

UCA-FC
Biotecnología
M271
C 1

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

MICROEVOLUCIÓN GENÓMICA EN LEVADURAS VÍNICAS

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



Por

Dinka Mandaković Seyler

Agosto, 2008
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Claudio Martínez Fernández

Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada
Universidad de Santiago de Chile



“MICROEVOLUCIÓN GENÓMICA EN LEVADURAS VÍNICAS”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

DINKA MANDAKOVIĆ SEYLER

Dr. Claudio Martínez Fernández
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. Martínez', written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'V. Cifuentes', written over a horizontal line.

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. Baeza', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, Agosto 2008

BIOGRAFÍA



Mi relación con la ciencia comenzó con un libro que me mandaron a leer en el colegio, “Boys from Brazil” de Ira Levin... Para quienes lo hayan leído, no se asusten, mi sueño no es revivir atrocidades ni maldad, sino que mi sueño era, y sigue siendo, el conocimiento. Este libro despertó en mí tantas inquietudes, dudas y desafíos, que fue en ese momento que decidí que la ciencia sería parte de mi vida... Espero que esta inspiración no termine nunca porque aún me quedan muchísimos cuestionamientos por resolver.

AGRADECIMIENTOS



El desarrollo de esta tesis ha sido un camino lleno de desafíos, con posteriores alegrías y mucho aprendizaje, en el cual muchas personas estuvieron a mi lado para ayudarme; algunos al principio, otros al final y muchos en todo momento.

Gracias a mis padres y hermanos por apoyarme, por confiar en mí y hacerme sentir orgullosa de la carrera que decidí estudiar.

Gracias al Dr. Claudio Martínez, por aceptarme en su laboratorio y ser un mentor excepcional, por darme siempre las herramientas adecuadas para salir adelante y por escucharme y apoyarme en todo lo que necesité. Gracias también a la Dra. Angélica Ganga, por su siempre buena disposición. Quisiera agradecer también al Dr. Bustos, por prestarme a "winkito", quien me dio muchos dolores de cabeza, pero que después aprendí a valorar y a querer.

Gracias amigos y compañeros LAMAP (Daniel G., Daniel M., Salinas, Lili, Paz, Fabi, Sarmiento), especialmente a la Carolita, que me ayudó desde un comienzo y que se transformó en una gran amiga. Como olvidar a mi partner Cubillos, que no sólo me llevó a LAMAP, sino que con mucha paciencia me enseñó todo lo que necesitaba saber, y que a pesar de estar lejos cumpliendo nuestro sueño, siempre será mi mejor amigo.

Gracias amigos de la vida, especialmente Patty, simplemente por quererme y escucharme. Y gracias Dani, por transformarte en una persona maravillosa y muy importante en mi vida.

Finalmente, gracias Negro, por apoyarme en todo momento y por ser el mejor crítico (constructivo por cierto) de este trabajo. Gracias por ser parte de mi vida.

FINANCIAMIENTO

La memoria de título se realizó gracias al financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1040099 titulado "Genómica estructural de aislados nativos de levaduras de interés enológico".



ÍNDICE CONTENIDOS



BIOGRAFIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
FINANCIAMIENTO	v
INDICE DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 La elaboración del vino	3
1.2 Levaduras vínicas	4
1.3 Adaptación de <i>S. cerevisiae</i> a la fermentación	6
1.4 AFLP e Interdelta Fingerprinting	10
2. HIPÓTESIS	15
2.1 Hipótesis	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo General	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Cepas	20
4.2 Medios de Cultivo y Soluciones	23



4.3 Extracción de DNA	23
4.4 Curvas de Crecimiento	24
4.5 Fermentaciones en Laboratorio	26
4.6 AFLP	29
4.7 Interdelta Fingerprinting	36
4.8 Secuenciación de Bandas Polimórficas	38
4.9 Análisis Estadístico	39
5. RESULTADOS	40
5.1 Fermentaciones en laboratorio	41
5.2 Análisis genómico de levaduras en fermentaciones en laboratorio mediante AFLP	44
5.3 Análisis genómico de levaduras en fermentaciones en laboratorio mediante Interdelta Fingerprinting	47
5.4 Análisis genómico de cepas comerciales y de cepas recolectadas de fermentaciones industriales	56
5.5 Análisis fenotípico de cepas comerciales y de cepas recolectadas de fermentaciones industriales	60
5.6 Secuenciación de los cambios genómicos detectados	64
6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES	74
8. BIBLIOGRAFÍA	76
9. ANEXOS	80

9.1 Medios de Cultivo	81
9.2 Soluciones	82
9.3 Secuenciaciones parciales de los cambios genómicos detectados	85





ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Cepas del género <i>Saccharomyces</i> utilizadas para realizar las fermentaciones en laboratorio	21
Tabla 2. Cepas de la especie <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que fueron analizadas genómica y fenotípicamente	22
Tabla 3. Adaptadores <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i>	30
Tabla 4. Partidores usados en amplificación por PCR de AFLP	33
Tabla 5. Partidores usados en amplificación por PCR de Interdelta Fingerprinting	37
Tabla 6. Datos obtenidos de la secuenciación de las bandas polimórficas observadas en las cepas comerciales y recolectadas de fermentaciones industriales	66
Tabla 7. Datos obtenidos de la secuenciación de las bandas polimórficas observadas en las fermentaciones en laboratorio	67



ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Sistema de fermentación de laboratorio utilizando bioreactor Applikon de 650 mL de capacidad	27
Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa L-16	42
Figura 3. Análisis AFLP de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-16 y sus controles	45
Figura 4. Análisis AFLP de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1764 y sus controles	46
Figura 5. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-16 y sus controles	49
Figura 6. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-720 y sus controles	50
Figura 7. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-757 y sus controles	51
Figura 8. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1333 y sus controles	52
Figura 9. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-846 y sus controles	53
Figura 10. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1374 y sus controles	55
Figura 11. Análisis AFLP de cepas comerciales y de cepas obtenidas de bodegas	58
Figura 12. Análisis Interdelta Fingerprinting de cepas comerciales y de cepas obtenidas de bodegas	59
Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c	61
Figura 14. Gráfico de las velocidades máximas ($\mu_{\text{máx}}$) de crecimiento de las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c	62

Figura 15. Gráfico de la biomasa total alcanzada por las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c 63

Figura 16. Modelo de posible recombinación homóloga entre secuencias repetidas del genoma de levaduras fermentadas 72



RESUMEN

Durante la elaboración del vino las levaduras se encuentran sujetas a múltiples condiciones adversas siendo las de mayor relevancia el estrés osmótico y las altas concentraciones de etanol producto de la fermentación alcohólica. Frente a esta situación, las levaduras deben responder fisiológicamente para lograr su supervivencia, lo que para algunos investigadores es visto como un proceso de adaptación específico a las condiciones de la fermentación. Por ello, en este trabajo, se estudió la relación que existiría entre la adaptación de las levaduras a las condiciones fermentativas con cambios en genes y/o fenotipos de interés industrial.

Se sometieron a fermentaciones continuas en condiciones de fin de la fase exponencial a ocho cepas del género *Saccharomyces*. El análisis molecular realizado a 30 colonias obtenidas de cada una de estas fermentaciones permitió detectar distintos grados de polimorfismo genómico en seis de ellas mediante Interdelta fingerprinting y no por AFLP. El análisis bioinformático de las secuencias asociadas a los cambios genómicos observados resultaron estar mayoritariamente asociadas a regiones repetidas del genoma y no a genes relacionados con los fenotipos industriales analizados. Por otra parte, se analizaron dos cepas *S. cerevisiae* comerciales genómicamente similares (EC1118 y L-1333) y 4 cepas recolectadas en bodegas donde en fermentaciones industriales anteriores se había utilizado la cepa EC1118. En estos casos se observó polimorfismo genómico al utilizar las dos técnicas antes mencionadas, pero éste nuevamente no se relacionó con genes o fenotipos asociados a fermentaciones vnicas.

De los resultados obtenidos es posible concluir que los cambios genómicos detectados estarían involucrando principalmente regiones repetidas del genoma y no necesariamente estarían asociados a genes relacionados a fenotipos fermentativos.

ABSTRACT

During wine production, yeasts are subjected to multiple adverse conditions, being the most relevant the osmotic stress and the high ethanol concentrations that result from alcoholic fermentation. Due to this situation, yeasts have to respond physiologically to survive, circumstance that for some researchers is seen like a specific adaptation process to fermentative conditions. This is the reason why, in this work, we studied the relationship that would exist between yeasts' adaptation to fermentative conditions with changes in genes and/or phenotypes of industrial interest.

Eight *Saccharomyces* strains were subjected to continuous fermentations in conditions of end of exponential phase. The molecular analysis performed to 30 colonies obtained from each fermentation permitted the detection of different degrees of genomic polymorphism in six of them using Interdelta fingerprinting, but not by AFLP. The bioinformatics' analysis of the sequences associated to the genomic changes resulted to be mainly associated to repeated regions of the genome, and not to genes related to the industrial phenotypes analyzed. On the other hand, two genetically similar commercial strains of *S. cerevisiae* (EC1118 y L-1333) and 4 strains collected from wine cellars in which previous industrial fermentations were carried out using the strain EC1118 were analyzed. In these cases, genomic polymorphism was observed using the techniques previously mentioned, but again these changes were not related to genes or phenotypes associated to wine fermentation.

From these results it is possible to conclude that the genomic changes detected in this study would be involving mainly repeated regions in the genome and would not be necessarily associated to genes related to fermentative phenotypes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La elaboración del vino

La elaboración del vino se puede resumir como la supervisión y refinado de un proceso que se da espontáneamente en la naturaleza en la medida que el jugo de uva fermenta al entrar en contacto con microorganismos denominados levaduras.

La fermentación alcohólica es un proceso catabólico y anaerobio (realizado en ausencia de oxígeno), por el cual las levaduras obtienen energía en forma de ATP (adenosín trifosfato) mediante la conversión de los azúcares de la uva en alcohol y anhídrido carbónico. En este procedimiento, el aceptor final de electrones del NADH (nicotinamida adenín dinucleótido) producido en la glicólisis, no es el oxígeno como ocurre en la cadena respiratoria, sino el acetaldehído. Al tener este compuesto poco poder oxidante, las fermentaciones son poco rentables del punto de vista energético, obteniéndose sólo 2 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa, mientras que en la respiración se producen 36.

El proceso de elaboración del vino se inicia con la vendimia o recogida de las uvas desde los viñedos. El grano de uva está formado por el hollejo (constituido por varias capas de células ordenadas cuya superficie está formada por una capa cerosa denominada pruina), la pulpa (que supone entre el 85-95% del fruto) y las semillas. Dentro de los componentes de la pruina se encuentran pigmentos tales como las antocianinas, que dan el color rojizo del vino tinto. Luego de la vendimia se realiza el prensado, que en otras palabras es extraer el mosto de la pulpa. El mosto de uva es el zumo o jugo obtenido por

presión de la uva en tanto que no haya comenzado su fermentación, sin hollejo y sin semillas. El mosto está compuesto por un 78-85% de agua, 12-25% de azúcares, dentro de los cuales la glucosa y la fructosa son los mayoritarios, ácidos (entre ellos ácidos tartárico y málico), sustancias nitrogenadas, pigmentos (antocianinas), aceites responsables del aroma del vino, vitaminas y sales minerales (Vogt, 1986). Finalmente, la elaboración del vino concluye con un tratamiento al mosto que consiste en azufrarlo para evitar la acción de microorganismos nocivos para el vino (por ejemplo, bacterias ácido acéticas, levaduras silvestres, mohos, entre otros).

1.2 Levaduras vínicas

La fundamental acción de las levaduras en la fermentación alcohólica del mosto de uva fue en definitiva demostrada por Louis Pasteur en sus famosos estudios realizados en vino y cerveza en los años 1866 y 1867 respectivamente, en donde incluso llega a manifestar que la naturaleza de la levadura que lleva a cabo la fermentación podría influenciar las características gustativas del vino.

La transformación de mosto de uva en vino mediante la fermentación alcohólica es el resultado de las actividades de una gran variedad de microorganismos. Las primeras etapas de la fermentación se caracterizan por la presencia de una diversa población de levaduras incluyendo las especies *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora* y *Saccharomyces* (Cocolin y col, 2000). Las levaduras no-*Saccharomyces* crecen por varios días antes de que la fermentación sea dominada y completada por una o más

cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta predominancia de *S. cerevisiae* se debe a distintas características que presenta esta levadura vínica, como lo es su alta tolerancia a etanol (You y col, 2002) como también su capacidad de fermentar glucosa de forma eficiente incluso en presencia de oxígeno (Ferea y col, 1999).

S. cerevisiae se caracteriza por ser un hongo unicelular perteneciente a la familia de los ascomicetes. Puede encontrarse en forma haploide (una copia de cada cromosoma por célula) o en forma diploide (dos copias de cada cromosoma por célula). Puede presentar un crecimiento vegetativo, en donde mediante mitosis sucesivas se generan células idénticas a la célula madre, como también puede manifestar una reproducción sexual, en donde por meiosis se generan esporas dentro de ascas.

Cepas haploides de levaduras vínicas contienen aproximadamente 12-13 Mb de DNA (ácido desoxirribonucleico) nuclear, distribuidos a lo largo de 16 cromosomas lineales, cuyos tamaños varían desde 250 hasta 2000 kb (Pretorius, 2000). La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* usadas en laboratorios son haploides de tamaños cromosómicos definidos. Sin embargo, las cepas vínicas son generalmente diploides, aneuploides (el número de cromosomas no es un múltiplo exacto del número haploide de la especie) y poliploides (el número de cromosomas aumenta más de dos veces con respecto al número haploide de la especie). La aneuploidía y poliploidía podrían conferir ventajas adaptativas frente al ambiente externo cambiante, como también podrían ser una forma de incrementar la dosis de algunos genes importantes para la fermentación (Bakalinsky & Snow, 1990).

1.3 Adaptación de *S. cerevisiae* a la fermentación

Durante la fermentación alcohólica, las levaduras están sujetas a numerosas condiciones adversas siendo las más importantes el estrés osmótico y la presencia de altas concentraciones de etanol (Pretorius, 2000). Este ambiente extremo ocasiona una reducción en la velocidad de crecimiento y en la tasa de supervivencia, tendiendo también a reducir la eficiencia fermentativa de las células. Adaptaciones fenotípicas y moleculares se manifiestan en las levaduras como respuesta a estas condiciones, adquiriendo la mejor cepa una mayor probabilidad de ser la dominante durante el proceso fermentativo (Querol y col, 2003).

Dentro de los mecanismos fisiológicos de adaptación a la fermentación se encuentra la modificación de la composición lipídica de la membrana celular de las levaduras como respuesta a las altas concentraciones de etanol. Se produce una disminución del contenido de esteroides y un incremento en el índice de ácidos grasos insaturados, lo que mantendría la fluidez de la membrana de las células (Alexandre y col, 1994).

Para llevar a cabo de forma apropiada el proceso completo de la elaboración del vino, las levaduras deben detectar y responder a las condiciones desfavorables dadas en este proceso sin significantes pérdidas de viabilidad celular. Para este propósito, estos microorganismos poseen sistemas sensoriales para detectar variaciones en el ambiente (Zuzuarregui y col, 2006). La captación sensorial de estos cambios conduce la activación de vías de transducción de señales, resultando en cambios de expresión

génica y/o de la modulación de la actividad proteica mediante modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales (Rodrigues-Pousada y col, 2004).

Se han descrito también cambios a nivel del genoma producto del proceso fermentativo. Esto principalmente debido a la inestabilidad genómica que presentan algunas cepas de levaduras vínicas, siendo desconocidas las causas de esta inestabilidad. Sin embargo, esta característica se asocia a pérdidas de heterocigocidad (mediante crossing-over o deleciones) y a cambios en tamaños cromosómicos, siendo *S. cerevisiae* estudiada como especie modelo de este rasgo (Ramírez y col, 2004).

Asimismo, Longo y Vézinhel (1993) observaron que cepas nativas de *S. cerevisiae* tienen la capacidad de reorganizar sus cromosomas durante el crecimiento mitótico. Ellos analizaron y compararon, durante crecimiento vegetativo, los cariotipos de dos cepas de esta especie de levadura, una haploide de uso en laboratorio y otra nativa diploide. El cariotipo de la levadura haploide se comportó de forma bastante estable, mientras que la levadura nativa sufrió diversas modificaciones. Entre ellas, se observaron reducciones en el número de bandas o la separación de una banda en dos, como también la presencia de rearrreglos cromosómicos entre el cromosoma I y el VI.

Separadamente de las mutaciones espontáneas, las cuales ocurren a muy baja frecuencia, se han propuesto otros mecanismos por los cuales se podrían producir cambios a nivel genómico en cepas de levaduras vínicas, como por ejemplo, traslocaciones cromosómicas (Rachidi y col, 1999) o crossing over durante el proceso de

mitosis (Aguilera y col, 2000). Uno de los mecanismos por los cuales se podrían llevar a cabo los rearrreglos cromosómicos en *S. cerevisiae* es mediante la recombinación homóloga entre elementos transponibles (elementos genéticos que ocasionalmente pueden moverse o transponerse de una posición a otra en el genoma) (Rachidi y col, 1999, Mieczkowski y col, 2006). Los estudios realizados por Rachidi y colaboradores (1999) a una cepa de *S. cerevisiae* que poseía cromosomas aberrantes, revelaron que la levadura efectuaba cuatro rearrreglos cromosómicos. En todos los casos, elementos Ty (elementos transponibles de levaduras) se encontraban presentes en las regiones del genoma implicadas en los rearrreglos, sugiriendo que las translocaciones resultaron de la recombinación entre los elementos transponibles.

Por otra parte, Nadal y colaboradores (1999) también observaron inestabilidad cariotípica, pero ahora durante crecimiento vegetativo (fermentaciones espontáneas) de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en la producción de vino espumoso. Esta variación en el genoma se reflejó en aneuploidías y polimorfismos en tamaños cromosómicos de secuencias repetidas de rDNA encontradas en el cromosoma XII. En este estudio, no hubo aparición de cambios en patrones de DNA mitocondrial, incluso en levaduras con alta tasa de rearrreglos cromosómicos.

Liti y colaboradores (2005) también decidieron evaluar la variabilidad génica en levaduras mediante el estudio de secuencias repetidas en el genoma, ya que los cambios génicos en organismos eucariontes aumentan hacia zonas teloméricas y subteloméricas, como también hacia los LTR de los retrotransposones. Utilizando sondas de hibridación

de estas regiones repetidas, encontraron variabilidad génica entre 112 cepas diferentes pertenecientes al complejo *Saccharomyces sensu stricto*. También hallaron presencia de rearrreglos cromosómicos (traslocaciones entre dos cromosomas y aumento de tamaños cromosómicos) en varias cepas al compararlas con un cariotipo convencional de la especie.

La hipótesis propuesta por Puig y colaboradores (2000) para que la levadura pueda sobrellevar las condiciones de estrés dadas por el proceso fermentativo, involucra cambios genómicos mediante recombinación mitótica entre secuencias homólogas del genoma de la levadura durante la vinificación. Este planteamiento es de acuerdo al estudio que realizaron sobre la estabilidad del locus Ura3 en una cepa de levadura vínica heterocigota para este gen durante consecutivas fermentaciones de mosto de uva y donde encontraron la aparición de levaduras homocigotas *ura3/ura3*, pero no hallaron evidencias de meiosis o esporulación durante el proceso. En este estudio también hubo aparición de polimorfismos y aneuploidías en levaduras obtenidas luego de la fermentación. Sin embargo, los estudios que se han realizado sobre modificaciones genómicas dadas por el proceso fermentativo han sido poco concluyentes y no han abarcado el análisis de presencia o ausencia de modificaciones a lo largo de todo el genoma de distintas cepas de levaduras vínicas.

Por otro lado, se realizó un estudio para evaluar la posible generación de cambios en el genoma de una cepa de levadura vínica comercial al estar presente en ambientes naturales aledaños a la producción de vinos (Schuller y col, 2007). Los datos

confirmaron que los aislados naturales presentaron considerable polimorfismo cromosómico, los que fueron más evidentes para los cromosomas pequeños III y VI y que fueron detectados utilizando las técnicas de interdelta fingerprinting, cariotipo cromosómico y microsatélites. Estos autores consideran que los cambios génicos podrían estar involucrados en procesos de adaptación evolutiva. Asimismo, estudios recientes en nuestro laboratorio han descrito la aparición de diferencias genómicas en cepas originalmente iguales mediante RFLP (en inglés, Restriction Fragment Length Polymorphism) con sondas de hibridación en regiones repetidas del genoma. Este análisis fue realizado a la cepa comercial chilena L-1333 y a la cepa comercial francesa EC1118, que a pesar de presentar distintos orígenes, tienen similitudes genéticas importantes. De hecho, se cree que la cepa L-1333 es efectivamente la cepa EC1118 que fue recolectada en Chile luego de ser utilizada como levadura comercial en viñas nacionales y que evolucionó en el ambiente. Interesantemente se observaron diferencias al realizar análisis comparativos de estas cepas con la técnica de RFLP utilizando sondas de hibridación contra secuencias repetidas del genoma (Sarmiento, 2007), pero no al compararlas genéticamente mediante microsatélites (Cubillos, 2007).

1.4 AFLP e Interdelta Fingerprinting

Existe en la actualidad una alta demanda por nuevas técnicas que permitan diferenciar levaduras a nivel de cepas. Este propósito es debido al interés de la industria de alimentos en conocer la ruta y la fuente de contaminación durante la producción de ciertos fermentados, como por ejemplo, pan, cerveza, vino o cidra. Esta iniciativa ha

permitido comparar y encontrar importantes diferencias a nivel intraespecífico mediante el uso de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen o secuencia de DNA que pueda ser utilizados para identificar especies, cepas o características fenotípicas de cada organismo. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos (isoenzimas) y los marcadores de DNA. Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico. A veces el grado de variación es tal que se denominan hipervariables. Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos.

Existen varios tipos de marcadores moleculares de DNA descritos para *S. cerevisiae*, dentro de los que destacan aquellos observables mediante las técnicas basadas en la amplificación del DNA mediante PCR (en inglés, Polymerase Chain Reaction). Entre estos se encuentran RFLP, RAPD (en inglés, Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Single Sequence Repeat) y las utilizadas en este estudio, AFLP (en inglés, Amplified Fragment Length Polymorphism) e Interdelta Fingerprinting.

La técnica de AFLP se basa en la amplificación específica de fragmentos de DNA dependiendo del patrón de digestión de enzimas de restricción. Esta técnica consta de

cuatro pasos: primero, la digestión del DNA usando enzimas de restricción (una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente); segundo, la ligación a estos fragmentos de adaptadores (oligonucleótidos); tercero, la amplificación selectiva de fragmentos de DNA utilizando partidores complementarios a las secuencias de los adaptadores y a los sitios de restricción; y cuarto, la visualización de los fragmentos de DNA amplificados en geles de poliacrilamida. La amplificación selectiva se consigue mediante el uso de partidores que se extienden a los fragmentos de DNA previamente digeridos, amplificando sólo aquellos fragmentos en donde las extensiones de los partidores coinciden con nucleótidos flanqueando los sitios de restricción. Usando este método, un conjunto de fragmentos producto de digestiones por enzimas de restricción, pueden ser visualizados por amplificaciones mediante PCR, sin necesidad de conocer la secuencia nucleotídica, como también permite la coamplificación específica de un alto número de fragmentos de digestión. De esta forma, AFLP provee un novedoso y poderoso método de obtener “fingerprintings” o impresiones digitales del DNA, sin importar su origen o complejidad (Vos y col, 1995). AFLP fue utilizado para investigar la variación genética de diferentes especies de levaduras vínicas comerciales y aislados naturales obtenidos de viñas (Barros Lopes y col, 1999). Este estudio demostró la efectividad de esta técnica en discriminar cepas estrechamente relacionadas de la especie *S. cerevisiae*, e incluso permitió la clasificación de aislados desconocidos mediante similitudes entregadas por estas impresiones digitales.

Por otra parte, Interdelta Fingerprinting fue una técnica diseñada exclusivamente para el análisis y comparación entre DNA proveniente de levaduras. Esto es porque la

técnica recae en la amplificación, mediante PCR, de regiones “interdelta”, es decir, de regiones entre secuencias “delta” o LTR (en inglés, Long Terminal Repeat) que flanquean los retrotransposones Ty1 y Ty2 de las levaduras. Estos elementos delta pueden encontrarse separados de los retrotransposones en el genoma, y han sido denominados “solo elementos delta”. Existen alrededor de 300 de estos “solo elementos delta” descritos para el genoma de la levadura de laboratorio S288c, y por lo tanto, son buenos blancos para la identificación de polimorfismos (Legras & Karst, 2003). La formación de estos elementos delta o LTR se origina a partir de la recombinación entre LTRs ubicados a cada extremo de un único provirus, evento que lleva a la pérdida de todo su DNA interno, dejando en el genoma del huésped un “solo LTR” o “solo elemento delta” (Coffin, 2004). Es así como los patrones de bandeo de las cepas utilizando Interdelta Fingerprinting dependen de la integración de los retrotransposones en el genoma, comportamiento que da variación y diferencias entre distintas especies y cepas de levaduras. Por otro lado, se ha descrito que un mecanismo para evaluar la variabilidad génica en levaduras es mediante el estudio de secuencias repetidas en el genoma, como los LTR de los retrotransposones, ya que los cambios génicos por recombinación en organismos eucariontes aumentan hacia estas zonas (Liti y col, 2005).

Interdelta Fingerprinting es una metodología que ha demostrado ser eficaz en la discriminación tanto inter como intraespecífica. Por ejemplo, esta técnica fue utilizada para diferenciar tres especies de levaduras responsables de la refermentación del vino durante el añejamiento (*S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Saccharomyces ludwigii*), a pesar de presentar una estrecha relación descrita por el análisis cariotípico

(Divol y col, 2005), como también logró inequívocamente diferenciar entre 53 cepas de levaduras comerciales, de uso en laboratorio y aislados naturales de la especie *S. cerevisiae* (Legras & Karst, 2003).

En este trabajo se analizaron y compararon a nivel fenotípico y genómico cepas de levaduras vínicas antes y después de ser fermentadas con el objeto de identificar las secuencias y mecanismos que favorecen los cambios genómicos y su eventual relación con el proceso fermentativo en que ellas participan.

2. HIPÓTESIS

2.1 Hipótesis

La adaptación de las levaduras a condiciones fermentativas significaría que cambios en su genoma debieran estar relacionados a cambios en genes y/o fenotipos de interés industrial.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Caracterizar cambios genéticos en cepas de levaduras vínicas sometidas a fermentaciones en laboratorio e identificar cambios fenotípicos y genéticos en cepas de levaduras vínicas sometidas a fermentaciones industriales.

3.2 Objetivos Específicos

1. Conocer e implementar un sistema de fermentación de laboratorio para levaduras del género *Saccharomyces*.
2. Evaluar la ocurrencia de cambios en el genoma de cepas de *Saccharomyces* durante fermentaciones en laboratorio mediante AFLP e Interdelta Fingerprinting.
3. Realizar comparaciones genéticas y fenotípicas entre cepas encontradas en estanques y viñas y cepas industriales genéticamente similares.
4. Determinar las secuencias implicadas en los cambios genómicos detectados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas

Con el objeto de evaluar cambios en el genoma durante fermentaciones en laboratorio, en este estudio se analizaron en total 15 cepas de levaduras del género *Saccharomyces*, de las cuales se seleccionaron siete de distintos tipos y orígenes de la especie *Saccharomyces cerevisiae* y una de la especie *Saccharomyces bayanus* (Tabla 1). Por otro lado, para realizar comparaciones fenotípicas y genéticas entre cepas encontradas en estanques y cepas industriales genéticamente similares, se seleccionaron seis cepas de la especie *S. cerevisiae* y una cepa de laboratorio como control (Tabla 2).

Todas las cepas utilizadas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile.

Tabla 1. Cepas del género *Saccharomyces* utilizadas para realizar las fermentaciones en laboratorio.

Cepa	Especie	Tipo	Origen
L-16	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	INIA, Cauquenes
L-1333	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Comercial	Casa Blanca, Valparaiso
L-720	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No comercial	Alto Jahuel, Santiago
L-846	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No comercial	Alto Jahuel, Santiago
L-757	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No comercial	Alto Jahuel, Santiago
L-1374	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No comercial	Quella, Cauquenes
L-1528	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	No comercial	Parral, Cauquenes
L-1764	<i>Saccharomyces bayanus</i>	No comercial	Cauquenes

Tabla 2. Cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que fueron analizadas genómica y fenotípicamente.

Cepa	Tipo	Origen
EC1118	Comercial	Champagne, Francia
L-1333	Comercial	Casa Blanca, Valparaíso, Chile
L-957 *	No comercial	Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina.
L-958 *	No comercial	Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina.
L-959 *	No comercial	Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina.
L-960 *	No comercial	Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina.
S288c	Laboratorio	

* Cepas aisladas desde estanques en donde se había fermentado mosto utilizando la cepa EC1118 la temporada anterior.

4.2 Medios de Cultivo y Soluciones

Todas las cepas usadas en este estudio fueron cultivadas en medio YPD (Anexo 1.1) a 28 °C durante 15-18 h. Para evaluar la ocurrencia de cambios en el genoma de cepas de *Saccharomyces* durante fermentaciones continuas (Tabla 1, sección 4.1), las levaduras fueron cultivadas en mosto sintético a 28 °C (Anexo 1.2). Las soluciones usadas en los experimentos se encuentran en el Anexo 2.

4.3 Extracción de DNA

La extracción del DNA genómico total de las levaduras se realizó con el sistema *Wizard, Genomic DNA Purification kit* (Promega), de acuerdo a las instrucciones dadas por el proveedor. Primero, la levadura fue crecida en 5 mL de medio YPD líquido durante 15-18 h a 28 °C en agitación (Multitron, Infors, AG). Luego, las células fueron colectadas por centrifugación a 15.700 g por 5 min (Microcentrifuga 541D, Eppendorf) en microtubos de 1,5 mL (Axigen), para después resuspenderlas en 285 µL de EDTA 50 mM. A continuación, la suspensión fue tratada con 20 µL de la enzima zymoliasa 20T (Seikagaku Corporation) a 10 mg/mL por 2 h a 37 °C en agitación de 483 g (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf). Las células fueron colectadas por centrifugación a 15.700 g durante 5 min, para después ser resuspendidas en 400 µL de la solución *nuclei lysis solution* y en 133 µL de la solución *protein precipitation solution*. La mezcla fue homogenizada utilizando vortex durante 2 min y fue incubada en hielo por aproximadamente 1 hora. Después de finalizado este tiempo, las muestras fueron

centrifugadas dos veces a 15.700 g por 15 min a 4 °C (Universal 32R, Hettich), recuperando cada vez el sobrenadante que contenía el DNA. Éste, fue trasferido a un microtubo de 1,5 mL que contenía 300 µL de isopropanol, para luego mezclar por inversión hasta observar la aparición de un precipitado. Se recuperó el precipitado (DNA) por centrifugación a 15.700 por 10 min descartando el sobrenadante. Luego, el precipitado obtenido fue lavado con 300 µL de etanol frío al 70%. Cuando el precipitado estuvo seco, éste fue re-hidratado con 50 µL de la solución TE pH 7,4.

El DNA obtenido fue cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % en TAE 1X a 90 V (cámara BioRad), usando como marcador de concentración el DNA del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas). Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (1 µg/mL) y fueron observados en un transiluminador de luz UV (Vilbert Lourmat). La concentración de DNA obtenida fue entre 50 y 200 ng/µL. El DNA fue almacenado a 4 °C hasta su uso.

4.4 Curvas de Crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento para 8 cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Primero, para implementar un sistema de fermentación de laboratorio controlada para mosto sintético propio de levaduras el género *Saccharomyces*, se realizó la curva de crecimiento de la cepa L-16, mientras que para realizar los análisis fenotípicos comparativos entre cepas encontradas en estanques y cepas industriales

genéticamente similares, se realizaron curvas de crecimiento para las siete cepas mencionadas en la Tabla 2.

Las curvas se realizaron cultivando un inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ cel/mL de cada cepa en un matraz de 500 mL que contenía 200 mL de mosto sintético a 28 °C y en agitación (362 g) (Multitron, Infors, AG). Estas condiciones se mantuvieron durante todo el período que duró el crecimiento de las levaduras hasta que alcanzaron fase estacionaria, es decir, aproximadamente 30 h después de la inoculación. La absorbancia a 600 nm (Weiss y col, 2003) fue medida en triplicado para cada cepa y en intervalos de una hora durante 35 h en un espectrofotómetro UV-visible (Shimadzu). Luego, estos datos de absorbancia fueron transformados a medidas de biomasa (mg/mL) mediante la medición de absorbancia a 600 nm de distintas diluciones de un precipitado de levaduras secas. Estos precipitados fueron obtenidos mediante el crecimiento de cada cepa en un matraz de 500 mL que contenía 200 mL de mosto sintético y un inóculo inicial de $1,5 \times 10^6$ cel/mL a 28 °C y en agitación (362 g) durante 30 h. Pasado este tiempo, se realizó la colecta de las células mediante centrifugación a 15.700 g por 15 min, las que fueron pesadas en una balanza (Sartorius BP 3100S) y diluidas en 10 mL de mosto sintético. Las medidas de absorbancia a 600 nm de las distintas diluciones del precipitado de levaduras secas permitió realizar curvas de Absorbancia (600 nm) vs. Biomasa (mg/mL) para cada cepa, curvas de donde se normalizaron los datos obtenidos de absorbancia a las distintas h de crecimiento para llevarlos a la medida de Biomasa vs. Tiempo. De todas las curvas se obtuvieron los datos de la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) para cada cepa desde las pendientes de las curvas en los puntos en donde las levaduras

se encontraban en fase exponencial. A las levaduras mencionadas en la Tabla 2, también se les calculó el tiempo generacional (T_g) o tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos utilizando la fórmula (1). A estas mismas cepas se les determinó el tiempo en el que estuvieron en fase lag de crecimiento, el tiempo durante el cual se encontraron en fase exponencial y la biomasa total, es decir, la biomasa encontrada al inicio de la fase estacionaria de crecimiento.

$$(1) T_g = \ln 2 / \mu_{\text{máx}} \text{ (Brock, 1997)}$$

4.5 Fermentaciones en Laboratorio

Las fermentaciones en laboratorio se realizaron en un bioreactor Applikon de 650 mL de capacidad a 28 °C utilizando mosto sintético como medio de cultivo (Figura 1). Para ello, se adicionó un inóculo inicial de levaduras correspondiente al 5 % (v/v) de los 650 mL de medio sintético previamente agregados al bioreactor, con lo que se inició la fermentación por lote de cada cepa durante las 30 primeras h de crecimiento (punto aproximado en el que se encuentran entre fase exponencial y estacionaria). Después, se emprendió la fermentación continua, etapa en la cual se utilizó un flujo de entrada de medio fresco y salida medio fermentado (F) calculado utilizando la fórmula (2). F se calculó utilizando el dato del 90 % de $\mu_{\text{máx}}$ de la cepa L-16 y los 650 mL de volumen (V) que fueron agregados al bioreactor.

$$(2) F = \mu_{\text{máx}} * V \text{ (Dunn y col, 2003)}$$



Figura 1. Sistema de fermentación de laboratorio utilizando bioreactor Applikon de 650 mL de capacidad. Las fermentaciones se realizaron en mosto sintético a 28 °C y agitación.

Finalmente, y aplicando la fórmula (3), se obtuvo el dato del tiempo (t) durante el cual se mantuvo el proceso de fermentación continua.

$$(3) \text{Ln } N_t = \text{Ln } N_o + \mu_{\text{máx}} * t \quad (N_t = 1000, N_o = 1) \quad (\text{Brock, 1997})$$

Luego de terminada la fermentación continua, el producto de fermentación fue sembrado a distintas diluciones en placas con medio YPD sólido para obtener colonias aisladas y luego elegir 30 de éstas al azar para extraer su DNA.

4.6 AFLP

Se analizaron mediante la técnica de AFLP 3 colonias al azar de cada cepa mencionada en la Tabla 1, así como 30 colonias al azar obtenidas del producto de la fermentación de estas mismas cepas. También se usó esta metodología para realizar análisis comparativos génicos a las cepas mencionadas en la Tabla 2.

4.6.1 Restricción del DNA

250 ng del DNA genómico de cada cepa fueron digeridos con 2,5 U de la enzima *MseI* (Fermentas) en 1X de Solución Buffer Tango 10 X (Fermentas), en un volumen final de 25 μ L para cada reacción. Esta mezcla fue incubada a 37 °C por 120 min y después la enzima fue inactivada a 65 °C por 20 min. A continuación, se agregaron 20 U de la enzima *EcoRI* a cada reacción y se incubó cada mezcla a 37 °C por 150 min. Finalmente, se inactivó la enzima a 65 °C por 20 min.

4.6.2 Ligación de adaptadores

Para preparar los adaptadores antes de la ligación, se elaboró una solución inicial de 50 μ M de cada adaptador (Tabla 3). Se alinearon los adaptadores a 65 °C por 15 min y fueron enfriados a temperatura ambiente por 30 min. En el caso del adaptador *EcoRI*, éste fue diluido a 5 μ M. Ambos adaptadores fueron almacenados a 4 °C hasta su uso.

Tabla 3. Adaptadores *EcoRI* y *MseI*.

Adaptador	Oligo 1 (5'-3')	Oligo 2 (5'-3')
<i>EcoRI</i>	CTCGTAGACTGCGTACC	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>MseI</i>	GACGATGAGTCCTGAG	TACTCA'GGACTCAT

La reacción de ligación se realizó mezclando 20 μ L de cada reacción de digestión (punto 4.6.1) con 0,025 μ M del adaptador *EcoRI*, 0,25 μ M del adaptador *MseI*, 1X de Solución Buffer T4 DNA ligasa 10 X (Fermentas), 0,02 Weiss U de la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) y agua estéril hasta completar 25 μ L de volumen final para cada reacción. Esta mezcla de ligación se dejó incubar a 37 °C por 3 h y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

4.6.3 Reacción de PCR AFLP

Para visualizar los fragmentos ligados a los adaptadores, fue necesario amplificarlos selectivamente mediante PCR. Esta amplificación selectiva se consigue mediante el uso de partidores complementarios a los adaptadores y a los sitios de restricción y que se extienden a los fragmentos de DNA, amplificando sólo aquellas secuencias en donde las extensiones de los partidores coinciden con uno o dos nucleótidos flanqueando los sitios de restricción. La pareja de partidores escogida fue *EcoAG-MseT* (Tabla 4).

Tabla 4. Partidores usados en amplificación por PCR de AFLP.

Partidor	Secuencia (5'-3')
<i>EcoAG</i>	AGACTGCGTACCAATTCAG
<i>MseT</i>	GATGAGTCCTGAGTAAT

La reacción de PCR se preparó para un volumen final de 25 μ L utilizando 5 μ L de una dilución 1/10 del DNA previamente digerido y ligado, 1 X de Solución Buffer 10 X (Fermentas), 2 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTP, 0,24 μ M de cada partidor y 0,5 U de Taq Polimerasa (Fermentas).

El programa de amplificación de la reacción de PCR fue el siguiente: denaturación inicial durante 2 min a 94 °C, seguido de 30 ciclos con denaturación durante 30 s a 94 °C, hibridación por 1 min a 55 °C y elongación durante 1 min a 72 °C. Finalmente, se realizó una elongación final durante 5 min a 72 °C.

4.6.4 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida

Los fragmentos producto de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y después fueron visualizados aplicando tinción de plata (SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System, Promega, USA). Para iniciar el procedimiento, se lavaron los vidrios en los que se iban a realizar las electroforesis con abundante agua y etanol. Luego, uno de los vidrios, el más pequeño, se trató con la solución Bind Silane (1 mL de etanol 100%, 5 μ L de Bind Silane PlusOne American Biosciences y 5 μ L de ácido acético 10%) y el vidrio de mayor tamaño fue tratado con 400 μ L de la solución Repel Silane ES (PlusOne, American Bioscience).

Después, se preparó el gel de poliacrilamida al 6% de la siguiente forma: se preparó una mezcla de acrilamida:bisacrilamida 19:1, urea 7M (Winkler) y TBE 1 X,

solución de la cual se tomaron 60 mL a los que se les agregaron 80 μ L de TEMED (Winkler) y 90 μ L de persulfato de amonio 20%. Se dejó polimerizar la mezcla durante 30 min.

Cuando el gel ya estuvo polimerizado, fue pre-corrído a 70 W durante 30 min con el buffer de corrida TBE 0,5 X. Antes de cargar las muestras, a cada una se le agregó buffer de carga denaturante (Formamida 95 %, xylencianol, EDTA 50 mM) en una relación 1:5 (buffer denaturante:muestra). A continuación, las muestras fueron denaturadas a 95 °C por 10 min e inmediatamente fueron puestas en hielo. 7 μ L de cada muestra fueron cargados en distintos pocillos del gel, el cual fue corrido a 30 W durante 3 h.

La tinción del gel se llevó a cabo con nitrato de plata de acuerdo a las indicaciones del fabricante del protocolo SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System (Promega, USA). Este protocolo consiste en fijar el gel en ácido acético 10% por 30 min, después lavarlo 2 veces con agua ultrapura por 5 min y teñirlo en una solución 0,1% nitrato de plata durante 30 min. Para el revelado del gel, éste fue sumergido en una solución alcalina 0,3 M de carbonato de sodio preparada con 1,9 mL de formaldehído 37% y 4 mg de tiosulfato de sodio.

4.7 Interdelta Fingerprinting

Se analizaron mediante la técnica de Interdelta Fingerprinting 3 colonias al azar de cada cepa mencionada en la Tabla 1, así como 30 colonias al azar obtenidas del producto de la fermentación de estas mismas cepas. También se usó esta metodología para realizar análisis comparativos génicos a las cepas mencionadas en la Tabla 2.

4.7.1 Reacción de PCR Interdelta Fingerprinting

Para visualizar los polimorfismos encontrados entre las secuencias delta del genoma de las levaduras, fue necesario amplificar estas regiones mediante PCR. La reacción de PCR se preparó para un volumen final de 25 μ L utilizando 12,5 ng de DNA, 1 X de Solución Buffer 10 X (Fermentas), 2,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 1 μ M de cada partidor (Tabla 5) (Legras & Karst, 2003) y 1 U de Taq Polimerasa (Fermentas).

El programa de amplificación de la reacción de PCR fue el siguiente: denaturación inicial durante 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos con denaturación durante 30 s a 95 °C, hibridación por 30 s a 46 °C y elongación durante 90 s a 72 °C. Finalmente, se realizó una elongación a 72 °C por 10 min.

Tabla 5. Partidores usados en amplificación por PCR de Interdelta Fingerprinting.

Partidor	Secuencia (5'-3')
Delta 12	TCAACAATGGAATCCCAAC
Delta 21	CATCTTAACACCGTATATGA

4.7.2 Electroforesis en Geles de Agarosa

Los fragmentos producto de la amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 % en TAE 1X a 90 V (cámara BioRad) usando como marcador de peso molecular el estándar de 100 pb. Después, el gel fue teñido con solución de bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL. La visualización de las bandas se realizó en un transiluminador de luz UV (Vilbert Lourmat).

4.8 Secuenciación de Bandas Polimórficas

La mayoría de los fragmentos de DNA polimórficos obtenidos mediante AFLP e Interdelta Fingerprinting fueron cortados desde geles de agarosa al 1% y el DNA fue purificado desde la agarosa utilizando el sistema Axy Prep DNA Gel Extraction Kit (Axigen). En el caso de la banda polimórfica obtenida por la técnica de AFLP, se realizó un paso previo que consistió en cortar la banda del gel de poliacrilamida al 6%, manteniéndola entre 12-16 h hidratada con 20 µL de solución TE en un microtubo de 1,5 mL. Luego, el DNA fue rescatado desde el sobrenadante y amplificado utilizando el mismo programa y reactivos de PCR AFLP descritos anteriormente. El producto amplificado se cargó en un gel de agarosa al 1%, desde donde fue posteriormente recuperado. Los DNA obtenidos de todas las muestras fueron cuantificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % en TAE 1X a 90 V (cámara BioRad), usando como marcador de concentración el DNA del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (Fermentas).

Las secuenciaciones de los fragmentos de DNA se realizaron a través del servicio de secuenciación automática de DNA del Departamento de Ciencias Ecológicas, Laboratorio de Genética, Universidad de Chile y del servicio de secuenciación automática de DNA del Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Católica de Chile. El análisis mediante BLAST de estas secuencias se realizó a partir de la base de datos del proyecto *Saccharomyces* Genome Database (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/blast-sgd.pl>).

4.9 Análisis Estadístico

Se realizaron análisis estadísticos comparativos para las curvas de crecimiento de cepas comerciales (EC1118 y L-1333) y de cepas recolectadas de fermentaciones industriales en cuanto a la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y biomasa total alcanzada utilizando la Prueba de T ($p < 0,05$).

5.RESULTADOS

5.1 Fermentaciones en laboratorio

Se implementó un sistema de fermentación continua para todas las cepas mencionadas en la Tabla 1. Para llevar a cabo este sistema, se realizó la curva de crecimiento para la cepa L-16 (Figura 2), de la cual se obtuvieron los datos necesarios para ser utilizados en todas las levaduras durante las fermentaciones. Se observó que aproximadamente a las 30 horas de cultivo, la levadura empezó a disminuir su velocidad de crecimiento, es decir, comenzó su fase estacionaria de crecimiento. En esta etapa, las levaduras pasan de un crecimiento exponencial, en donde la velocidad de crecimiento alcanzada por las células es máxima, a una fase en donde se comienzan a agotar los nutrientes y/o se empiezan a acumular productos tóxicos, condición que produce un enorme estrés en los microorganismos y al cual las levaduras deben responder para poder sobrevivir (Werner-Washburne y col, 1996). Es por esta razón que fue elegido este momento de la curva, 30 horas después de iniciada la fermentación por lote, para iniciar la fermentación continua, ya que las levaduras se encontrarían respondiendo genética y fenotípicamente a las condiciones fermentativas desfavorables. Se seleccionó el valor del 90 % de la velocidad máxima de crecimiento (μ) (sección 4.4) de la cepa L-16 para crear el flujo de entrada de medio fresco y salida de medio fermentado (F) del bioreactor durante la fermentación continua, a modo de simular el crecimiento de las células dado por las condiciones desfavorables en la que se encontraban al terminar la fase exponencial y comenzar la fase estacionaria. El valor del 90 % de μ fue de $0,0482 \text{ horas}^{-1}$. Con este dato, y utilizando 650 mL de volumen (V) de medio sintético en el bioreactor, se

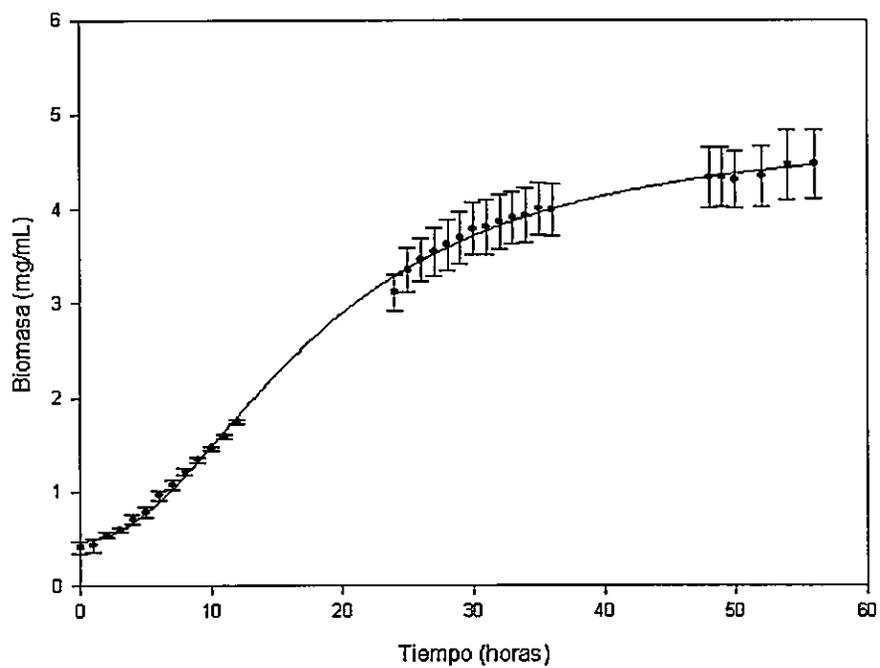


Figura 2. Curva de crecimiento de la cepa L-16. La cepa L-16 fue crecida en mosto sintético y agitación a 28 °C. La curva es el promedio de tres experimentos.

aplicó la fórmula (2) de la sección 4.5, obteniéndose un valor de F de 31,33 mL/hora. Finalmente, y aplicando la fórmula (3) de la sección 4.5, se obtiene el dato del tiempo (t) durante el cual se mantuvo el proceso de fermentación continua, cuyo valor fue de 143,3 horas, lo que corresponde a aproximadamente 6 días. Es así como la fermentación se coordinó en dos partes: primero, una fermentación por lote durante las 30 primeras horas de crecimiento y segundo, 6 días de fermentación continua controlada.

5.2 Análisis genómico de levaduras en fermentaciones en laboratorio mediante

AFLP

Con el objeto de seleccionar los partidores que originaran el mayor grado de polimorfismo entre las cepas estudiadas, se realizaron varias pruebas de AFLP utilizando distintas parejas de partidores. La pareja de partidores escogida fue *EcoAG-MseT* (Tabla 4), en la cual la extensión del partidor *EcoAG* coincide con los nucleótidos adenina y guanina que flanquean los sitios de restricción y la extensión del partidor *MseT* coincide con el nucleótido timina flanqueante a los mismos sitios.

Se analizaron mediante la técnica de AFLP tres colonias al azar de las cepas mencionada en la Tabla 1, así como 30 colonias al azar obtenidas del producto de la fermentación de estas mismas cepas. Las tres colonias escogidas al azar sin fermentar de cada cepa revelaron bandeos monomórficos, lo que permitió descartar la presencia de mutaciones espontáneas al menos detectadas por esta técnica. Esto permitió usar estas 3 colonias como controles negativos de cambios en el genoma en levaduras que no han sufrido el proceso de fermentación.

Los resultados arrojados luego de aplicar la técnica de AFLP al DNA de las 30 colonias indicaron que no hubo presencia de bandeos polimórficos al compararlas con sus respectivas colonias controles. Ejemplos de esta evidencia se advierten en los geles de AFLP de las cepas L-16 (Figura 3) y L-1764 (Figura 4).

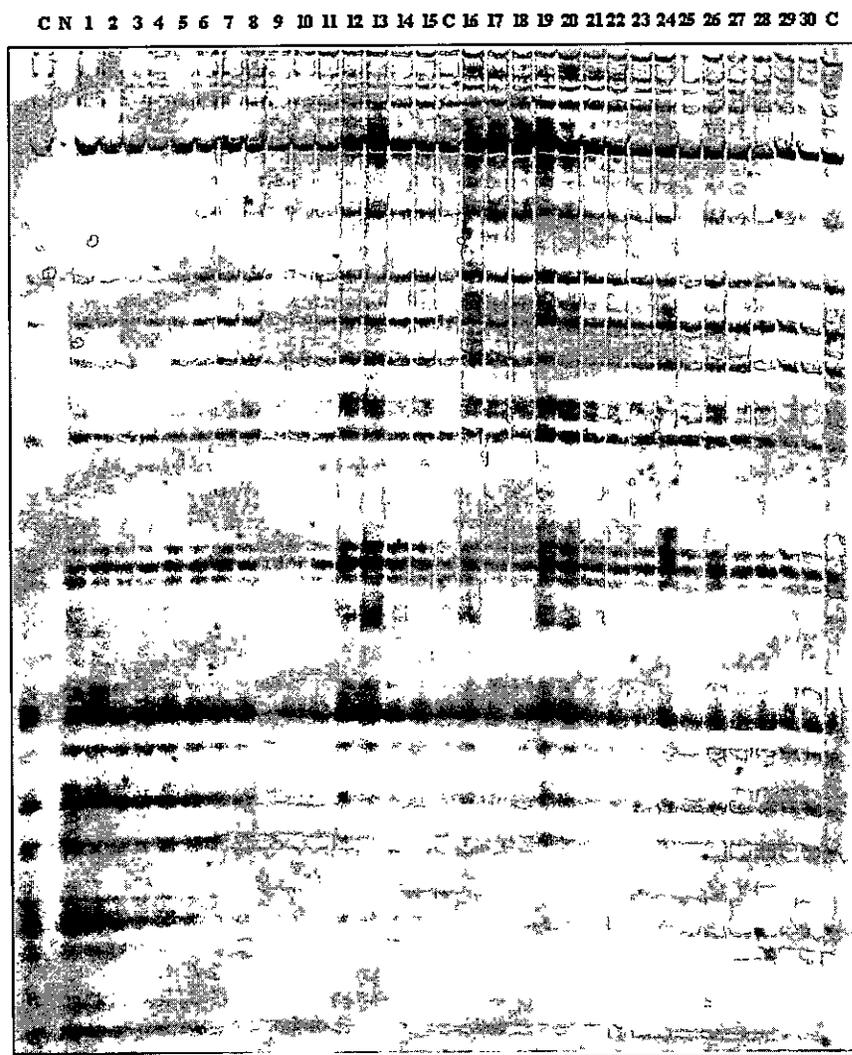


Figura 3. Análisis AFLP de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-16 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR AFLP correspondientes a 34 muestras separadas en gel de poliacrilamida al 6% a 30 W durante 3 h. Carriles 1 al 30: colonias obtenidas del producto de la fermentación de la cepa L-16; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carril N: control negativo de la reacción de PCR.

C N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 C 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 C

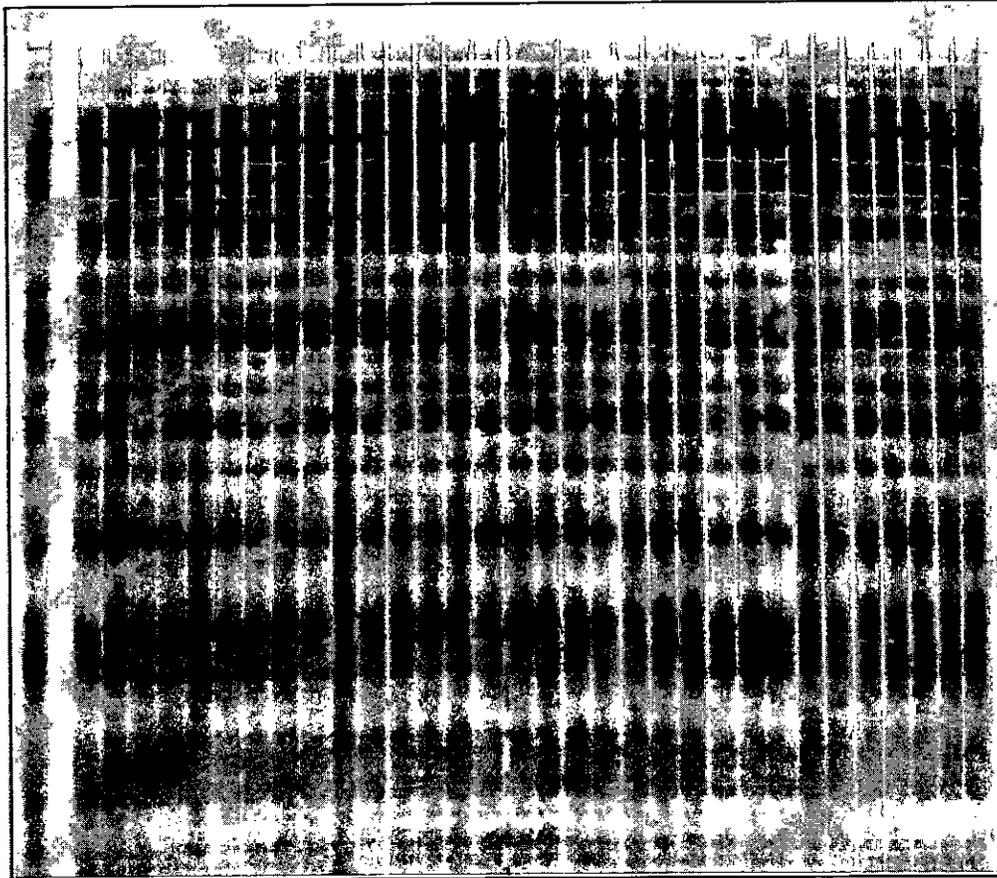


Figura 4. Análisis AFLP de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1764 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR AFLP correspondientes a 34 muestras separadas en gel de poliacrilamida al 6% a 30 W durante 3 h. Carriles 1 al 30: colonias obtenidas del producto de la fermentación de la cepa L-1764; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carril N: control negativo de la reacción de PCR.

5.3 Análisis genómico de levaduras en fermentaciones en laboratorio mediante

Interdelta Fingerprinting

Todos las reacciones de PCR Interdelta Fingerprinting se realizaron utilizando los partidores delta 12 y delta 21 (Tabla 5), ya que se ha descrito que optimizan la obtención de amplificadores polimórficos de forma tanto inter como intraespecífica (Legras & Karst, 2003).

Se analizaron mediante la técnica de Interdelta Fingerprinting tres colonias al azar de cada cepa mencionada en la Tabla 1, así como 30 colonias al azar obtenidas del producto de la fermentación de estas mismas cepas. Al igual que lo ocurrido al aplicar la técnica de AFLP, las tres colonias escogidas al azar sin fermentar de cada cepa presentaron bandeos monomórficos. Esto permitió descartar, al menos por esta técnica, la presencia de mutaciones espontáneas que podrían afectar el posterior análisis. Es por esta razón que se usaron estas tres colonias de cada cepa como controles negativos de cambios en el genoma de las levaduras.

A las mismas 30 colonias escogidas al azar, a cuyo DNA se les efectuó un análisis mediante AFLP (sección 5.2), y que fueron producto de las fermentaciones realizadas en las 8 cepas mencionadas en la Tabla 1, también se les realizó un análisis mediante Interdelta Fingerprinting. Los resultados obtenidos con este marcador fueron diversos entre las cepas estudiadas. En 6 de éstas (L-16, L-720, L-757, L-846, L-1333 y L-1374), se observó polimorfismo genómico entre las colonias obtenidas de la fermentación y los

controles, pero en distintos grados. Por otro lado, en las dos cepas restantes de este estudio (L-1528 y L-1764), no hubo aparición de bandeos polimórficos. Las cepas que presentaron el menor polimorfismo entre las colonias fermentadas y las colonias sin fermentar fueron las cepas L-16 (Figura 5), L-720 (Figura 6) y L-757 (Figura 7). En estas cepas sólo se observó la presencia o ausencia de una banda en una de las colonias producto de la fermentación. En la figura 5 podemos observar que la colonia 13 producto de la fermentación de la cepa L-16, no presentó una banda de aproximadamente 110 pb que sí se encontraba en todas las otras colonias estudiadas. Asimismo, el gel de Interdelta Fingerprinting de la cepa L-757 (Figura 7) tampoco presentó una banda de aproximadamente 520 pb en la colonia 1. Por otro lado, la colonia 13 obtenida de la cepa L-720 (Figura 6) presentó una banda extra de aproximadamente 50 pb que en ninguna de las otras colonias apareció.

Otra cepa que presentó un bajo polimorfismo producto de la fermentación de laboratorio fue la cepa L-1333 (Figura 8), en la cual se encontraron cambios en la colonia 20 obtenida de la fermentación. En esta colonia, hubo aparición de una banda de aproximadamente 100 pb y ausencia de una banda de aproximadamente 160 pb, diferencias que no se detectaron en las otras colonias fermentadas.

Con un mayor grado de polimorfismo se observó el DNA de la cepa L-846 (Figura 9), en el cual se logra detectar la presencia de 5 patrones de bandeo entre las colonias. Uno de ellos fue el encontrado en la mayoría de las colonias, el cual fue el mismo patrón dado por los controles sin fermentar, es decir, en estas colonias no hubo cambios

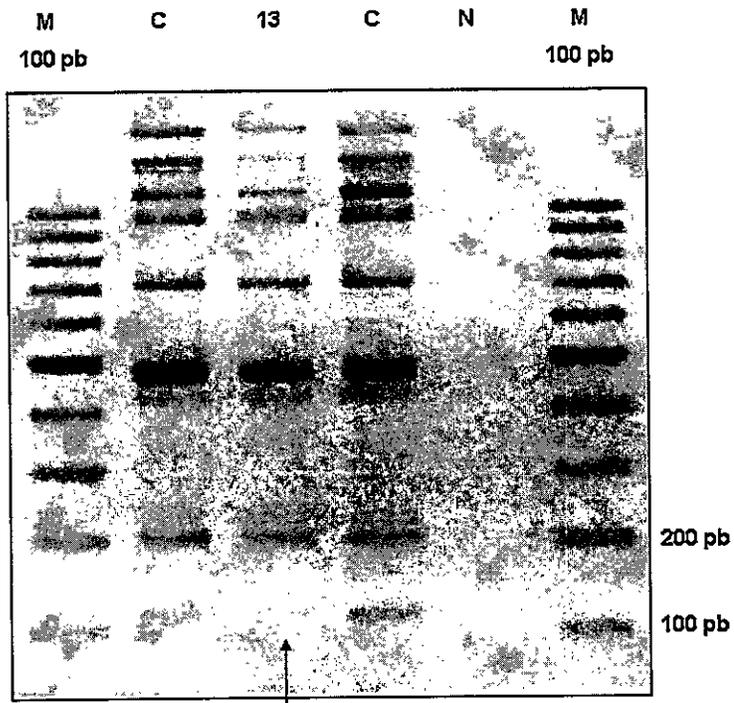


Figura 5. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-16 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 4 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carril 13: colonia 13 obtenida del producto de la fermentación de la cepa L-16; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carril N: control negativo de la reacción de PCR. Flecha negra indica banda de aproximadamente 110 pb ausente en colonia 13.

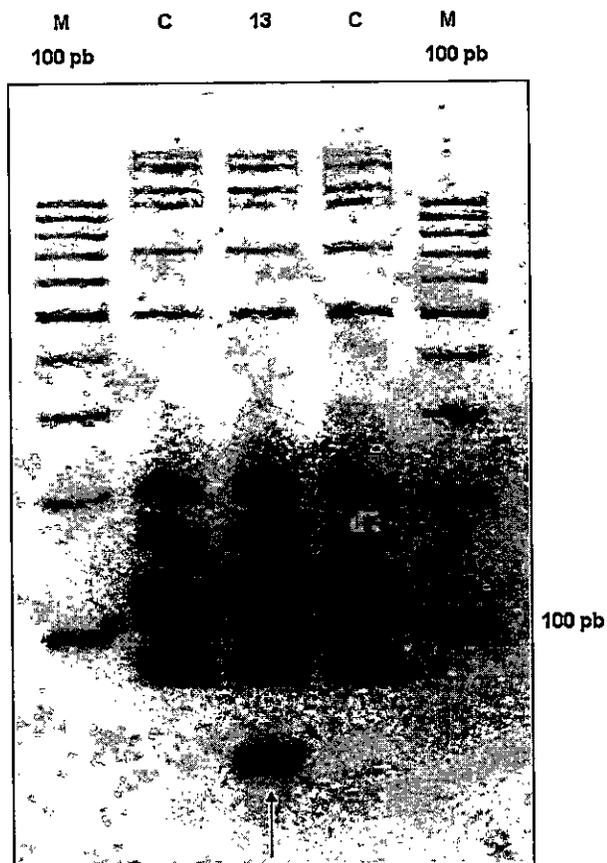


Figura 6. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-720 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 3 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carril 13: colonia 13 obtenida del producto de la fermentación de la cepa L-720; Carriles C: colonias controles sin fermentar. Flecha negra indica banda de aproximadamente 50 pb presente en colonia 13.

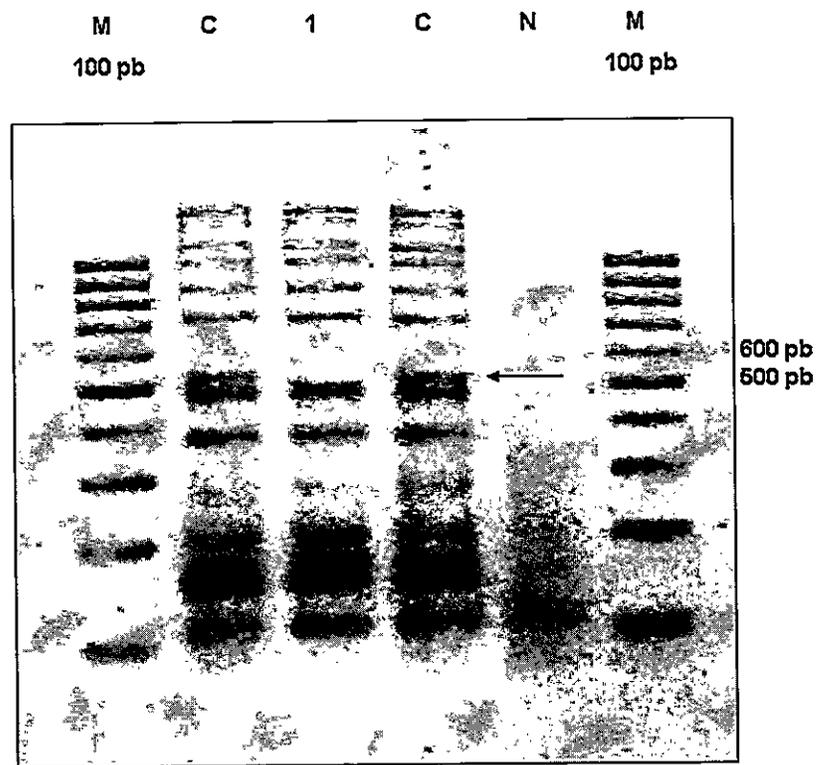


Figura 7. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-757 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 4 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carril 1: colonia 1 obtenida del producto de la fermentación de la cepa L-757; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carril N: control negativo de la reacción de PCR. Flecha negra indica banda de aproximadamente 520 pb ausente en colonia 1.

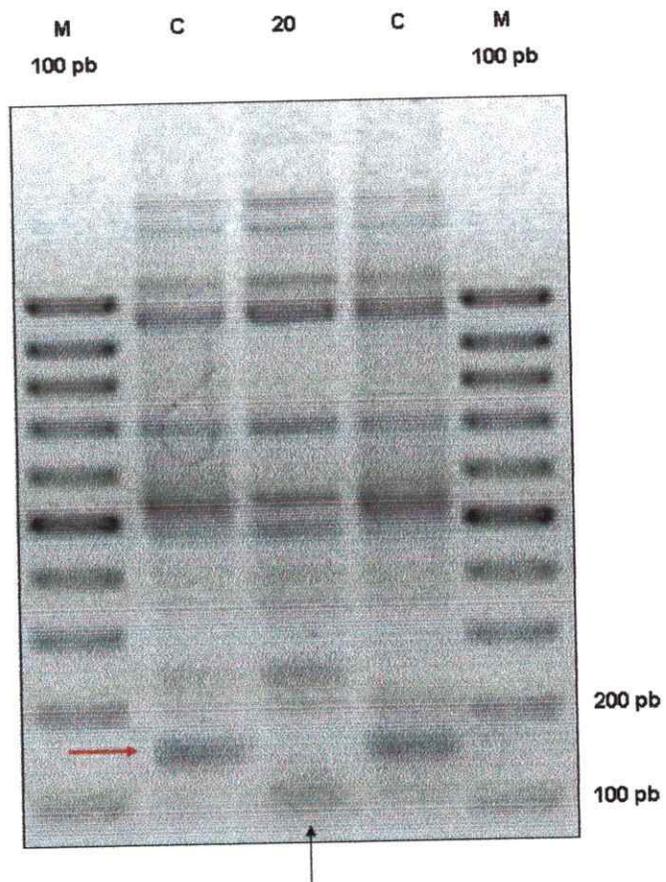


Figura 8. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1333 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 3 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carril 20: colonia 20 obtenida del producto de la fermentación de la cepa L-1333; Carriles C: colonias controles sin fermentar. Flecha negra indica banda de aproximadamente 100 pb presente en colonia 20 y flecha roja indica banda de aproximadamente 160 pb ausente en colonia 20.

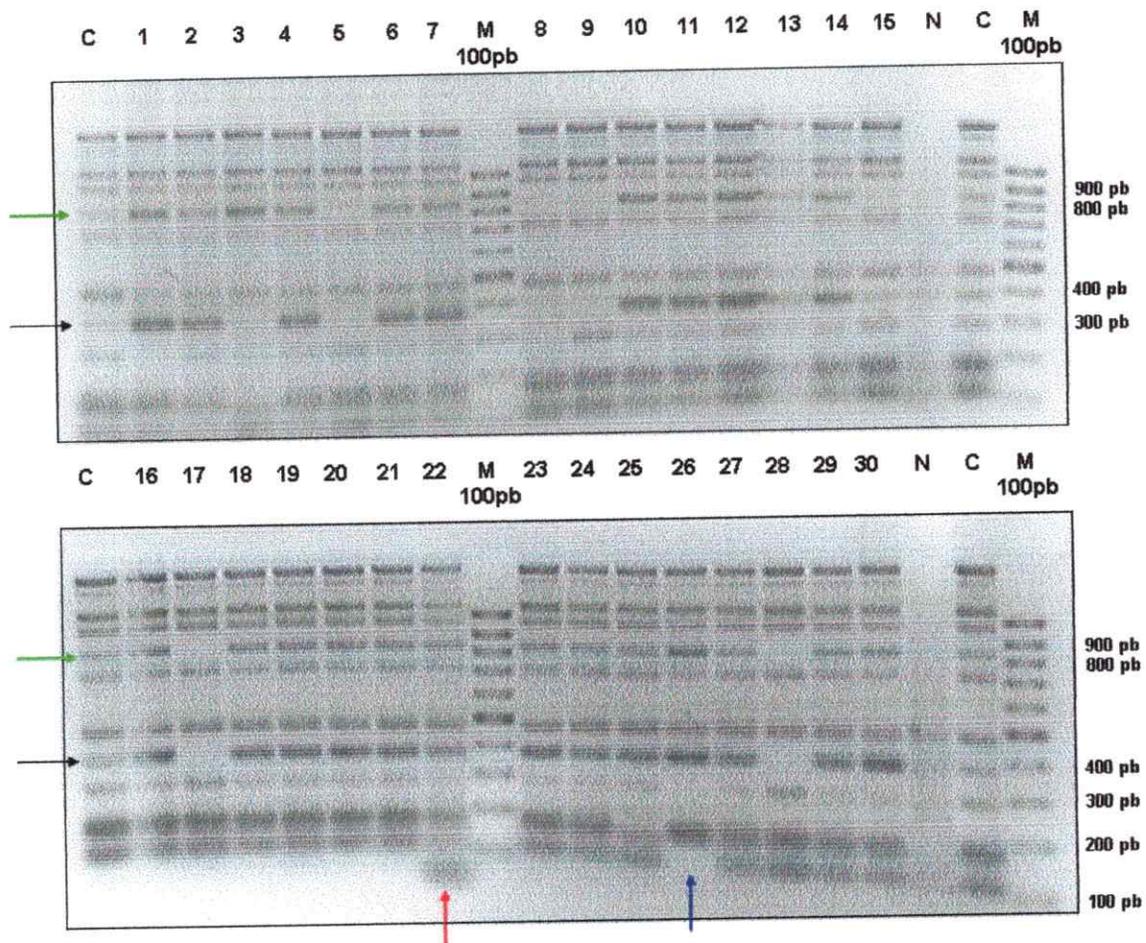


Figura 9. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-846 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 36 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carriles 1-30: colonias obtenidas del producto de la fermentación de la cepa L-846; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carriles N: control negativo de la reacción de PCR. Flecha verde indica banda de aproximadamente 850 pb ausente en colonias 5, 8, 9, 15, 17 y 28; flecha negra indica banda de aproximadamente 380 pb ausente en colonias 3, 5, 8, 9, 17 y 28; flecha roja indica presencia de banda de aproximadamente 70 pb en colonia 22 y flecha azul indica ausencia de banda de aproximadamente 110 pb en colonia 26.

producto de la fermentación. Sin embargo, los otros 4 patrones observados fueron diferentes a los controles y fueron observados en colonias distintas. Una banda de aproximadamente 850 pb estuvo ausente del patrón de bandeo en las colonias 5, 8, 9, 15, 17 y 28 al compararlas con los controles sin fermentar. De esta misma forma, se observó la ausencia de una banda de aproximadamente 380 pb en las colonias 3, 5, 8, 9, 17 y 28. Por otro lado, los dos patrones restantes fueron los detectados en las colonias 22 y 26. En la primera, hubo presencia de una banda de aproximadamente 70 pb que no se encontró en ninguna otra colonia, mientras que en la colonia 26 hubo ausencia de una banda de aproximadamente 110 pb.

Finalmente, la última cepa de las analizadas en la que se observaron bandeos polimórficos fue la cepa L-1374 (Figura 10), la cual tuvo la peculiaridad de presentar sólo dos patrones de bandeo, en donde el patrón de las colonias controles sin fermentar no fue el mayoritario entre las colonias analizadas, contrario a lo que había ocurrido en las cepas analizadas anteriormente. 22 de las 30 colonias seleccionadas al azar (colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30) presentaron un patrón de bandeo particular, el cual constaba de una banda extra de aproximadamente 1375 pb, una banda de aproximadamente 850 pb, una banda de aproximadamente 480 pb, y la ausencia de una banda de aproximadamente 500 pb que si se encontraba presente en las colonias controles y en las 8 colonias restantes.

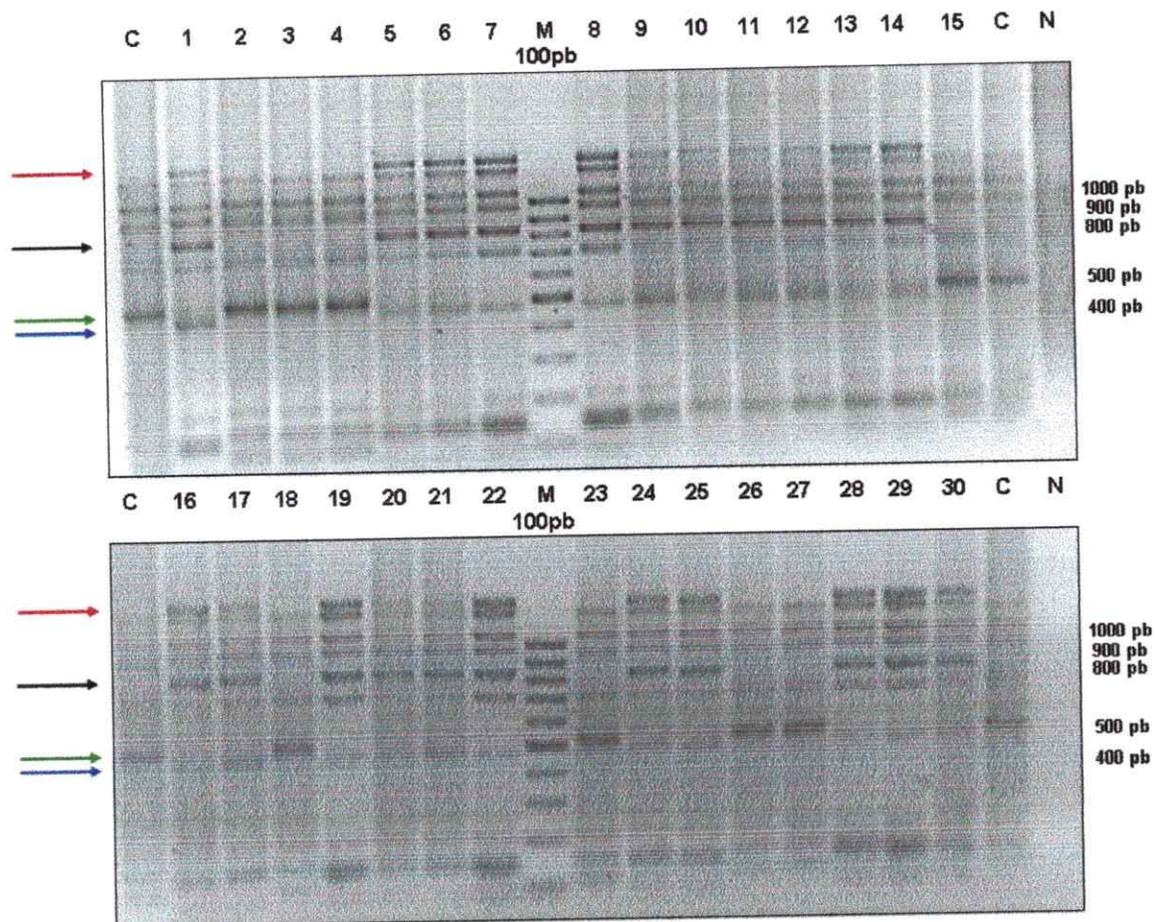


Figura 10. Análisis Interdelta Fingerprinting de las colonias producto de la fermentación de la cepa L-1374 y sus controles. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a 36 muestras y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Carriles 1-30: colonias obtenidas del producto de la fermentación de la cepa L-1374; Carriles C: colonias controles sin fermentar; Carriles N: control negativo de la reacción de PCR. Las colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30 presentaron una banda extra de aproximadamente 1375 pb (flecha roja), una banda de aproximadamente 850 pb (flecha negra) y una banda de aproximadamente 480 pb (flecha azul), pero no una banda de aproximadamente 500 pb (flecha verde) que si se encontraba presente en las colonias controles y en el resto de las colonias.

5.4 Análisis genómico de cepas comerciales y de cepas recolectadas de fermentaciones industriales

Cepas utilizadas de forma industrial (EC1118 y L-1333) y cepas aisladas desde bodegas en donde en la temporada anterior se había fermentado mosto utilizando la cepa EC1118, fueron utilizadas en este análisis comparativo, así como también un control negativo (cepa de laboratorio S288c) (Tabla 2).

La cepa EC1118 es una levadura comercial proveniente de Champagne, Francia, que ha sido ampliamente utilizada en viñas chilenas y en otras partes del mundo desde la década de los 80. Por otro lado, la cepa L-1333 es una cepa que fue recolectada en el valle de Casablanca, Valparaíso, Chile, a fines de los años 90, y desde hace aproximadamente 3 años es comercializada. Por características genéticas similares, se sugiere que la cepa EC1118 sería ancestro de la cepa L-1333, y que habría sido utilizada en alguna bodega o viña de la zona de Casablanca como cepa comercial, y que después habría sido recolectada, denominándola L-1333 (Martínez y col, 2007). Por otra parte, las cepas L-957, L-958, L-959 y L-960 fueron recolectadas de bodegas en la zona de Lujan de Cuyo, Mendoza, Argentina, en donde se había fermentado mosto utilizando la cepa comercial EC1118 un año antes. Este análisis buscó comparar genéticamente cepas comerciales genómicamente similares, como también analizar cepas recolectadas desde un ambiente fermentativo poco favorable en donde permanecieron por un período prolongado.

En la figura 11 se puede observar que, mediante la técnica de AFLP, no hubo distinción entre las cepas comerciales EC1118 y L-1333. Por otro lado, sí hubo una diferencia a nivel de DNA en la cepa L-958 en donde se observa la ausencia de una banda que sí se encontró presente en todas las otras cepas estudiadas. Algo similar ocurrió en el caso del análisis mediante Interdelta Fingerprinting (Figura 12), en donde tampoco se encontraron diferencias entre las cepas comerciales, pero de la misma forma anterior, hubo una banda de aproximadamente 160 pb que no se encontró presente en la cepa L-957 al compararla con el resto de las cepas.

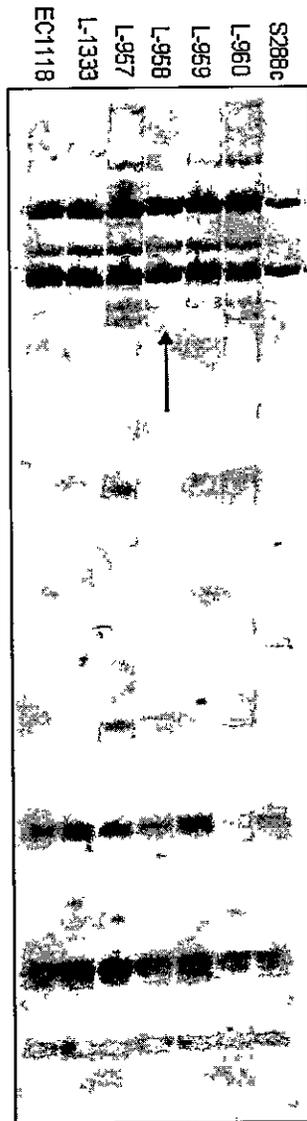


Figura 11. Análisis AFLP de cepas comerciales y de cepas obtenidas de bodegas. Amplificados obtenidos de PCR AFLP correspondientes a las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c separadas en gel de poliacrilamida al 6% a 30 W durante 3 h. Flecha negra indica ausencia de banda en la cepa L-958.

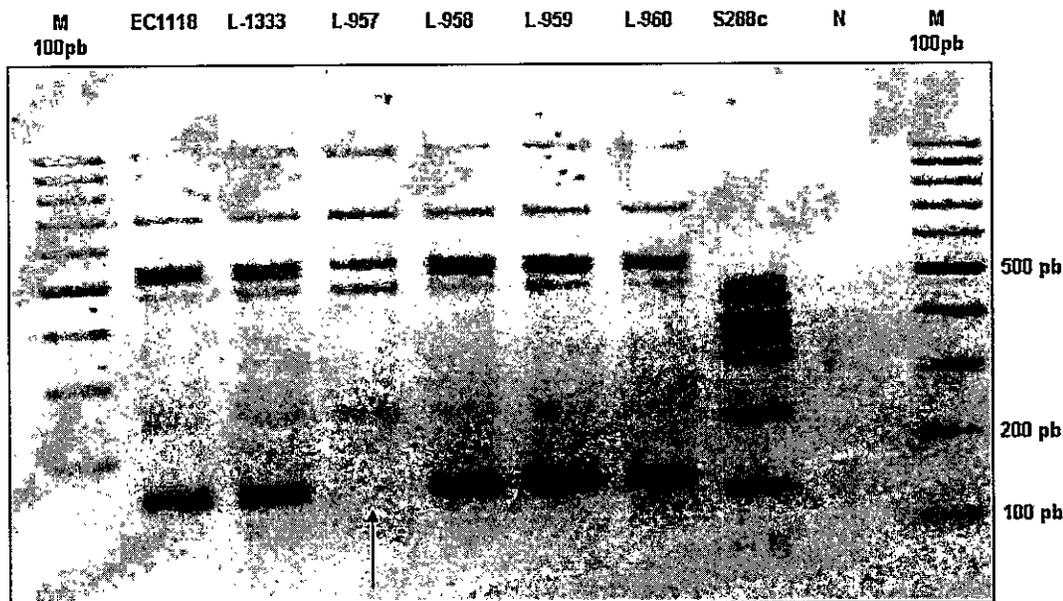


Figura 12. Análisis Interdelta Fingerprinting de cepas comerciales y de cepas obtenidas de bodegas. Amplificados obtenidos de PCR Interdelta Fingerprinting correspondientes a las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c y marcadores estándar de 100 pb separados en gel de agarosa al 2% a 90 V. Flecha negra indica ausencia de banda de aproximadamente 160 pb en la cepa L-957.

5.5 Análisis fenotípico de cepas comerciales y de cepas recolectadas de fermentaciones industriales

Las mismas cepas de levaduras analizadas en la sección 5.4 fueron estudiadas fenotípicamente, a modo de evaluar si los cambios genómicos se correlacionaban con fenotipos asociados a características industriales.

Se realizaron curvas de crecimiento de todas las cepas mencionadas anteriormente (Figura 13). En esta figura, se distinguen dos agrupaciones, una que solo consta de la cepa S288c y otra que congrega las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959 y L-960, y que presentan un promedio de biomasa menor al de la cepa de laboratorio. Se realizó un análisis estadístico comparativo utilizando la Prueba de T ($p < 0,05$) a estas curvas en cuanto a la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y biomasa total alcanzada por cada cepa. El gráfico de la Figura 14 nos indica que todas las velocidades máximas de crecimiento de las cepas estudiadas no presentaron diferencias estadísticas ($p < 0,05$), a excepción de la cepa control de laboratorio S288c, cuyo valor promedio fue de aproximadamente el doble del de las otras cepas. Esta misma tendencia se observó en el gráfico de la Figura 15, en donde la biomasa total alcanzada por la cepa S288c fue bastante mayor y significativamente diferente a todas las biomásas totales logradas por las otras cepas, las cuales resultaron no ser significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). De la misma forma, y al estar el tiempo generacional (tg) asociado al valor de $\mu_{\text{máx}}$ mediante la fórmula (1), este valor tampoco fue significativamente distinto entre las cepas recolectadas de bodegas (L-957, L-958, L-959 y L-960) y las cepas comerciales

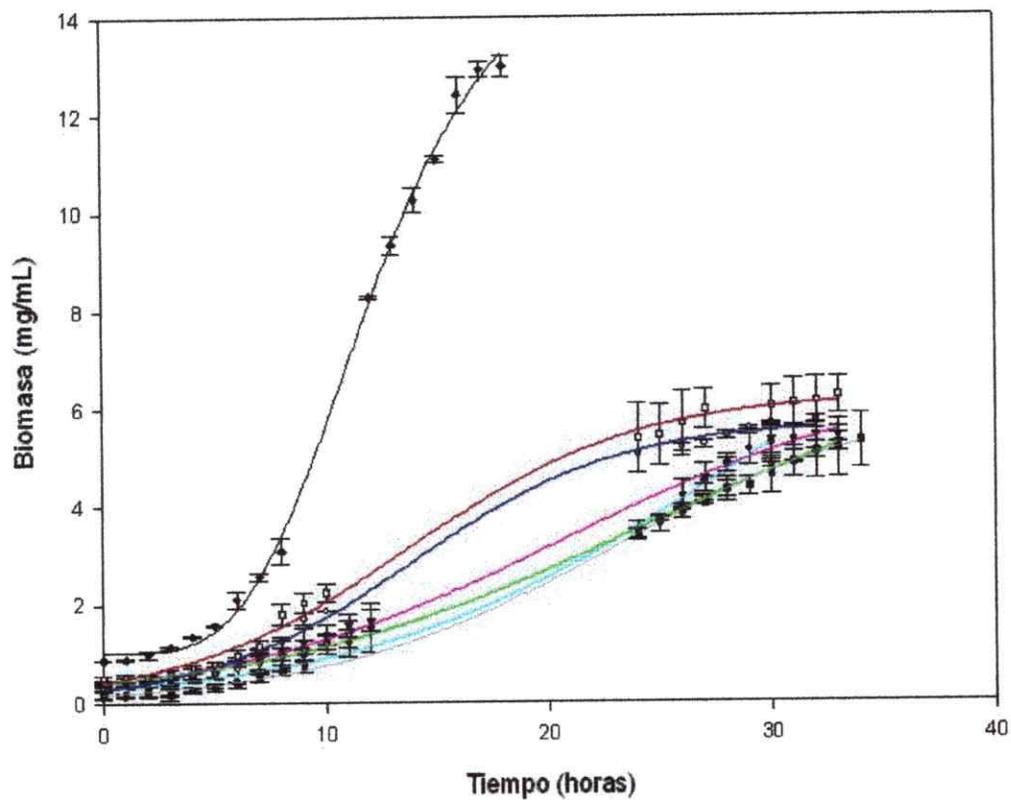


Figura 13. Curvas de crecimiento de las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c. Las levaduras fueron crecidas en mosto sintético, a 28 °C y en agitación, y los valores de biomasa fueron normalizados a partir de las magnitudes de absorbancia (600 nm) medidas cada una hora durante 35 h. EC1118 --- L-1333 --- L-957 --- L-958 --- L-959 --- L-960 --- S288c ---.

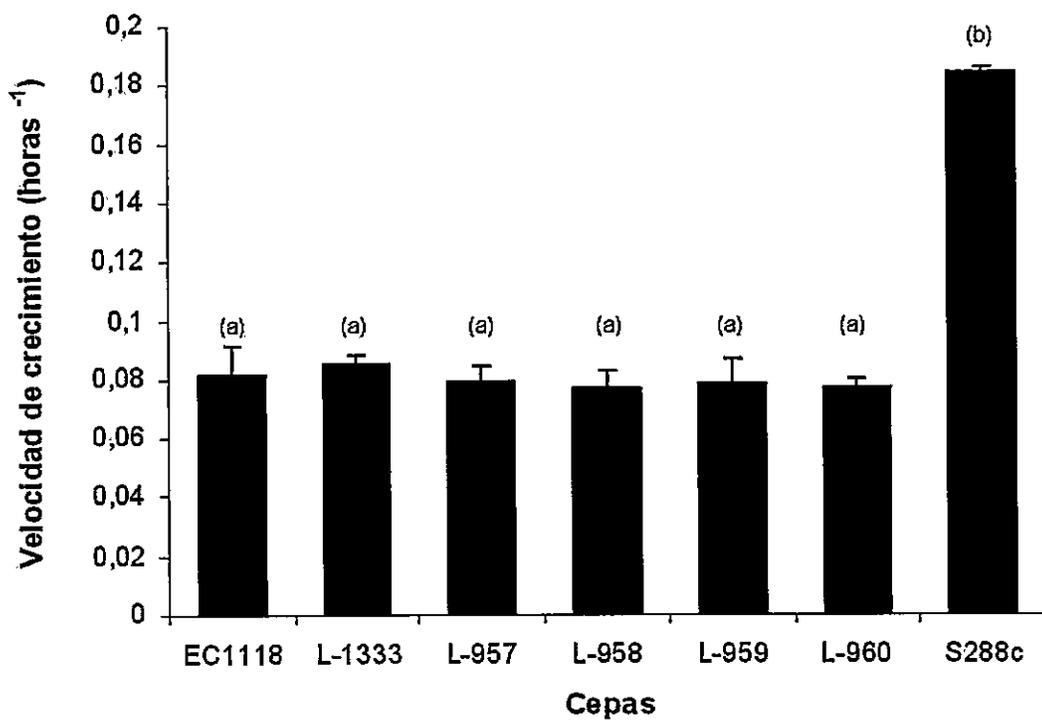


Figura 14. Gráfico de las velocidades máximas ($\mu_{\text{máx}}$) de crecimiento de las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c. Las velocidades máximas de crecimiento fueron obtenidas desde las pendientes de las curvas de crecimiento en los puntos de fase exponencial. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

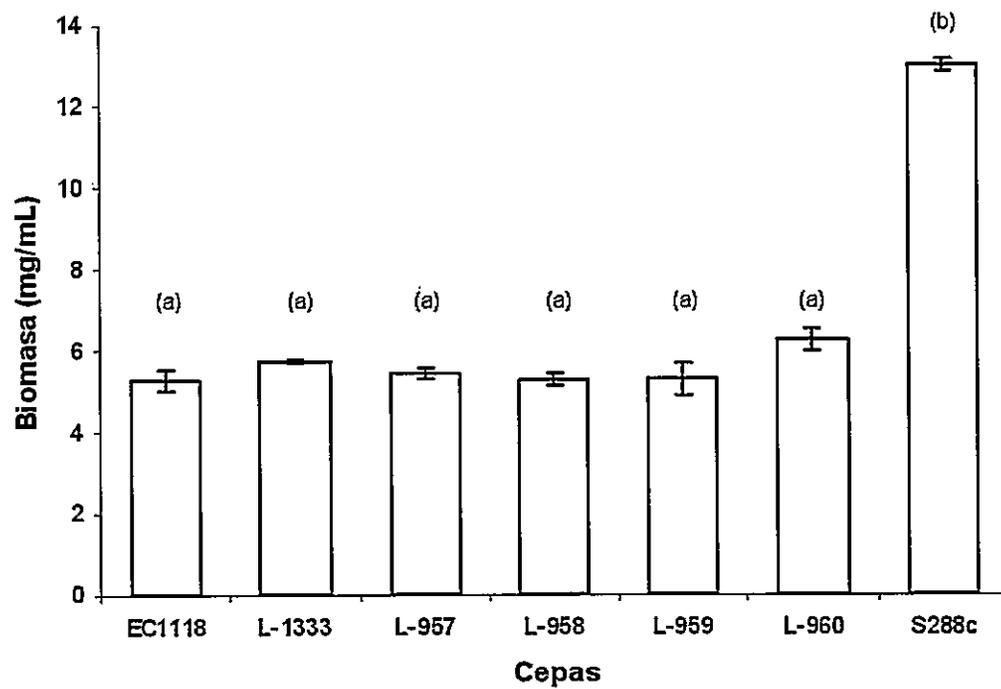


Figura 15. Gráfico de la biomasa total alcanzada por las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959, L-960 y S288c. Las biomاسas totales fueron obtenidas del promedio de las biomاسas encontradas al inicio de la fase estacionaria de las curvas de crecimiento. Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

(EC1118 y L-1333), pero efectivamente presentó un valor desigual al comparar este tg con el de la cepa S288c ($p < 0,05$). Por otra parte, y a excepción de la cepa control S288c, todas las otras cepas de la Tabla 2 presentaron tiempos similares en fase lag de crecimiento (valores entre 6 y 7 horas), y tiempos durante los cuales se encontraron en fase exponencial (valores entre 25 y 28 horas). El tiempo en que la cepa S288c se mantuvo en fase lag y en fase exponencial de crecimiento fue de 4 y 15 horas respectivamente, lapsos bastante menores al del promedio de las otras cepas estudiadas.

Toda esta información nos permite suponer que las cepas EC1118, L-1333, L-957, L-958, L-959 y L-960 presentan el mismo comportamiento fenotípico en cuanto a sus curvas de crecimiento, manifestando valores muy parecidos de tiempos en fase lag y en fase exponencial de crecimiento, así como la ausencia de valores significativamente distintos de $\mu_{\text{máx}}$, de tg y de biomasa total.

5.6 Secuenciación de los cambios genómicos detectados

13 de los 15 fragmentos de DNA polimórficos obtenidos utilizando las técnicas de AFLP e Interdelta Fingerprinting fueron purificados desde los geles y secuenciados, con el objeto de identificar las regiones del genoma que estarían involucradas en los rearrreglos producidos durante las fermentaciones en laboratorio e industriales.

En las Tablas 6 y 7 se encuentran los resultados de estas secuenciaciones parciales (anexo 3), en donde se observa que todas las secuenciaciones de las bandas polimórficas analizadas por las dos técnicas usadas en este trabajo, alinean con genes o regiones del genoma de *S. cerevisiae* que no tendrían relación con funciones fermentativas. Esto sugiere que los cambios genómicos observados podrían deberse a mutaciones en regiones de inestabilidad o variabilidad genómica, y que no afectarían necesariamente las propiedades fermentativas de la levadura.

Tabla 6. Datos obtenidos de la secuenciación de las bandas polimórficas observadas en las cepas comerciales y recolectadas de fermentaciones industriales.

Cepa	Presencia/Ausencia banda	Tamaño banda	Identidad de Secuencia (%)
L-957*	Ausencia al compararla con las cepas L-1321, L-1333, L-958, L-959, L-960	160 pb	LTR Ty1 (95)
L-958**	Ausencia al compararla con las cepas L-1321, L-1333, L-957, L-959, L-960	450 pb	LTR Ty1 (61)

* Metodología aplicada: Interdelta Fingerprinting.

** Metodología aplicada: AFLP.

Tabla 7. Datos obtenidos de la secuenciación de las bandas polimórficas observadas en las fermentaciones en laboratorio.

Cepa	Presencia/Ausencia banda	Tamaño banda	Identidad de Secuencia (%)
L-16	Ausencia colonia 13	110 pb	LTR Ty1 (66)
L-720	Presencia colonia 13	50 pb *	-
L-757	Ausencia colonia 1	520 pb	LTR Ty2 (82)
L-846	Presencia colonia 22	70 pb.*	-
	Ausencia colonia 26	110 pb	LTR Ty1 (67)
	Ausencia colonias 3, 5, 8, 9, 17 y 28	380 pb	ARS (82)
	Ausencia colonias 5, 8, 9, 15, 17 y 28	850 pb	LTR Ty1 (86)
L-1333	Presencia colonia 20	100 pb	Proteína de función desconocida (72)
	Ausencia colonia 20	160 pb	LTR retrotransposón grupo <i>Pseudoviridae</i> (87)
L-1374	Presencia colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30	480 pb	LTR Ty1 (97)
	Ausencia colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30	500 pb	LTR Ty1 (95)
	Presencia colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30	850 pb	LTR Ty1 (63)
	Presencia colonias 1, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 28, 29 y 30	1375 pb	Proteína Bifuncional carbamoyl fosfato sintetasa - aspartato transcarbamilasa (74)

* Bandas que no fueron secuenciadas por su bajo tamaño.
Metodología aplicada para todas las cepas: Interdelta Fingerprinting.

6.DISCUSIÓN

En los análisis genómicos de levaduras obtenidas de fermentaciones continuas en laboratorio, una cepa de levadura que se caracterizó por poseer patrones de bandeo repetidos entre las colonias obtenidas de la fermentación fue la cepa L-1374, en donde el 73,3 % de las colonias obtenidas de la fermentación presentaron un patrón de bandeo único y diferente al del inóculo (colonias controles). Esto permite inducir que probablemente estas mutaciones observadas se habrían concretado en fases muy tempranas de la fermentación en una o varias colonias, y que mediante mitosis sucesivas, las levaduras con estas modificaciones fueron imponiéndose en el mosto. De esta forma se puede concluir que las mutaciones sufridas por las colonias fermentadas de la cepa L-1374 podrían haber afectado positivamente su desarrollo ya que se presentan mayoritariamente luego de 10 generaciones.

Una cepa que no habría sido afectada por la fermentación fue *S. bayanus* L-1764. Esta levadura es usada en la producción de vino y cidra, y al igual que *S. cerevisie*, pertenece al complejo “*sensu stricto*”, grupo que incluye los organismos más utilizados desde un punto de vista industrial y que son responsables de la fermentación alcohólica. Esta especie se encuentra estrechamente relacionada con *S. cerevisiae*. Su genoma es de 11.54 Mb y está organizado en 16 cromosomas, al igual que *S. cerevisiae*. Asimismo, presenta una alta conservación en el orden de los genes con la especie *S. cerevisiae*, como resultado de la descendencia de un ancestro común (Kellis y col, 2003). Morfológica y biológicamente estas especies son muy similares, e incluso pueden crecer bajo las mismas condiciones (Kawahara & Imanishi, 2007). En este estudio, esta cepa se caracterizó por presentar un bandeo distinto al de todas las cepas de *S. cerevisiae*

utilizando AFLP e Interdelta Fingerprinting. Sin embargo, tuvo un comportamiento similar al de la cepa L-1528 (*S. cerevisiae*), en donde ninguna de las colonias obtenidas de la fermentación presentaron cambios en el genoma detectables por alguna de estas dos metodologías. Se puede decir entonces que, por lo menos esta cepa de *S. bayanus*, bajo las mismas condiciones de fermentación y estudiada por las mismas técnicas, manifiesta un genoma más estable que el de la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* analizadas en este trabajo.

No se puede concluir sobre la estabilidad genómica de las cepas comerciales en comparación a las cepas no comerciales, ya que a pesar que en las cepas comerciales usadas en estos análisis (L-16 y L-1333) se observa baja variabilidad en colonias obtenidas de fermentaciones en laboratorio, también se observa esta misma condición en cepas no comerciales (L-720 y L-757). Asimismo, en cepas no comerciales se encuentran también diferentes y extremos grados de estabilidad en colonias obtenidas de la fermentación, presentándose un alto polimorfismo en algunas cepas (L-846 y L-1374), como también un bandeo homogéneo en otras (L-1528 y L-1764). De todas formas, dados todos los cambios genómicos encontrados en las distintas cepas, se puede concluir que las condiciones adversas dadas por el proceso fermentativo podrían estar modificando el genoma de las levaduras, tal como lo proponen Puig y colaboradores (2000).

En cuanto a los análisis fenotípicos realizados a las cepas comerciales y a las cepas recolectadas de fermentaciones industriales, podemos concluir que, aunque

mediante DNA fingerprinting fue posible detectar polimorfismo genético en colonias obtenidas de fermentaciones, éste no se correlacionó necesariamente con fenotipos asociados a fermentaciones vínicas ya que no se encontraron diferencias significativas en los parámetros fenotípicos estudiados entre estas cepas. La cepa control S288c fue la única que sí presentó diferencias estadísticamente significativas, en donde la velocidad de crecimiento fue mayor al doble de la manifestada por las otras cepas, al igual que la biomasa total alcanzada. Estas características observadas en la cepa de laboratorio sugieren una gran capacidad para crecer rápido y abundantemente, a diferencia de lo ocurrido en las cepas comerciales y en las levaduras recolectadas de fermentaciones industriales utilizadas en este estudio. Estas últimas no se destacan por su gran crecimiento probablemente porque se encuentran mejor adaptadas a procesos fermentativos, como lo es la producción de etanol, características propias de las cepas vínicas.

En los resultados de las secuenciaciones de los cambios gnómicos detectados, la mayoría de las secuenciaciones de las bandas polimórficas obtenidas por Interdelta Fingerprinting alinearon con “solo LTRs” de los retrotransposones Ty1 y/o Ty2, los que a su vez se encontraban cercanos a otras secuencias LTR. Esto podría indicar que la desaparición de algunos fragmentos del genoma de las levaduras durante la fermentación podría deberse a un tipo de recombinación homóloga entre secuencias repetidas (en este caso entre LTRs), de manera similar a como ocurre durante la formación de “solo LTRs” (Figura 16). Asimismo, otro mecanismo que podría explicar la no amplificación de

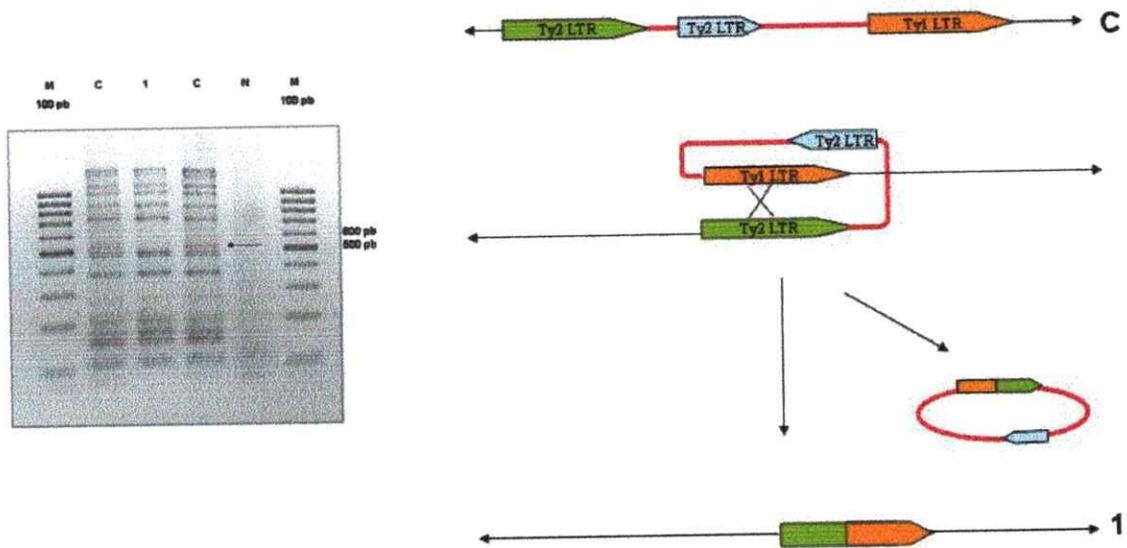


Figura 16. Modelo de posible recombinación homóloga entre secuencias repetidas del genoma de levaduras fermentadas. Este modelo representa la posible recombinación ocurrida en la colonia 1 obtenida de la fermentación de la cepa L-757.

ciertos fragmentos genómicos durante el proceso fermentativo es la manifestación de mutaciones puntuales en ciertas regiones LTR, lo que no permitiría la unión de los partidores a estas zonas, impidiendo la amplificación de estas secuencias.

Las bandas de pequeño tamaño, por ejemplo, la de 70 pb de la colonia 22, cepa L-846, o la de 50 pb de la cepa L-720, colonia 13, no fueron secuenciadas por la alta probabilidad que fueran amplificados entre dos secuencias LTR situadas una al lado de la otra en el genoma. Esto debido a que las secuencias de los partidores no se encuentran exactamente en los extremos de los LTR.

Estos datos, junto con los resultados fenotípicos, sugieren que los cambios genómicos no estarían asociados necesariamente al proceso fermentativo y que estarían involucrando principalmente regiones repetidas del genoma.

7. CONCLUSIONES

- La técnica de Interdelta Fingerprinting resultó ser más sensible que la técnica de AFLP para la detección de polimorfismo genético en colonias *Saccharomyces* obtenidas de fermentaciones.
- Cambios genómicos observados en colonias obtenidas de fermentaciones estarían mayoritariamente asociadas a regiones repetidas del genoma.
- Los cambios genómicos producidos durante la fermentación vínica no necesariamente están relacionados a fenotipos fermentativos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera A., Chávez S., Malagón F. 2000. Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* 16:731-754.

Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. 1994. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiol. Lett.* 124:17-22.

Bakalinsky AT., Snow R. 1990. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6:367-382.

Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P., Langridge P. 1999. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:915-924.

Brock, T.D. 1997. *BIOLOGY OF MICROORGANISMS*. M., Madigan, J., Martinko, J. Parker (eds) Calculating generation times. pp 153. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett.* 189:81-87.

Coffin, J.M. 2004. Evolution of Retroviruses: Fossils in our DNA. *Proc Am Philos Soc.* 148:264-280.

Cubillos, F. 2007. Análisis por microsatélites de cepas vónicas de *Sacharomyces cerevisiae*. Tesis. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.

Divol, B., Miot-Sertier, C., Lonvaud-Funel, A. 2005. Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.

Dunn, I.J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J.E. 2003. *BIOLOGICAL REACTION ENGINEERING*. General Balances for Tank-Type Biological Reactors. pp 105. Wiley-VHC, Weinheim, Alemania.

Ferea, T., Botstein, D., Brown, P., Rosenzweig, F. 1999. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9721-9726.

Kawahara, Y., Imanishi, T. 2007. A genome-wide survey of changes in protein evolutionary rates across four closely related species of *Saccharomyces sensu stricto* group. *BMC Evolutionary Biology* 2007:7-9.

- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E.S. 2003. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* 423:233-234.
- Legras, J.L., Karst, F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters* 221:249-255.
- Liti G., Peruffo A., James S., Roberts I., Louis 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.
- Longo E., Vézinhel F. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 59:322-326.
- Martínez C., Cosgaya P., Vásquez C., Gac S., Ganga A. 2007. High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. *Journal of Applied Microbiology* 103:2185-2195.
- Mieczkowski P., Lemoine F., Petes T. 2006. Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 5, 1010-1020.
- Nadal D., Carro D., Fernández-Larrea J., Pina B. 1999. Analysis and Dynamics of the Chromosomal Complements of Wild Sparkling-Wine Yeast Strains. *Appl Environ Microbiol.* 65:1688-1695.
- Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16:675-729.
- Puig S., Querol A., Barrio E., Pérez-Ortín J. E. 2000. Mitotic Recombination and Genetic Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2057-2061.
- Querol A., Fernández-Espinara M., Del Olmo M., Barrioc E. 2003. Adaptive evolution of wine yeast (Review). *International Journal of Food Microbiology* 86:3-10.
- Rachidi N., Barre P., Blondin B. 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 261:841-850.
- Ramírez M., Vinagre A., Ambrona J., Molina F., Maqueda M., Rebollo J. 2004. Genetic instability of heterozygous, hybrid, natural wine yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4686-4691.

Rodrigues-Pousada, C., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J., Amaral C. 2004. Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Letters* 567:80-85.

Sarmiento, F. 2007. Estudio molecular de la diversidad genotípica de poblaciones nativas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis. Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile.

Schuller D., Pereira L., Alves H., Cambon B., Dequin S., Casal M. 2007. Genetic characterization of commercial *Saccharomyces cerevisiae* isolates recovered from vineyard environments. *Yeast* 24:625-636.

Werner-Washburne, M., Braun, E., Crawford, M., Peck, V. 1996. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 19:1159-1166.

Vogt, E., 1986. EL VINO: obtención, elaboración y análisis. L. Jacob, E. Lemperle y E. Weiss (eds.) La fermentación. pp 51-84. Acirbia, Zaragoza.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.

You, K.M., Rosenfield, C., Knipple, D. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:1499-1503.

Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., Del Olmo, M. 2006. Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:836-847.

9. ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo

1.1 Medio YPD

Extracto de Levadura	0,5%
Peptona	0,5%
Glucosa	2,0%
Agar *	2,0%
Estreptomicina	200 ug/ml.

* Sólo para preparar medio sólido.

El volumen final se alcanza con agua destilada y luego el medio se autoclava por 21 min a 15 psi.

1.2 Mosto Sintético

Ácido Tartárico	5 g/L
Ácido Málico	5 g/L
Cloruro de Calcio Dihidratado	0,3 g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	1,3 g/L
Fosfato de Amonio	1,2 g/L
Fructosa	100 g/L
Sacarosa	5 g/L
Glucosa	100 g/L

Hidróxido de Potasio	2,5 g/L
----------------------	---------

Solución de Vitaminas (Anexo 2.1)	2 mL/L
-----------------------------------	--------

Después de disolver uno a uno los reactivos, se ajusta el pH a 3,3 con Hidróxido de Sodio 0,1 N. Luego el medio se autoclava por 21 min a 15 psi y se adiciona la Solución de Vitaminas al mosto frío una vez autoclavado.

Anexo 2: Soluciones

2.1 Solución de Vitaminas Mosto Sintético

Tiamina	1,152 g/L
Biotina	$4,8 \times 10^{-3}$ g/L
Ácido Nicotínico	2,3 g/L
Piridoxina Hidrocloruro	0,23 g/L
Pantoteanato de Calcio	1,152 g/L
Ácido Sulfúrico 0,25 M	$1,4 \times 10^{-3}$ g/L.

2.2 Buffer TBE 10X (Geles Poliacrilamida)

Tris-Borato	0,89 M
Ácido Bórico	0,89 M
EDTA pH 8,0	0,02M

2.3 EDTA 0,5 M pH 8,0 (Buffer TBE 10X, Geles Poliacrilamida)

Disodioetildiamintetraacetato * 2 H₂O 186,1 g.

Se agregan 800 mL de agua y se ajusta el pH a 8,0 con Hidróxido de Sodio. Se lleva el volumen final a 1 L con agua destilada y se autoclava por 21 min a 15 psi.

2.4 Bis Acrilamida 19:1 40% (Geles Poliacrilamida)

Acrilamida 5,3 M

BisAcrilamida 0,13 M

2.5 Solución Poliacrilamida 6% (Geles Poliacrilamida)

Acrilamida:Bisacrilamida 40% 150 mL

Urea 7,5 M

TBE 1X 500 mL

Se ajustar el volumen final a 1 L con agua destilada.

2.6 Solución Fijación (Geles Poliacrilamida)

Ácido acético 10%

Se ajusta el volumen final a 2 L con agua destilada ultrapura

2.7 Solución de tñido (Geles Poliacrilamida)

Ag₂NO₃ 6 mM

Formaldehído 37% 3 mL

Se ajusta el volumen final a 2 L con agua destilada ultrapura

2.8 Solución de Revelado (Geles Poliacrilamida)

Na₂CO₃ 0,35 M

Formaldehído 37% 3 mL

Na₂S₂O₃ * 5 H₂O 1 granalla

Se ajusta el volumen final a 2 L con agua destilada ultrapura.

2.9 TE pH 7,4 (Extracción de DNA)

Tris-HCl pH 7,4 10 mM

EDTA pH 8,0 1mM

2.10 TAE (Tris-acetato EDTA) 50 X (Electroforesis Agarosa)

2 M Tris base 242,2 g

2 M Ácido acético glacial 57,1 mL

50 mM EDTA 18,61 g

Se ajusta el volumen final a 1 L con agua destilada.

Anexo 3: Secuenciaciones parciales de los cambios genómicos detectados

3.1 Cepa L-957. Fragmento 160 pb

CCGCATCATCATTTTTTCTTTACTATCATCATTGTTGGAATAAAAATCAACTATCATCTACTA
ACTAGTATTTACGTTACTAGTATATTATCATATACGGTGTTAAGATGA

3.2 Cepa L-958. Fragmento 450 pb

ATAGGATGCTGTATTATGATGATTGGTCCTGAGTCATGACGGTGAGTCCAGAATAATGACGA
TTACTCCTGAATAATGATGATGAGTCCTGAGTAATGACGAAAACCTCTT-TGTT ATGAT

3.3 Cepa L-16. Fragmento 110 pb

GCTATCCTCGCTCGTGCTCGAATTCTGACTATTCTCCACTGCTCATAACTACGTTACTATGTCT
TATAATATGTTAAGATGAGATGACATTGCTTTC

3.4 Cepa L-757. Fragmento 520 pb

AATTACATCAAATCCACAGAATCATCATTTTTTATACCTTTAACTATCATCATTGTTGGAATA
AAAATCAACTATCATCTACTAAGTATTTACGTTACTAGTATATTATCATATACGGTGTTA
AGATGACGCAAATGATGAGAAATAGTCATCTAAATTAGTGGAAGCTGAAACGCAAGGATTG
ATAATGTAATAGGATCAATGAATATTAACATATAAAACGATGATAATAATTTTATAGAATT
GTGTAGAATTGCAGATTCCCTTTTATGGATTCCTAAATCCTAGAGGAGAACTTCTAGTATATC
TACATACCTAATATTATAGCCTTAATCACAATGGAATCCCAACAATTACATCAAATCCACAG
AATCATTTTTTATACCTTTAACTATCATCATTGTTGGAATAAAAATCAACTATCATCTACTA
AGTATTTACGTTACTAGTATATTA

3.5 Cepa L-846. Fragmento 110 pb

AGCTTATAACTANTCACGTATTATTATCATATACGGGNGNTTAAGATNNCANCCCTGGAATG
NCATCNNANCNGCATNGAGGGGGT

3.6 Cepa L-846. Fragmento 380 pb

AATTATCTCAAATTCACCCATTTCTCAGATTTACATTAGTATTGATTTAAATACTTATCACT
ACCAGTTATAATAAATCTAATGTTTACATCATATAGTAATGTATCTTTTGGCAAGTGTGACCG
AATTACACGTTTTAAATACTAATTATTAATAATTTATCCTGATAAGTTGATCTTTATTCCGTAC
AGCACAACCGATAGAAAAGATGTTTAAAGTGTTTAAAGCTCACTTTATAGGGTGAAACACATT
TTGACGGCCGTAAAAGGTGTTGGAATAAAAATCAACTATCATCTACTAAGTATTTACGTT
ACTAGTATATTA

3.7 Cepa L-846. Fragmento 850 pb

AATTACATCAAAATCCACATTCTCTTCAATAAGTAACATTCCGTGAATTAATCTGATAAACTG
TTTTGACAACTGGTACTTCCCTAAGACTGTTTATATTAGGATTGTCAAGACACTCCGGTATT
ACTCGAGCCCCTAATAACAACAAAGTGGTAAGCATAATATCAGAATCTTATGCCTTAGTATAA
GTCAATTGAAATTGCAATCCTTGTATGTTTTATATTAATTTTGGGTGAATAATTGGATAATT
GTTTGAAATCCACTGTTGAAGAAAGGCTATAATATTCGTACACAGAGTATACTAGAAGTTCTT
CTCGAGGGTCTTGAATCCACAAAAAGGCGTCGATAAATCTCCATAACTATATTACTTATCCT
ATTACATTATCAATCTTGCTTTTAGCTTCTATTGTATTGGATAAAAATTTTCGGCTTCTTTTAT
GTGTATGCGATTGCGTATTACTTAATATAAATTTATATTTTCTGCGACCATTTGCCCGTCAGA
AAAGGCTATGAAAAACAACACTACCTTTTACCGGAAATCACAACTAAATGTAAAAATA
AGAATTTAACATCATCCATTGATTATGAATATTGAGTGAATGATTTAATGATTGTTGCGATTT
CCTTGTGGTGAAGGCTATGATATCAGCTATGCAGAATATACTAGTAGTTATCCACCAGAAC
ATAAGAATCTCAAATGTAATTAATAATCCACTATCGTCTATCAACCAAGTAATAATACTA
TCAATATATTA

3.8 Ceba L-1333. Fragmento 100 pb

ATGCATGGCATCCCCGCTCTCTATGGAATCCCATCTTATCATTGGTATCCCATCTATGTTGTGA
TATCCCGTGTTTCCAGATGGTATCC

3.9 Ceba L-1333. Fragmento 160 pb

CAATCNCCTGCGTCATCATCAGTGAATCCNCCCNTCAATTCTAGTCATCCCTCAGNTGGAATA
AGAGATCANCCTATCATCTACTAAGTATNTACGTTACTAGTATATCTATCATATACGGT
GTTCCAGATGTCAACANTGGNAT

3.10 Ceba L-1374. Fragmento 480 pb

TAATATACTAGTAAACGTAAATACTAGTTAGTAGATGATAGTTGATTTTTATTCCAACAACAT
GTAAGACGTCAAAGATGGCATGAGTTATGGTTGCTCAGTTACCAAATCTACTGAAAACAGT
TCGAATCTTCTTCTAAACATCACATAATTCATCAATTTGAAAGCCCCGTATGAACATCTG
CCAATAGATAACAGTTGTCTCTAATTTAGTAAGTAATGGTAGCATAGAATGGTGGTACTTAT
TTTTCGCTAACTCTTGTGCGCTTCGTATTTAACCGCTGAAATCATTGCATTTTTGTCATACTT
GGCACAGGACAGAATACGTGAAACAACAGCGACAATGTTACAAGTGAACACTACTGATTA
ATTGAAAAGGTGACTGCAATCTAGAAAATTTGGTAAATTTGCGACAA

3.11 Ceba L-1374. Fragmento 500 pb

TTTATACTTTTGGGTAGTTCAGCTAGGGAAGGCCGGGNTTTTATCTCATGTTGTTGTTTTGTT
ATAAGGTTGTTTCATATGTGTTTTATGAACGTTTAGGATGACGTATTGTCATACTGACGTATC
TCATTTTGAGATACAACATGCTCTAACCACCTGAGCTAAAACTTAATACAGGATTAGTTGAT
AAATGGGTATTATCAACTCAATCCACAGTGNAGGAATCAGAGTCAGNTATCATCTTTGGGCT
AGNATTATTGTAAGTGGTGAATAAAAATNCTAAAATATCATCCNTTTAGTAGTGTTCATATT
ACTAATATATCTGTTGGAATAAAAATCCACTATCGTCTATCAACTAATAGTTATATTATNAAT
ATATTATCNTATACGGNGTTAAGATG

3.12 Ceba L-1374. Fragmento 850 pb

TCTGTGATCGAGCTAGATTGATATCAATCGTCGTCTGGAAGAACATCTCACATGTAATCCACA
AGGAAAGGAATCCCAACTCAACAATGGAATCCCAACTCTCAATTTCCCCCAACTAAGGAAA
GGAATCCCAACTAACAAGAAATCCCAACTAAAACGATTTCCCAACAACAAGTCTTTTTT
TTTTGGCGGGTGCA

3.13 Cepa L-1374. Fragmento 1375 pb

AATTATCTAATGACTCACCAAATATCAATGGTACATCAGGAACTGCACCTGTTTATGTAATT
AGACATTTGAATGTTGTTGGGAAATGAAATATCCAATATTCTTCAATTCCTGGGTGAATCGC
TAACAGCAGTACATTTCTGGACCAAAAATCCAGACACTTACGGAAATGATCGGTGCTTTTAT
GCCAATGGTAGCCGCTCAAGTTTCGAAGACTCCTCTCAAGGAAAGGATCACGCATGAGAGCC
ATCTCAAATCCAATTACTAACATTCGCAACACATTCATCAATGTTTAAATATTTAAACGGCTAT
ATATTCGCGGTAGGACAATGTACTAAAACATGAAAGGCCACGAAAAAAAAAATCGATACAA
ATGAGCACACATCATAGTCATGGGCCACTTAGCGATCCTTTTCAGTATTATCGCTGTATGGAA
TATAGCTACAGCTGTTGCATCGAGCGACAGCATTACCTTAAGGGACACAGAGTAGGACAGG
ATATCGACAGTCTATACAGAGTGTACGATAATGGTACTATGTACCCTGTCACTTTCAA