering, E., Gilson, C.E. 1999. Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions. *EMBO J.* 18:2522–2537.

Franzot, S.P., Hamdan, J.S., Currie, B.P., Casadevall, A. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* 1997 Sep;35(9):2243-51.

Gac, S. 2004. Evaluación molecular del carácter autóctono en aislados silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* para uso vitivinícola. Memoria para optar al título de Ingeniero en Biotecnología molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Ganga, M., Martínez, C. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 96(1):76-83.

Garfinkel, D.J., Nyswander, K.M., Stefanisko, K.M., Chang, C., Moore, S.P. 2005. Ty1 copy number dynamics in *Saccharomyces*. *Genetics.* 169: 1845–1857.

Gee, S.F., Joly, S., Soll, D.R., Meis, J.F., Verweij, P.E., Polacheck, I., Sullivan, D.J., Coleman, D.C. 2002. Identification of four distinct genotypes of *Candida dubliniensis* and detection of microevolution in vitro and in vivo. *J. Clin. Microbiol.* 40(2):556-74.

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*. 274(5287):546, 563-7.

Granchi, L., Bosco, M., Messini, A., Vincenzini M. 1999. Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rDNA ITS region. *J. Appl. Microbiol.* 87: 949–956.

Guillamon, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A. 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4):708-14.

Guillamón, J.M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J., Querol, A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* 169 : 387–392

Ibeas JI, Lozano I, Perdignes F, Jimenez J. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):998-1003.

Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., other members of the Genome Sequencing Center, Albermann, K., André, B., Ansorge, W., Benes, V., Brückner, M., Delius, H., Dubois, E., Dusterhöft, A., Entian, K.-D., Floeth, M., Goffeau, A., Hebling, U., Heumann, K., Heuss-Neitzel, D., Hilbert, H., Hilger, F., Kleine, K., Kötter, P., Louis, E. J., Messenguy, F., Mewes, H. W., Miosga, T., Möstl, D., Müller-Auer, S., Nentwich, U., Obermaier, B., Piravandi, E., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Rechmann, S., Rieger, M., Rinke, M., Rose, M., Scharfe, M.,

Scherens, B., Scholler, P., Schwager, C., Schwarz, S., Underwood, A. P., Urrestarazu, L. A., Vandenbol, M., Verhasselt, P., Vierendeels, F., Voet, M., Volckaert, G., Voss, H., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Zimmermann, F. K., Zollner, A., Hani J., Hoheisel J.D. 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*.387:87-90.

Joly, S., Pujol, C., Rysz, M., Vargas, K., Soll, D.R. 1999. Development and Characterization of Complex DNA Fingerprinting Probes for the Infectious Yeast *Candida dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*37:1035-1044.

Kim, J.M., Vanguri, S., Boeke, J.D., Gabriel, A., Voytas, D.F. 1998. Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Research*. 8:464-478.

Lebrun, E. Revardel, E., Boscheron, C., Li, R., Gilson, E., Fourel, G. 2001. Protosilencers in *Saccharomyces cerevisiae* Subtelomeric regions. *Genetics* 158: 167–176.

Legras, J., Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. 2003. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 249-255.

Liti G., Peruffo, A., James, S., Roberts, I.N., Louis, E.J. 2005. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*. 22: 177–192.

Liti, G., Louis, E. 2005. Yeast evolution and comparative genomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:135–53.

Lockhart, S.R., Joly, S., Pujol, C., Sobel, J.D., Pfaller, M.A., Soll, D.R. 1997. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. *Microbiology.* 143 (Pt 12):3733-46.

Louis E.J., Haber J.E. 1990. The subtelomeric Y' repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics.*124(3):533-45.

Louis E.J., Haber J.E. 1992. The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*131(3):559-74.

Louis, E.J., Naumova, E.S., Lee, A., Naumov, G., Haber, J.E. 1994. The chromosome end in yeast: its mosaic nature and influence on recombinational dynamics. *Genetics.* 136(3):789-802.

Marinoni, G., Manuel, M., Petersen, R., Hvidtfeldt, J., Sulo, P., Piskur, J. 1999. Horizontal Transfer of Genetic Material among *Saccharomyces* Yeasts. *J. Bacteriol.*181: 6488–6496.

Martínez, C., Gac, S., Lavín, A., Ganga, M. 2004. Genomic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from wine-producing areas in South America. *J. Appl. Microbiol.* 96:1161–1168.

Martorell P, Fernandez-Espinar MT, Querol A. 2005. Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruit nougats to determine food contamination sources. *Int. J. Food. Microbiol.* 101(3):293-302.

Mills, D., Johannsen, E, Cocolin, L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10):4884-93.

Orberá, T. 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:15-19

Petes, T.D. 1979. Yeast ribosomal DNA genes are located on chromosome XII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(1):410-4.

Piper, P. 1996. Isolation of yeast DNA. In Evans, I. [Eds.] *Methods in Molecular Biology*, vol 53: Yeasts Protocols. Human Press, Totowa, NJ, pp.103-107.

Posteraro B., Sanguinetti M., D'Amore G., Masucci L., Morace G., Fadda G. 1999. Molecular and epidemiological characterization of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37(7):2230-5.

Pryde, F.E., Louis, E.J. 1999. Limitations of silencing at native yeast telomeres. *EMBO J.* 18(9): 2538-2550.

Puig, S., Querol, A., Barrio, E., Perez-Ortin J.E. 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(5):2057-61.

Pulvirenti, A., Caggia, C., Restuccia, C., Gullo, M., Giudici, P. 2001. DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from Sicilian sourdoughs. *Ann. Microbiol.* 51:107-120.

Querol A., Fernandez-Espinar M.T., del Olmo M., Barrio E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food. Microbiol.* 86(1-2):3-10.

Querol, A., Belloch, C., Ferandez-Espinar, M.T., Barrio, E. 2003. Molecular evolution in yeast of biotechnological interest. *Int. Microbiol.* 6: 201–205.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl Environ Microbiol.* 58(9):2948-2953.

Saber de Vinos. 2005. Historia: El vino Chileno. [en línea] <<http://www.saberdevinos.cl/html/interior/vino.html>> [consulta: 15 Noviembre, 2004]

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Vásquez, C. 2005. Estudio molecular de la biodiversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* colectadas de localidades productoras de vino de la zona central de Chile. Tesis en desarrollo. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

Vaughan-Martini A. 2003. Reflections on the classification of yeasts for different end-users in biotechnology, ecology, and medicine. *Int. Microbiol.* 6(3):175-82.

Youngren SD, Boeke JD, Sanders NJ, Garfinkel DJ. 1988. Functional organization of the retrotransposon Ty from *Saccharomyces cerevisiae*: Ty protease is required for transposition. *Mol. Cell. Biol.* 8(4): 1421-1431.

9. ANEXO 1: SOLUCIONES Y MEDIOS

1. Medio YPD

Extracto de levadura	0,5%
Peptona	0,5%
Glucosa	2,0%
Agar*	2,0%
Estreptomycin*	200 ug/ml

* Solo para medio sólido.

El volumen final es dado con agua destilada y el medio autoclavado por 20 min a 15 psi.

2. Medio LB

Triptona	1%
Extracto de levadura	0,5%
NaCl	1%
Agar *	2%

*Solo para medio sólido.

Llevar al volumen final con agua destilada y autoclavar

3. TBE 5x

Tris Base	445 mM
Ácido Bórico	445 mM
EDTA pH 8,0	10 mM

Llevar al volumen final deseado con agua destilada.

4. EDTA 0,5 M pH 8,0

Disodioetildiamintetraacetato • 2H₂O 186,1 g

Agregar 800 ml de agua y llevar a pH 8,0 con hidróxido de sodio sólido.
Ajustar a 1 L con agua destilada y autoclavar por 20 min a 15 psi.

5. TE pH 7,4

Tris-HCl pH 7,4 10 mM

EDTA pH 8,0 1 mM

Llevar al volumen final con agua destilada.

6. Tampón fago

Tris-HCl (pH 7,4) 20 mM

NaCl 100 mM

MgSO₄ 10 mM

Llevar a volumen final con agua destilada y autoclavar por 20 min a 15 psi.

7. SSC 20X

NaCl 3 M

Citrato de Sodio 0,3 M

Ajustar a pH 7,0 y autoclavar.

8. Tampón SM

Gelatina	0,01%
Tris-HCl	50 mM
NaCl	10 mM
MgSO ₄	8 mM

Esterilizar por autoclavado.

9. Agarosa Top

Tryptona	1 g
NaCl	0,8 g
Agarosa	0,6 g

Llevar a un volumen final de 100 ml con agua destilada y esterilizar mediante autoclavado.

10. Tampón SC

Sorbitol	1.2 M
Citrato-fosfato*	50 mM

Llevar a volumen final con agua destilada y autoclavar. Agregar 0.2%v/v 2-mercaptoetanol y 5mg/ml de zimoliasa justo antes de usar.

*Citrato-fosfato: 0.1M acido citrico y 0.2M Na₂HPO₄.

11. Tris-HCl 2M

Tris base	242.2 g
-----------	---------

Llevar a 1Litro de volumen final con agua destilada y ajustar a pH deseado.

12. Tampón Sorbitol-Tris-HCl.

Sorbitol	2 M
Tris-HCl pH 8.0	1 M

13. NDS

EDTA 0,5 M pH 8,0	50 ml
N-laurosilsarcosina	5 g
Tris-HCl 1 M pH 7,4	5 ml

14. LET

Tris Base	0,375 g
B-mercaptoetanol	18,75 ml

Llevar a 250 ml con EDTA 0,5 M pH 8,0.

15. Tampón de ácido maleico

Ácido maleico	11,6 g
NaCl	8,77 g

Ajustar a un pH de 7,5 y llevar a un volumen final de 1L. Esterilizar por autoclavado.

16. Tampón de lavado

Tampón ácido maleico	1L
Tween 20	3 ml

17. Tampón de detección

Tris-HCl 1M	50 ml
NaCl	2,9 g

Ajustar a pH 9,5 y llevar a un volumen final de 500 mL con agua destilada. Autoclavar.