

UCh-FC  
Biotecnología  
C 227  
F. 1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**ANÁLISIS DE CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces cerevisiae* MEDIANTE  
MICROSATÉLITES**

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

Francisco Alberto Cubillos Riffo

Agosto, 2007  
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Claudio Martínez Fernández.

Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología

UCH-Fc  
Biotecnología  
C 227  
F. 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ANÁLISIS DE CEPAS VINICAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE  
MEDIANTE MICROSATELITES”**

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

**FRANCISCO CUBILLOS RIFFO**

Dr. Claudio Martínez Fernández  
Director Seminario de Título

**Comisión de Evaluación Seminario de Título**

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán  
Presidente Comisión

Dra. Margarita Carú Marambio  
Profesora correctora



Santiago de Chile, 23/agosto/ 2007

## BIOGRAFÍA



Yo, Francisco Cubillos nací un día 2 de Junio de 1983 en la ciudad de Santiago, Chile. Durante los primeros años de mi vida viví junto a mi madre y hermanas las cuales me ayudaron durante todo el proceso de mi crecimiento. Desde pequeño sentí una gran atracción hacia los deportes, en particular por el básquetbol, que lo práctico desde los 6 años de edad. A esa misma edad ingresé al colegio del cual posteriormente me graduaría en el año 2001, obteniendo el premio al mérito académico como mejor alumno de mi generación. En el año 2002 ingresé a la Universidad de Chile a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, sin embargo este ingreso no fue fácil ya que tuve que esperar hasta el final del proceso de selección para que corriera la lista y ser finalmente aceptado. A través de los años en la universidad generé grandes amistades que espero mantener en el tiempo y adquirí una gran cantidad de conocimientos que espero aplicar en el futuro. En el año 2006, logré terminar con éxito todos los ramos de la carrera, obteniendo a fin de año una grata sorpresa al ser premiado por el Decano de la facultad. Ahora, en Agosto del 2007, estoy terminando con unas de las etapas más importantes en mi vida, estoy consiguiendo un título profesional.



## FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada con aportes del proyecto FONDECYT 1040099



# ÍNDICE DE CONTENIDOS



|   |      |
|---|------|
| BIOGRAFÍA.....  | iii  |
| FINANCIAMIENTO.....   | iv   |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS.....   | v    |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | ix   |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....  | x    |
| RESUMEN.....  | xii  |
| ABSTRACT.....   | xiv  |
| <br>  |      |
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| <br>  |      |
| 1.1. El vino.....   | 2    |
| 1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                            | 3    |
| 1.2.1. Características de <i>S. cerevisiae</i> .....                  | 3    |
| 1.2.2. Ciclo de Vida.....   | 4    |
| 1.3. Genética de poblaciones de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 6    |
| 1.3.1 Teoría de Renovación del genoma.....                            | 6    |
| 1.3.2 Mecanismos de reproducción en <i>S. cerevisiae</i> .....        | 8    |
| 1.3.3 Ecología en poblaciones de <i>S. cerevisiae</i> .....           | 9    |
| 1.4. Microsatélites.....  | 12   |
| 1.5. Subestructura de poblaciones de <i>S. cerevisiae</i> .....       | 14   |

|   |    |
|---|----|
| 1.5.1. Heterocigosidad.....                         | 14 |
| 1.5.2. F-estadísticos.....                          | 15 |
| 1.6 Descripción del problema.....                   | 16 |
| <br>  |    |
| 2.- PROPÓSITO DEL TRABAJO.....                      | 19 |
| <br>  |    |
| 3.- OBJETIVOS.....                                  | 20 |
| 3.1. Objetivo General.....                          | 21 |
| 3.2. Objetivos Específicos.....                     | 21 |
| <br>  |    |
| 4.- MATERIALES Y MÉTODOS.....                       | 22 |
| 4.1 .Cepas.....                                     | 23 |
| 4.2. Soluciones y medios de cultivo.....            | 27 |
| 4.3. Extracción del DNA total.....                  | 27 |
| 4.4. Marcadores microsatélites.....                 | 28 |
| 4.5. Reacción PCR.....                              | 30 |
| 4.6. Electroforesis en geles de Poliacrilamida..... | 30 |
| 4.7. Análisis estadísticos.....                     | 32 |



|   |    |
|---|----|
| 5.-RESULTADOS.....  | 33 |
| 5.1. Microsatélites de <i>S. cerevisiae</i> .....                           | 34 |
| 5.2. Análisis de cepas provenientes de diferentes regiones geográficas..... | 39 |
| 5.2.1. Descripción de marcadores.....                                       | 39 |
| 5.2.2. Frecuencias Alélicas.....  | 40 |
| 5.2.3. Genética de las cepas.....   | 45 |
| 5.3. Diversidad en zonas artesanales e industriales.....                    | 47 |
| 5.4. Cepas comerciales.....   | 49 |
| 5.5. Análisis de Poblaciones.....   | 51 |
| 6.- DISCUSIÓN.....  | 54 |
| 6.1. Marcadores de SSR.....   | 55 |
| 6.2. Teoría "Renovación del genoma".....                                    | 58 |
| 6.3. Diversidad de levaduras.....   | 59 |
| 6.4. Cepas comerciales.....   | 60 |
| 7.- CONCLUSIÓN.....   | 62 |
| 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 65 |
| 9.- ANEXOS.....   | 71 |



## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cepas utilizadas para la estandarización de la técnica de SSR.....   | 24 |
| <b>Tabla 2.</b> Cepas utilizadas en los análisis de SSR.....   | 25 |
| <b>Tabla 3.</b> Cepas comerciales utilizadas en los análisis.....  | 26 |
| <b>Tabla 4.</b> Cepas provenientes de viñas utilizadas en el estudio de SSR.....   | 26 |
| <b>Tabla 5.</b> Secuencia de los partidores utilizados, tipo de repetido y su ubicación dentro del genoma de <i>S. cerevisiae</i> .....          | 29 |
| <b>Tabla 6.</b> Número de genotipos identificados por cada marcador.....   | 38 |
| <b>Tabla 7.</b> Número de genotipos, alelos y coeficiente de información de polimorfismo (PIC) en 41 cepas de diversas regiones geográficas..... | 41 |
| <b>Tabla 8.</b> Número de individuos según número de loci heterocigotos para 7 marcadores de SSR.....  | 46 |
| <b>Tabla 9.</b> Heterocigosidad para cepas aisladas de zonas con prácticas artesanales e industriales.....                                       | 48 |
| <b>Tabla 10.</b> Heterocigosidad para las poblaciones de Isla de Maipo y Sagrada Familia....   | 53 |





## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Visualización de amplificadores del marcador YKR014C en geles de agarosa..... | 35 |
| <b>Figura 2.</b> Perfiles de amplificación de microsatélites para el marcador YDR160W.....     | 37 |
| <b>Figura 3.</b> Frecuencias alélicas para los loci YDR160W, YML091C E YKR014C.....            | 43 |
| <b>Figura 4.</b> Frecuencias alélicas para los loci YPL009C, YLR013W, YBR058C, e YGL184C.....  | 44 |
| <b>Figura 5.</b> Perfil de amplificación para las cepas comerciales L-1321 y L-1333.....       | 50 |



## LISTA DE ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| ATP:   | adenosín trifosfato   |
| DNA:   | ácido desoxirribonucleico                                   |
| RAPD:  | DNA polimorfo aleatoriamente amplificado                    |
| RFLP:  | polimorfismo de la longitud del fragmento de la restricción |
| SSR:   | repetidos de secuencia corta                                |
| CHEF:  | cariotipo electroforético                                   |
| IAM:   | modelo de alelo infinito                                    |
| SSM:   | modelo de mutación por etapas                               |
| CAPS:  | secuencia polimórfica amplificada digerida                  |
| AFLP:  | polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado       |
| PIC:   | contenido de información polimórfica                        |
| H:     | heterocigosidad   |
| He:    | heterocigosidad esperada                                    |
| Ho:    | heterocigosidad observada                                   |
| °C:    | grados Celsius  |
| rpm:   | revoluciones por minuto                                     |
| YPD:   | medio de cultivo extracto de levaduras, peptona y glucosa   |
| % v/v: | porcentaje volumen – volumen                                |
| EDTA:  | etilendiaminotetraacético                                   |
| TE:    | tris-EDTA   |
| TAE:   | tris-ácido acético-EDTA                                     |
| TBE:   | tris-ácido bórico-EDTA                                      |

pb: pares de bases  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio  
dNTPs: desoxinucleótidos  
W: watts

## RESUMEN

Las levaduras vínicas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae* son de importancia comercial debido a su capacidad para fermentar mostos de uvas en forma eficiente, sobrellevando las condiciones adversas de éste. Sin embargo, los antecedentes que se manejan acerca del comportamiento de esta levadura en el medio ambiente son escasos, así como también sobre los mecanismos de reproducción que se encontrarían asociados al crecimiento de las poblaciones naturales. Estudios en organismos relacionados demuestran un dominio de la reproducción clonal, sin embargo existen evidencias que establecen la posibilidad de encontrar, en el ambiente, otras formas de reproducción (sexual y autofecundación).

Diversas técnicas han sido utilizadas con el propósito de estudiar la estructura de las poblaciones basándose en el análisis de los genotipos de los individuos que la componen, entre los que se destaca, por su alto potencial informativo, los microsatélites (SSR).

En este trabajo, se establecieron las condiciones experimentales para el análisis de poblaciones naturales de *S. cerevisiae* mediante SSR, con el objeto de discriminar genotipos pertenecientes a diversas poblaciones. De esta forma se logró configurar un protocolo de trabajo para realizar un estudio tendiente a caracterizar genéticamente poblaciones silvestres y deducir el tipo de reproducción preponderante en este tipo de levaduras. De esta forma se evaluaron 7 marcadores en un total de 41 cepas, obteniendo en todos un alto polimorfismo. A su vez, se determinó un porcentaje del 31,7% de cepas homocigotas. Este valor resultó ser similar a otros encontrados en la literatura que

apoyan la teoría de renovación del genoma (hipótesis que explica el mecanismo de evolución de las levaduras vínicas *S. cerevisiae*) Finalmente, se realizó un estudio en cepas pertenecientes a zonas con prácticas industriales versus prácticas artesanales de producción vínica, encontrando en esta última una mayor diversidad genética. Esto podría revelar un efecto, según el tipo de práctica utilizada en la producción de vino, sobre la ecología de las poblaciones.

La técnica de microsatélites se perfila como una herramienta útil para el análisis de poblaciones. Con estos resultados se sientan las bases para estudios posteriores que permitan determinar, con una mayor precisión, las diferencias de diversidad entre poblaciones de levaduras pertenecientes a zonas con distintas prácticas vitivinícolas. Así mismo, permitiría responder a preguntas acerca del comportamiento de esta levadura en el ambiente.

## ABSTRACT

Wine yeasts belonging to the specie *Saccharomyces cerevisiae* are commercially important due to their capacity to ferment grape must efficiently, overcoming the adverse conditions of this process. On the other hand, there are few antecedents about the behavior of this yeast in the environment, and also about the mechanism of reproduction associated to the growth of the natural populations. Studies done in related organisms show that clonal reproduction is the most predominant type, but there are evidences that establish the possibility of finding in the environment other ways of reproduction (sexual and inbreeding).

Different techniques have been used to study the structure of the populations based on the individuals genotype analysis. One of these is microsatellites (SSR), because of their high informative potential.

In this work, we establish the experimental conditions for the analysis of the natural populations of *S. cerevisiae* using SSR, with the aim to discriminate genotypes belonging to different populations. In this way, we set up a job-protocol for a genetic study of the wild populations and for the deduction of the dominant type of reproduction in these yeasts. We evaluated 7 markers in 41 strains, obtaining in all of them a high polymorphism. At the same time, we calculated a percent of 31.7 of homocigotes strains. This value turns out to be similar to others found in literature that supports the genome renewal theory (hypothesis that explains the wine yeast *S. cerevisiae* evolution mechanism).

Finally, we did a study of strains belonging to areas with industrial practices versus artisan practices of wine production, finding in the last one higher genetic diversity. This could reveal an effect based on the practice type used in the wine production, over the population's ecology.

The microsatellites technique outlines as a useful tool for the analysis of populations. With these results we set the bases for further studies that allow, with a major precision, to determinate the diverse differences between the yeast populations belonging to areas with dissimilar winemaking practices. These would allow the answers to questions about the behavior of this yeast in the environment.

## **1.- INTRODUCCIÓN**



## 1.1 El vino

El vino es una de las bebidas de mayor producción a nivel mundial y se genera mediante la fermentación alcohólica de mostos uvas a cargo de microorganismos denominados levaduras. En una primera etapa, la uva es recolectada, seleccionada y posteriormente triturada con el objeto de generar el mosto, el cual puede ser fermentado directamente por las levaduras presentes en el medio o, en el caso de fermentaciones industriales, ser inoculado con levaduras comerciales capaces de producir un vino con determinadas cualidades. La fermentación consiste en una reacción compleja en la cual se produce un desarrollo secuencial de levaduras y otros microorganismos. En 1860, Luis Pasteur estableció la relación que existía entre los fermentos vivos y la transformación de azúcar en alcohol al realizar un experimento de pasteurización sobre el mosto. De esta forma evidenció que al no existir microorganismos en el medio (debido al calentamiento del mosto), el proceso de fermentación era interrumpido (Vogt, 1986). A partir de entonces, se han realizado numerosos estudios microbiológicos de colecta e identificación de los microorganismos asociados a la fermentación del mosto que han permitido reconocer la presencia de especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces* y *Torulaspota* (Phaff y Starmer, 1987; Fleet y Heard, 1993). Estos microorganismos son encontrados en las primeras etapas del proceso fermentativo, sin embargo, en etapas tardías el mosto se encuentra dominado por la levadura vínica *Saccharomyces cerevisiae*.

En los inicios de la fermentación natural de uvas trituradas, la población de levaduras vínicas es pequeña pues deriva de solo unas pocas uvas (Mortimer y Polsinelli, 1999). El ambiente de crecimiento para esta levadura es ácido ya que el mosto presenta un pH que varía entre 2,5 y 3,8 debido a la presencia de ácidos orgánicos como ácido tartárico, ácido láctico y ácido málico. La toxicidad de este ambiente es exacerbada por compuestos fenólicos y a su vez, las altas concentraciones de azúcar de sobre el 40% generan una severa presión osmótica en el medio. Las fuentes de nitrógeno son escasas y el contenido de oxígeno bajo (Phaff y Starmer, 1987; Fleet y Heard, 1993). Finalmente, los altos niveles de etanol producidos, en conjunto con las condiciones anaerobias, bajo pH y el estrés osmótico, eliminan la mayoría de los microorganismos presentes en el mosto dando como resultado que cepas de *S. cerevisiae* son esencialmente el único microorganismo que se mantiene vivo al final del proceso de fermentación (Phaff y Starmer, 1987; Fleet y Heard, 1993).

## 1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.2.1 Características de *S. cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular perteneciente a la familia de los ascomicetes. Este microorganismo posee características que le permiten imponerse rápidamente en el mosto de fermentación frente a otras levaduras ya que ha logrado adaptarse a este medio modificando las condiciones del mosto. Entre estas cualidades se

encuentra su capacidad de utilizar glucosa como sustrato de forma rápida y eficiente, prefiriendo el proceso fermentativo, aún en presencia de oxígeno molecular. Por otra parte, posee una extraordinaria capacidad de soportar altas concentraciones de etanol (Thomson y col, 2005 en Landry y col, 2006) y dióxido de sulfuro, así como también altas temperaturas, lo que en su conjunto le permite sobrevivir en condiciones que otros microorganismos no logran. Si bien la fermentación es descrita como un proceso poco efectivo en la generación de ATP, ésta reacción se encuentra optimizada en *S. cerevisiae* y la producción neta de ATP por segundo es similar a la producida bajo un metabolismo aerobio (Pfeiffer y col, 2001).

### 1.2.2 Ciclo de vida

En la naturaleza *S. cerevisiae* puede ser encontrada tanto en forma haploide como diploide. Las células haploides pueden existir como uno de los 2 tipos de apareamiento posibles,  $\alpha$  o  $a$ . Al encontrarse 2 células haploides con distinto tipo de apareamiento, estas pueden cruzarse y generar un individuo diploide, el cual será igualmente estable con respecto a sus predecesores haploides (Sprague y Thorner, 1992; Bardwell y col, 1994; Schultz y col, 1995).

El ambiente también influye en su tipo de reproducción. Para el caso de un ambiente con abundantes nutrientes, el cultivo presentará un crecimiento vegetativo mediante mitosis sucesivas. El ciclo celular vegetativo es fácilmente identificable, en general es posible observar yemas de menor tamaño, a partir de las células adultas. Este tipo de reproducción genera una nueva célula idéntica a la madre y, por lo tanto, correspondería

a una reproducción del tipo clonal (Pringle y Hartwell, 1981). Sin embargo, si la célula cae en un estado de estrés debido a la falta de alguna fuente nutritiva, ya sea de carbono o nitrógeno, la célula cambia a un tipo alternativo de reproducción en el cual ocurre meiosis y formación de esporas contenidas en ascas. Una de las características más importantes del proceso de esporulación es que permite la reproducción sexual en levaduras así como también la autofecundación. Para entender mejor este punto es necesario explicar los dos mecanismos de apareamientos observados en esta especie. El primero de ellos es el llamado homotalismo, este tipo de células posee una copia funcional del gen HO y permite a aquellas células que han sido madres cambiar su tipo de apareamiento de a hacia  $\alpha$  o viceversa. Dado esto, en cultivos homotáticos, el estado haploide es relativamente corto, siendo el diploide el más estable. El otro mecanismo de apareamiento observado es el llamado heterotalismo, en el cual las células poseen el mismo gen en su forma inactiva (ho) y, por lo tanto, no presentan la capacidad antes descrita. Estas cepas exhiben estados haploides estables, no obstante también es posible encontrarlas como diploides, siendo la frecuencia de este último evento menor con respecto a las cepas homotáticas (Herskowitz, 1988).

## 1.3 Genética de poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*

### 1.3.1 Teoría de Renovación del genoma

Considerables estudios se han realizado en *S. cerevisiae* ya que sus propiedades biológicas la hacen un organismo ideal para la comprensión de células eucariontes. Esta levadura es un organismo ampliamente estudiado en áreas como la bioquímica, biología celular, genética clásica y biología molecular. Además, posee un genoma relativamente pequeño y rico en genes, siendo a su vez posible realizar en esta levadura experimentos a gran escala que involucran un alto número de individuos. Sin embargo, las características y antecedentes acerca de la genética de poblaciones y la ecología de *S. cerevisiae* que han modelado la evolución de esta especie en el tiempo son escasos y su comportamiento en el ambiente sigue siendo una interrogante (Johnson y col, 2004).

La domesticación de la levadura emerge por el uso intensivo que se le ha dado en procesos de fermentación, tales como en producción de vino y destilación. La primera cepa aislada con propósitos científicos fue la S288C, la cual deriva de la cepa EM93, esta última cepa heterotática aislada de higos en 1938 (Mortimer y Johnston, 1986). En contraste con la cepa S288C, se ha planteado que la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* serían diploides y homocigotas para el gen del homotalismo HO (Romano y col, 1988). En base a esto, Mortimer y col. (1994) formularon la teoría de “renovación del genoma”, la cual establece que, al esporular, las cepas que presentan una acumulación de mutaciones recesivas heterocigotas generarán productos meióticos haploides que contendrán todas las combinaciones posibles para los rasgos

heterocigotos, pero al ser homotáticas, cambiarán su tipo de apareamiento, se auto-aparearán y formarán diploides homocigotos. De estos nuevos diploides, aquellos con mayor aptitud se reproducirán y reemplazarán a la cepa madre original y al resto de los diploides generados.

En este mismo estudio, se confirmó lo planteado previamente por Romano y col, 1988, en el sentido que la mayoría de estas cepas serían homotáticas, diploides y con una alta capacidad para esporular (Mortimer y col, 1994). Por otra parte, la proporción de cepas homocigotas para los rasgos estudiados correspondía a un 35% del total. Estas cepas habrían sido generadas mediante el mecanismo de renovación del genoma, lo que podría ser evidencia del rápido proceso de evolución planteado en esta teoría (Mortimer, 2000).

Posteriormente, otros trabajos se realizaron con el objeto de poner a prueba la hipótesis planteada por Mortimer. Análisis en cepas heterocigotas para el locus *URA3* crecidas durante fermentaciones consecutivas mostraron que la generación de homocigotos recesivos para el gen *URA3* se debería a procesos de recombinación mitótica, lo que cuestionaría la teoría planteada por Mortimer (Puig y col, 2000)

Estudios realizados por Johnson y col. (2004) en *Saccharomyces paradoxus*, levadura no domesticada estrechamente relacionada con *S. cerevisiae*, demostraron que esta levadura sería capaz de reproducirse de 3 formas en laboratorio: reproducción sexual, clonal y endogámica. Además, estos autores observaron en *S. paradoxus* un alto número de individuos homocigotos, lo cual al igual que lo propuesto para *S. cerevisiae*, sería producto de una preponderancia de reproducción endogámica.

Por otra parte, Bradbury y col. (2006) mediante análisis de microsatélites lograron demostrar la presencia de cepas completamente homocigotas, lo cual estaría de acuerdo

con lo propuesto por Mortimer y col (1994) en el sentido que la reproducción endogámica es un mecanismo importante para mantener los altos niveles de homocigosis observados. En este mismo sentido, Aa y col. (2006) mediante secuenciación de 4 genes de *S. cerevisiae*, también sugirieron un carácter homotálico para las cepas en estudio, apoyando que la autodiploidización sería un mecanismo frecuente en la naturaleza.

### 1.3.2 Mecanismos de reproducción en *S. cerevisiae*

En eucariontes se supone que el modo más común es la reproducción sexual, debido al carácter diploide de los organismos y a la alta tasa de recombinación sexual observada a nivel de laboratorio. Para el caso de *S. cerevisiae* las evidencias a nivel de campo aun no son suficientes para determinar que tipo de reproducción estaría operando, sin embargo, ciertas aproximaciones han sido realizadas durante los últimos años, no sólo en este microorganismo, sino en otros estrechamente relacionados, con el objeto de entender lo que ocurre con esta levadura en el ambiente.

Estudios a principios de los años 90 postularon que el tipo de reproducción predominante en la mayoría de los microorganismos eucariontes unicelulares sería la clonalidad, sin embargo, estos mismos estudios no descartaban la presencia de eventos de recombinación que impliquen una reproducción del tipo sexual, aun cuando estos eventos de recombinación no ocurrirían de forma estable (Tibayrenc y col, 1991).

*Candida albicans* es un hongo unicelular al igual que *S. cerevisiae* y ambas presentan un estrecha relación filogenética. Un estudio basado en RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) y secuenciación de DNA mostró un alto desequilibrio gamético

entre los genotipos estudiados, lo que sugiere que las poblaciones de esta levadura serían predominantemente clonales (Graser y col, 1996). Posteriores estudios en cepas colectadas desde campo sugirieron que este microorganismo podría reproducirse clonalmente, sin embargo, también se encontraron evidencias de segregación cromosomal y recombinación intracromosomal, sugiriendo una reproducción sexual en baja frecuencia (Tavanti y col, 2004). Estudios similares en *S. paradoxous* detectaron más de un tipo de reproducción en este organismo, encontrando evidencias no sólo de reproducción clonal, sino también de endogamia y reproducción sexual (Johnson y col, 2004).

Recientemente, mediante el análisis de secuencias génicas y utilizando herramientas bioinformáticas, se logró encontrar evidencia que sugiere entrecruzamientos entre distintas cepas de *S. cerevisiae*, aunque con una frecuencia relativamente baja (Ruderfer y col, 2006).

### 1.3.3 Ecología de poblaciones de *S. cerevisiae*

La mayoría de las cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae* son obtenidas directamente de uvas, sin embargo, es poco frecuente encontrarlas en uvas sanas, siendo posible colectarlas desde uvas dañadas en una cantidad aproximada de  $10^5$  a  $10^6$  células/uva (Mortimer y Polsinelli, 1999). A su vez, otros estudios han explicado que la dispersión de levaduras sería entre ambientes relacionados por medio de pájaros e insectos (Phaff y Starmer, 1987; Landry y col, 2006). La biota levaduriforme depende fuertemente de las características ambientales, la ubicación geográfica donde se encuentren (Longo y col,



1991), la aplicación de fungicidas (Monteil y col, 1986 en Schuller y Casal, 2007), la variedad de las uvas y la edad de la viña (Martini y col, 1980), así como también del suelo (Farris y col, 1990 en Schuller y Casal, 2007).

Las cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae* se encuentran estructuradas en subpoblaciones, sin embargo, la divergencia génica entre las cepas vínicas no es significativa en relación a las cepas de laboratorio ni tampoco entre aquellas que se encuentran ampliamente alejadas geográficamente. La comparación de cepas provenientes de diferentes continentes revela que éstas serían bastante similares genotípicamente (Aa y col, 2006), con un nivel normal de progenie viable al ser cruzadas (Sniegowski y col, 2002).

Diversos trabajos se han realizado para determinar la correlación entre distancia geográfica y génica de cepas silvestres en esta levadura (Guillamón y col, 1996; Martínez y col, 2004; Schuller y Casal, 2007). Uno de los primeros trabajos publicados en levaduras vínicas utilizando la técnica del RFLP del DNA mitocondrial, estableció una alta correlación entre la distancia genética y el origen geográfico de las cepas estudiadas mediante un análisis de cluster (Guillamón y col, 1996). Sin embargo, trabajos posteriores mediante microsátélites no lograron encontrar dicha relación al observar que la distancia geográfica no se correlacionaba con la distancia genética entre las cepas analizadas (Schuller y Casal, 2007).

El uso intensivo de las cepas comerciales en los mostos de fermentación sumado a la escasa reglamentación sobre tratamientos de residuos industriales, han hecho que estas sean liberadas en zonas geográficas a las cuales originalmente no pertenecían. Estudios realizados por Valero y col (2005) lograron encontrar la presencia de cepas comerciales

en campo, sin embargo, estas cepas colectadas se encontraban cercanas a las bodegas donde fueron usadas para fermentaciones y su implantación en la viña al parecer no ocurriría. En base a esto, se han planteado una serie de hipótesis acerca de las consecuencias que podría traer la introducción de cepas comerciales al ambiente, entre ellas, una disminución de la diversidad de levaduras de *S. cerevisiae* o un desplazamiento de otras cepas por parte de las cepas comerciales. Mediante fermentaciones en monocultivos se observó una disminución de la diversidad de cepas del tipo no-*Saccharomyces* en mostos de uva provenientes de regiones con una alta actividad industrial (zonas con alto uso de cepas comerciales, fungicidas y microbicidas) e inoculados con cepas comerciales, en comparación a mostos con fermentación espontánea (no inoculados con cepas comerciales) donde las uvas provenían de regiones con una baja actividad industrial (Ganga y Martínez, 2004).

## 1.4 Microsatélites

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

Cada SSR, independiente de su secuencia repetida, representa un locus altamente variable, poli-alélico y de gran contenido de información genética. Se han propuesto 2 mecanismos de mutaciones que generarían los distintos alelos de microsatélites. El primero de ellos, denominado IAM (Infinite Allele Model), sugiere que debido a errores durante el proceso de recombinación durante la meiosis se generarían nuevos alelos no presentes previamente en la población (Kimura y Crow, 1964 en Balloux y col, 2002). El segundo modelo, SMM (Stepwise Mutation Model), establece que el DNA podría sufrir un incorrecto apareamiento durante la replicación en el lugar del repetido, el cual sería entonces reparado agregando bases o eliminando aquellas que no se encuentran apareadas (Levison y Gutman, 1987; Goldstein y Schlotterer, 1999). Inicialmente se postuló que los SSR seguirían un comportamiento según lo planteado por el segundo modelo, sin embargo, esto no sería así ya que dependiendo del tamaño del repetido un microsatélite se adaptaría más a un modelo o al otro. Aquellos SSR de repetidos de 3-5 pb seguirían el modelo SMM, mientras que aquellos de 1-2 pb seguirían el modelo IAM (Goldstein y Schlotterer, 1999).

El elevado polimorfismo que presentan los SSR y su capacidad de detectar ambos alelos (carácter co-dominante) lo hace muy útil para identificaciones individuales, ya que es muy poco probable que 2 individuos elegidos al azar compartan los mismos alelos para varios marcadores estudiados. A principios del siglo XXI, diversos grupos se dedicaron a estudiar la capacidad de los microsatélites para diferenciar cepas de levaduras del tipo *S. cerevisiae*. Estos estudios demostraron que los marcadores de microsatélites son capaces de discriminar entre cepas vínicas altamente relacionadas (Hennequin y col, 2000; Gonzalez Techera y col, 2001; Bradbury y col, 2006; Schuller y Casal, 2007). Pérez y col. (2001a) identificaron 6 regiones polimórficas de repetidos en *S. cerevisiae* las cuales permitieron discriminar inequívocamente 44 de 57 genotipos estudiados, demostrando de esta forma el alto poder de resolución de la técnica.

Al comparar los microsatélites con otros tipos de marcadores tales como RAPD y CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) se observó que los SSR eran capaces de reconocer un mayor número de genotipos (Pérez y col, 2001b). Estudios posteriores compararon los microsatélites con los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y concluyeron que ambas técnicas mostraban un alto grado de polimorfismo, sin embargo, los SSR entregaban el doble de información que AFLP y el triple que RAPD para cada locus analizado (Gallego y col, 2005).

Con el objetivo de determinar el grado de polimorfismo de los marcadores se han descrito una serie de parámetros, entre ellos el contenido de información polimórfica (PIC, Polymorphic information content). Este parámetro es usualmente calculado para evaluar el valor informativo de un marcador en estudios de relaciones génicas. Fue

descrito por Botstein (1980), y se define como la probabilidad de inferir en la descendencia el alelo transmitido por un parental heterocigoto.

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

donde  $p_i$  corresponde a la frecuencia en la población del alelo  $i$  y  $p_j = p_{i+1}$

### 1.5 Sub-estructura de poblaciones de *S. cerevisiae*

La formación de sub-poblaciones ocurre de manera natural en los organismos lo cual es fácilmente observable al ver manadas, colonias u otro tipo de agregados. Esto tiene por consecuencia una diferenciación génica y, por lo tanto, frecuencias alélicas distintas entre las sub-poblaciones. Variadas herramientas son utilizadas en la actualidad con el objeto de entender la estructura genética de las poblaciones en estudio, entre ellas la heterocigosidad y los estadísticos F.

#### 1.5.1 Heterocigosidad

Uno de los estadísticos más importantes en el estudio de la diversidad de poblaciones es la heterocigosidad (H) que corresponde a la frecuencia relativa de individuos heterocigotos en una muestra. Existen dos tipos de H, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).  $H_o$  se estima en relación al número de individuos heterocigotos observados en la muestra y  $H_e$  corresponde a la H esperada bajo equilibrio

Hardy-Weinberg. Esta ley establece que en una población suficientemente grande, con individuos diploides y reproducción sexual aleatoria, sin selección, mutación o migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes entre las generaciones (Hardy, 1908; Stark, 2005). La heterocigosidad esperada, también conocida como diversidad génica de Nei (1977) en un único locus es determinada como:

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

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

### 1.5.2 F-estadísticos

A partir del estadístico  $H_e$ , es posible inferir mediante un parámetro derivado las variaciones genéticas dentro y entre las poblaciones. La correlación entre 2 alelos elegidos al azar entre sub-poblaciones relativo a los alelos muestreados al azar a partir de la población total, se denomina  $F_{ST}$ . En términos prácticos, una reducción de heterocigosidad se debe a que individuos de una misma sub-población comparten ancestros comunes y, por lo tanto, una acumulación de endogamia.

El índice de fijación  $F_{ST}$  permite determinar la relación genética entre sub-poblaciones, de esta forma valores entre 0-0,05 indican pequeña diferenciación génica, 0,05-0,15, moderada diferenciación, 0,15-0,25 gran diferenciación y sobre 0,25 una muy alta diferenciación génica (Wright, 1978).

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

$$F = (H_e - H_o) / H_e \quad (3)$$

## 1.6 Descripción del problema

En Chile, al igual que en otras regiones vitivinícolas del mundo, durante los últimos años ha existido un uso intensivo tanto de cepas comerciales como de agroquímicos en la producción de vino. El uso de estas cepas le otorga al vino una mejor calidad y características reproducibles, deseadas tanto por consumidores como por productores. Uno de los problemas emergentes, radica en que estas cepas que han sido liberadas en regiones geográficas distintas a las de origen, podrían generar efectos significativos sobre la biota levaduriforme endémica ya que no sólo podrían alterar la estructura poblacional de las poblaciones nativas, sino también su diversidad. Sin embargo, hasta la actualidad no existen registros que expliquen los efectos en el largo plazo que tendría el uso de levaduras comerciales. A su vez, los problemas antes planteados dependen de las características de las poblaciones bajo estudio ya que, como fue mencionado, los mecanismos de reproducción que estarían llevando a cabo las levaduras vínicas no están del todo claros y podrían ser puntos importantes para entender las consecuencias del uso de cepas comerciales sobre las poblaciones nativas. Por lo tanto, es necesario realizar estudios acerca de la estructura de las poblaciones de *S. cerevisiae* endémicas de Chile para comprender su comportamiento a nivel ecológico y así estimar los posibles efectos que sobre estas poblaciones podría tener la introducción de cepas foráneas. Como primera aproximación, es necesario tipificar las poblaciones nativas de levaduras *S. cerevisiae* mediante marcadores moleculares del tipo microsatélites, lo cual permitiría responder algunas interrogantes planteadas anteriormente.

En este trabajo, se pretendió adaptar la técnica de microsátélites con el objeto de estudiar y caracterizar poblaciones de levaduras vínicas en Chile e identificar a su vez la posible presencia de cepas comerciales en estos ecosistemas.



## **2.- PROPÓSITO DEL TRABAJO**

## **2.1- Propósito del Trabajo**

La utilización de microsatélites como marcador molecular permitiría discriminar cepas de levaduras vínicas *Saccharomyces cerevisiae* tanto endémicas como foráneas y a su vez identificar genotipos de levaduras comerciales en aislados de zonas industriales.

### **3.- OBJETIVOS**

### **3.1.- Objetivo General**

Evaluar la capacidad de la metodología de microsatélites para discriminar genotipos de levaduras vínicas provenientes de diversas regiones geográficas.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Determinar y establecer las condiciones óptimas para la caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante microsatélites (SSR) e investigar las propiedades de los marcadores seleccionados.
2. Caracterizar mediante SSR cepas comerciales ampliamente usadas en Chile
3. Analizar mediante SSR dos poblaciones de levaduras *S. cerevisiae* aisladas desde Sagrada Familia, Curicó, e Isla de Maipo, Santiago.

## **4.- MATERIALES Y MÉTODOS**

## 4.1 Cepas

Un total de 71 cepas de levaduras vínicas de la especie *S. cerevisiae* fueron seleccionadas para el análisis. Inicialmente se estudiaron 18 cepas de diversos orígenes, las cuales fueron utilizadas con el fin de establecer la técnica de microsátélites en el laboratorio. En la tabla 1 se indican las cepas utilizadas en este estudio además de la localidad de colecta de las cepas.

De la misma forma, 34 cepas nativas de *S. cerevisiae* y 7 cepas de frecuente uso comercial (tablas 2 y 3), fueron seleccionadas para ser analizadas mediante microsátélites en base a 3 criterios: zona geográfica de colecta, tipo de práctica enológica utilizada para la producción de vino y similitudes de sus patrones de cariotipo electroforético y/o RFLP del DNA mitocondrial (Vasquez, 2006). La tabla 2 resume las cepas nativas de *S. cerevisiae* estudiadas indicando además su origen geográfico y tipo de práctica enológica utilizada en la zona de colecta.

Finalmente, con el objeto de analizar la estructuración genética de poblaciones, se estudiaron 19 cepas nativas de *S. cerevisiae* de las cuales 11 corresponden a aislados provenientes de viñas en Isla de Maipo, Santiago y 8 de Sagrada Familia, Curicó. En la tabla 4 se indican las cepas utilizadas en este análisis y la localidad de colecta.

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

**Tabla 1.- Cepas utilizadas para la estandarización de la técnica de SSR.**

| País      | Localidad de Aislamiento       | Cepa           | Tipo de Práctica Enológica |
|-----------|--------------------------------|----------------|----------------------------|
| Chile     | Inia, Cauquenes                | L-16           | Industrial                 |
|           | Quella, Cauquenes              | L-146          | Artesanal                  |
|           | Panguillemu, Cauquenes         | L-165          |                            |
|           | Rincón de Melládo, Curicó      | L-246          | Industrial                 |
|           | Maquehua, Curicó               | L-281          |                            |
|           | Isla de Maipo, Santiago        | L-1055         |                            |
|           | Isla de Maipo, Santiago        | L-1061         |                            |
|           | Alto Jahuel, Santiago          | L-846          |                            |
| Perú      | Valle del Ica                  | L-1197         | Artesanal                  |
|           | Valle del Ica                  | L-1198         |                            |
| Argentina | Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza | L-952<br>L-958 | Industrial                 |
| España    | Alicante                       | L-1220         |                            |
|           | Barcelona                      | L-1225         |                            |
| Francia   | Bordeaux                       | L-1320         |                            |
|           | Champagne                      | L-1321         |                            |
|           | Bordeaux                       | L-1322         |                            |
|           | Bourgogne                      | L-1335         |                            |

**Tabla 2. Cepas utilizadas en los análisis de SSR.** Las cepas fueron clasificadas según localidad de aislamiento y tipo de práctica enológica

| Pais                      | Localidad de Aislamiento            | Cepa       | Tipo de Práctica Enológica |
|---------------------------|-------------------------------------|------------|----------------------------|
| Chile                     | Inia, Cauquenes                     | L-7        | Industrial                 |
|                           |                                     | L-16       |                            |
|                           |                                     | L-20       |                            |
|                           |                                     | L-21       |                            |
|                           |                                     | L-22       |                            |
|                           | Coronel del Maule, Cauquenes        | L-79       | Artesanal                  |
|                           |                                     | L-80       |                            |
|                           |                                     | L-351      |                            |
|                           |                                     | L-354      |                            |
|                           | Quella, Cauquenes                   | L-146      | Artesanal                  |
|                           |                                     | L-1374     |                            |
|                           | Panguillemu, Cauquenes              | L-165      |                            |
|                           |                                     | L-169      |                            |
|                           | Pocilla, Cauquenes                  | L-494      |                            |
|                           | L-531                               |            |                            |
|                           | L-532                               |            |                            |
| Parral, Cauquenes         | L-1528                              |            |                            |
| Rincón de Mellado, Curicó | L-246                               | Industrial |                            |
|                           | L-263                               |            |                            |
|                           | Entre Rios, Curicó                  | L-269      | Artesanal                  |
|                           | Maquehua, Curicó                    | L-281      | Industrial                 |
|                           |                                     | L-283      |                            |
|                           | Alto Jahuel, Santiago               | L-720      |                            |
|                           |                                     | L-757      |                            |
|                           |                                     | L-846      |                            |
| Isla de Maipo, Santiago   | L-1054                              |            |                            |
|                           | L-1064                              |            |                            |
| Argentina                 | Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza      | L-958      | Industrial                 |
|                           |                                     | L-960      |                            |
|                           | INTA Malbec, Lujan de Cuyo, Mendoza | L-962      |                            |
|                           | Syrah, Mendoza                      | L-981      |                            |
|                           | Ugni Blanc, Mendoza                 | L-982      |                            |
|                           | INTA, Mendoza                       | L-1005     |                            |
| INTA, Mendoza             | L-1006                              |            |                            |



**Tabla 3. Cepas comerciales utilizadas en los análisis.**

| Pais    | Denominación Comercial | Cepa   |
|---------|------------------------|--------|
| Francia | Lalvin EC1118          | L-1321 |
|         | Zymaflore F10          | L-1322 |
|         | ALG 804                | L-1323 |
|         | Fermicru VR5           | L-1324 |
|         | V.R. 44                | L-1332 |
|         | Fermicru LVCB          | L-1333 |
|         | ALG 111 (VP30Y5)       | L-1335 |

**Tabla 4. Cepas provenientes de viñas utilizadas en el estudio de SSR**

| Pais   | Localidad de Aislamiento | Cepa   |
|--------|--------------------------|--------|
| Chile  | Sagrada Familia, Curicó  | L-1052 |
|        |                          | L-1054 |
|        |                          | L-1059 |
|        |                          | L-1065 |
|        |                          | L-1066 |
|        |                          | L-1067 |
|        |                          | L-1074 |
|        |                          | L-1310 |
|        | Isla de Maipo, Santiago  | L-1051 |
|        |                          | L-1053 |
|        |                          | L-1055 |
|        |                          | L-1056 |
|        |                          | L-1058 |
|        |                          | L-1060 |
|        |                          | L-1061 |
| L-1062 |                          |        |
| L-1063 |                          |        |
| L-1070 |                          |        |
| L-1073 |                          |        |

## 4.2 Soluciones y medios de cultivo

Las cepas de *S. cerevisiae* fueron cultivadas en medio YPD a 28 °C durante 15-18 horas. La composición de los medio de cultivo, así como las soluciones utilizadas se encuentran en el Anexo 1.

## 4.3 Extracción del DNA total

La extracción del DNA genómico de levaduras se realizó con el sistema *Wizard, Genomic DNA Purification kit* (Promega), de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para esto la levadura fue crecida en 5 ml de caldo YPD durante 15-18 horas a 28 °C con agitación (Multitron, Infors, AG). Las células fueron colectadas por centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos (Microcentrifuga 541D, Eppendorf) en microtubos de 1.5 ml (Axigen) y se resuspendieron en 275 µL de EDTA 50 mM. Posteriormente, la suspensión se trató con 20 µL de la enzima zymoliasa 20T (Seikagaku Corporation) a 10 mg/ml por 120 minutos a 37 °C con agitación a 500 rpm (Termomixer Comfort y Compact, Eppendorf). Los esferoplastos fueron colectados por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos, resuspendidos en 400 µL de la solución *nuclei lysis solution*. Luego se agregaron 133 µL de la solución *protein precipitation solution* y la mezcla fue agitada en vortex vigorosamente durante 2 minutos e inmediatamente puesta en hielo. Luego de 1 hora se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13000 rpm a 4 °C (Universal 32R, Hettich) y el sobrenadante que contenía el DNA fue traspasado a un

microtubo que contenía 300  $\mu\text{L}$  de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló por inversión hasta observar la aparición de un precipitado. Los tubos fueron centrifugados a 13000 rpm por 10 minutos para coleccionar el DNA, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue lavado 2 veces con 300  $\mu\text{L}$  de etanol frío al 70% v/v. Luego de secar el precipitado, este fue re-hidratado con 50  $\mu\text{L}$  de TE pH 7,4.

Finalmente el DNA fue almacenado a 4 °C y cuantificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 100 V utilizando como marcador de tamaño el DNA del fago lambda digerido con *HindIII* (Promega). La concentración de DNA promedio obtenida fue de 100 ng/ $\mu\text{L}$ .

#### 4.4 Marcadores microsatélites

Siete marcadores de microsatélites para análisis de cepas fueron obtenidos a partir de la literatura (Bradbury y col, 2006). En esta selección se consideró que los marcadores pertenecieran a cromosomas distintos para tener una mayor representación del genoma. De la misma forma, se seleccionaron marcadores que fueran altamente polimórficos capaces de reconocer un alto número de alelos (superior a 6) considerando que el tamaño del amplificado se encontrara en el rango de 100 a 450 pb. Las secuencias de los partidores no fueron modificadas y se siguió el protocolo indicado en la literatura para su utilización (Bradbury y col, 2006). La secuencia de los partidores, el tipo y número de repetidos, además de la localización cromosómica de cada marcador, se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Secuencia de los partidores utilizados, tipo de repetido y su ubicación dentro del genoma de *S. cerevisiae*.**

| Marcador | Secuencia   | Repetido                              | Cromosoma |
|----------|---|---------------------------------------|-----------|
| YML091C  | F: GTGTCTAAGCCTCTTCAAGCATGAC<br>R: GTGTCTGGACAATTTTGCCACCTTA          | (AAT) <sub>35</sub>                   | XIII      |
| YPL009C  | F: GTGTCTGGGTTTTGGATTTTTATGGA<br>R: GTGTCTTTCAATTTTCCTCTTTTACCAC      | (GAA) <sub>16</sub>                   | XVI       |
| YDR160W  | F: GTGTCTGAGGAGGGAAATGGACAG<br>R: GTGTCTGCTTCTTTGGCTTGCCTA            | (AAT) <sub>23</sub>                   | IV        |
| YBR058C  | F: GTGTCTGGTTATATTTATTTCTATACAAGATGC<br>R: GTGTCTAGATCAAGTACCAAGCCAGC | (AC) <sub>13</sub> (AT) <sub>20</sub> | II        |
| YLR013W  | F: AATCATCACTGGAAATGTAAGA<br>R: GTGTCTTAAAATGATAGAAGCAACAGTC          | (AT) <sub>16</sub>                    | XII       |
| YGL184C  | F: GTGTCTCTCATCGCATCTCAAAAGTG<br>R: GTGTCTTACCACAAGTATCTAATCTCT       | (AT) <sub>14</sub>                    | VII       |
| YKR014C  | F: AACTGCTACTTTCCGATAATAA<br>R: GTGTCTATGGTAAATAGGGTGAACGA            | (AT) <sub>8</sub> TT(AT) <sub>9</sub> | XI        |

#### **4.5 Reacción de PCR**

Para poder visualizar los polimorfismos evidenciados por los SSR fue necesario realizar una amplificación mediante PCR. Las mezclas de PCR se prepararon para un volumen final de 20  $\mu$ L utilizando una concentración final de DNA de 1,5 ng/ $\mu$ L, 1X de Solución Tampón 10X (Fermentas), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM dNTP, 0,325  $\mu$ M de cada partidor y 1 U de Taq Polimerasa (Fermentas). El programa de amplificación utilizado para la reacción de PCR fue el siguiente: denaturación inicial a 95 °C durante 7 minutos. Luego, 30 ciclos con una denaturación a 95 °C por 45 segundos. Hibridación a 56 °C durante 45 segundos, elongación 72 °C durante 90 segundos. Finalmente se realizó una elongación a 72 °C durante 10 minutos

#### **4.6 Electroforesis en geles de Poliacrilamida**

La separación de los fragmentos de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y los fragmentos fueron visualizados empleando tinción de plata (SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System, Promega, USA). Los vidrios con los cuales se realizaron las electroforésis fueron lavados y posteriormente el vidrio de menor tamaño se trató con la solución Bind Silane (5 $\mu$ L de Bind Silane PlusOne American Biosciences, 5 $\mu$ L de ácido acético 10% y 1 ml de etanol 100%), mientras que

el vidrio de mayor tamaño fue preparado empleando 400  $\mu$ L Repel Silane ES (PlusOne, American Bioscience).

El gel de poliacrilamida fue preparado al 6% (19:1 acrilamida:bisacrilamida), urea 7M (Winkler) y TBE 1X. Posteriormente, se agregaron a 60 ml de esta solución, 80 $\mu$ L de TEMED (Winkler) y 90  $\mu$ L de persulfato de amonio 20% y se dejó polimerizar durante 30 minutos.

Tampón de corrida TBE 0.5X fue utilizado y el gel fue pre-corrído a 70 W durante 30 minutos. A cada muestra se le agregó tampón de carga denaturante (Formamida 95%, xylencianol, EDTA 50mM) en una relación 2:1 (muestra: tampón denaturante) para luego ser denaturadas durante 10 minutos a 95 °C e inmediatamente colocadas en hielo. Posteriormente, 0,7  $\mu$ L de muestra fueron cargados y el gel fue corrido a 30 W durante 3 horas o hasta que el colorante migrara tres cuartos del gel.

Posteriormente el gel fue teñido con nitrato de plata, de acuerdo al protocolo SILVER SEQUENCE DNA Sequencing System (Promega, USA). Brevemente, el gel fue fijado en ácido acético 10% durante 30 minutos, luego lavado en agua durante 10 minutos y posteriormente teñido en una solución 0,1% nitrato de plata durante otros 30 minutos. Finalmente el gel se reveló en una solución alcalina 0,3 M de carbonato de sodio que contenía 3 ml de formaldehído 37% y 4 mg de tiosulfato de sodio.

#### 4.7 Análisis estadísticos

Los análisis de los resultados se realizaron mediante herramientas de bioinformática. El contenido de información polimorfo (PIC) fue calculado para cada uno de los marcadores tal como fue descrito según Botstein (Botstein, 1980) así como también la heterocigosidad (Nei, 1977) para cada una de las zonas y poblaciones estudiadas. Para esto se utilizó el software POWERMARKER v. 3.25. Las frecuencias alélicas y los valores  $F_{st}$ , fueron estimados mediante la utilización del software GENETIX v 4.05. Para el estadístico  $F_{st}$ , se consideró el método descrito por Weir y Crockerham (1984).

## **5.- RESULTADOS**

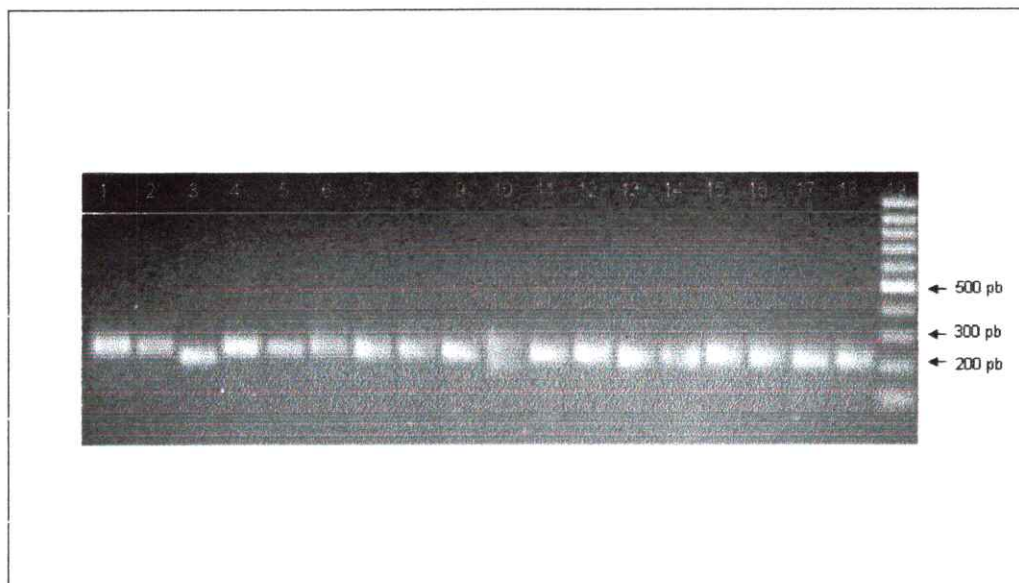


### 5.1 Microsatélites de *S. cerevisiae*

Durante los últimos años, una serie de trabajos se han enfocado a la caracterización de microsatélites en *Saccharomyces cerevisiae*. En base a esto, y con el objeto de tipificar a nivel molecular diversas cepas de *S. cerevisiae*, se utilizaron 7 marcadores de SSR (microsatélites) los cuales fueron previamente descritos (Pérez y col, 2001a; Bradbury y col, 2006). El criterio de selección se basó en el alto número de alelos que estos marcadores eran capaces de discriminar en conjunto con su ubicación dentro del genoma (Pérez y col, 200a; Bradbury y col, 2006; Schuller y Casal, 2007).

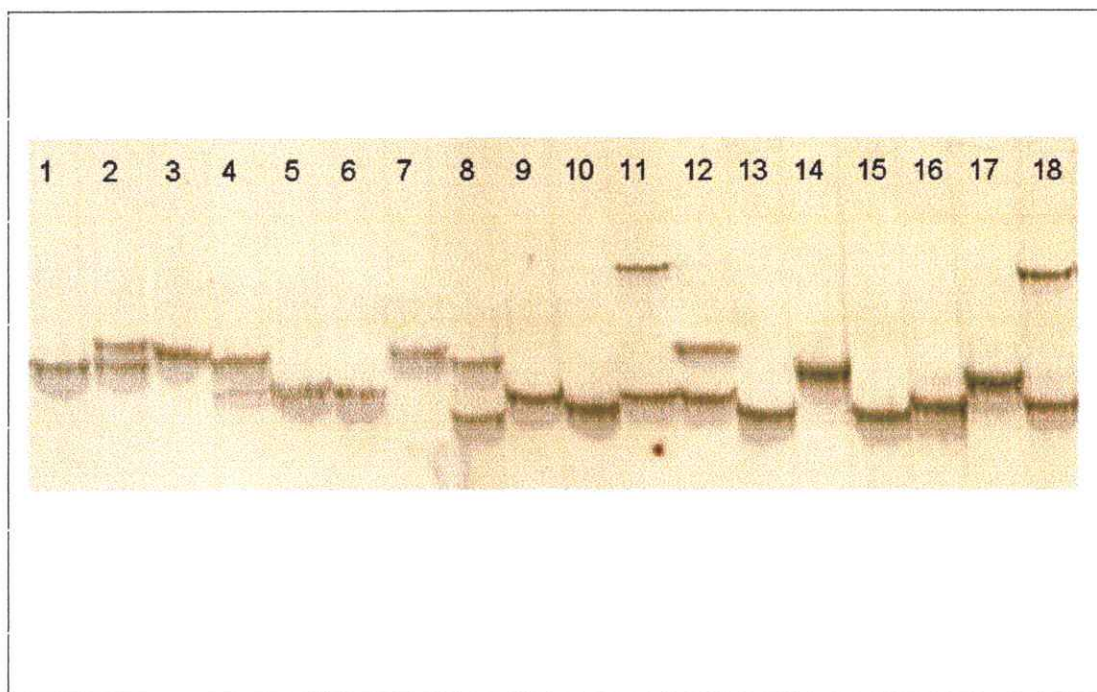
Inicialmente, con el fin de evaluar la capacidad de discriminación en cada uno de los marcadores seleccionados, se caracterizaron 18 cepas de *S. cerevisiae* de distintos orígenes geográficos. La visualización de las reacciones de PCR se realizó inicialmente en geles de agarosa, sin embargo ésta técnica no permitió la discriminación de los fragmentos amplificados y posteriormente fue utilizada con la única finalidad de verificar la amplificación del DNA y a su vez observar que el fragmento encontrado correspondiera al rango de tamaños indicado en la literatura (figura 1).

**Figura 1.- Visualización de amplificadores del marcador YKR014C en geles de agarosa.** Amplificados correspondiente a 18 cepas en gel de agarosa al 2%. Carriles 1 al 18, cepas: L-16, L-146, L-165, L-246, L-281 L-846, L-952, L-958, L-1055, L-1061, L-1197, L-1198, L-1220, L-1225, L.1320, L-1321, L-1335, L-1338. Carril 19, Marcador de tamaño molecular de 100 pb.



Con el fin de visualizar los polimorfismos de tamaño de los fragmentos amplificados, las bandas fueron observadas en geles de poliacrilamida al 6% lo que permitió discriminar fragmentos en el rango de las 100 a 500 pb. Mediante el análisis de los geles obtenidos (figura 2), logramos observar que los marcadores en conjunto fueron capaces de discriminar las 18 cepas seleccionadas, sin embargo, cada uno de los marcadores por si sólo no fue capaz de entregar esta información (tabla 6). Dentro de estos marcadores, YML091C logró discriminar el mayor número de cepas, al identificar un total de 15 genotipos diferentes. Por otra parte, el marcador YLR013W fue el menos informativo al identificar sólo 5 genotipos distintos en este grupo de cepas.

**Figura 2.- Perfiles de amplificación de microsatélites para el marcador YDR160W..**  
Amplificados correspondientes a 18 cepas corridas en gel de poliacrilamida al 6% durante 3 horas a 30 V. Carriles 1-18, cepas: L-246, L-1198, L-1335, L-281, L-16, L-146, L-1322, L-846, L-1054, L-1061, L-958, L-952, L-1197, L-1225, L-1220, L-165, L-1320, L-1321.



**Tabla 6.- Número de genotipos identificados por cada marcador.**

| Marcador | Genotipos identificados |
|----------|-------------------------|
| YML091C  | 15                      |
| YPL009C  | 9                       |
| YDR160W  | 9                       |
| YBR058C  | 8                       |
| YLR013W  | 5                       |
| YGL184C  | 8                       |
| YKR014C  | 7                       |

## **5.2 Análisis de cepas provenientes de diferentes regiones geográficas.**

### **5.2.1 Descripción de marcadores**

Una vez estandarizada la técnica y demostrada la capacidad de resolución por parte de los marcadores, se procedió a analizar una serie de 41 cepas provenientes de diversas zonas de Chile o del extranjero, con el objetivo de estudiar la diversidad genética de las cepas seleccionadas. Se escogieron por región, genotipos que presentaban patrones moleculares similares o muy semejantes al ser analizados por otras técnicas de tipificación de cepas como restricción del DNA mitocondrial o CHEF (Vasquez, 2006). Al analizar los amplificadores en cada muestra, logramos identificar el número de alelos para cada marcador y el número de genotipos que eran capaces de discriminar (tabla 7). Se determinó a su vez, el coeficiente de información de polimorfismo (PIC) para cada marcador.

En base a estos resultados, el marcador YML091C resultó ser el más polimórfico, al lograr identificar 24 genotipos distintos. A su vez, este marcador presentó el valor más alto para PIC indicando su gran capacidad de discriminación entre individuos. Por el contrario, el marcador YKR014C presentó los menores valores para todos los parámetros evaluados, sin embargo, fue capaz de discriminar genotipos que otros marcadores más polimórficos no diferenciaron. Este es el caso para las cepas L-20, L-21 y L-22, las cuales presentaron patrones muy semejantes entre ellas, sin embargo, para el marcador YKR014C la cepa L-21 presentó una banda extra que no se encontró en las otras dos cepas, permitiendo ser diferenciada con respecto a la cepa L-20 (dado que

presentaban el mismo perfil molecular en los otros 6 marcadores) y la cepa L-22 (dado que comparten 11 de 14 alelos). Con estos resultados se logró demostrar el alto poder resolutivo de cada uno de los marcadores y a su vez, calificar a cada uno de ellos como altamente informativos.

### 5.2.2 Frecuencias Alélicas

Con el objeto de estudiar el polimorfismo y la variabilidad en cada uno de los marcadores, se estimó la distribución de las frecuencias alélicas entre las cepas estudiadas. En las figuras 3 y 4 se observan los resultados obtenidos. Estos gráficos muestran el polimorfismo de cada marcador y es posible notar el alto número de alelos para el marcador YML091C (figura 3), así como también para el marcador YDR160W (figura 3). A su vez, las frecuencias alélicas estimadas en cada uno de los marcadores resultaron ser bastante homogéneas y no se observó la presencia de alelos predominantes, a excepción de lo encontrado en los marcadores YKR014C (figura 3), YBR058C (figura 4) e YGL184C (figura 4), donde la gráfica muestra que la frecuencia de uno de los alelos es considerablemente mayor, cercana al 50%.

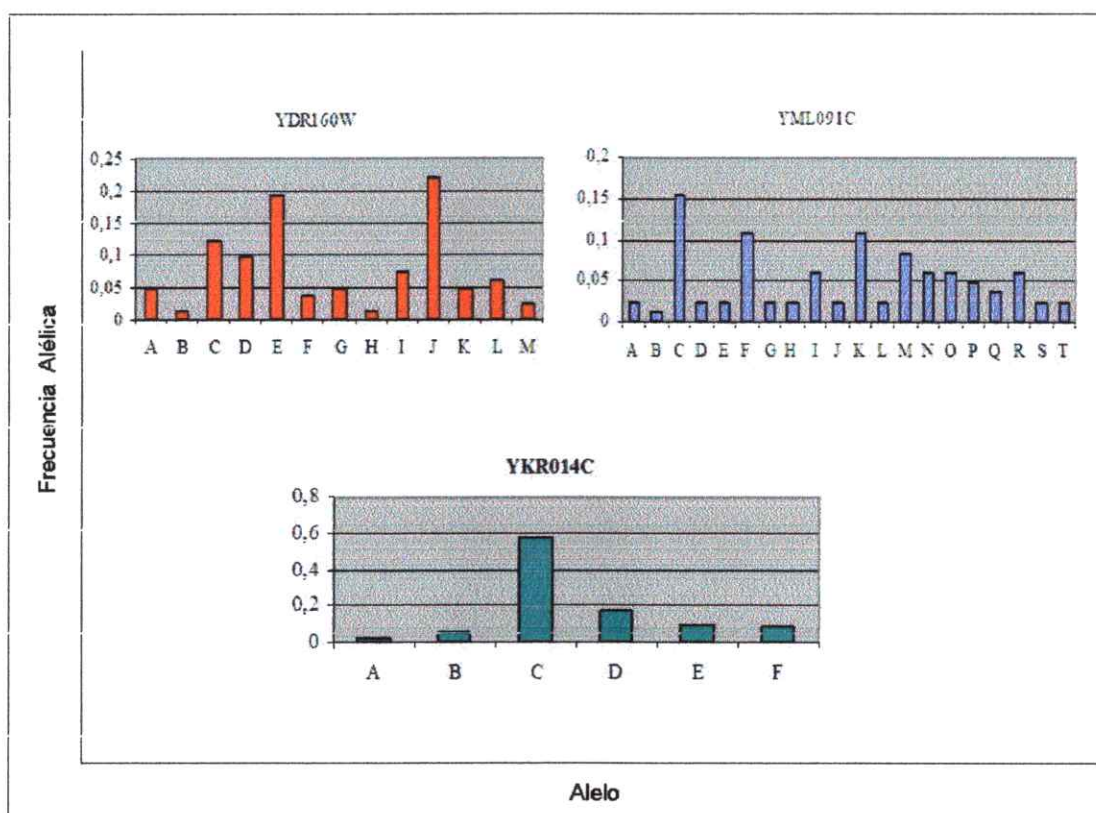
**Tabla 7.- Número de genotipos, alelos y coeficiente de información de polimorfismo (PIC) en 41 cepas de diversas regiones geográficas.**

| Marcador | Genotipos | Alelos | PIC  |
|----------|-----------|--------|------|
| YML091C  | 24        | 20     | 0,92 |
| YPL009C  | 14        | 9      | 0,74 |
| YDR160W  | 17        | 13     | 0,86 |
| YBR058C  | 17        | 11     | 0,75 |
| YLR013W  | 14        | 8      | 0,75 |
| YGL184C  | 13        | 11     | 0,68 |
| YKR014C  | 10        | 6      | 0,59 |

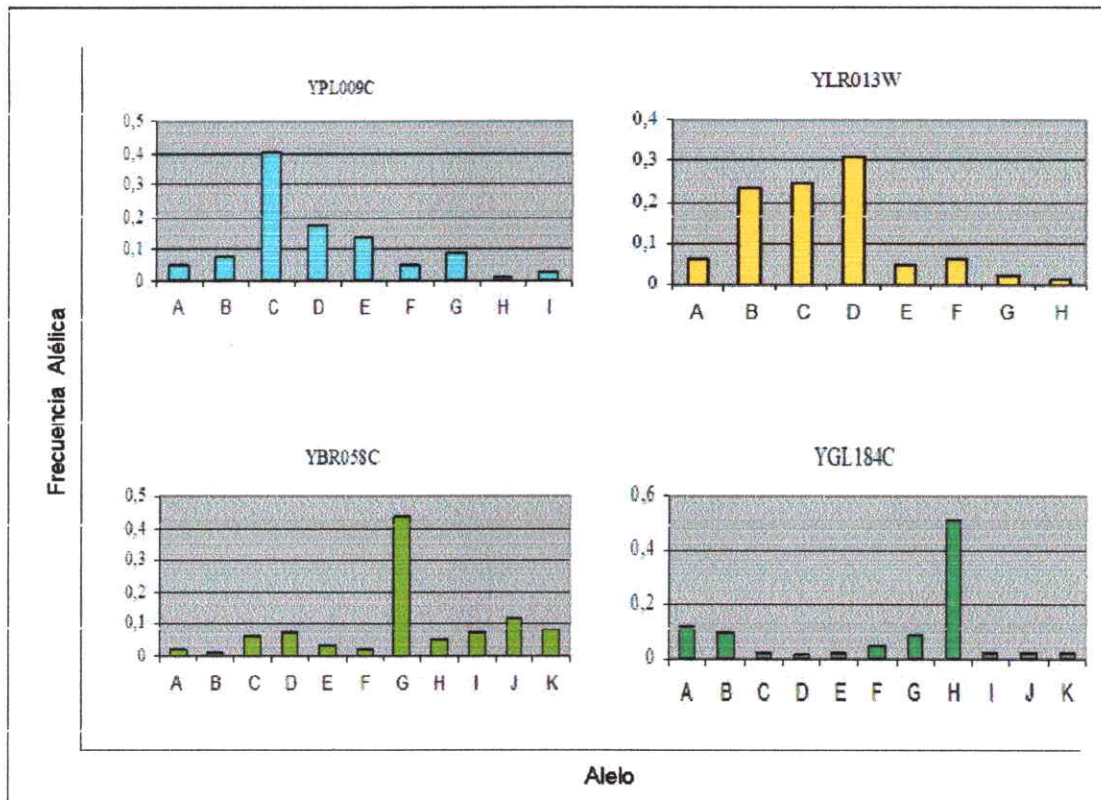


Para todos los casos, el número de alelos observado fue menor al descrito en la literatura (Bradbury y col, 2006; Schuller y Casal, 2007), lo cual podría deberse al criterio de selección de cepas utilizado para realizar este estudio. El caso mas extremo lo constituyó el marcador YKR014C (figura 3) en donde Bradbury y col. (2006) identificaron un total de 12 alelos, sin embargo en nuestros análisis solo observamos 6 alelos. En otros marcadores el número de alelos encontrado fue cercano al descrito en la literatura. Bradbury y col, (2006) encontraron un total de 13 alelos para el marcador YGL184C, de la misma forma en nuestro trabajo se lograron identificar 11 alelos para este marcador.

**Figura 3.- Frecuencias alélicas para los loci YDR160W, YML091C e YKR014C.** En cada uno de los gráficos se representan en barras las frecuencias de los alelos encontrados para los marcadores descritos. En la abscisa se especifican los alelos para cada uno de los marcadores, mientras que en la ordenada las frecuencias alélicas para cada uno de estos.



**Figura 4.- Frecuencias alélicas para los loci YPL009C, YLR013W, YBR058C, e YGL184C.** En cada uno de los gráficos se representan en barras las frecuencias de los alelos encontrados para los marcadores descritos. En la abscisa se especifican los alelos para cada uno de los marcadores, mientras que en la ordenada las frecuencias alélicas para cada uno de estos.



### 5.2.3 Genética de las cepas

Dentro de los resultados derivados del análisis de los patrones moleculares de las 41 cepas en estudio, se encontró un grupo de 13 cepas que serían diploides homocigotas, lo que corresponder a un 31,7% del total. Este valor es similar a lo obtenido por Mortimer y col, (1994) donde observaron un 35% de individuos homocigotos. En la tabla 8 se describen los genotipos encontrados con respecto al número de loci heterocigotos observados.

Por otra parte, se encontraron 4 individuos completamente heterocigotos, de los cuales 2 corresponden a cepas del tipo comercial y 2 a cepas provenientes de una zona industrial de Mendoza. Por otra parte, dentro de las 13 cepas homocigotas descritas anteriormente, 2 corresponden a cepas comerciales y el resto son cepas nativas que provienen de zonas con prácticas industriales. Dados los antecedentes bibliográficos que sugieren que las cepas vínicas serían mayormente diploides (Romano y col, 1988; Mortimer y col, 1994; Bradbury y col, 2006) nosotros sugerimos que estas cepas serían homocigotas y, por lo tanto, nuestros datos concuerdan con lo postulado por Mortimer en cuanto a la importancia de la endogamia en las poblaciones de levaduras silvestres. Sin embargo, es necesario estudios mas detallados para confirmar lo antes mencionado.

**Tabla 8.- Número de individuos identificados según número de loci heterocigotos para 7 marcadores de SSR.**

| Número de loci heterocigotos | Numero de individuos |
|------------------------------|----------------------|
| 0                            | 13                   |
| 1                            | 6                    |
| 2                            | 6                    |
| 3                            | 3                    |
| 4                            | 4                    |
| 5                            | 4                    |
| 6                            | 1                    |
| 7                            | 4                    |

### 5.3 Diversidad en zonas artesanales e industriales

Dentro de los objetivos de este trabajo se planteó obtener una aproximación acerca de la diversidad en zonas tanto con prácticas enológicas artesanales como industriales para la producción de vino. En cada una de estas regiones la tecnología utilizada para la producción de vino es distinta. La zona industrial se caracteriza por un uso intensivo tanto de cepas comerciales como de productos agroquímicos, lo que podría afectar la estructura de las poblaciones naturales presentes en éstas regiones. Por el contrario, las zonas artesanales no utilizan ninguna de las técnicas antes mencionadas.

Para cumplir con este objetivo, se realizó una agrupación de todas las cepas chilenas presentes tanto en zonas industriales como artesanales y se procedió a evaluar el parámetro heterocigosidad observada ( $H_o$ ), como medida de diversidad, mediante la utilización del software POWERMARKER v 3.25, el cual utiliza la definición descrita por Nei (1977). En la tabla 9, se detallan los valores de diversidad obtenidos para ambas agrupaciones. De estos resultados es posible observar una tendencia a un mayor valor de diversidad en la zona con prácticas artesanales ( $H_o = 0,33 \pm 0,1$ ) con respecto a la zona industrial ( $H_o = 0,29 \pm 0,2$ ). Esto podría indicar un efecto del tipo de práctica utilizada en la producción de vino sobre las poblaciones de levaduras.

Si bien es posible notar que las áreas bajo estudio presentan diferencias en sus niveles de diversidad estas diferencias no serían estadísticamente significativas, por lo que las estimaciones de éste trabajo deben ser profundizadas.

**Tabla 9.- Heterocigosidad observada para cepas aisladas de zonas con prácticas artesanales e industriales. Heterocigosidad observada (Ho) según Nei (1977).**

| Zona       | Individuos | Heterocigosidad |
|------------|------------|-----------------|
| Artesanal  | 13         | $0,33 \pm 0,10$ |
| Industrial | 14         | $0,29 \pm 0,18$ |

#### 5.4 Cepas comerciales

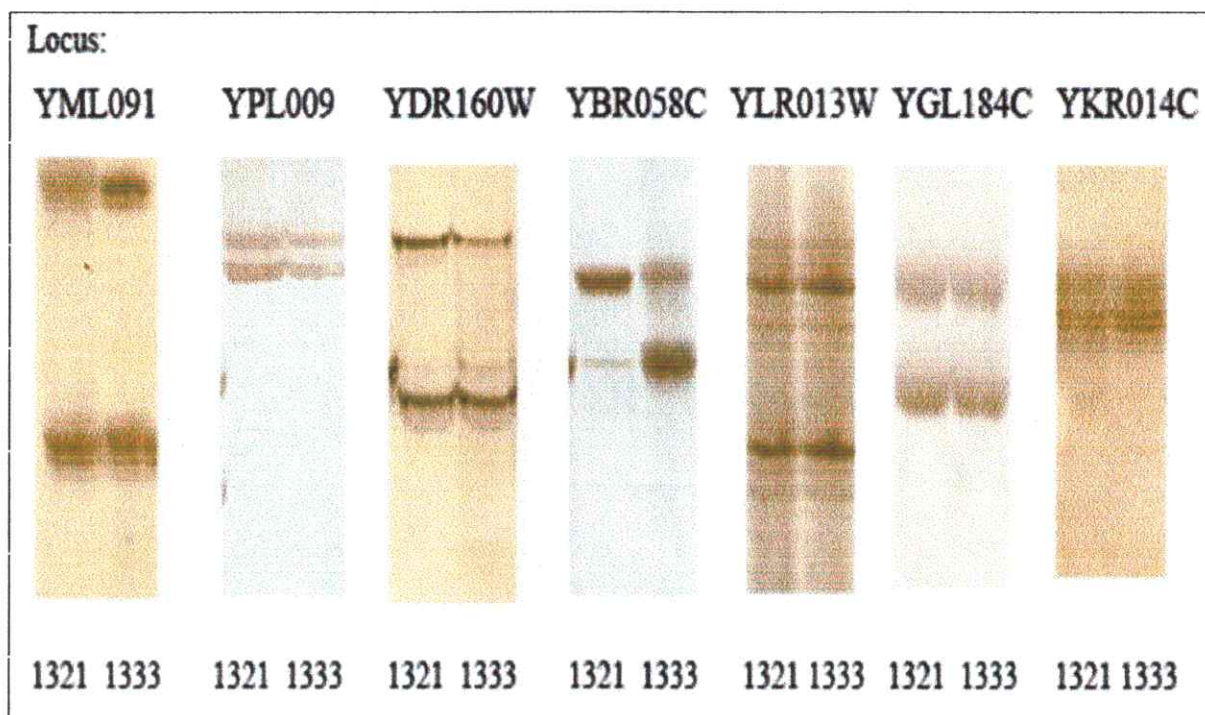
Dentro de las 41 cepas analizadas, se incluyeron 7 cepas comerciales con el objeto de comparar los genotipos de éstas con las cepas nativas y detectar la presencia de cepas comerciales en aislados de campo. De estos resultados es posible rescatar lo obtenido para 3 pares de cepas que presentaban patrones similares. El primero de los casos fue lo observado en las cepas L-1321y L-1333 (figura 5), las cuales en todos los marcadores presentaron el mismo amplificado. La cepa L-1321 es la segunda levadura comercial más usada a nivel nacional y también ha sido encontrada en colectas de regiones de Europa (Valero y col, 2005). Por otra parte, la cepa L-1333 fue aislada en el valle de Casablanca, Valparaíso, a finales de los años 90 y desde entonces es comercializada como una cepa comercial.

El segundo ejemplo lo constituyen las cepas L-1335 y L-1338. Al igual que el par anterior, los marcadores mostraron un patrón de bandas idéntico. Cabe destacar que ambas cepas son comercializadas por la misma empresa y, por lo tanto, es probable que una de ellas sea ancestro de la otra. El último caso lo presentan las cepas L-1323 y L-1324, las cuales presentan los mismos alelos en todos los loci analizados. Al igual que las cepas L-1335 y L-1338, su similitud puede ser explicada debido a que las cepas provienen de la misma empresa.

Finalmente, la cepa L-1332 no presentó similitud con ninguna de las otras cepas comerciales analizadas. A su vez, no se lograron encontrar cepas nativas con genotipos similares a cepas comerciales.



**Figura 5.- Perfil de amplificación para las cepas comerciales L-1321 y L-1333. De izquierda a derecha marcador: YML091C, YPL009, YDR160W, YBR058C, YLR013W, YGL184C e YKR014C. En cada uno de los geles, carril izquierdo cepa L-1321, carril derecho cepa L-1333.**



## 5.5 Análisis de Poblaciones

Con el fin de determinar parámetros de diversidad que nos permitieran confirmar las diferencias de heterocigosidad observada entre poblaciones colectadas desde zonas con prácticas artesanales e industriales, se estudiaron 2 subpoblaciones de levaduras vínicas con distintos orígenes geográficos. Además, otro de los objetivos de este análisis fue determinar los efectos que tendría el transporte de uva desde una región a otra sobre las poblaciones de levaduras y que podría dar cuenta de eventos de migración entre estas subpoblaciones. Los cepas colectadas fueron obtenidos desde zonas con prácticas industriales, en Isla de Maipo, Santiago y desde zonas con prácticas artesanales, en Sagrada Familia, Curicó. Cercano a la zona de Sagrada Familia existe una viña la cual adquiere uvas desde las viñas aledañas. Estas uvas, en algunos casos, son transportadas hasta Isla de Maipo acarreado consigo las levaduras que se encuentran en estas uvas. Sin embargo, a partir del análisis de los perfiles moleculares obtenidos no logramos observar cepas pertenecientes a poblaciones distintas que presentaran el mismo patrón molecular. De esta forma, procedimos a determinar parámetros poblacionales para estimar la distancia genética entre ambas subpoblaciones. Mediante  $F_{st}$ , se obtuvo un valor de 0,001, lo que sugiere una estrecha relación genética entre ambas poblaciones. Sin embargo al no encontrar individuos con genotipos similares en las poblaciones estudiadas y dado el mecanismo de reproducción clonal postulado en estas levaduras, no es posible sugerir que la alta similitud en las frecuencias alélicas se deba a procesos de migración.

Posteriormente, determinamos valores de heterocigosidad ( $H_o$ ) para las poblaciones de Sagrada Familia e Isla de Maipo (tabla 10). Para este caso, la diversidad calculada en Sagrada Familia fue mayor en comparación a Isla de Maipo. Esto se correlaciona con lo obtenido en el análisis previo en 41 cepas, donde se observó una mayor diversidad genética en las poblaciones de levaduras colectadas en zonas artesanales. Esto también sugiere que la diversidad genética de las poblaciones de levaduras endémicas podría estar siendo afectada por el tipo de prácticas enológicas utilizada en la producción de vino, sin embargo, un mayor análisis es necesario para validar estadísticamente los resultados obtenidos en este trabajo.

**Tabla 10.- Heterocigosidad observada para las poblaciones de Isla de Maipo y Sagrada Familia.** Medidas de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) obtenida mediante la formula descrita por Nei (1977) para las poblaciones en estudio.

| Población       | Número de individuos | Heterocigosidad |
|-----------------|----------------------|-----------------|
| Sagrada Familia | 8                    | $0,38 \pm 0,3$  |
| Isla de Maipo   | 11                   | $0,32 \pm 0,19$ |

## **6.- DISCUSIÓN**

## 6.1 Marcadores de SSR

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta una gran capacidad para fermentar mostos de uva ya que posee características, como la tolerancia a altas concentraciones de etanol, que le permiten imponerse dentro del mosto de fermentación desplazando al resto de las levaduras presentes (Querol y col, 2003). Cada una de estas características han sido ampliamente estudiadas tanto a nivel bioquímico como molecular, sin embargo la estructura poblacional de estas levaduras en el medio ambiente es poco conocida (Landry y col, 2006). Con el objeto de estudiar las poblaciones de levaduras *S. cerevisiae* provenientes de diversas regiones geográficas y entender las diferencias entre estas y los posibles efectos de las prácticas industriales en las zonas correspondientes, tipificamos genéticamente un total de 71 cepas mediante la técnica de microsatélites (SSR). Para ello, inicialmente la técnica de SSR fue optimizada mediante el estudio e identificación de 18 cepas seleccionadas. De esta forma se logró estandarizar cada uno de los parámetros involucrados (extracción de DNA, reacción de PCR y corrida electroforética). A su vez fue posible demostrar la alta capacidad de discriminación del método, al identificar y diferenciar mediante sus patrones moleculares los 18 genotipos en estudio (tabla 6).

Al evaluar los marcadores seleccionados mediante el análisis de 41 cepas, encontramos que el marcador YML091C presenta el mayor polimorfismo (tabla 7). Este marcador ha sido ampliamente utilizado en estudios de microsatélites y fue inicialmente descrito por Pérez y col. (2001a), siendo desde entonces utilizado en gran parte de los trabajos que

involucran SSR en *S. cerevisiae*. En nuestro trabajo logramos encontrar 20 alelos para este marcador y un coeficiente de información de polimorfismo (PIC) de 0,92. Este valor es considerado como alto al ser cercano al máximo valor 1,0 (tabla 7) y, por lo tanto, el marcador YML091C sería capaz de discriminar la mayoría de los genotipos presentes en la población. A su vez, este marcador tendría una alta capacidad para detectar individuos heterocigotos, en contraste con otros marcadores que no tendrían esta facultad. Previamente, Schuller y Casal. (2007), habían descrito para este marcador cerca de 30 alelos. Este valor es superior al encontrado en nuestro estudio, posiblemente debido al diverso origen geográfico de las cepas utilizadas en el estudio de Schuller y Casal. (2007). Con respecto a los otros marcadores analizados, todos fueron considerados como altamente polimórficos al presentar valores de PIC sobre 0,6 (tabla 9). El número de alelos detectado por cada uno de los marcadores también fue alto y, por lo tanto, estos marcadores podrían ser utilizados posteriormente para el estudio de poblaciones.

El criterio utilizado en la elección de las cepas se basó en las similitudes que ellas presentaban al ser analizadas por otras técnicas moleculares tales como restricción del DNA mitocondrial y cariotipo electroforético (CHEF) (Vasquez, 2006). Estas analogías observadas en sus patrones moleculares se presentaban en determinadas cepas, en general, en aquellas provenientes de una misma región. Basados en esto, se seleccionaron grupos de cepas con similares patrones moleculares, teniendo cada uno de estos grupos un origen geográfico distinto. Este criterio nos debería permitir evaluar la capacidad de la técnica para resolver, primero, entre cepas de diversos orígenes geográficos y, segundo, entre cepas que otros métodos no habían logrado discriminar y que poseían un mismo origen geográfico. En total se lograron distinguir 33 genotipos,

obteniendo 8 pares de cepas que no pudieron ser diferenciadas con los marcadores utilizados. Esta capacidad es considerablemente superior a la de CHEF y similar a la de restricción del DNA mitocondrial (mtRFLP) (Vasquez, 2006). Sin embargo, la técnica de microsatélites analiza DNA genómico y, por lo tanto, lo observado puede ser extrapolado a cambios y divergencias a éste nivel a diferencia del mtRFLP el cual no necesariamente refleja los cambios ocurridos a nivel genómico. El DNA mitocondrial no posee un comportamiento mendeliano y al ser de carácter haploide, a diferencia de los SSR, dificulta generar un análisis para identificar individuos heterocigotos u homocigotos (Ferreira, 1998; Castrejon y col, 2002). Los microsatélites, a diferencia del mtRFLP, favorecen el análisis genético al ser un marcador co-dominante (Tautz y col, 1986).

Para demostrar que todos los marcadores son útiles para el análisis de cepas, aun cuando algunos de ellos son menos informativos, destacamos el caso de las cepas L-20, L-21 y L-22. Las cepas L-20 y L-21 presentaron patrones similares para todos los marcadores a excepción del YKR014C. Con respecto a la cepa L-22, ésta se diferencia de las 2 cepas anteriores en 2 loci. Aun así, para este marcador la cepa L-22 presenta un patrón similar a la cepa L-20 y no así con la cepa L-21.

Uno de los requisitos para denominar a un marcador como polimórfico, es que ninguno de sus alelos se encuentre representado en más de un 95%. Al analizar las frecuencias alélicas observamos que aquellos marcadores con un mayor número de alelos presentaban frecuencias alélicas distribuidas homogéneamente y, por lo tanto, el marcador YML091C e YDR160W fueron considerados como los más informativos dentro del grupo analizado. Con respecto al resto de los marcadores, en general cada uno



de estos presentó un alelo predominante cuya frecuencia no superó el 50% del total, lo que demuestra el carácter polimórfico de los marcadores estudiados (figuras 3 y 4).

## 6.2 Teoría “Renovación del genoma”

Diversas hipótesis han surgido con respecto al posible mecanismo de evolución que tendrían las levaduras vínicas de la especie *S. cerevisiae*, entre ellas la llamada “Renovación del genoma” (Mortimer y col, 1994). Esta hipótesis establece que el carácter diploide-homotálico de la mayoría de las levaduras vínicas, permitiría generar nuevos individuos homocigotos, algunos con mayor aptitud que sus predecesores. En su estudio, Mortimer y col. (1994) encontraron que el 35% del total de las cepas estudiadas eran homocigotas las cuales se habrían generado debido al proceso de renovación del genoma. Esta hipótesis ha sido ampliamente discutida, con experimentos que la avalan o que la rechazan (Puig y col, 2000; Aa y col, 2006; Ruderfer y col, 2006; Schuller y Casal, 2007).

En nuestro trabajo, nosotros encontramos que el 31,7% de las cepas serían homocigotas al observar sólo un amplificado en sus patrones moleculares para cada uno de los marcadores (tabla 8). Esto representa un valor muy cercano a lo obtenido por Mortimer y col (1994) y basados en el carácter diploide que presentarían las levaduras vínicas (Romano y col, 1988; Mortimer, 1999; Bradbury y col, 2006) nuestros resultados apoyarían esta hipótesis sugiriendo que estas cepas habrían sido generadas mediante el mecanismo de renovación del genoma.

### 6.3 Diversidad de levaduras

Durante los últimos años gran parte de los estudios en *S. cerevisiae* han estado enfocados a comprender la biología de las células eucariontes. Sin embargo, pocos son los trabajos enfocados al estudio de la estructura poblacional y la genética molecular de las poblaciones de levaduras (Landry y col, 2006). Dentro de estos se destacan los estudios de diversidad, mediante análisis de secuencias subteloméricas y CHEF, los cuales han dado cuenta de un alto nivel de diversidad en levaduras vínicas de *S. cerevisiae* (Cavalieri y col, 2006; Schuller y Casal, 2007). Por otra parte, Ganga y Martínez (2004) postularon que existiría una disminución de la diversidad de levaduras del tipo *no-Saccharomyces* en mostos provenientes desde zonas con prácticas industriales en relación a mostos no inoculados, con fermentación espontánea, provenientes de regiones con prácticas artesanales. Con el objeto de estudiar las diferencias a nivel de diversidad en las poblaciones naturales, distribuimos un conjunto de 34 cepas en 2 grupos según la localidad a partir de la cual fueron colectadas, dependiendo del tipo de práctica enológica utilizada en dicha región (Vasquez, 2006). De esta forma observamos que el grupo de aislados proveniente desde zonas artesanales presenta un índice de diversidad genética mayor en comparación al grupo de cepas colectadas desde regiones con actividad industrial (tabla 9).

Como segundo experimento que nos permitiera confirmar la disminución de diversidad antes observada, analizamos 2 subpoblaciones con distintos tipos de prácticas enológicas. Para esto seleccionamos cepas colectadas desde Isla de Maipo, Santiago

(zona industrial) y desde Sagrada Familia, Curicó (zona artesanal). Los resultados obtenidos indican una mayor diversidad en la zona artesanal con respecto a la zona industrial (tabla 10) observando para este caso valores y diferencias aún mayores que las antes descritas (tabla 9). Esta disminución de diversidad en zonas industriales sugiere que el tipo de práctica enológica utilizada en estas regiones influiría sobre la biota levaduriforme de *S. cerevisiae* y la estructura poblacional de ésta.

Sin embargo, debido a que las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas, se hace necesario el estudio de un mayor número de poblaciones para confirmar el efecto negativo que tendría la industria vitivinícola sobre la diversidad de las poblaciones de levaduras nativas.

#### **6.4 Cepas comerciales**

El uso intensivo de cepas comerciales y la ausencia de un tratamiento de los efluentes industriales permiten que estas cepas puedan ser liberadas en nuevas zonas geográficas (Valero y col. 2005). Basados en esto, caracterizamos 7 cepas comerciales, ampliamente utilizadas a nivel nacional, con el objeto de identificar cepas colectadas en campo que correspondieran a cepas del tipo comercial. Al analizar los patrones moleculares de las cepas comerciales, encontramos que existía una gran similitud entre la mayoría de las cepas, al observar que 3 pares de estas poseían el mismo patrón molecular. Cabe destacar que 2 de estos 3 pares correspondían a cepas de la misma empresa y, por lo tanto, es probable que en ambos casos una cepa sea progenitora de la otra.

El caso mas interesante es el de las cepas L-1321 y L-1333 (figura 5), las cuales en contraste con los otros pares de cepas, pertenecen a empresas distintas. La cepa L-1333 fue aislada durante los años 90 en el valle de Casablanca, Valparaíso y su comercialización ha sido reciente, mientras que la cepa L-1321 ha sido comercializada desde los años 80. Esto sugiere que la cepa L-1321 habría sido utilizada en alguna bodega del valle de Casablanca y posteriormente recolectada, evidenciando la liberación de cepas comerciales al campo. Resultados obtenidos por nuestro grupo de laboratorio mediante RFLP, indican que existirían diferencias entre estas cepas a nivel de secuencias repetidas subteloméricas evidenciando procesos de micro-evolución en la cepa L-1333 (Sarmiento, 2007).

## **7.- CONCLUSIONES**

En base a los resultados antes expuestos podemos concluir que:

- La técnica de microsatélites (SSR) presenta una gran capacidad para discriminar entre genotipos estrechamente relacionados. Por otra parte, su resolución logró ser comparable con la técnica de restricción del DNA mitocondrial, sin embargo ésta última no permite obtener mayor información acerca de las relaciones a nivel genómico entre cepas a diferencia de los SSR los cuales otorgan una mayor facilidad en los análisis genético para el estudio de poblaciones debido a su carácter co-dominante.
- Los siete marcadores seleccionados presentaron un alto grado de polimorfismo lo que, según la categorización de Bolstein (1980), permitió clasificarlos como marcadores altamente informativos. Dentro de estos se destaca el marcador YML091C el cual mostró el mayor polimorfismo, comprobando de esta forma lo que ya había sido propuesto en la literatura.
- El porcentaje de individuos homocigotos obtenido apoya la hipótesis “renovación del genoma” que propone un mecanismo de reproducción autofecundativa en las levaduras vínicas.
- Las poblaciones nativas de levaduras *S. cerevisiae* estarían siendo afectadas al evidenciar una tendencia a la reducción de la diversidad en zonas que utilizan prácticas industriales para la producción de vino en comparación a otras zonas donde no se utilizan estas prácticas.

- La cepa L-1321 presenta un genotipo idéntico a la cepa L-1333 y dados los antecedentes acerca de la comercialización y recolecta de ambas en el valle de Casablanca, se sugiere que la cepa L-1321 sería ancestro de la cepa L-1333.

## **8.- REFERENCIAS**



- Aa, E., Townsend, J., Adams, R., Nielsen, K. y Taylor, J. 2006. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*. 6: 702-715.
- Balloux, F. y Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 11: 155-165.
- Bardwell, L., Cook, J., Inouye, C., Thorner, J. 1994. Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Developmental Biology*. 166: 363-379.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. y Davis, R. 1980. Construction of Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *The American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Bradbury, J., Richards, K., Niederer, H., Lee, S., Dunbar, P. y Gardner, C. 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. 11: 27-37.
- Castrejon, F., Codon, A., Cubero, B. y Benitez, T. 2002. Acetaldehyde and Etanol are Responsible for Mitochondrial DNA (mtDNA) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) in Flor yeast. *System and Applied Microbiology*. 25: 464-467.
- Cavaliere, D., McGovern, P., Hartl, L., Mortimer, R., Polsinelli, M. 2003. Evidence for *Saccharomyces cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*. 57: 226-232.
- Ferreira, M. y Grattapaglia. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el análisis genético. 11-68. Ministerio de Agricultura y Abastecimiento. Brasilia.
- Fleet, G., Heard, G. 1993. Yeast-growth during fermentation. En Fleet, G. (ed) *Wine microbiology and Biotechnology*. Pp 27-57. Hardwood Academic Publishers, Switzerland.
- Gallego, F., Perez, M.A., Nuñez, Y. e Hidalgo P. 2005. Comparison of RAPDs, AFLPs, and SSR marks for the gentic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*. 22: 561-568.
- Ganga, M y Martínez, C. 2004. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of *non-Saccharomyces* yeast. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 76-83
- Goldstein, DB., Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, New York. 352 pp.

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

Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonlan, G., Presber, W., Mitchel, T. y Vilgalys, R. 1996. Molecular Markers reveal that population structure of the Human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 12473 – 12477.

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

Hardy, G.H. 1908. Mendelian proportion in a mixed population. *Science*. 28: 49–50

Hedrick, P. y Kumar, S. 2001. Mutation and linkage disequilibrium in human mtDNA. *European Journal of Human Genetics*. 9: 969-972.

Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G., Lecointre, G., Nguyen, H., Gaillardin, C. y Dujon, B. 2000. Microsatellite Typing as a New Tool for Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 551-559.

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

Johnson, L., Koufopanou, V., Goddard, M., Hetherington, R., Schafer, S y Burt A. 2004. Population Genetics of the wild Yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics*. 166: 43-52.

Levison, G., Gutman, GA. Slipped strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. En *Tools for Developing Molecular Markers*. University of Florida.

Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa TG. 1991. Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 42: 141-144.

Landry, C., Townsend, J., Hartl, D. y Cavallieri, D. 2006. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Ecology*. 15: 575-591.

Martini, A., Frederichi, F., Rosini, G. 1980 A new approach to the study of yeast ecology on natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*. 26: 856-859.

Mortimer, R., 2000. *Evolution and Variation of the Yeast (Saccharomyces) Genome*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 10: 403-409.

Mortimer, R., y Johnston, J. 1986. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*. 113: 35-43.

Mortimer, R., y Polsinelli, M. 1999. On the origins of wine yeast. *Research Microbiology*. 150: 199-204.

Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G. y Polsinelli, M. 1994. Genome Renewal: A new Phenomenon Revealed From a Genetic Study of 43 Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Derived From Natural Fermentation of Grape Must. *Yeast*. 10: 1543-1552.

Mullis K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 262:56-65

Nei, M. 1977. F-Statistics and analysis of gene Diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*. 41: 225-233

Pérez, M., Gallego, F., Martínez, I. e Hidalgo, P. 2001a. Detection, distribution and Selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 461-466

Pérez, M., Gallego, F. e Hidalgo, P. 2001b. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*. 205: 375-378.

Pfeiffer, T., Schuster, W., Bonhoeffer, S., 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. 292: 504-507.

Phaff, H., Starmer, W. 1987. Yeast associated with plants, insects and soil. En Rose and Harrison (Eds), *The Yeasts*, Academic Press Inc., London, *Biology of Yeasts*, p. 123-180

Pringle, J. y Hartwell, L. 1981. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. En Strathern, J., Jones, E., Broach, J (Eds). *The Molecular Biology of the yeast Saccharomyces*. Vol 1, Life cycle and Inheritance. pp. 97-142. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory.

Puig, S., Querol, A., Barrio, E. y Perez-Ortin, J. 2000. Mitotic Recombination and Genetic Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2057-2061.

Querol, A., Fernandez-Espinar, M., del Olmo, M., Barrio, E. 2003. Adaptative evolution of wine yeast . *Internacional Journal of Food Microbiology*. 86: 3-10.

Romano, P., Soli, M., y Zambonelli, C. 1988. Physiological characteristics of single spore cultures of wine yeast for Industrial purpose. *Annals of Microbiology*. 38: 123-129

Ruderfer, D., Pratt, S., Seidel, H. y Kruglyak, L. 2006. Population genomic análisis of outcrossing and recombination in yeast. *Nature*. 38(9) 1177-1181.

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

Selkoe, K., Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologist: A practical guide to using and evaluating microsatellites markers. *Ecology Letters*. 9: 615-629.

Schuller D. y Casal, M. 2007. The genetic structure of fermentative vineyard-associated *Saccharomyces cerevisiae* populations revealed by microsatellite analysis. *Antonie van Leeuwenhoek*. 91 (2): 137-150

Sniegowski, P., Dombrowski, P., Fingerman, E. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and siplay different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Research*. 1: 299-306.

Schultz, J., Ferguson, B. y Sprague, G. 1995. Signal transduction and growth control in yeast. En Dickinson, J. *The metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. pp 1-20

Sprague, G., y Thorner, J. 1992. Pheromone response and signal transduction during the mating process of *Saccharomyces cerevisiae*. En Dickinson, J (Ed). *The metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. pp 1-20.

Stark AE. 2005. The Hardy-Weinberg principle. *Genetic Molecular Biology*. 28:485-485

Tauzt, D. y Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukariotic genomes. En *Tools for Developing Molecular Markers*. University of Florida

Tauzt, D., Trick, M., Dover, GA. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a mayor source of genetic variation. En *Tools for Developing Molecular Markers*. University of Florida.

Tavanti, A., Gow, N., Maiden, M., Odds, F. y Shaw, D. 2004. Genetic evidence for recombination in *Candida albicans* based on haplotype analysis. *Fungal Genetics and Biology*. 41: 553-562.

Taylor, J., Geiser, D., Burt, A. y Koufopanou, V. 1999. The Evolutionary Biology and Population Genetics Underlying Fungal Strain Typing. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 126-146.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Breniere, S., Dardé, ML. y Ayala, F. 1991. Are eukaryotic microorganism clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 5129-5133.

Valero, E., Schuller, D., Gambon, B., Casal, M., Dequin, S. 2005. Dissemination and survival of comercial wine yeast in the vineyard: a large-scale, three years study. *FEMS Yeast Research*. 5: 959-969.

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

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

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

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

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Population, Vol.4: Variability within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago

## **ANEXOS**

## Anexo 1: Soluciones y Medios.

### 1. Medio YPD

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| Extracto de Levadura | 0,5%      |
| Peptona              | 0,5%      |
| Glucosa              | 2,0%      |
| Agar*                | 2,0%      |
| Estreptomina         | 200 ug/ml |

\* Solo para medio sólido

El volumen final es dado con agua destilada y el medio es autoclavado por 21 minutos a 15 psi.

### 2. TBE 10X

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

### 3. EDTA 0,5M pH 8,0

Disodioetildiamintetraacetato \* 2 H<sub>2</sub>O      186,1 g.

Agregar 800 mL de agua y llevar a pH 8,0 con hidróxido de Sodio sólido.  
Ajustar a 1 L con agua destilada y autoclavar por 21 minutos a 15 psi.

### 4. TE pH 7,4

Tris-HCl pH 7,4      10 mM  
EDTA pH 8,0      1 mM

### 5. Solución Acrilamida: Bis Acrilamida 19:1 40%

Acrilamida      5,3 M  
BisAcrilamida      0,13 M

### 6. Solución Poliacrilamida 6%

Acrilamida:Bisacrilamida 40%      150 mL

Urea 7,5 M

Agregar 500 mL de TBE 1X  
Ajustar a L con agua destilada.

7. Solución Fijación

Ácido acético 10%

Ajustar a 1L con agua destilada ultrapura

8. Solución de tñido

$\text{Ag}_2\text{NO}_3$  6 mM  
Formaldehído 37% 3 mL

Ajustar a 2 L con agua destilada ultrapura

9. Solución de Revelado

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,35 M  
Formaldehído 37% 3 mL  
 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  1 granalla

Ajustar a 2 L con agua destilada ultrapura.