

UCH-FC  
Biotecnología  
K424  
C.I



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTUDIO DE LAS VARIANTES ALÉLICAS INVOLUCRADAS EN LA  
RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *Saccharomyces cerevisiae*”**

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

**EDUARDO IGNACIO KESSI PÉREZ**

Director del Seminario de Título: Dr. Claudio Martínez Fernández

Co-Director del Seminario de Título: Dr. Francisco Cubillos Riffo

Patrocinante del Seminario de Título: Dr. Marcelo Baeza Cancino

Noviembre 2014

Santiago – Chile



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato

**EDUARDO IGNACIO KESSI PÉREZ**

**“ESTUDIOS DE LAS VARIANTES ALÉLICAS INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A FUNGICIDAS EN *Saccharomyces cerevisiae*”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

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

Dr. Francisco Cubillos Riffo  
**Co-Director del Seminario del Título**

Dr. Marcelo Baeza Cancino  
**Patrocinante del Seminario de Título**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Margarita Carú Marambio  
**Presidenta**

Dr. Víctor Cifuentes Guzmán  
**Evaluador**

Santiago de Chile, Noviembre de 2014

## BIOGRAFÍA



Un homocigoto biológico. Así lo definió su 'amigo' el Dr. Tito Ureta. Hijo único de dos biólogos de formación, bioquímico y genetista de pasión, fue nacido y criado al alero de la Universidad de Chile, desde aquel Miércoles 6 de Diciembre de 1989 en el hospital J. J. Aguirre, pasando por esos infantiles paseos al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias.

Su formación básica se dio en Ñuñoa, entre su casa, la de sus abuelos y el colegio Heinrich High School (ubicado a pasos de la Facultad), en donde además de ser un alumno destacado participó en el equipo de básquetbol. Posteriormente, y en un principio contra su voluntad, partió a probar suerte al glorioso Instituto Nacional General José Miguel Carrera, donde terminó de formarse no sólo como estudiante sino que también como ciudadano. Siempre con la túnica azul bajo la ropa ordinaria, y como todo buen institutano, la Universidad de Chile era el único lugar al que aspiraba.

No sólo una túnica azul, sino que una camiseta y un corazón azul, lo han identificado siempre. Hinchista ferviente de la U, ha vibrado con su equipo en buenas y malas, y ha sufrido como los hinchas azules están destinados a sufrir. Esta pasión la ha compartido con su padre en cada visita al Nacional, así como también han compartido aquella por la música, ya sea yendo a la ópera en familia o en especial disfrutando del buen Rock clásico, además de la pasión por el conocimiento, esa de largas conversaciones sobre Biología y Filosofía, sobre Física y Literatura. Por su parte, su madre ha sido siempre ese necesario cable a tierra, esa necesaria conversación cotidiana, ese insustituible enfocarse para una mente dispersa.

Los años de colegio y Universidad, de estadio y de conciertos, se han mezclado con su otra pasión: el Escultismo. En su colegio de niñez ingresó al Grupo Guía-Scout Heinrich, en el que ha transitado por todas las Unidades tanto como Beneficiario como Dirigente, y el cual un día lo llevó al Jamboree Mundial en Inglaterra a celebrar los 100 años del Movimiento Scout. El ser Scout lo moldeó e hizo crecer como persona, y le enseñó el valor incalculable de ser amigo de sus amigos y, por sobre todo, de sus amigas. El amor en cambio le fue esquivo, ahí y en todo lado, pero finalmente llegó en su querida Universidad con la mejor de las personas, otra orgullosa hija de Bello.

Su abuelo quiso que fuera Marino, pero de pequeño decidió que despertarse a las 5 am a ducharse con agua helada no parecía un futuro confortable. Sus padres por su parte le inculcaron tanto la Biología como la idea de no ser biólogo. Y les hizo caso: en vez de eso, estudió biotecnología. En parte por el gusto por la Biología, en parte por el desafío, y en parte por lo cercano a su casa. La Facultad de Ciencias lo acogió como tantas veces de niño ahora como un verdadero hijo, y él le respondió como tal. Nuevamente se dedicó al deporte, esta vez atletismo, compitiendo en diversos torneos en casi cada prueba existente. Mejor puntaje en su año de ingreso a la Facultad, terminó la licenciatura con distinción máxima y como el mejor de su generación. Tras un año sabático reflexivo en que comenzó a incursionar como ayudante en su Facultad y en el Programa Académico de Bachillerato, y como docente en la Universidad Andrés Bello, decidió ir a probar suerte al Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada de la USACH, el cual le abrió sus puertas, lo llevó a un congreso, y ahora le permite terminar con éxito su Seminario de Título para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular de la gloriosa Universidad de Chile.

## DEDICATORIA

*"No se comprende aquí ya ni la locura. Hasta del loco creen y dicen que lo será por tenerle su cuenta y razón. Lo de la razón de la sinrazón es ya un hecho para todos los miserables. Si nuestro señor Don Quijote resucitara y volviese, andarían buscándole una segunda intención a sus nobles desvaríos."*

**Don Miguel de Unamuno**

A Carolina, mi Bombón, mi compañera y la razón de mi sinrazón...

## AGRADECIMIENTOS

Mis cercanos me habrán escuchado decir más de una vez que, al momento de realizar la presentación oral de la tesis, no haría "la típica 'mamonería' de mostrar fotitos y agradecerle a medio mundo", que sólo daría los agradecimientos formales y también aquellos para esas pasiones que me han ayudado a mantener la cordura durante este proceso. Habrá que esperar para ver qué pasa en ese momento. Por ahora lamento decepcionarlos, porque hay palabras para todos.

Partir agradeciendo al LAMAP por la oportunidad de haber realizado este Seminario de Título. A Claudio, por haberme acogido y abierto las puertas a la ciencia de primer nivel. A Francisco, por su guía y su paciencia durante todo el proceso, y su dedicación tanto con mi trabajo como con la revisión del presente escrito. A Verónica, por sus palabras siempre precisas. A Valentina, por su ayuda cada vez que la requerí. A Sebastián, por la camaradería. A Walter, por estar ahí no sólo cada vez que yo lo necesité, sino que cada vez que todos lo necesitamos. Y en general a todos, sin excepción, por ser no sólo un gran grupo científico sino que un gran grupo humano, a veces incluso demasiado cálido para alguien tan introvertido como yo.

Continuar con mi familia. A Patricia y Eduardo (¿o Luz y Elías?), mis padres, porque sin ellos, sin su infinito cariño, sus eternas enseñanzas y sus inextinguibles ironías, sencillamente no sería quien soy ni estaría donde estoy. A mi Lala por las interminables conversaciones, y a mi Tata Rafa por enseñarme el incalculable valor de ser recto y honrado, me dieron todo lo que quise en la vida, y sé lo orgullosos que estarían de verme finalizar este camino. A mi Ela y mi Tata Abraham, porque a pesar de la distancia han sido siempre unos abuelos muy presentes, dejándome ser su 'bebé' hasta el día de hoy. A mi Ita, por todo su amor incondicional, por cada consejo preciso,

por tomarme como un hijo. A Fito por ser un hermano para mí, y a mi tía Ivonne por hacer de su casa siempre también mi casa. Y a todos mis demás tías, tíos, primas y primos, no importando si son putativos(as) o en segundo grado, porque sé que a través de estas más de dos décadas aportaron con más de una experiencia a mi devenir.

Proseguir con mis amigos y amigas, porque muchos(as) de ustedes son los hermanos(as) que nunca tuve. A los Scouts, a todos aquellos compañeros de vida que fui conociendo a través de los años, y con los que aún subsistimos algunos como Dirigentes, resistiéndonos a crecer. A los Biotec, a los que se fueron porque para mí jamás lo hicieron, a los que terminamos juntos por afrontar con compañerismo los desafíos planteados, a mis amigas Daniela, Sandra y Leslie por ser la motivación para afrontar cada día de clases, y a los Anners por dejarlo todo en la cancha.

Agradecer también a mis pasiones, aquellas que me han ayudado a mantener la cordura (¿o la locura?) durante toda la vida universitaria. Al Escultismo, por ser un estilo de vida, hacerme una mejor persona, y entregarme amigos de verdad. Al Bulla, por todas las penas y alegrías, por todo el sufrimiento, por la pasión infinita, por la locura total. Al Rock, por el desenfreno y la calma, por ser la banda sonora de mi vida.

Finalmente, un especial agradecimiento a mi querida Carolina. Mi Bombón, has sido mi razón y mi inspiración, y por eso te estoy eternamente agradecido. Gracias por todo tu amor, tu tiempo, tu comprensión, tus enojos, tus besos, tus caricias, porque sin todo eso no sería ni la mitad de la persona que soy. Gracias por Tetito, nuestro retoño, que es el canguro explorador más lindo. Te amo mucho, hoy, y siempre.

Y al Toto... por ser tan gordo.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA .....	ii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1. Rasgos complejos en la naturaleza presentan variaciones cuantitativas .....	5
1.2. Mapeo por ligamiento de QTLs .....	6
1.3. Mapeo por ligamiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	9
1.4. Diversidad genética y variación natural en <i>S. cerevisiae</i> .....	13
1.5. Variación natural de la resistencia a fungicidas en <i>S. cerevisiae</i> .....	16
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
Objetivo General .....	20
Objetivos Específicos.....	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas .....	21
2.1.1. Cepas parentales .....	21
2.1.2. Poblaciones recombinantes.....	21
2.1.3. Híbrido y recíprocos hemicígotos.....	21
2.2. Medios de cultivo y fungicidas utilizados .....	22
2.2.1. Medios de cultivo.....	22
2.2.2. Fungicidas.....	22
2.3. Evaluación de resistencia a fungicidas en medio sólido mediante diluciones seriadas .....	22



2.4.	Fenotipificación de poblaciones recombinantes.....	23
2.4.1.	Fenotipificación en medio sólido.....	23
2.4.2.	Fenotipificación en microcultivo.....	24
2.5.	Análisis de ligamiento.....	25
2.5.1.	Obtención de QTLs.....	25
2.5.2.	Determinación de varianzas fenotípicas explicadas.....	25
2.6.	Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas.....	26
2.7.	Análisis estadísticos.....	26
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
3.1.	Selección de fungicidas utilizados.....	27
3.2.	Estandarización de un método cuantitativo para evaluar diferencias fenotípicas.....	30
3.2.1.	Determinación de las condiciones óptimas de microcultivo.....	30
3.2.2.	Desarrollo de un protocolo de tratamiento de datos para obtener parámetros asociados al crecimiento.....	31
3.3.	Evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales.....	35
3.3.1.	Determinación de diferencias de resistencia entre las cepas parentales a los fungicidas seleccionados.....	35
3.3.2.	Las cantidades de DMSO utilizadas no afectan el crecimiento.....	37
3.3.3.	Las concentraciones seleccionadas varían entre experimentos en medio sólido y microcultivo.....	37
3.4.	Fenotipificaciones en medio sólido para poblaciones recombinantes.....	39
3.5.	Fenotipificaciones en microcultivo para poblaciones recombinantes.....	43
3.6.	Análisis de ligamiento de las fenotipificaciones obtenidas en medio sólido para poblaciones recombinantes.....	50
3.7.	Análisis de ligamiento de las fenotipificaciones obtenidas en microcultivo para poblaciones recombinantes.....	55
3.8.	Identificación y validación del gen <i>RIM15</i> como uno de los genes involucrados en la resistencia a maneb y captan.....	62
3.8.1.	Comprobación de la vinculación existente entre el QTL VI.65 con los fenotipos en estudio.....	62
3.8.2.	Identificación de genes candidatos en el QTL VI.65.....	64
3.8.3.	Participación del gen <i>RIM15</i> en la resistencia a maneb y captan.....	69

<b>4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES .....</b>	<b>71</b>
4.1. Estandarización de un método cuantitativo para evaluar diferencias fenotípicas .....	72
4.2. Evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales y poblaciones recombinantes .....	74
4.3. Correlación entre parámetros asociados al crecimiento .....	75
4.4. QTLs obtenidos para la resistencia a fungicidas.....	76
4.5. Diferencias entre resultados obtenidos en medio sólido y microcultivo.....	78
4.6. Mecanismos de acción de fungicidas y genes causales candidatos de la resistencia a ellos .....	79
4.6.1. Tiabendazol.....	79
4.6.2. Maneb .....	80
4.6.3. Captan .....	81
4.7. Identificación de <i>RIM15</i> como un gen involucrado en la resistencia a maneb y captan.....	82
4.8. Proyecciones.....	85
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>87</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Resumen de propiedades de fungicidas.	28
<b>Tabla 2</b>	Resumen los principales resultados obtenidos para la evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales.	38
<b>Tabla 3</b>	<i>p-values</i> obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en medio sólido.	42
<b>Tabla 4</b>	<i>p-values</i> obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en microcultivo para cada fungicida.	48
<b>Tabla 5</b>	<i>p-values</i> obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en microcultivo para cada parámetro.	49
<b>Tabla 6</b>	Resultados obtenidos del análisis de ligamiento para las fenotipificaciones realizadas en medio sólido.	53
<b>Tabla 7</b>	Resultados obtenidos del análisis de ligamiento para las fenotipificaciones realizadas en microcultivo.	59
<b>Tabla 8</b>	Diferencias encontradas entre secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las cepas SA y WE.	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema general de realización de mapeo por ligamiento de QTLs.	7
<b>Figura 2</b>	Esquema general de realización de mapeo por ligamiento de QTLs en <i>S. cerevisiae</i> .	10
<b>Figura 3</b>	Esquema de obtención de parámetros asociados al crecimiento a partir de curvas de crecimiento.	12
<b>Figura 4</b>	Dendograma de aislados de <i>S. cerevisiae</i> en base a SNP.	15
<b>Figura 5</b>	Distribución continua de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> crecidas en presencia de tiabendazol.	18
<b>Figura 6</b>	Fórmulas estructurales de los fungicidas seleccionados.	29
<b>Figura 7</b>	Esquema de obtención de parámetros asociados al crecimiento.	34
<b>Figura 8</b>	Resistencia a fungicidas de cepas parentales.	36
<b>Figura 9</b>	Diferencias de resistencia a fungicidas en poblaciones recombinantes evaluadas en medio sólido.	40
<b>Figura 10</b>	Distribución continua de los segregantes de poblaciones recombinantes en medio sólido.	41
<b>Figura 11</b>	Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WAXNA crecidos en presencia de tiabendazol.	45
<b>Figura 12</b>	Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WExSA crecidos en presencia de maneb.	46
<b>Figura 13</b>	Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WExSA crecidos en presencia de captan.	47
<b>Figura 14</b>	Gráfico de <i>LOD score</i> en función de la posición en el genoma para los análisis de ligamiento de fenotipificaciones en medio sólido.	52

<b>Figura 15</b>	Gráfico de <i>LOD score</i> en función de la posición en el genoma para los controles en medio sólido.	54
<b>Figura 16</b>	Gráfico de <i>LOD score</i> en función de la posición en el genoma para los análisis de ligamiento de fenotipificaciones en microcultivo.	58
<b>Figura 17</b>	Ligamiento y asociación entre los marcadores presentes en el cromosoma VI.	60
<b>Figura 18</b>	Gráfico de <i>LOD score</i> en función de la posición en el genoma para los controles en microcultivo.	61
<b>Figura 19</b>	Vinculación entre el QTL VI.65 y los fenotipos en estudio.	63
<b>Figura 20</b>	Determinación de genes candidatos para el QTL VI.65.	65
<b>Figura 21</b>	Alineamiento de secuencias de <i>RIM15</i> y <i>Rim15p</i> .	68
<b>Figura 22</b>	Resistencia diferencial a maneb y captan entre el híbrido y los recíprocos hemicígotos para el gen <i>RIM15</i> .	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

**DMSO** - Dimetilsulfóxido

**LPI** - Índice logarítmico fenotípico (del inglés *logarithmic phenotypic index*)

**LSC** - Coeficiente logarítmico de cepa (del inglés *logarithmic strain coefficient*)

**NA** - *North American*, linaje puro

**OD** - Densidad óptica (del inglés *optical density*)

**PI** - Índice fenotípico (del inglés *phenotypic index*)

**QTL** - Locus de carácter cuantitativo (del inglés *quantitative trait locus*)

**SA** - *Sake*, linaje puro

**SC** - Coeficiente de cepa (del inglés *strain coefficient*)

**SGRP** - Proyecto de Resequenciación del Genoma de *Saccharomyces* (del inglés *Saccharomyces Genome Resequencing Project*)

**SNP** - Polimorfismo de nucleótido simple (del inglés *single nucleotide polymorphism*)

**WA** - *West African*, linaje puro

**WE** - *Wine/European*, linaje puro

**YNB** – Base nitrogenada de levadura (del inglés *yeast nitrogen base*)

**YPD** – Extracto de levadura-peptona-dextrosa (del inglés *yeast extract-peptone-dextrose*)

## RESUMEN

Gran parte de los rasgos fenotípicos de un individuo están determinados por múltiples regiones del genoma, además de interacciones gen-gen y gen-ambiente, presentando como consecuencia variaciones cuantitativas dentro de una población. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en un modelo de estudio para el mapeo de loci de caracteres cuantitativos (QTLs) y el análisis de la variación natural, al presentar una gran diversidad genética entre los cinco linajes puros descritos hasta la fecha (*Wine/European (WE)*, *West African (WA)*, *Malaysian (MA)*, *Sake (SA)* y *North American (NA)*). Uno de los nichos naturales para esta levadura son los viñedos y el mosto de fermentación, siendo la principal especie responsable de la fermentación alcohólica en la producción de vino. Adicionalmente, esta levadura ha estado expuesta al amplio uso de fungicidas en viñedos, lo cual tendría un impacto sobre la diversidad de levaduras presentes en las uvas. Poco se conoce respecto a las regiones genómicas involucradas en la resistencia a fungicidas, por lo que en el presente trabajo se planteó el objetivo de determinar los genes que podrían estar involucrados en la resistencia a fungicidas en *S. cerevisiae*. Para ello, se seleccionaron tres fungicidas (tiabendazol, maneb y captan) ampliamente utilizados en la industria vitivinícola, y se evaluaron diferencias fenotípicas entre cepas parentales representativas de cuatro de los cinco linajes puros, presentando las cepas NA y WE mayor resistencia a tiabendazol, SA y NA a captan, y SA a maneb. Paralelamente se estandarizó un método cuantitativo de fenotipificación por microcultivo, obteniendo tres parámetros asociados al crecimiento (eficiencia, adaptación y velocidad máxima). Tras ello, se utilizaron dos estrategias distintas de fenotipificación en poblaciones recombinantes, por un lado en medio sólido y por otra parte la de microcultivo previamente

estandarizada. El análisis de dichas fenotipificaciones mostró que existen diferencias significativas de crecimiento entre miembros de estas poblaciones recombinantes (WAXNA para tiabendazol, WExSA para maneb y captan), tanto en medio sólido como en microcultivo, confirmando que la resistencia a fungicidas tiene un carácter poligénico al presentarse distribuciones continuas en ambas condiciones de cultivo. Sumado a esto, se observó que existe una fuerte asociación entre los parámetros de eficiencia y velocidad máxima, pero no con la adaptación, sugiriendo que estos dos parámetros tienen estructuras genéticas subyacentes similares. De los análisis de ligamiento respectivos se identificaron diversos QTLs que subyacen la variación natural de resistencia a fungicidas, encontrándose diferencias entre las estrategias de fenotipificación utilizadas, y destacando el QTL VI.65 como el más importante entre ellos al explicar por sí solo importantes porcentajes de varianza fenotípica tanto en medio sólido como en microcultivo. Finalmente, mediante un análisis de hemicigosidad recíproca se identificó al gen *RIM15* como locus causal de dicho QTL y, por lo tanto, como uno de los genes responsables de la variación natural de resistencia a los fungicidas maneb y captan en *S. cerevisiae*. Estos resultados sugieren a *RIM15* como candidato para selección asistida por marcadores y/o ingeniería metabólica, en particular para la industria vitivinícola.



## ABSTRACT

Many phenotypic traits of an individual are determined by multiple regions of the genome, in addition to gene-gene and gene-environment interactions, and consequently quantitative variations within a population. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has become a model of study for quantitative trait loci (QTL) mapping and analysis of natural variation, presenting a great genetic diversity among the five clean lineages described up to date (Wine/European (WE), West African (WA), Malaysian (MA), Sake (SA) and North American (NA)). Natural niches for this yeast are vineyards and fermentation must, being the main specie responsible for the alcoholic fermentation in wine production. Additionally, *S. cerevisiae* has been long exposed to fungicides in vineyards, which would have an impact on the diversity of yeast present in grapes. Thus far, little is known about the genomic regions involved in fungicide resistance and therefore the aim of this work was to identify genes that may be involved in fungicide resistance in *S. cerevisiae*. For this purpose, three fungicides (thiabendazole, maneb and captan) highly used in the wine industry were selected, and phenotypic differences between parental strains representing four of the five clean linages were evaluate. The NA and WE strains showed higher resistance to thiabendazole, SA and NA to captan, and SA to maneb. In parallel, a quantitative phenotyping method by microculture was standardized, obtaining three parameters associated with growth (efficiency, adaptation and maximum growth speed). Thereafter, two different phenotyping strategies of recombinant populations, one in solid medium and the previously standardized microculture, were used. The phenotyping analysis showed significant differences of growth between members of these recombinant populations (WAXNA for thiabendazole, WEXSA for maneb and captan), in both solid medium and microculture, demonstrating

that fungicide resistance is a polygenic trait, having continuous distributions in both culture conditions. Moreover, we observed that there is a strong association between efficiency and maximum velocity, but not with adaptation, suggesting that these two parameters have similar underlying genetic structures. Various QTLs underlying natural variation of fungicide resistance were identified by linkage analysis, some of which differed between both phenotyping strategies, highlighting QTL VI.65 as the most important among them, as it explains a significant fraction of the phenotypic variance under both culture conditions. Finally, *RIM15* was identified as the causal locus of this QTL by a reciprocal hemizyosity analysis, and thus as one of the genes responsible for the natural variation in resistance to maneb and captan fungicides in *S. cerevisiae*. These results suggest *RIM15* as a candidate for marker-assisted selection and/or metabolic engineering, particularly for the wine industry.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Rasgos complejos en la naturaleza presentan variaciones cuantitativas

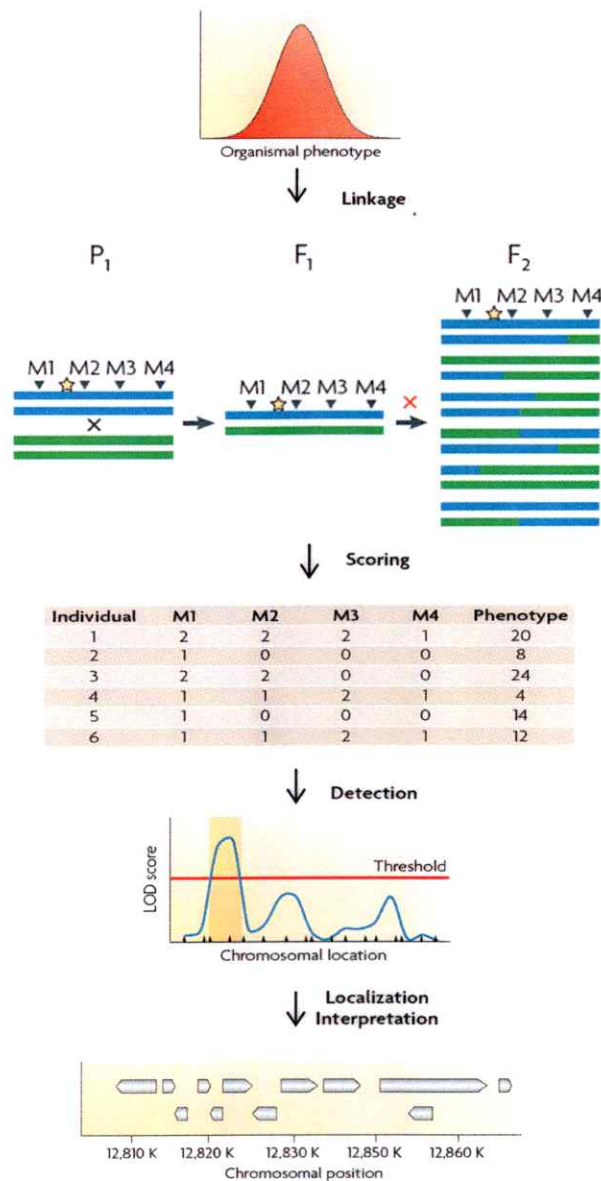
Gran parte de los rasgos fenotípicos de un individuo, incluyendo algunos como susceptibilidad a enfermedades, rasgos de interés industrial y fenotipos extremos, tienen una base genética que no es monogénica, estando determinados por múltiples regiones del genoma (herencia poligénica), además de interacciones gen-gen y gen-ambiente (Mackay y col., 2009). Esto es la causa de que muchos rasgos de interés presenten variaciones cuantitativas y por ende distribuciones continuas dentro de una población (Klug y Cummings, 1999), siendo un desafío de gran importancia para el actual estudio en ciencias biológicas el entender las bases genéticas de dichas variaciones que se dan a nivel fenotípico. La teoría formal de la genética cuantitativa establece procedimientos para la recolección y análisis de datos, proporcionando una guía para el desarrollo de programas de cría selectiva y mejoramiento genético en especies de interés comercial (Gardner y col., 1991).

Actualmente, el objetivo predominante en estudios de genética cuantitativa es la búsqueda de las bases moleculares que subyacen las diferencias fenotípicas observadas (Travisano y Shaw, 2013). En este contexto, cobra particular importancia el estudio de los llamados loci de caracteres cuantitativos (QTLs), los cuales pueden ser definidos como regiones del genoma que contienen uno o más genes que afectan a la variación en un rasgo cuantitativo, y que se identifican por su vinculación con loci marcadores polimórficos (Mackay y col., 2009). Estudios de gran escala para la detección de genes han confirmado ampliamente que diversos factores genéticos contribuyen de forma importante a la variación en la mayoría de los rasgos cuantitativos (Hill 2005, 2010; Rockman 2012).

## 1.2. Mapeo por ligamiento de QTLs

Desde inicios del siglo XX (Sax, 1923), varias estrategias se desarrollaron para estudiar las bases genéticas que subyacen variaciones fenotípicas cuantitativas, destacando en la actualidad los mapeos por ligamiento y por asociación, y el estudio de asociación de genoma completo (*genome-wide association study*) (Mackay y col., 2009). El mapeo por ligamiento permite la identificación de QTLs en levaduras, plantas y otros organismos modelos (Massouras y col., 2012), basándose en la premisa de que los QTLs pueden ser localizados a través de su vinculación genética con loci marcadores visibles en genotipos que puedan ser fácilmente clasificados. Para esto se utilizan marcadores moleculares, siendo los más comunes los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), los indels y los microsatélites. En la figura 1 se muestra la estrategia general utilizada para realizar un mapeo por ligamiento.

La vinculación genética se basa en que los marcadores predictivos se encontrarían ligados a los loci causales del fenotipo, por lo que tienden a segregar juntos. Esta asociación puede verse interrumpida por un evento de recombinación, y la probabilidad de entrecruzamiento aumenta con la distancia física, por lo que se espera que los marcadores más predictivos residan en la proximidad del locus causal (Mackay y col., 2009). Esta vinculación se puede estudiar mediante un *LOD score*, test estadístico desarrollado por Morton (1955) para el análisis de ligamiento en humanos, que corresponde al logaritmo en base 10 de la razón entre la probabilidad de que los loci se encuentren efectivamente ligados y la probabilidad de que el ligamiento observado se deba al azar. Un *LOD score* mayor indica una mayor probabilidad de que el ligamiento observado no se deba al azar y, en general, un *LOD score* mayor a 3,0 se considera evidencia de la existencia de ligamiento (Strachan y Read, 1999).



**Figura 1. Esquema general de realización de mapeo por ligamiento de QTLs.** La generación parental ( $P_1$ ) se compone de dos líneas endogámicas genéticamente divergentes que se cruzan para crear la generación  $F_1$ , mientras que de la cruce de individuos de la generación  $F_1$  se genera la población de mapeo  $F_2$ . M1, M2, M3 y M4 representan marcadores que distinguen a las dos cepas parentales, mientras que la estrella amarilla indica la posición de un locus causal o QTL. La recombinación en la población  $F_2$  crea nuevos haplotipos y puede desacoplar los marcadores del locus causal. Los fenotipos y genotipos (marcadores) se puntúan (0 y 2 indican los genotipos homocigotos alternativos y 1 indica el genotipo heterocigótico en cada marcador bialélico), siendo estos datos evaluados para determinar si hay una diferencia media en los fenotipos del rasgo entre las clases de genotipo marcador; si la hay, el marcador está ligado al QTL. El mapeo por ligamiento generalmente utiliza un mapeo por intervalos para estimar la posición en el mapa y el efecto de cada QTL. El umbral de significancia debe ser ajustado para el número de pruebas independientes realizadas. Los bloques de haplotipos en la población de mapeo pueden ser amplios y, como consecuencia de ello, el locus causal sólo puede ser asignado a una región de gran tamaño, pudiendo identificarse en ella genes relevantes para estudios futuros o candidatos para secuenciación selectiva o perturbación experimental. Modificado de Mackay y col. (2009).

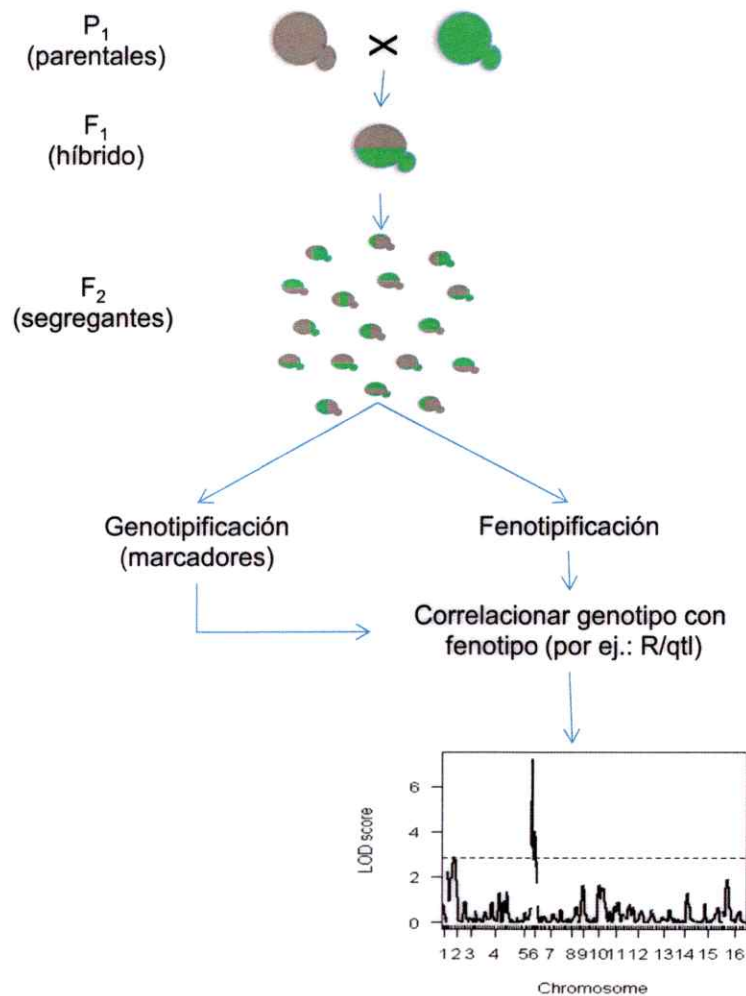
Es importante destacar que la localización de QTLs en pequeñas regiones dentro de los cromosomas requiere que existan marcadores moleculares estrechamente espaciados y, más aún, el tener líneas parentales que difieran entre ellas en los alelos que portan dichos loci (Griffiths y col., 1996). Por otra parte, el análisis de segregantes individuales para realizar la identificación de QTLs ha demostrado ser de mayor utilidad que el análisis de grupos de los mismos (*bulk segregant analysis*), puesto que esta última aproximación presenta factores de confusión como son mutaciones y aneuploidías (Wilkening y col., 2014).

Una herramienta para realizar la correlación entre genotipo y fenotipo, y con ello la detección de QTLs, es la utilización del *software* R, el cual corresponde a un lenguaje y entorno de programación para análisis estadístico y gráfico (R Core Team, 2013). Para este *software* existe un paquete llamado R/qtl, diseñado específicamente para mapear QTLs en cruces experimentales (Broman y col., 2003), el cual fue desarrollado basándose en los métodos estadísticos de mapeo de QTLs descritos en distintos trabajos como, por ejemplo, los de Lander y Botstein (1989), y Churchill y Doerge (1994), y que ha sido utilizado por Cubillos y col. (2011). Además de la identificación de QTLs, el programa R/qtl tiene otras funciones como son generar modelos de interacción entre pares de QTLs y determinar la varianza fenotípica explicada tanto por cada QTL en particular, como por las interacciones entre ellos y por el modelo generado (Broman y Sen, 2009).

### **1.3. Mapeo por ligamiento en *Saccharomyces cerevisiae***

Durante los últimos años la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en un modelo de estudio para el mapeo de QTLs, al ofrecer ventajas únicas para estudios de genómica evolutiva en organismos eucariontes (Dujon, 2010). Esta levadura es de gran importancia tanto por su amplio uso como modelo de estudio en laboratorio como por su utilización industrial y artesanal en la producción de pan y de diversas bebidas alcohólicas (por ejemplo, cerveza y vino). Estudios de QTLs en esta levadura incluyen fenotipos como son los de crecimiento en alta temperatura (Steinmetz y col., 2002), reparación de DNA (Demogines y col., 2008), rasgos enológicos (Salinas y col., 2012) y los de agregación celular no sexual (Li y col., 2013). Además, esta aproximación se utilizó para la identificación de variantes genéticas que subyacen diferencias en el metabolismo central del nitrógeno (Jara y col., 2014) y utilización de fuentes de nitrógeno (Gutierrez y col., 2013), como también en estudios en ambientes ecológicamente relevantes (Cubillos y col., 2011). La estrategia general que se lleva a cabo para realizar este mapeo se esquematiza en la figura 2.

La información aportada por la identificación de QTLs en *S. cerevisiae* también se utiliza con fines biotecnológicos. Por ejemplo, el análisis de capacidad máxima de acumulación de etanol y tolerancia a altos niveles del mismo (Pais y col., 2013) en conjunto con la identificación de alelos múltiples que interactúan confiriendo alto rendimiento de etanol y bajo de glicerol en la fermentación alcohólica (Hubmann y col., 2013b), lo cual tiene importantes proyecciones de aplicación industrial para la producción de bioetanol. Sumado a esto, hay resultados que muestran que el análisis poligénico de la biodiversidad en levaduras puede proporcionar importantes herramientas genéticas para realizar ingeniería metabólica (Hubmann y col., 2013a).

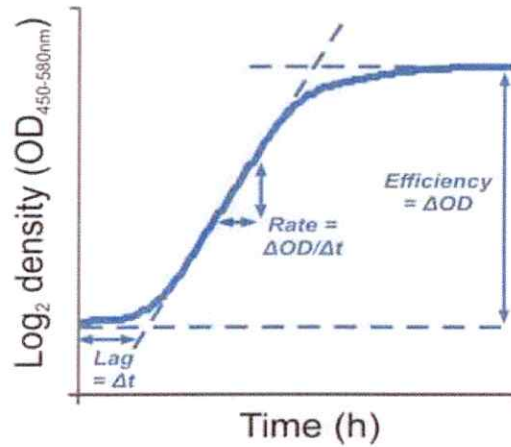


**Figura 2. Esquema general de realización de mapeo por ligamiento de QTLs en *S. cerevisiae*.** El primer requisito es contar con dos cepas parentales haploides (representadas en gris y verde) genéticamente diferentes, que al ser apareadas generan un híbrido diploide, el cual luego de esporular genera una población biparental recombinante compuesta de segregantes (Madigan y col., 2004). Esta población es genotipificada con marcadores moleculares y fenotipificada para el rasgo en estudio, para luego realizar el análisis de ligamiento respectivo. El gráfico mostrado corresponde a un ejemplo real de un análisis de ligamiento realizado en una población biparental recombinante de *S. cerevisiae* utilizando el software R/qtl.



En un mapeo por ligamiento el locus causal sólo puede ser asignado a una región que contiene decenas de genes, pudiendo identificarse dentro de ella posibles genes candidatos (Mackay y col., 2009). Una estrategia experimental llevada a cabo en *S. cerevisiae* para comprobar la participación de un gen candidato es realizar un análisis de hemicigosidad recíproca (Steinmetz y col., 2002), el cual se realiza mediante la comparación de dos cepas híbridas que sólo se diferencian por el alelo presente en un único locus hemicigoto, el cual corresponde al gen de interés (Kim y col., 2012).

Para poder realizar un mapeo de QTLs en *S. cerevisiae* es fundamental disponer de una metodología que permita la fenotipificación con una alta resolución de una gran cantidad de segregantes en una población. En este sentido, un importante avance fue el descrito por Warringer y Blomberg (2003) el cual consistió en el desarrollo de una metodología automatizada para el estudio de perfiles fenotípicos a gran escala utilizando cambios cuantitativos en el crecimiento de levaduras. Esta metodología se aplica con éxito para estudiar características fisiológicas en respuesta a sales en *S. cerevisiae* (Warringer y col., 2003), la variación natural de fenotipos relacionados con utilización de carbono, resistencia a toxinas, medio ambiente y metabolismo, utilización de nitrógeno y requerimientos nutricionales en cepas de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. arboricolus*, *S. kudriavzevii*, *S. bayanus*, *S. mikatae* y *S. castellii* (Warringer y col., 2011), y la genómica de poblaciones de levaduras domesticadas y salvajes (Liti y col. 2009a). También es clave en la identificación de QTLs en fenotipos de importancia enológica (Salinas y col., 2012) y en ambientes ecológicamente relevantes (Cubillos y col., 2011). Como se esquematiza en la figura 3, la fenotipificación se basa en la posibilidad de obtención de tres parámetros asociados al crecimiento a partir de curvas de crecimiento de *S. cerevisiae*.



**Figura 3. Esquema de obtención de parámetros asociados al crecimiento a partir de curvas de crecimiento.** A partir de curvas de crecimiento de alta densidad ( $n = 2$ ) de 86 aislados de *Saccharomyces sensu stricto* en más de 200 ambientes diferentes se extrajeron tres parámetros asociados al crecimiento nombrados como lag (retraso proliferativo; tiempo para iniciar la proliferación), rate (tasa proliferativa; tiempo de duplicación de la población) y efficiency (eficiencia proliferativa; cambio en la densidad de la población). Modificado de Warringer y col. (2011).

#### 1.4. Diversidad genética y variación natural en *S. cerevisiae*

Distintas cepas de *S. cerevisiae* presentan una gran diversidad genética, la cual no necesariamente se correlaciona con sus diferentes orígenes geográficos (Liti y col., 2006), remarcando la importancia que ha tenido su larga asociación con la actividad humana y los eventos de domesticación que han ocurrido en procesos productivos como, por ejemplo, la producción de vino y de sake (Pretorius, 2000; Fay y Benavides, 2005). En este sentido, un importante avance en el estudio a nivel genómico de esta levadura es el Proyecto de Resecuenciación del Genoma de *Saccharomyces* (SGRP), en el cual se res secuenciaron 36 cepas de diferentes orígenes geográficos seleccionadas en base a variedad de fuentes y lugares de aislamiento (Liti y col., 2009a). Del análisis genómico realizado (figura 4) se describieron cinco linajes puros cuyos nombres en inglés son: *Wine/European* (WE), *West African* (WA), *Malaysian* (MA), *Sake* (SA) y *North American* (NA). Estos linajes fueron definidos en función de que presentan polimorfismos únicos no compartidos entre linajes (SNPs privados).

La identificación de estos linajes y la posibilidad de utilizar cepas representativas de los mismos como cepas parentales en estudios genómicos y de mapeo de QTLs son de gran utilidad para trabajos cuyo objetivo es determinar las bases de la variación natural en poblaciones recombinantes derivadas de aislados naturales de *S. cerevisiae* (Liti y col., 2009a; Cubillos y col., 2011). Los experimentos de cruce simple utilizando cepas de laboratorio son exitosos en el mapeo de loci causantes de algunas características, pero proporcionan una pobre comprensión de la relación entre el fondo genético y los QTLs, subestimando la compleja arquitectura genética de los rasgos poligénicos en levaduras. Además, las cepas de laboratorio sólo capturan una pequeña fracción de la variación fenotípica presente en poblaciones naturales (Cubillos y col.,



2011). Cepas representativas de linajes puros se utilizan como cepas parentales en estudios de QTLs en el cual mediciones cuantitativas de crecimiento en 23 ambientes ecológicamente relevantes permitieron estimar, mediante análisis de ligamiento, un promedio de 6,3 QTLs distintos en cada uno de ellos (Cubillos y col., 2011). De forma similar, Salinas y col. (2012) utilizando los mismos cruces determinaron QTLs para rasgos de importancia enológica.

Otro importante avance reciente para realizar estudios genómicos en *S. cerevisiae* es la producción y caracterización genética de una población recombinante tetraparental llamada SGRP-4X (Cubillos y col., 2013). Esta población fue generada a partir de 11 rondas de cruces al azar entre cepas representativas de 4 de los 5 linajes puros identificados en el SGRP, de la cual 192 segregantes fueron secuenciados para obtener un mapa genético preciso. Los recombinantes que resultan contienen bloques de ligamiento menores a aquellos observados en poblaciones biparentales, mejorando la resolución en la identificación de QTLs. Estudios iniciales mediante mapas de ligamiento han indicado que varios de los QTLs previamente identificados en poblaciones biparentales pueden ser nuevamente identificados en la SGRP-4X, y que QTLs no observados previamente pueden ser adicionalmente obtenidos en pequeños intervalos de confianza. La SGRP-4X es un recurso profundamente caracterizado que proporciona un marco para un análisis genético potente y de alta resolución de fenotipos de levadura (Cubillos y col., 2013).



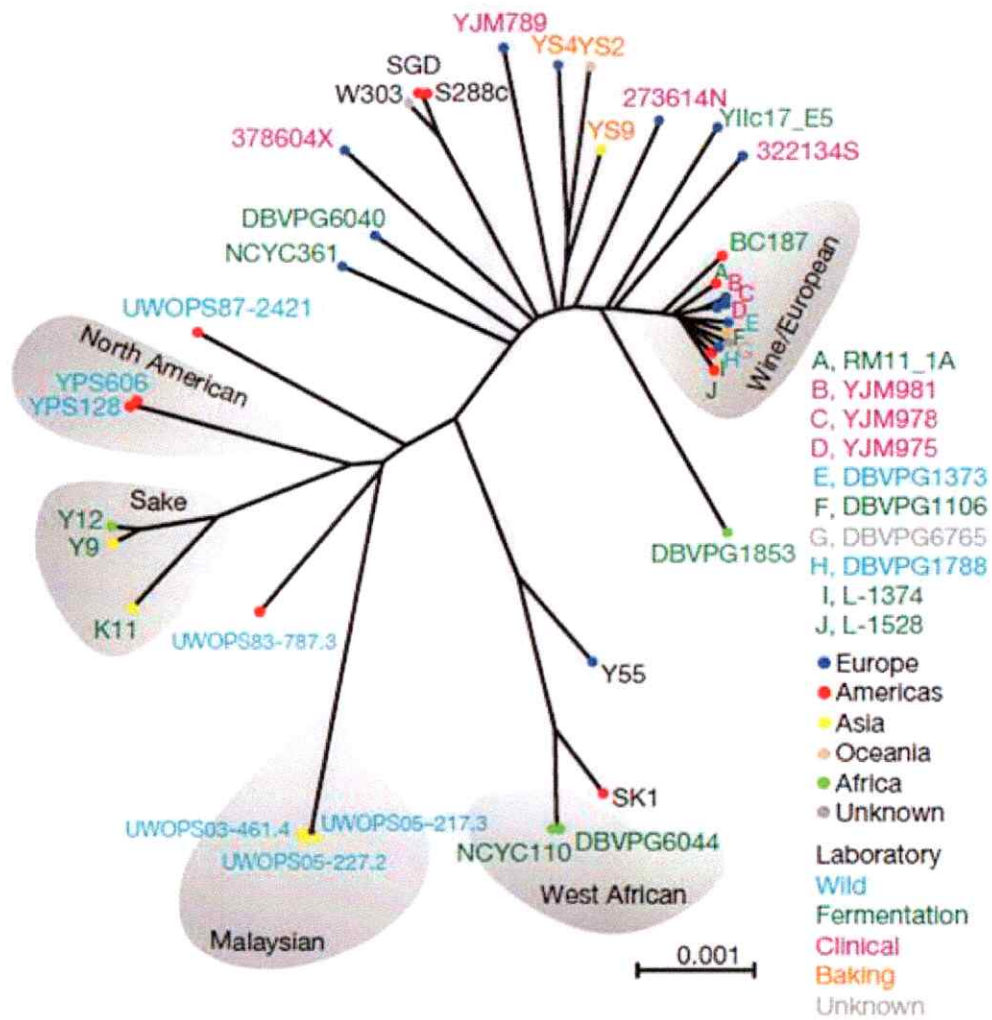


Figura 4. Dendrograma de aislados de *S. cerevisiae* en base a SNPs. Los linajes puros se encuentran resaltados en color gris, mientras que en colores se indican la fuente (nombre) y el origen geográfico (puntos) de cada una de las cepas secuenciadas. La barra de escala indica la frecuencia de diferencias de pares de bases. Modificado de Liti y col. (2009a).

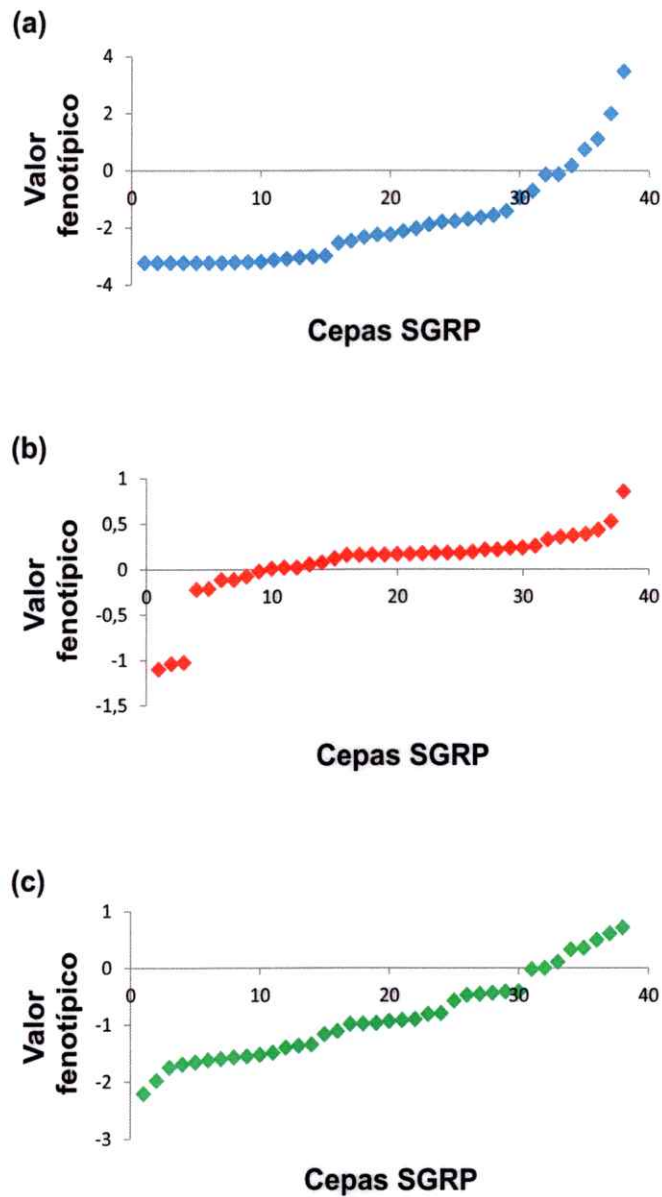
### **1.5. Variación natural de la resistencia a fungicidas en *S. cerevisiae***

Gran parte de la variación natural se funda en la interacción entre las variantes alélicas y el ambiente (Nordborg y Weigel, 2008), por lo que el estudio de los efectos de los polimorfismos en regiones regulatorias y codificantes debe realizarse en el contexto de diversos ambientes (Flint y Mackay, 2009). *S. cerevisiae* es capaz de habitar en variados nichos como son viñedos, bosques y zonas de elevadas temperaturas (Cubillos y col., 2009b), convirtiéndola en un organismo ideal para el estudio de la adaptación al ambiente. Es además la principal especie responsable de la fermentación alcohólica en el complejo proceso microbiológico que implica la transformación del mosto de uva en vino (Bisson, 1994; Pretorius, 2000). En el contexto del estudio de cepas vínicas de esta levadura, el análisis de DNA mitocondrial muestra que poblaciones procedentes de zonas no industriales tienen 40% más diversidad genética que las poblaciones aisladas desde zonas industriales, dando cuenta de que las prácticas enológicas industriales pueden afectar negativamente a las poblaciones de levaduras nativas al reducir su biodiversidad (Cubillos y col., 2009a).

Un ejemplo de una práctica industrial enológica habitual es el amplio uso de fungicidas en los viñedos, siendo éstos ambientes un nicho natural para *S. cerevisiae* (Milanović y col., 2013). El uso de fungicidas responde a la necesidad de eliminar hongos dañinos para las plantas, y tiene sus inicios en el siglo XVII con la utilización de éstos en semillas de cereales. En el siglo XIX comienza la utilización de fungicidas en viñedos, primero para tratar el oídio, y luego con la utilización de fungicidas de amplio espectro en las hojas de las vides. A mediados del siglo XX, especialmente entre los años 1940-1970, se introducen las clases químicas de fungicidas utilizadas en la actualidad (como benzimidazol, ditiocarbamato y ftalimida, entre otras) (Russell, 2005).

Los fungicidas no sólo tienen efecto sobre los hongos, sino que también sobre las poblaciones de levaduras que habitan los mismos nichos. Los estudios sobre los efectos de los fungicidas sobre hongos y levaduras se remontan también a mediados del siglo XX (Horsfall, 1975) y perduran hasta hoy, habiéndose realizado en las últimas décadas variados estudios en *S. cerevisiae* entre los cuales se incluyen la evaluación de efectos de fungicidas sobre el crecimiento (Vadkertiová y Sláviková, 2011) y diversidad (Milanović y col., 2013), caracterización de mutantes sensibles y/o resistentes (Casalone y col., 2010), búsqueda y caracterización de genes involucrados en la resistencia a fungicidas (Teixeira y col., 2007; Monteiro y col., 2011), identificación de mecanismos de acción de fungicidas (Li y col., 1996; Shohat-Tal y Eshel, 2011), y generación de bioensayos para evaluar la toxicidad de fungicidas (Fai y Grant, 2009). La mayoría de estos estudios han utilizado cepas de laboratorio (Li y col., 1996; Teixeira y col., 2007; Fai y Grant, 2009; Shohat-Tal y Eshel, 2011), aunque hay otros que han utilizado cepas vínicas (Casalone y col., 2010) o aislados naturales (Vadkertiová y Sláviková, 2011; Milanović y col., 2013).

Un estudio de gran importancia fue el llevado a cabo por Warringer y col. (2011), en el cual se mostró la existencia de variación natural para un fungicida en particular, llamado tiabendazol. Este rasgo de resistencia a tiabendazol resultó ser del tipo cuantitativo, tal como se desprende de la evaluación de distintas cepas de *S. cerevisiae*, puesto que como se observa en la figura 5 se tiene una distribución continua de las cepas al ordenarlas de menor a mayor valor fenotípico obtenido. Las cepas de levadura presentan variados niveles de resistencia a fungicidas, posiblemente debido a una selección de haplotipos causada por el uso de los mismos, convirtiéndola en un modelo ideal para el estudio en respuesta a estímulos externos.



**Figura 5. Distribución continua de las cepas de *S. cerevisiae* crecidas en presencia de tiabendazol.** Los gráficos se confeccionaron con los datos obtenidos en el trabajo de Warringer y col. (2011), en el cual se evaluaron las mismas cepas utilizadas en el SGRP (Liti y col., 2009a). En dicho trabajo se determinó para cada cepa un valor fenotípico utilizando la estrategia de fenotipificación en microcultivo, esto para cada uno de los parámetros en estudio: (a) *efficiency* (eficiencia proliferativa), (b) *lag* (retraso proliferativo) y (c) *rate* (tasa proliferativa). Los gráficos muestran las cepas ordenadas de menor a mayor valor fenotípico obtenido, lo cual deja en evidencia la distribución continua existente para los tres parámetros.



El análisis de la variación natural de la resistencia a fungicidas en *S. cerevisiae* representa un interesante modelo de estudio tanto en el ámbito evolutivo-ecológico como económico-productivo, por el impacto que puede llegar a tener la utilización de fungicidas sobre las poblaciones naturales de levadura y la producción de vinos, respectivamente. Esto es de particular importancia en un país como Chile, el cual es uno de los mayores productores y exportadores de vino a nivel mundial, y para el cual el vino representa una de sus mayores exportaciones, lo cual recalca la importancia de la investigación en vitivinicultura en nuestro país, y con ella el desarrollo de líneas de investigación relacionadas con fisiología vegetal, microbiología y biotecnología, entre otras (CONICYT, 2007).

En particular respecto a los fungicidas, estudios previos muestran que su uso tiene impacto sobre la diversidad de levaduras presentes en las uvas (Milanović y col., 2013), y si bien se puede desprender que la exposición de poblaciones de levaduras a distintos fungicidas ha causado variación natural a nivel fenotípico (mayor resistencia o sensibilidad), actualmente poco se conoce respecto a las regiones genómicas involucradas en dicha variación. El mapeo por ligamiento de QTLs aparece entonces como una buena aproximación, dado su éxito en encontrar genes que subyacen la variación natural a varios fenotipos tanto en *S. cerevisiae* (Cubillos y col., 2011; Salinas y col., 2012; Jara y col., 2014) como en otras especies del género *Sacharomyces sensu stricto* como lo es *S. paradoxus* (Liti y col., 2009b). Los antecedentes enfatizan la necesidad de utilizar un sistema eficiente para la identificación de regiones del genoma que subyacen la variación natural de resistencia o sensibilidad a fungicidas en *S. cerevisiae* como lo es la fenotipificación utilizando microcultivos y el posterior mapeo por ligamiento de QTLs.

## **HIPÓTESIS**

La variación natural de resistencia a fungicidas en poblaciones silvestres de *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a un rasgo poligénico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar genes que expliquen la diferencia en resistencia a fungicidas en poblaciones silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar concentraciones que permitan observar diferencias fenotípicas entre cepas silvestres de *S. cerevisiae* para fungicidas utilizados intensivamente en la industria vitivinícola.
- Realizar la fenotipificación tanto de cepas parentales como de poblaciones biparentales derivadas de ellas.
- Identificar QTLs utilizando marcadores moleculares de tipo SNP.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas

#### 2.1.1. Cepas parentales

Las cepas parentales utilizadas corresponden a versiones haploides estables (*Mat a*, *ho::HygMX*, *ura3::KanMX*) de cepas representativas de cuatro de los cinco linajes puros descritos para *S. cerevisiae* (Litti y col., 2009) generadas en el trabajo de Cubillos y col. (2009b). Estas cepas son: *North American* (NA): YPS128; *Sake* (SA): Y12; *West African* (WA): DBVPG6044; y *Wine/European* (WE): DBVPG6765. Además se utilizó la cepa de laboratorio S288c como control.

#### 2.1.2. Poblaciones recombinantes

Se utilizaron dos poblaciones recombinantes biparentales previamente descritas y genotipificadas (Cubillos y col., 2011) provenientes de los cruces WExSA (96 segregantes) y WAXNA (83 segregantes). Los segregantes que componen ambas poblaciones son haploides estables (*ho::HygMX*, *ura3::KanMX*).

#### 2.1.3. Híbrido y recíprocos hemicigotos

Para realizar la validación del gen *RIM15* (YFL033C) se utilizó el híbrido entre las cepas WE y SA, llamado CC28F, como también los recíprocos hemicigotos para este gen *RIM15* llamados YJM7 (CC28-*rim15*(WE) / *rim15*(SA)::*ura3*) e YJM8 (CC28-*rim15*(SA) / *rim15*(WE)::*ura3*), generados previamente en el trabajo de Jara y col. (2014). Brevemente, el gen fue deletado en las versiones haploides de las cepas parentales (ya sea *Mat a*, *ho::HygMX*, *ura3::KanMX* o *Mat a*, *ho::HygMX*, *ura3::KanMX*) realizando PCR de un paso y utilizando *URA3* como marcador de selección, siendo

confirmadas las deleciones también por PCR. Posteriormente se cruzaron cepas con tipo de apareamiento opuesto para generar las cepas híbridas hemicigotas diploides.

## **2.2. Medios de cultivo y fungicidas utilizados**

### **2.2.1. Medios de cultivo**

En los cultivos en medio sólido se utilizó medio completo YPD (0,5% extracto de levadura, 0,5% peptona, 2% glucosa, 2% agar), mientras que en los cultivos en microcultivo se utilizó medio mínimo YNB suplementado con uracilo (0,67% YNB, 2% glucosa, 0,2% uracilo).

### **2.2.2. Fungicidas**

Los fungicidas utilizados fueron tiabendazol, maneb y captan, preparándose para cada experimento solución fresca de fungicida en DMSO. Dado que la selección de los mismos es parte de los objetivos del presente trabajo, los detalles respecto a este procedimiento se encuentran en la sección de Resultados (véase sub-sección *6.1 Selección de fungicidas utilizados*).

## **2.3. Evaluación de resistencia a fungicidas en medio sólido mediante diluciones seriadas**

La evaluación de resistencia a fungicidas se realizó mediante un ensayo en medio YPD con diluciones seriadas, en el cual para cada cepa se diluyeron células provenientes de cultivos sólidos previamente realizados también en medio YPD. Para cada cepa se tomó con una punta estéril de micropipeta un volumen equivalente (una esfera de aproximadamente 1 mm de diámetro) el cual se diluyó en 50 µl de agua estéril utilizando una placa de microcultivo, para luego realizar 6 diluciones seriadas de 10 en 10 (esto tomando 5 µl de la dilución anterior y agregándolos a 45 µl de agua

estéril). Todas las diluciones fueron incubadas a 28 °C por 48 h. Cada experimento se realizó con un control YPD y otro control YPD+DMSO (añadido en la misma cantidad que la placa que tuviera mayor cantidad de DMSO de las con tratamiento). Las placas fueron digitalizadas directamente para obtener las imágenes respectivas.

## **2.4. Fenotipificación de poblaciones recombinantes**

### **2.4.1. Fenotipificación en medio sólido**

Para evaluar diferencias de resistencia a cada fungicida en las poblaciones recombinantes, se utilizó inicialmente una metodología de fenotipificación en medio sólido. Los segregantes fueron incubados en placas Petri con medio YPD a 28 °C por 96 h, para las condiciones tratamiento (con fungicida) y control (sólo YPD). Para cada experimento el fungicida fue agregado al medio ya esterilizado antes de solidificarlo en la placa Petri. Cada experimento se realizó por triplicado, y además en cada placa se agregó la cepa parental SA para normalizar entre placas.

La obtención de valores fenotípicos se realizó siguiendo un tratamiento de datos modificado del trabajo de Warringer y col. (2003), adaptado desde el trabajo en microcultivo al trabajo en medio sólido. Las placas fueron digitalizadas directamente para obtener imágenes de ellas, y la fenotipificación se realizó obteniendo los pixeles de cada cepa utilizando el *software* ImageJ. El posterior tratamiento de datos realizado sobre estos valores se muestra en las ecuaciones (1) y (2). Cada valor  $x_{ijk}$  obtenido para la cepa  $i$ , placa  $j$ , condición  $k$  (tratamiento o control) fue normalizado al calcular el cociente entre  $x_{ijk}$  y su respectivo normalizador  $y_{jk}$ , obteniéndose así los valores de  $SC_{jk}$  (coeficientes de cepa). Tras ello, se calculó el cociente entre los valores normalizados de la condición con tratamiento y la condición control para cada cepa  $i$ , obteniéndose

así los valores de  $PI_i$  (índices fenotípicos). Finalmente se obtuvo el promedio entre las tres réplicas  $r$  realizadas.

$$SC_{ik} = \frac{x_{ijk}}{y_{jk}} \quad (1)$$

$$PI_i = \frac{\sum_{r=1}^3 \left( \frac{SC_{i(tratamiento)}}{SC_{i(control)}} \right)_r}{3} \quad (2)$$

#### 2.4.2. Fenotipificación en microcultivo

Para evaluar diferencias de resistencia a cada fungicida en las poblaciones recombinantes, se utilizó una técnica de microcultivo modificada del trabajo de Warringer y Blomberg (2001). Se obtuvieron curvas de crecimiento realizando mediciones de densidad óptica (OD) a 630 nm mediante el *software* Gene5™ junto con un lector de placas de microcultivo BioTek® EL808™. Para ello, los segregantes fueron inoculados en 200 µl de medio mínimo YNB utilizando una placa de microcultivo de 96 pocillos e incubados a 28 °C, para las condiciones tratamiento (con fungicida) y control (sólo YNB), por el tiempo requerido según cada condición. Para cada experimento el fungicida fue agregado al medio ya esterilizado antes de distribuirlo en los pocillos de la placa. Cada experimento se realizó por duplicado, y se agregó en cada placa la cepa S288c por triplicado para normalizar entre placas. De las curvas generadas para cada segregante se obtuvieron los valores fenotípicos de tres parámetros asociados al crecimiento llamados eficiencia, adaptación y velocidad máxima. Los coeficientes de correlación de Pearson se utilizaron para el análisis de correlación entre parámetros. Dado que la estandarización de esta técnica de fenotipificación es parte de los objetivos del presente trabajo, los detalles respecto a su desarrollo se encuentran en la

sección de Resultados (véase sub-sección 6.2 *Estandarización de un método cuantitativo para evaluar diferencias fenotípicas*).

## **2.5. Análisis de ligamiento**

### **2.5.1. Obtención de QTLs**

El análisis de ligamiento se realizó utilizando el *software* R (R Core Team, 2013) y el paquete llamado R/qtl (Broman y col., 2003), siguiendo el protocolo de Cubillos y col. (2011). Los QTLs fueron obtenidos utilizando un modelo no paramétrico a través de un test de 1000 permutaciones. Se consideraron como QTLs significativos aquellos con un *p-value* < 0,050 y como QTLs marginalmente significativos aquellos con un *p-value* < 0,150. El programa entrega además los *LOD scores* de corte para *p-values* seleccionados en cada caso. La nomenclatura de los QTLs consiste en números romanos para los cromosoma y números arábigos para la coordenada cromosómica (por ejemplo, el QTL VI.65 se encuentra en el cromosoma VI en la posición 65 kb, basado en el genoma de referencia de la cepa S288c).

### **2.5.2. Determinación de varianzas fenotípicas explicadas**

Para determinar las varianzas fenotípicas explicadas por cada QTL se utilizaron funciones específicas del paquete R/qtl (Broman y Sen, 2009) diseñadas para ello. En primera instancia se estimó una mejor posición para cada uno de los QTLs identificados para cada fenotipo (utilizando la función 'refineqtl'), y luego con estas estimaciones se generó un modelo con el tipo de interacción que existe entre pares de QTLs a la vez (utilizando la función 'addint'), determinando si sus efectos eran meramente aditivos o si existía interacción entre ellos. Con dicho modelo se determinó finalmente la varianza fenotípica explicada (utilizando también la función 'addint') tanto

por cada QTL en particular como por cada interacción, y también por el modelo generado.

## **2.6. Alineamiento de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas**

Las secuencias nucleotídicas de los loci en estudio para cada cepa fueron obtenidas del trabajo de Bergström y col. (2014), parte del Proyecto de Resecuenciación del Genoma de *Saccharomyces* (SGRP), y desde ellas se obtuvo las secuencias aminoacídicas correspondientes utilizando la herramienta bioinformática online ExPASy (<http://web.expasy.org/translate/>) perteneciente al Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). Los alineamientos fueron realizados utilizando la herramienta bioinformática online ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) perteneciente a The European Bioinformatics Institute (EBI).

## **2.7. Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se hicieron utilizando el *software* R (R Core Team, 2013). La elección de las pruebas utilizadas se realizó tomando en cuenta la literatura pertinente al respecto (Spiegel y Stephens, 2002; Canals, 2010). Las comparaciones entre varianzas se realizaron mediante una prueba F (*F-test*, utilizando la función 'var.test'). Las correlaciones se realizaron mediante una correlación lineal de Pearson (utilizando la función 'cor.test'). Las comparaciones entre promedios se realizaron mediante una prueba t de Student no pareada (*t-test*, utilizando la función 't.test'). La significancia se evaluó en todos los casos considerando un intervalo de confianza del 95% ( $p\text{-value} < 0,050$ ).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Selección de fungicidas utilizados

Con el objetivo de estudiar la variación natural de la resistencia a fungicidas en aislados silvestres de *S. cerevisiae*, fue necesario en primera instancia seleccionar los fungicidas con los cuales se evaluarían diferencias fenotípicas entre cepas y poblaciones recombinantes de dicha levadura. El primer criterio de selección fue encontrar fungicidas utilizados en la industria vitivinícola y que además tuvieran distintos modos y blancos de acción. Para esto, se realizó una búsqueda bibliográfica de la cual se escogió, con datos obtenidos del Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) (Brent y Hollomon, 2007; Fishel y Dewdney, 2012), tres de las clases de fungicidas más utilizadas en el mercado de cultivo de vegetales como son benzimidazol, ditiocarbamato y ftalimida (tabla 1a) (Morton y Staub, 2008). Mientras que los fungicidas de la clase benzimidazol tienen un modo de acción específico alterando la mitosis y división celular (a través de la inhibición del ensamblaje de  $\beta$ -tubulina), los de la clase ditiocarbamato y ftalimida se considera que tienen actividad de contacto multisitio (Fishel y Dewdney, 2012).

Para determinar fungicidas representativos de cada clase se realizó una búsqueda bibliográfica basándose en estudios en donde anteriormente se hayan utilizado cepas de *S. cerevisiae* (tabla 1b). En base a este análisis, se seleccionaron los fungicidas tiabendazol, maneb y captan, representativos de las clases benzimidazol, ditiocarbamato y ftalimida, respectivamente, cuyas características químicas se detallan en la tabla 1c y la figura 6. Diferentes concentraciones de estos tres fungicidas se utilizaron con posterioridad como tratamientos para llevar a cabo las fenotipificaciones necesarias para realizar los subsecuentes análisis de ligamiento.

**Tabla 1. Resumen de propiedades de fungicidas.** (a) Características de las tres clases de fungicidas seleccionadas según el Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC), la American Phytopathological Society (APS) y la Pesticide Properties DataBase (PPDB). (b) Características observadas en estudios previos para los fungicidas seleccionados. (c) Fórmula empírica y nombres de los fungicidas seleccionados.

(a)

Clase de fungicida	Compuestos activos	Riesgo de resistencia	Porcentaje del mercado (%)	Modo de acción
Benzimidazol	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Benomilo</li> <li>• Carbendazim</li> <li>• Metil tiofanato</li> <li>• Tiabendazol</li> </ul>	Alto	3,8	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Afecta la biosíntesis de <math>\beta</math>-tubulina mediante la inhibición de sitio único de ensamblaje de microtúbulos durante la mitosis</li> </ul>
Ditiocarbamato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mancozeb</li> <li>• Maneb</li> <li>• Nabam</li> <li>• Tiram</li> <li>• Zineb</li> </ul>	Bajo	6,5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contacto multisitio</li> <li>• Amplio espectro, no sistémico, contacto con acción protectora, actúa interrumpiendo el metabolismo lipídico y la respiración</li> </ul>
Ftalimida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captafol</li> <li>• Captan</li> <li>• Folpet</li> </ul>	Bajo	4,2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contacto multisitio</li> <li>• Reactivo tiol no específico con acción protectora y curativa que funciona inhibiendo la respiración</li> </ul>

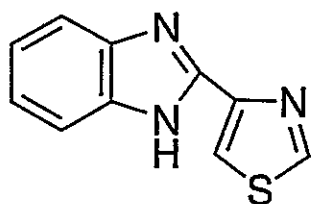
(b)

Fungicida	Utilizado por	Concentración [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Tiabendazol	Warringer y col., 2011	25 / 50	-
	Fai y Grant, 2009	3-200	134,9
Maneb	Fai y Grant, 2009	0,2-100	1,8
Captan	Fai y Grant, 2009	0,01-100	5,8

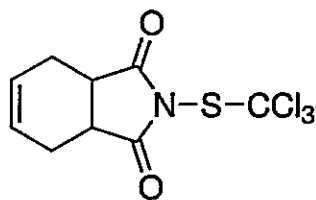
$\text{IC}_{50}$  = Concentración a la que ocurre un 50% de inhibición del crecimiento

(c)

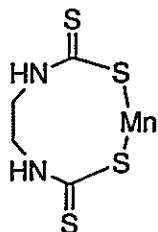
Nombre comercial	Nombre IUPAC	Nombre químico alternativo	Fórmula empírica
Tiabendazol	4-(1H-1,3-benzodiazol-2-yl)-1,3-tiazol	2-(4-Tiazolil)benzimidazol	$\text{C}_{10}\text{H}_7\text{N}_3\text{S}$
Maneb	[[2-[[ditiocarboxi]amino]etil]carbamo]ditiocarbato]](2-)-kS,kS]manganeso	Manganeso etilenebis(ditiocarbamato)	$[\text{C}_4\text{H}_6\text{MnN}_2\text{S}_4]_n$
Captan	(3aR,7aS)-2-[[triclorometil]sulfanil]-3a,4,7,7a-tetrahidro-1H-isóindol-1,3(2H)-diona	N-(triclorometil) ciclohex-4-ene-1,2-dicarboximida	$\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_3\text{NO}_2\text{S}$



**Tiabendazol**



**Captan**



**Maneb**

**Figura 6. Fórmulas estructurales de los fungicidas seleccionados.** Los tres fungicidas utilizados presentan estructuras químicas diferentes entre sí. Para el caso del maneb se muestra el monómero, dado que químicamente corresponde a un complejo polimérico de manganeso con el ligando aniónico etilenbis(ditiocarbamato). Las imágenes corresponden a las que se encuentran a disposición en la página web de Sigma-Aldrich ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com)), empresa donde los fungicidas fueron adquiridos.

### **3.2. Estandarización de un método cuantitativo para evaluar diferencias fenotípicas**

#### **3.2.1. Determinación de las condiciones óptimas de microcultivo**

La fenotipificación corresponde a un proceso fundamental para realizar un mapeo por ligamiento de QTLs (regiones del genoma que contienen uno o más genes que afectan a la variación en un rasgo cuantitativo) en *S. cerevisiae*, dada la necesidad de contar con valores fenotípicos para cada segregante de la población en estudio. Una vez determinados los fungicidas a ser utilizados, se abordó la necesidad de disponer de una metodología que permita realizar dicho procedimiento en una gran cantidad de segregantes. Para ello, se estandarizó una técnica de fenotipificación mediante un método de microcultivo (modificado de Warringer y Blomberg, 2003) en placas de 96 pocillos, en que en cada pocillo se crece un individuo en 200 µl de medio. El primer paso fue determinar condiciones óptimas para realizar el microcultivo; a continuación se detalla, para cada parámetro ajustado, los resultados obtenidos:

- Tiempo e intervalo de medición: Se determinó como tiempo máximo de incubación 72 h dado que para este tiempo todas las cepas, independiente del medio, ya han llegado a fase estacionaria. Aquellas cepas que para este tiempo aún se mantenían en fase lag se les consideró sin crecimiento. Se decidió además realizar mediciones cada 20 min para obtener curvas de alta resolución con una mayor densidad de datos que asegurara tener una regresión de datos confiable en el posterior tratamiento de datos (Warringer y Blomberg, 2003).
- Agitación: El poder incluir agitación en el microcultivo es importante para poder proveer una dispersión homogénea de las células (Warringer y

Blomberg, 2003). El *software* permite tener agitación constante (durante el tiempo de incubación) o variable (sólo antes de las mediciones y por un tiempo determinado), y tres niveles de intensidad para la agitación (lenta, meda y rápida). El modo de agitación es importante debido a que, de no encontrarse una combinación adecuada, pueden obtenerse curvas de crecimiento atípicas y no reproducibles. Para determinar la agitación con la que se obtuvieran mejores resultados se ensayó una serie de combinaciones: sin agitación, lenta constante, media por 10 s, media por 30 s, media por 45 s, rápida por 1 min y rápida por 2 min (los procedimientos de agitación indicados se aplicaron justo antes de la medición). A partir de estos ensayos, se observó que cualquiera fuera la combinación realizada la agitación causaba un agrupamiento disparejo de las células, las cuales se acumulaban hacia la periferia de los pocillos, no pudiendo obtenerse curvas consistentes con el crecimiento obtenido (resultados no mostrados). En base a estos resultados se decidió trabajar sin agitación, con lo cual las células decantan agrupándose de forma pareja en el fondo de los pocillos, obteniéndose de esta forma curvas de crecimiento sobre las cuales trabajar.

### **3.2.2. Desarrollo de un protocolo de tratamiento de datos para obtener parámetros asociados al crecimiento**

Tras la obtención de curvas de crecimiento fue necesario disponer de un protocolo de tratamiento de datos que permitiera obtener valores fenotípicos de forma rápida y eficiente. Para ello se realizó un análisis de datos utilizando el *software* Gene5™. Los datos obtenidos fueron importados a Microsoft Excel para poder

posteriormente utilizarlos en GraphPad Prism (*software* comercial científico diseñado para realizar estadística y gráficos en 2D), en donde se les aplicó una regresión sigmoidea (*Sigmoideal dose-response(variable slope)*) con interpolación de datos (Motulsky, 2007), a partir de la cual se obtienen tanto los valores máximo y mínimo de la curva como también los valores de primeras y segundas derivadas en cada punto. De dicha regresión se determinó para cada cepa en estudio tres parámetros asociados al crecimiento, llamados eficiencia, adaptación y velocidad máxima, de la manera (modificada de Warringer y col. (2011)) que se esquematiza en la figura 7. La eficiencia corresponde a la diferencia entre la OD máxima y la OD mínima, la adaptación al inverso del tiempo en que la segunda derivada es máxima, y la velocidad máxima a la máxima primera derivada; la adaptación se define como el inverso del tiempo para que mantenga la misma direccionalidad de los otros parámetros.

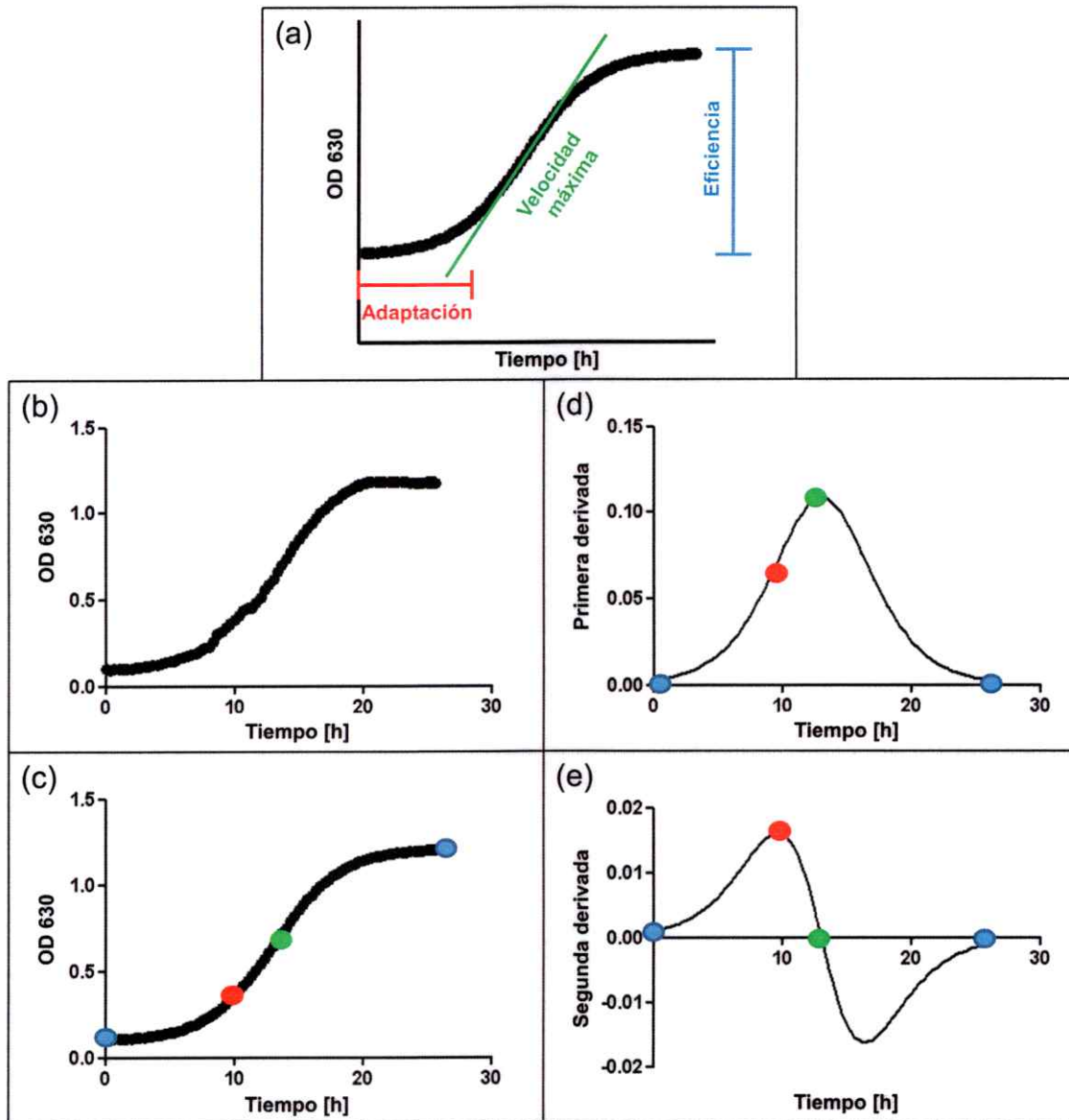
Una vez obtenidos los valores para los tres parámetros asociados al crecimiento para cada cepa, tanto en condición con tratamiento como control, se siguió un tratamiento de datos modificado del trabajo de Warringer y col. (2003), el cual se muestra en las ecuaciones (3) y (4). Cada valor  $x_{ijk}$  obtenido para la cepa  $i$ , parámetro  $j$ , condición  $k$  (tratamiento o control) fue normalizado al calcular su cociente con el valor  $y_{jk}$  de su respectivo normalizador (promedio entre las tres réplicas  $s$  de la cepa S288c), esto con el objetivo de eliminar el error asociado a posibles diferencias no controlables en las condiciones experimentales (por ejemplo, diferencias de temperatura ambiente entre un experimento y otro, que pueda causar una leve diferencia de temperatura en el equipo). Luego se promediaron los valores obtenidos para las dos réplicas  $r$  del experimento, y se calculó el logaritmo en base dos de dichos promedios para normalizar las distribuciones y disminuir la dispersión de los datos, obteniéndose así

los valores de  $LSC_{ijk}$  (coeficientes logarítmicos de cepa). Finalmente, se restaron los valores de la condición control a los de la condición con tratamiento para cada cepa  $i$  para así obtener valores fenotípicos que reflejen diferencias entre las cepas únicamente debidas al tratamiento (y no a las condiciones experimentales utilizadas), los cuales corresponde a los valores de  $LPI_{ij}$  (índices logarítmicos fenotípicos). Aquellas cepas que no presentaron crecimiento en alguna de las dos réplicas se les asignó, para cada fenotipo, el mínimo valor encontrado para el fenotipo en cuestión considerando como referencia las cepas con el menor crecimiento.

$$LSC_{ijk} = \log_2 \left[ \frac{\sum_{r=1}^2 \left\{ \frac{x_{ijk}}{\left( \frac{\sum_{s=1}^3 (y_{jk})_s}{3} \right)} \right\}}{2} \right] \quad (3)$$

$$LPI_{ij} = LSC_{ij(\text{tratamiento})} - LSC_{ij(\text{control})} \quad (4)$$

En base a la optimización de este procedimiento se logró la obtención de valores fenotípicos para los tres parámetros asociados al crecimiento en estudio de forma eficiente para un gran número de cepas, método utilizado para la posterior fenotipificación de poblaciones recombinantes de *S. cerevisiae* tratadas con los fungicidas seleccionados.



**Figura 7. Esquema de obtención de parámetros asociados al crecimiento.** (a) Los tres parámetros asociados al crecimiento que se obtienen desde las curvas de crecimiento corresponden a la eficiencia (diferencia entre la OD máxima y la OD mínima), la adaptación (inverso del tiempo en que la segunda derivada es máxima) y la velocidad máxima (máxima primera derivada). (b-e) Ejemplo de las curvas obtenidas al realizar la regresión sigmoidea empleada: (b) datos crudos, (c) curva tras la regresión sigmoidea, (d) curva de los valores de primeras derivadas en función del tiempo y (e) curva de los valores de segundas derivadas en función del tiempo. En cada curva, los puntos azules indican las OD mínima y máxima, el punto rojo la máxima segunda derivada, y el punto verde la máxima primera derivada.

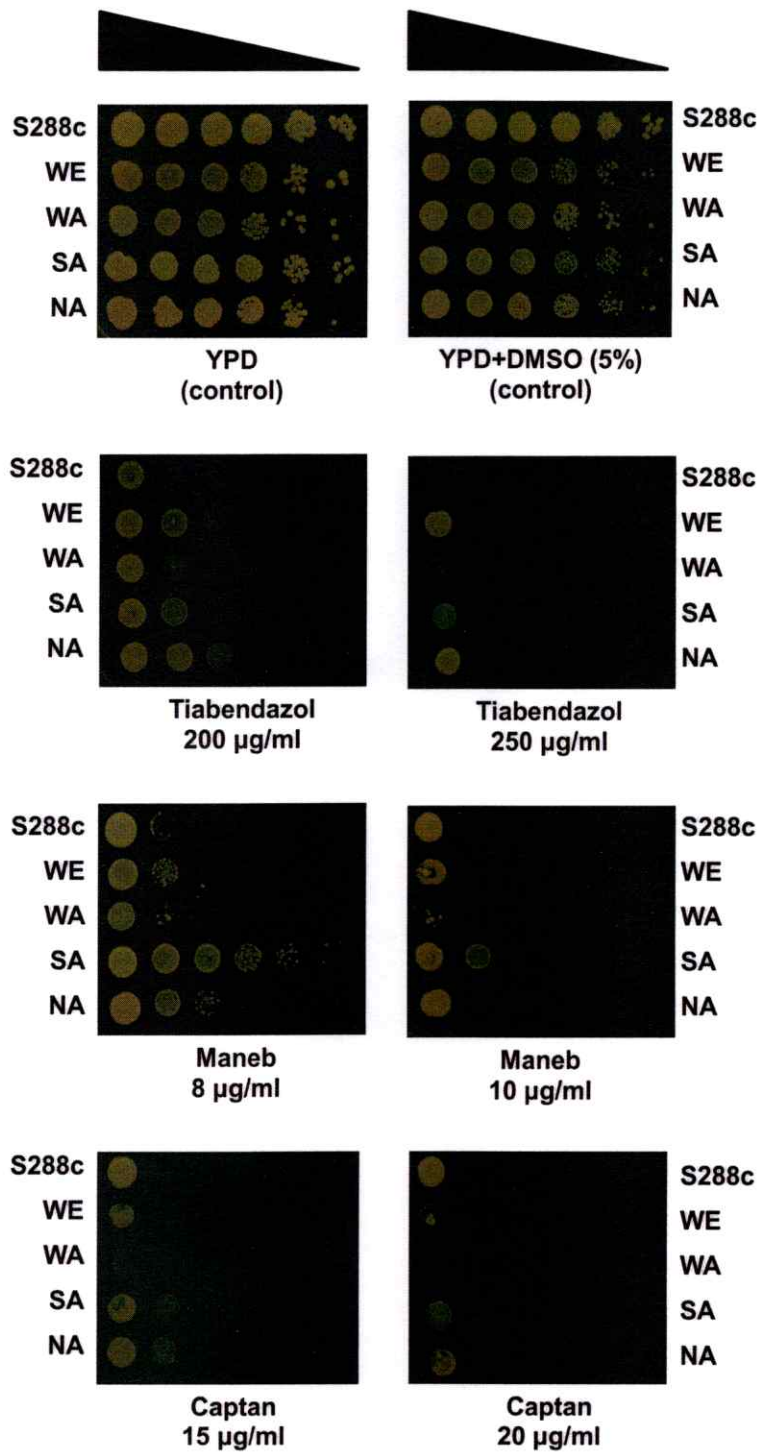


### **3.3. Evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales**

#### **3.3.1. Determinación de diferencias de resistencia entre las cepas parentales a los fungicidas seleccionados**

Para determinar concentraciones de los fungicidas seleccionados que permitieran evaluar posteriormente poblaciones recombinantes, se realizaron experimentos de diluciones seriadas utilizando las cepas parentales NA, SA, WA y WE, además de la cepa de laboratorio S288c. En principio se evaluaron para los fungicidas concentraciones en el rango de 0,1, 1, 10 y 100 µg/ml, las cuales se encuentran dentro de los rangos utilizados en estudio previos (Fai y Grant, 2009). Posteriormente se evaluó para cada fungicida otras concentraciones buscando maximizar las diferencias de crecimiento entre las cepas.

A partir de lo anterior, se obtuvo un óptimo de concentraciones de 200 y 250 µg/ml para tiabendazol, de 8 y 10 µg/ml para maneb, y de 15 y 20 µg/ml para captan. Como se observa, la concentración óptima para tiabendazol es un orden de magnitud mayor que aquellas para maneb y captan. Además de lo anterior, se determinó que para estas concentraciones existen diferencias de resistencia a los fungicidas entre las cepas parentales evaluadas, presentando las cepas NA y WE mayor resistencia a tiabendazol, las cepas SA y NA mayor resistencia a captan, y la cepa SA mayor resistencia a maneb (figura 8).



**Figura 8. Resistencia a fungicidas de cepas parentales.** Para cada placa las diluciones seriadas de células de levadura se encuentran de izquierda (mayor concentración de células) a derecha (menor concentración de células), lo cual se encuentra representado por los triángulos negros ubicados en la parte superior de la figura. Las concentraciones de fungicida utilizadas en cada placa son indicadas, además de los controles YPD e YPD+DMSO.

### **3.3.2. Las cantidades de DMSO utilizadas no afectan el crecimiento**

Dado que la utilización de DMSO puede afectar el crecimiento de *S. cerevisiae*, fue necesario evaluar si tiene un efecto sobre el crecimiento a las concentraciones utilizadas para preparar las soluciones de fungicidas. Para evaluar su efecto se realizaron placas YPD+DMSO a la máxima concentración en que fue utilizado, la cual corresponde a un 5% (que es la ocupada en la placa de tiabendazol 250 µg/ml), observándose que no causa diferencia de crecimiento entre las cepas parentales evaluadas (figura 8). En base a estos resultados, se decidió realizar los controles en medio sin DMSO.

### **3.3.3. Las concentraciones seleccionadas varían entre experimentos en medio sólido y microcultivo**

En el caso del microcultivo se decidió trabajar sólo con una concentración de cada fungicida, partiendo por concentraciones similares a las obtenidas en medio sólido. Sin embargo, para maneb y en especial para captan, las concentraciones utilizadas resultaron ser limitantes para el crecimiento, por lo cual fue necesario ajustarlas independientemente, escogiéndose finalmente concentraciones de 200 µg/ml para tiabendazol, 4 µg/ml para maneb, y 0,4 µg/ml para captan. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para la evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales, considerando tanto las concentraciones a ser utilizadas en las posteriores fenotipificaciones, como las cepas más resistentes y los cruces a ser evaluados para cada fungicida, escogidos en función de presentar las cepas parentales respectivas la mayor diferencia de crecimiento entre ellas para cada uno de los fungicidas en estudio.

Tabla 2. Resumen los principales resultados obtenidos para la evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales.

Fungicida	Concentraciones utilizadas en medio sólido [µg/ml]	Concentración utilizada en microcultivo [µg/ml]	Cepa(s) más resistente(s)	Cruce a ser evaluado
Tiabendazol	200 250	200	WE NA	WAxNA
Maneb	8 10	4	SA	WExSA
Captan	15 20	0,4	SA NA	WExSA

### 3.4. Fenotipificaciones en medio sólido para poblaciones recombinantes

Para realizar el mapeo por ligamiento de QTLs es imprescindible contar para el fenotipo en estudio con valores fenotípicos para cada segregante de la población evaluada. Con el objetivo de obtener valores fenotípicos para las poblaciones recombinantes se evaluaron las poblaciones completas seleccionadas anteriormente, WAXNA (83 segregantes) para tiabendazol y WExSA (96 segregantes) para maneb y captan, a las dos concentraciones determinadas para cada fungicida. Esta primera fenotipificación se realizó en medio sólido, como un método alternativo a la fenotipificación en microcultivo antes estandarizada, dado que tiene la ventaja de ser un *screening* semi-cuantitativo más rápido que permite tener una primera aproximación de forma simple, permitiendo además comparar posteriormente las diferencias en los resultados que se puedan obtener al utilizar los dos métodos distintos de fenotipificación. En cada caso, se observaron diferencias de resistencia dentro de las poblaciones, encontrándose cepas que no presentan crecimiento y otras que presentan crecimientos similares al control (figura 9).

Lo anterior se corrobora al observar la figura 10, en la cual también es posible observar una distribución de los segregantes del tipo continua, sugiriendo que la resistencia a estos fungicidas corresponde a un rasgo poligénico. Al comparar las varianzas poblacionales obtenidas mediante una prueba F (tabla 3), éstas resultan ser significativamente mayores a mayor concentración evaluada para tiabendazol ( $p\text{-value} < 0,004$ ) y para captan ( $p\text{-value} < 5,021\text{e-}6$ ), pero no así para maneb ( $p\text{-value} < 0,524$ ). Los datos obtenidos desde esta fenotipificación en medio sólido fueron utilizados posteriormente para realizar el correspondiente análisis de ligamiento.

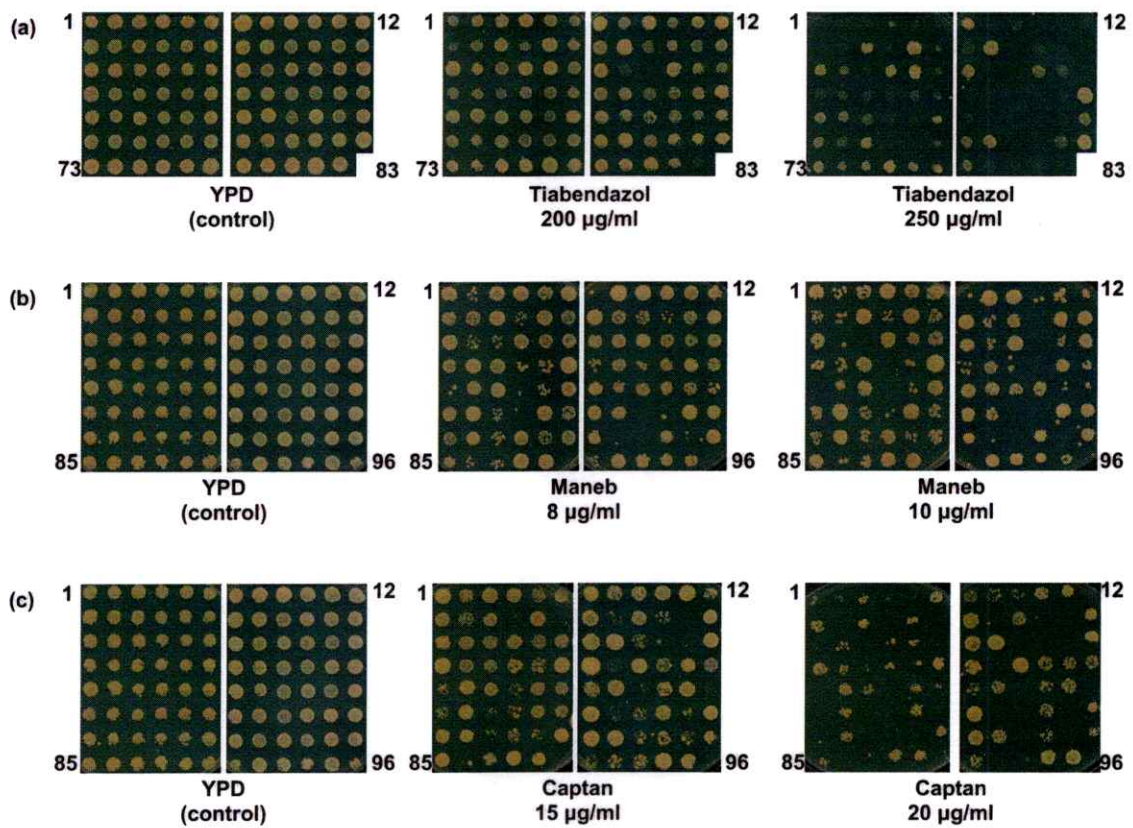
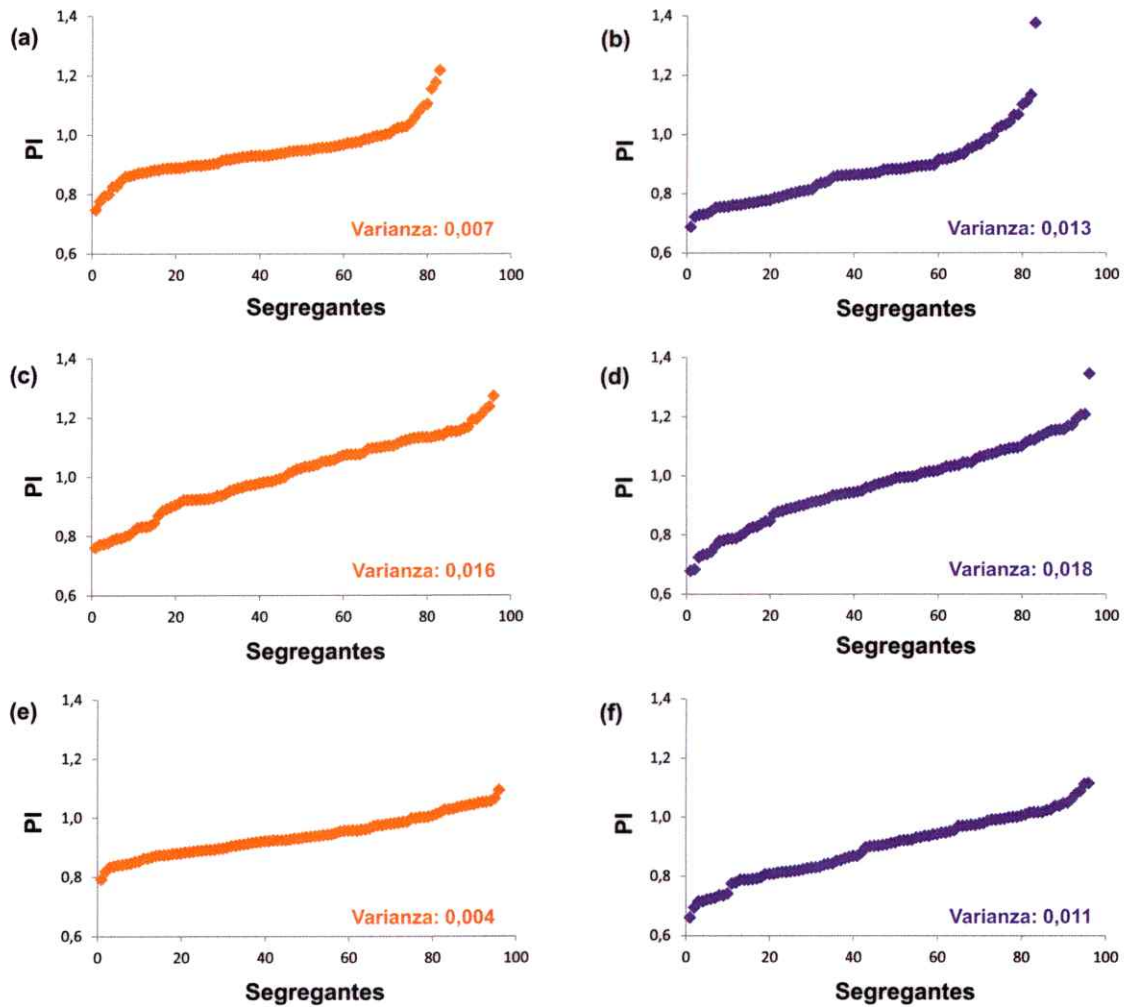


Figura 9. Diferencias de resistencia a fungicidas en poblaciones recombinantes evaluadas en medio sólido. En cada caso se muestra una de las tres réplicas realizadas. Los segregantes se encuentran numerados de izquierda a derecha para su identificación: (a) cruce WAXNA con tiabendazol, (b) cruce WExSA con manebl y (c) cruce WExSA con captan.



**Figura 10. Distribución continua de los segregantes de poblaciones recombinantes en medio sólido.** Los segregantes fueron ordenados de menor a mayor índice fenotípico (PI) obtenido en cada caso. (a-b) Resultados obtenidos para el cruce WAxNA, para (a) tiabendazol 200  $\mu\text{g/ml}$  y (b) tiabendazol 250  $\mu\text{g/ml}$ . (c-f) Resultados obtenidos para el cruce WExSA, para (c) maneb 8  $\mu\text{g/ml}$ , (d) maneb 10  $\mu\text{g/ml}$ , (e) captan 15  $\mu\text{g/ml}$  y (f) captan 20  $\mu\text{g/ml}$ . Las varianzas poblacionales se muestran en cada gráfico.

Tabla 3. *p-values* obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en medio sólido. Las varianzas se muestran entre paréntesis, y fueron analizadas mediante una prueba F (\*\*\*, *p-value* < 0,001; \*\*, *p-value* < 0,010; \*, *p-value* < 0,050).

	Tiabendazol 200 µg/ml (0,007)	Tiabendazol 250 µg/ml (0,013)	Maneb 8 µg/ml (0,016)	Maneb 10 µg/ml (0,018)	Captan 15 µg/ml (0,004)	Captan 20 µg/ml (0,011)
Tiabendazol 200 µg/ml (0,007)	-	0,004**	8,706e-5***	7,809e-6***	0,035*	0,019*
Tiabendazol 250 µg/ml (0,013)	-	-	0,324	0,118	3,658e-7***	0,501
Maneb 8 µg/ml (0,016)	-	-	-	0,524	7,131e-10***	0,086
Maneb 10 µg/ml (0,018)	-	-	-	-	1,924e-11***	0,020*
Captan 15 µg/ml (0,004)	-	-	-	-	-	5,021e-6***
Captan 20 µg/ml (0,011)	-	-	-	-	-	-



### 3.5. Fenotipificaciones en microcultivo para poblaciones recombinantes

Además de llevar a cabo la fenotipificación en medio sólido como un *screening* semi-cuantitativo, se llevó también a cabo la fenotipificación en microcultivo antes estandarizada con el objetivo de obtener valores fenotípicos para los segregantes de dichas poblaciones. Este segundo método de fenotipificación tiene más precisión al ser cuantitativo y permitir generar cinéticas de crecimiento, de las cuales se pueden obtener valores para tres parámetros asociados al crecimiento (eficiencia, adaptación y velocidad máxima), lo cual le otorga la ventaja de ser más informativo. Para llevar esto a cabo, las poblaciones completas WAXNA (83 segregantes) para tiabendazol y WEXSA (93 segregantes) para maneb y captan fueron evaluadas a la concentración determinada para cada fungicida. Cabe destacar que 3 de los 96 segregantes de la población WEXSA fueron descartados al azar para ubicar la cepa control (triplicado de la cepa S288c).

Al igual que para el caso de la fenotipificación en medio sólido, se observó una distribución continua en los segregantes para cada parámetro de cada fungicida evaluado (figuras 11a-c, 12a-c y 13a-c), reafirmando que la resistencia a estos fungicidas corresponde a un rasgo poligénico. Además, se observó que varias de las cepas no presentaron crecimiento en al menos una de las réplicas para cada fungicida, en especial para maneb (crecimiento de 78 de 83 para tiabendazol, 58 de 93 para maneb, 73 de 93 para captan). Al evaluar la existencia de correlaciones entre los parámetros (figuras 11d-f, 12d-f y 13d-f) se encontró que para tiabendazol existe una fuerte correlación entre eficiencia y velocidad máxima ( $r = 0,613$ ,  $p\text{-value} = 3,546e-9$ ) y una menor entre adaptación y eficiencia ( $r = 0,225$ ,  $p\text{-value} = 0,049$ ), pero no entre adaptación y velocidad máxima ( $r = 0,106$ ,  $p\text{-value} = 0,358$ ). Por su parte, para maneb

se encontró una fuerte correlación sólo entre eficiencia y velocidad máxima ( $r = 0,915$ ,  $p\text{-value} < 2,200e-16$ ), no encontrándose entre adaptación ni con eficiencia ( $r = 0,233$ ,  $p\text{-value} = 0,078$ ) ni con velocidad máxima ( $r = 0,223$ ,  $p\text{-value} = 0,085$ ). Mismo caso se obtuvo para captan, obteniéndose una fuerte correlación sólo entre eficiencia y velocidad máxima ( $r = 0,948$ ,  $p\text{-value} < 2,200e-16$ ), pero no entre adaptación ni con eficiencia ( $r = 0,139$ ,  $p\text{-value} = 0,241$ ) ni con velocidad máxima ( $r = 0,172$ ,  $p\text{-value} = 0,147$ ). Estos resultados sugieren una fuerte asociación entre los parámetros de eficiencia y velocidad máxima, y una falta de asociación entre ellos y la adaptación.

Respecto a las varianzas poblacionales observadas (tablas 4 y 5), al analizar cada fungicida por separado es posible observar que en el caso de tiabendazol (tabla 4a) las varianzas muestran diferencias significativas entre los tres parámetros (eficiencia < velocidad máxima < adaptación), mientras que tanto para maneb (tabla 4b) como captan (tabla 4c) éstas muestran diferencias significativas al comparar adaptación con los otros dos parámetros (siendo la varianza de la adaptación siempre menor), pero no así al comparar eficiencia con velocidad máxima. Por otra parte, al analizar cada parámetro por separado es posible observar tanto para eficiencia (tabla 5a) como para velocidad máxima (tabla 5b) que las varianzas muestran diferencias significativas entre los tres fungicidas (tiabendazol < maneb < captan, en ambos casos), mientras que para la adaptación (tabla 5c) se tienen diferencias significativas entre tiabendazol con maneb y con captan (siendo la varianza en tiabendazol siempre menor), pero no entre maneb y captan. Estos resultados reafirman la asociación existente entre los parámetros de eficiencia y velocidad máxima. Los datos obtenidos desde esta fenotipificación en microcultivo fueron utilizados posteriormente para realizar el correspondiente análisis de ligamiento.



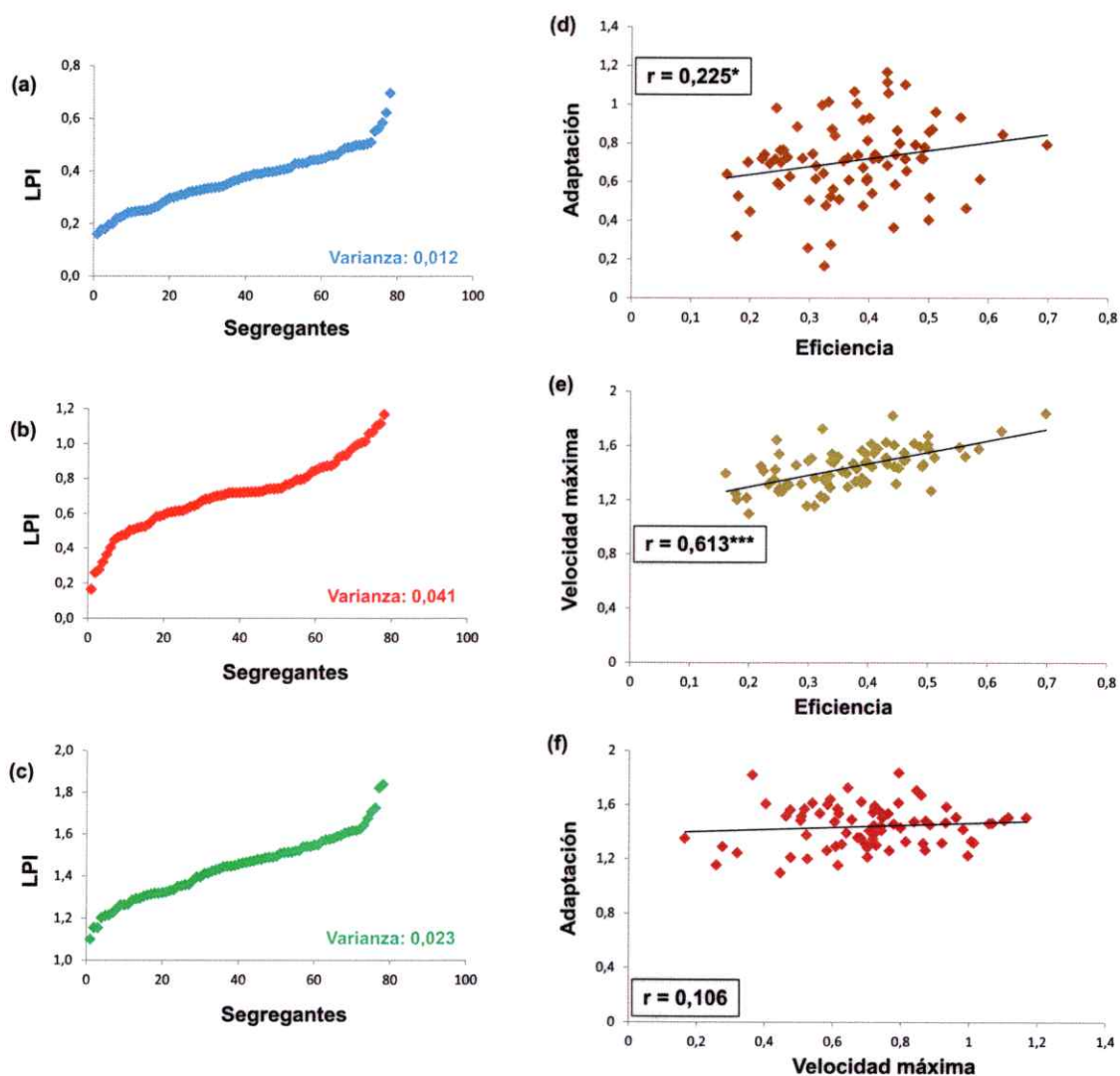
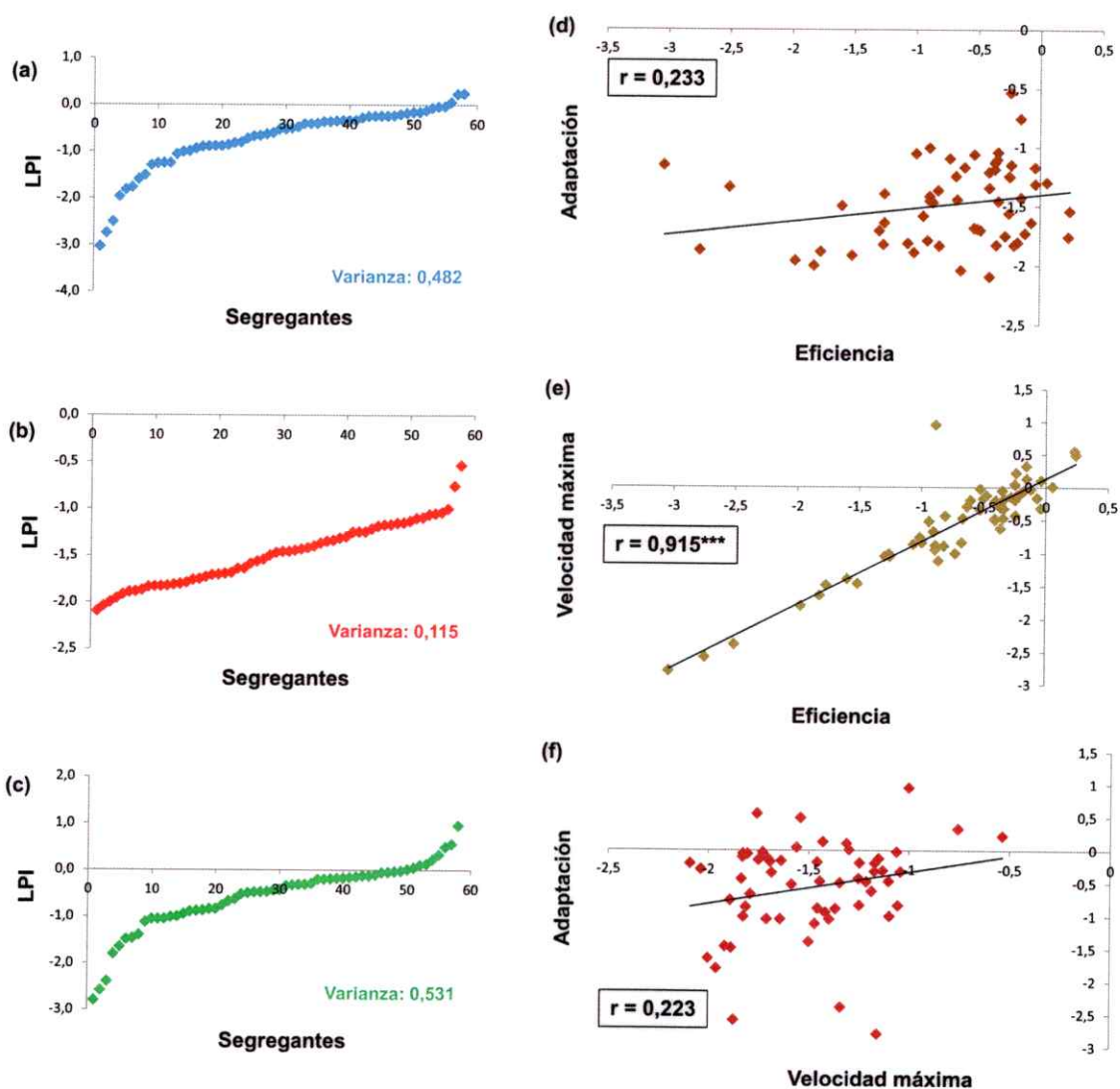
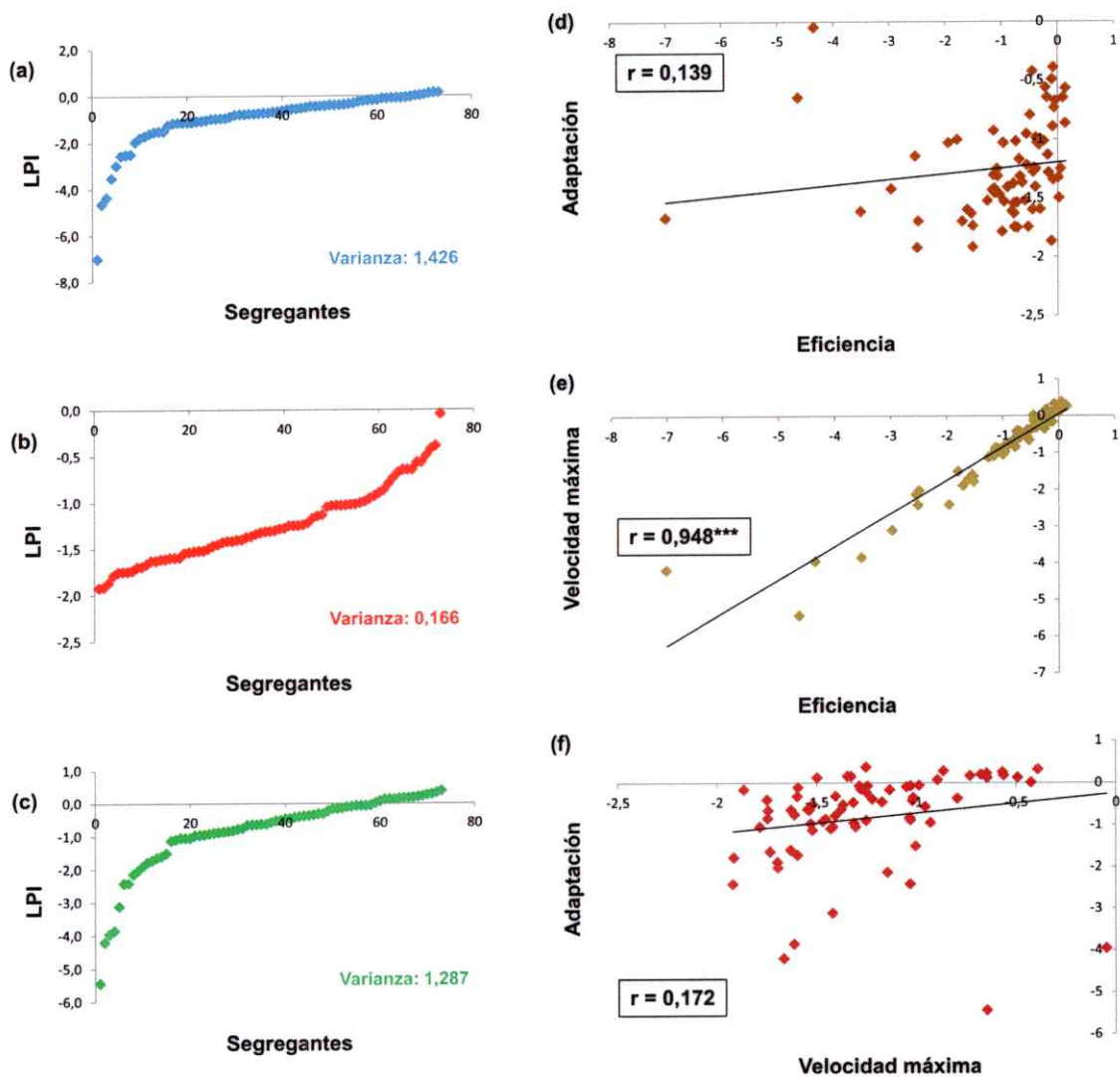


Figura 11. Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WAxNA crecidos en presencia de tiabendazol. (a-c) Distribución continua de los segregantes, los cuales fueron ordenados de menor a mayor índice fenotípico logarítmico (LPI) obtenido, para cada parámetro en estudio: (a) eficiencia, (b) adaptación y (c) velocidad máxima. Las varianzas poblacionales se muestran en cada gráfico. (d-f) Correlaciones entre los parámetros asociados al crecimiento: (d) adaptación en función de la eficiencia, (e) velocidad máxima en función de la eficiencia y (f) adaptación en función de la velocidad máxima. El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) se indica encuadrado en cada gráfico (\*\*\*,  $p$ -value < 0,001; \*,  $p$ -value < 0,050).



**Figura 12. Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WExSA crecidos en presencia de maneb.** (a-c) Distribución continua de los segregantes, los cuales fueron ordenados de menor a mayor índice fenotípico logarítmico (LPI) obtenido, para cada parámetro en estudio: (a) eficiencia, (b) adaptación y (c) velocidad máxima. Las varianzas poblacionales se muestran en cada gráfico. (d-f) Correlaciones entre los parámetros asociados al crecimiento: (d) adaptación en función de la eficiencia, (e) velocidad máxima en función de la eficiencia y (f) adaptación en función de la velocidad máxima. El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) se indica encuadrado en cada gráfico ( $^{***}$ ,  $p$ -value < 0,001).



**Figura 13. Resultados obtenidos de la fenotipificación en microcultivo de los segregantes del cruce WExSA crecidos en presencia de captan.** (a-c) Distribución continua de los segregantes, los cuales fueron ordenados de menor a mayor índice fenotípico logarítmico (LPI) obtenido, para cada parámetro en estudio: (a) eficiencia, (b) adaptación y (c) velocidad máxima. Las varianzas poblacionales se muestran en cada gráfico. (d-f) Correlaciones entre los parámetros asociados al crecimiento: (d) adaptación en función de la eficiencia, (e) velocidad máxima en función de la eficiencia y (f) adaptación en función de la velocidad máxima. El coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) se indica encuadrado en cada gráfico (\*\*\*,  $p$ -value < 0,001).

Tabla 4. *p-values* obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en microcultivo para cada fungicida. Las varianzas se muestran entre paréntesis, y fueron analizadas mediante una prueba F (\*\*\*, *p-value* < 0,001; \*\*, *p-value* < 0,010; \*, *p-value* < 0,050). El análisis comparó las varianzas entre los distintos parámetros para cada fungicida por separado: (a) tiabendazol, (b) maneb y (c) captan.

(a)

	Eficiencia (0,012)	Adaptación (0,041)	Velocidad máxima (0,023)
Eficiencia (0,012)	-	1,550e-7***	0,005**
Adaptación (0,041)	-	-	0,011*
Velocidad máxima (0,023)	-	-	-

	Eficiencia (0,482)	Adaptación (0,115)	Velocidad máxima (0,531)
Eficiencia (0,482)	-	2,346e-7***	0,718
Adaptación (0,115)	-	-	3,987e-8***
Velocidad máxima (0,531)	-	-	-

	Eficiencia (1,426)	Adaptación (0,166)	Velocidad máxima (1,287)
Eficiencia (1,426)	-	<2,200e-16***	0,665
Adaptación (0,166)	-	-	8,882e-16***
Velocidad máxima (1,287)	-	-	-

Tabla 5. *p-values* obtenidos al comparar las varianzas poblacionales de las fenotipificaciones en microcultivo para cada parámetro. Las varianzas se muestran entre paréntesis, y fueron analizadas mediante una prueba F (\*\*\*, *p-value* < 0,001; \*\*, *p-value* < 0,010; \*, *p-value* < 0,050). El análisis comparó las varianzas entre los distintos fungicidas para cada parámetro por separado: (a) eficiencia, (b) adaptación y (c) velocidad máxima.

(a)

	Tiabendazol (0,012)	Maneb (0,482)	Captan (1,426)
Tiabendazol (0,012)	-	<2,200e-16***	<2,200e-16***
Maneb (0,482)	-	-	3,812e-5***
Captan (1,426)	-	-	-

	Tiabendazol (0,041)	Maneb (0,115)	Captan (0,166)
Tiabendazol (0,041)	-	3,131e-5***	6,184e-9***
Maneb (0,115)	-	-	0,152
Captan (0,166)	-	-	-

	Tiabendazol (0,023)	Maneb (0,531)	Captan (1,287)
Tiabendazol (0,023)	-	<2,200e-16***	<2,200e-16***
Maneb (0,531)	-	-	0,001**
Captan (1,287)	-	-	-

### **3.6. Análisis de ligamiento de las fenotipificaciones obtenidas en medio sólido para poblaciones recombinantes**

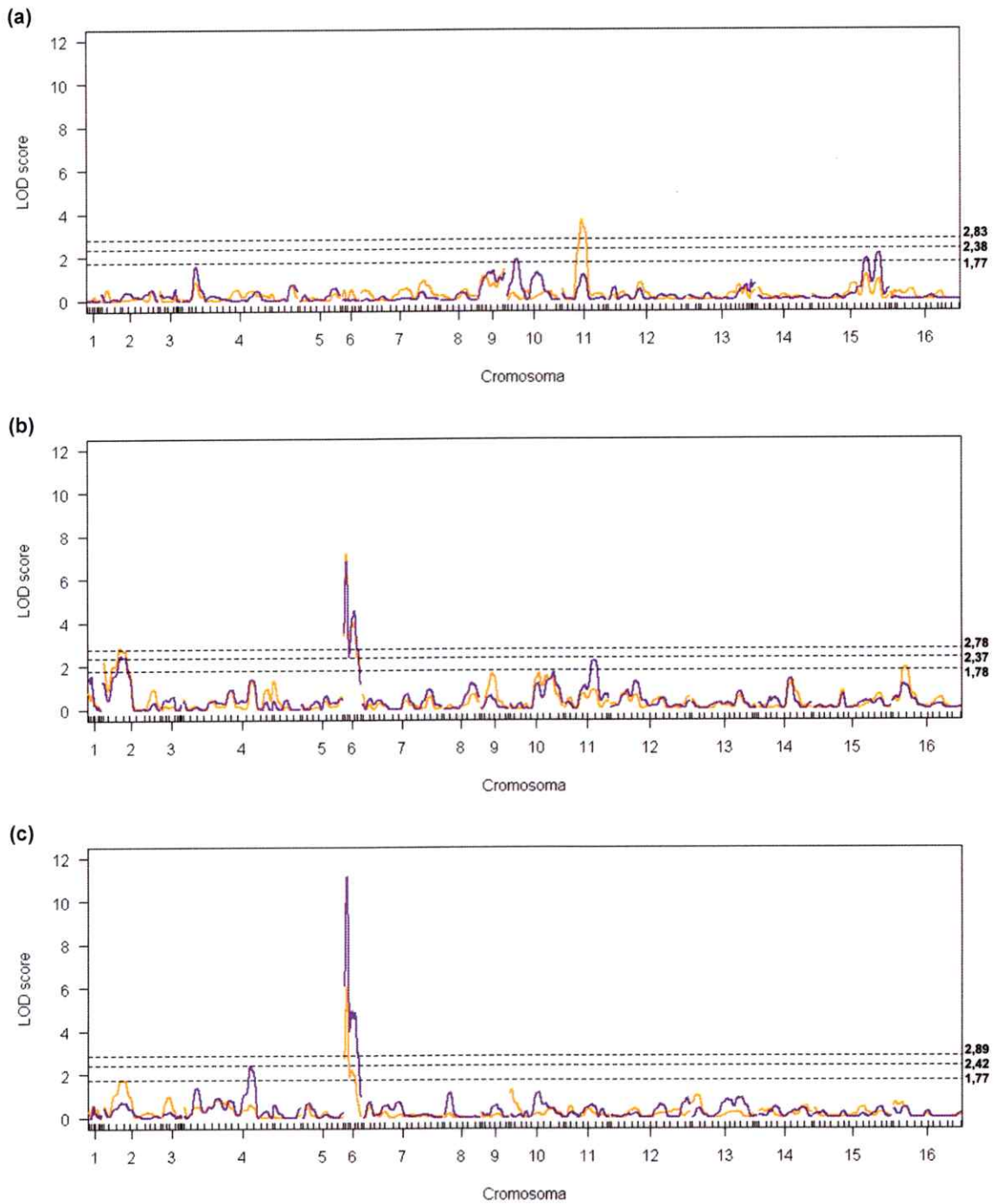
Una vez realizadas las fenotipificaciones para un grupo de segregantes, una estrategia útil para poder determinar las regiones genómicas que subyacen las diferencias fenotípicas observadas para el rasgo en estudio es el realizar un mapeo por ligamiento de QTLs. Para llevar a cabo dicho mapeo por ligamiento se utilizó el programa R/qtl, en primera instancia con los datos de las fenotipificaciones en medio sólido. Para tiabendazol (cruce WAXNA), se obtuvo el QTL significativo XI.322 (*LOD score* 3,74) para la concentración de 200 µg/ml, siendo la varianza fenotípica explicada por este QTL estimada en un 7,8 % (figura 14a y tabla 6a).

Por su parte, para maneb (cruce WExSA) se obtuvo para la concentración de 8 µg/ml los QTLs significativos II.308 (*LOD score* 2,86) y VI.65 (*LOD score* 7,22), mientras que para la concentración de 10 µg/ml se obtuvieron los mismos dos QTLs (*LOD scores* 2,47 y 6,84, respectivamente), siendo el QTL II.308 menos significativo (figura 14b y tabla 6b). Con el objetivo de determinar la existencia de interacciones entre los QTLs encontrados, y subsecuentemente los porcentajes de varianza fenotípica explicados por cada QTL, se generó un modelo de interacción entre los dos QTLs también utilizando el programa R/qtl, no presentándose una interacción significativa entre ellos, y obteniéndose que para ambas concentraciones evaluadas (8 y 10 µg/ml) explican de forma conjunta aproximadamente el 40% de la varianza fenotípica (43,7% y 39,3%, respectivamente). De particular interés resulta el QTL VI.65 puesto que es el más importante encontrado, explicando 30.5% y 26.8% de las varianzas fenotípicas para cada concentración evaluada, mientras que para el QTL II.308 dichos porcentajes son de 8,7% y 9,2% (tabla 6b).



Finalmente, para captan (cruce WExSA) se encontró tanto para la concentración de 15 µg/ml como de 20 µg/ml nuevamente el QTL significativo VI.65 (*LOD scores* 6,06 y 11,13, respectivamente) antes encontrado para maneb, el cual explica respectivamente 29,7% y 49,9% de la varianza fenotípica (figura 14c y tabla 6c), sugiriendo que en dicha región genómica se encuentra un gen de efecto mayor respecto a la resistencia tanto a maneb como a captan. Adicionalmente, se obtuvo el QTL marginalmente significativo IV.902 (*LOD score* 2,42), explicando una menor varianza (3,7%). Al igual que para el caso de los QTLs encontrados para maneb, no se encontró una interacción significativa entre estos dos QTLs (tabla 6c).

Además de realizar los análisis a las fenotipificaciones respectivas, también se le realizó a los datos de los controles (YPD) por separado, para constatar que los QTLs encontrados se deban efectivamente a los tratamientos con fungicidas y no a las condiciones experimentales empleadas. Al realizar este análisis no se obtuvieron regiones significativas para ninguno de los dos cruces (figura 15), sugiriendo que los QTLs encontrados se deben sólo al tratamiento con los respectivos fungicidas y no a las condiciones experimentales de la fenotipificación en medio sólido.



**Figura 14. Gráfico de *LOD score* en función de la posición en el genoma para los análisis de ligamiento de fenotipificaciones en medio sólido.** (a) Tiabendazol 200  $\mu\text{g/ml}$  (naranja) y 250  $\mu\text{g/ml}$  (morado). Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,83 ( $p\text{-value} < 0,050$ ), 2,38 ( $p\text{-value} < 0,150$ ) y 1,77 ( $p\text{-value} < 0,500$ ). (b) Maneb 8  $\mu\text{g/ml}$  (naranja) y 10  $\mu\text{g/ml}$  (morado). Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,78 ( $p\text{-value} < 0,050$ ), 2,37 ( $p\text{-value} < 0,150$ ) y 1,78 ( $p\text{-value} < 0,500$ ). (c) Captan 15  $\mu\text{g/ml}$  (naranja) y 20  $\mu\text{g/ml}$  (morado). Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,89 ( $p\text{-value} < 0,050$ ), 2,42 ( $p\text{-value} < 0,150$ ) y 1,77 ( $p\text{-value} < 0,500$ ).

Tabla 6. Resultados obtenidos del análisis de ligamiento para las fenotipificaciones realizadas en medio sólido. (a) Tiabendazol. (b) Maneb. (c) Captan.

(a)

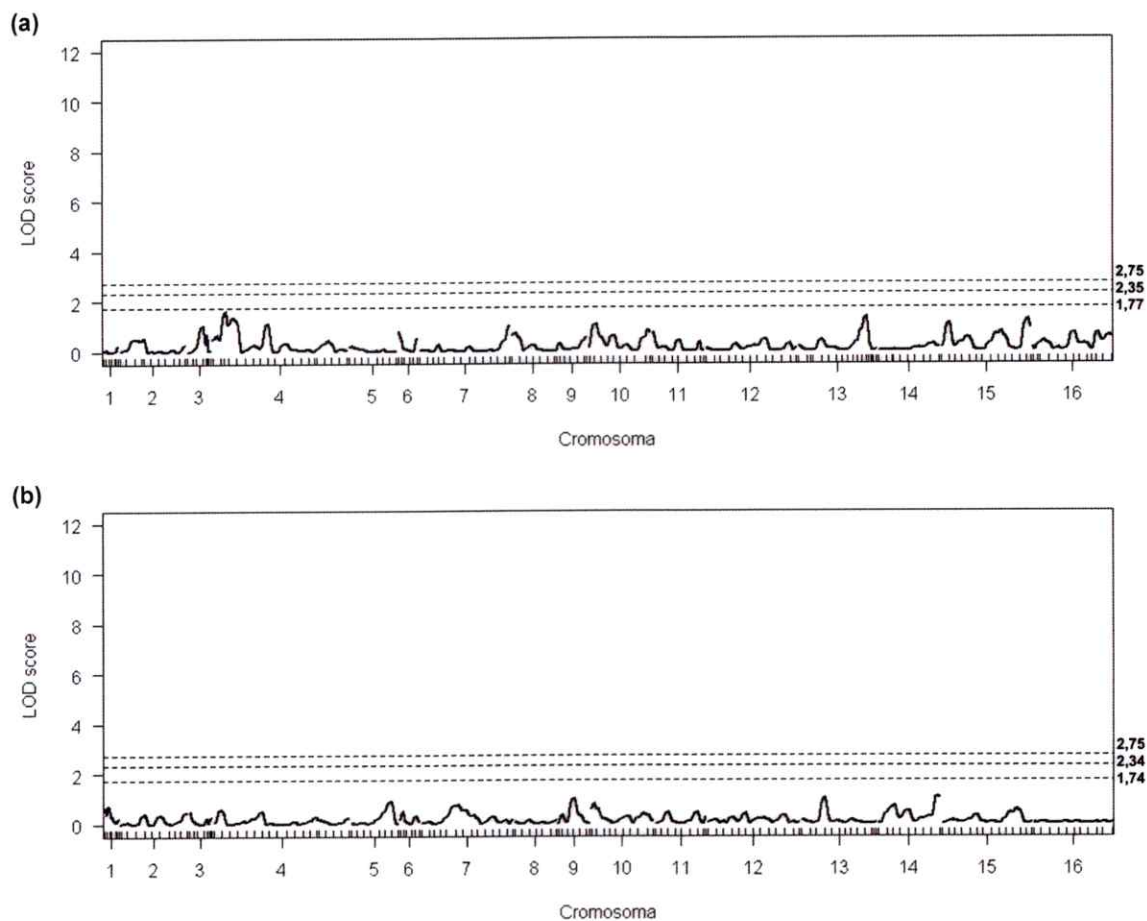
Concentración [µg/ml]	Elemento del modelo	Posición	LOD score	p-value	Varianza fenotípica explicada (%)
200	Q1	XI.322	3,74	0,005	7,8
250	-	-	-	-	-

(b)

Concentración [µg/ml]	Elemento del modelo	Posición	LOD score	p-value	Varianza fenotípica explicada (%)
8	Q1	II.308	2,86	0,040	8,7
	Q2	VI.65	7,22	0,000	30,5
	Modelo	Q1 + Q2	-	-	43,7
10	Q1	II.308	2,47	0,119	9,2
	Q2	VI.65	6,84	0,000	26,8
	Modelo	Q1 + Q2	-	-	39,3

(c)

Concentración [µg/ml]	Elemento del modelo	Posición	LOD score	p-value	Varianza fenotípica explicada (%)
15	Q1	VI.65	6,06	0,000	29,7
20	Q1	IV.902	2,42	0,150	3,7
	Q2	VI.65	11,13	0,000	49,9
	Modelo	Q1 + Q2	-	-	58,5



**Figura 15. Gráfico de *LOD score* en función de la posición en el genoma para los controles en medio sólido. (a) Cruce WxNA: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,75 ( $0 < 0,15$ ), 2,35 ( $p\text{-value} < 0,150$ ) y 1,77 ( $p\text{-value} < 0,500$ ). (b) Cruce WExSA: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,75 ( $p\text{-value} < 0,050$ ), 2,34 ( $p\text{-value} < 0,150$ ) y 1,74 ( $p\text{-value} < 0,500$ ).**

### 3.7. Análisis de ligamiento de las fenotipificaciones obtenidas en microcultivo para poblaciones recombinantes

Al momento de realizar las fenotipificaciones se dispuso de dos métodos distintos, medio sólido y microcultivo, debido a que mientras el primero se utilizó como un *screening* semi-cuantitativo más rápido para obtener una primera aproximación de forma simple, el segundo es el método de interés por ser cuantitativo y más preciso, lo cual aumenta la resolución al momento de determinar regiones genómicas asociadas a los rasgos en estudio. Dado lo anterior, una pregunta por responder es si los QTLs encontrados realizando los análisis de ligamiento sobre los datos de las distintas fenotipificaciones son los mismos o bien son distintos, para cada uno de los fungicidas evaluados. Por ende, y al igual que para el caso del análisis de ligamiento con los datos de las fenotipificaciones en medio sólido, se llevó a cabo el mapeo por ligamiento utilizando el programa R/qtl, esta vez utilizando los datos obtenidos de las fenotipificaciones en microcultivo. Para tiabendazol (cruce WAXNA) no se encontró ningún QTL significativo (figura 16a), distinto al caso en medio sólido donde se identificó el QTL XI.322.

Por su parte, y como se observa en la figura 16b y la tabla 7a, para maneb (cruce WExSA) no se replicaron los QTLs II.308 y QTL VI.65 encontrados en medio sólido. Sin embargo, se obtuvieron otros QTLs anteriormente no identificados (algunos marginalmente significativos), como son VII.331 (*LOD score* 5,32) y X.725 (*LOD score* 2,82) para el parámetro de eficiencia; VI.196 (*LOD score* 2,42), VII.516 (*LOD score* 5,35) y XIII.875 (*LOD score* 2,75) para el parámetro de adaptación; y VI.196 (*LOD score* 3,08) y VII.331 (*LOD score* 5,00) para el parámetro de velocidad máxima. Debido a que los QTLs VI.65 y VI.196 se encuentran muy cercanos físicamente en el



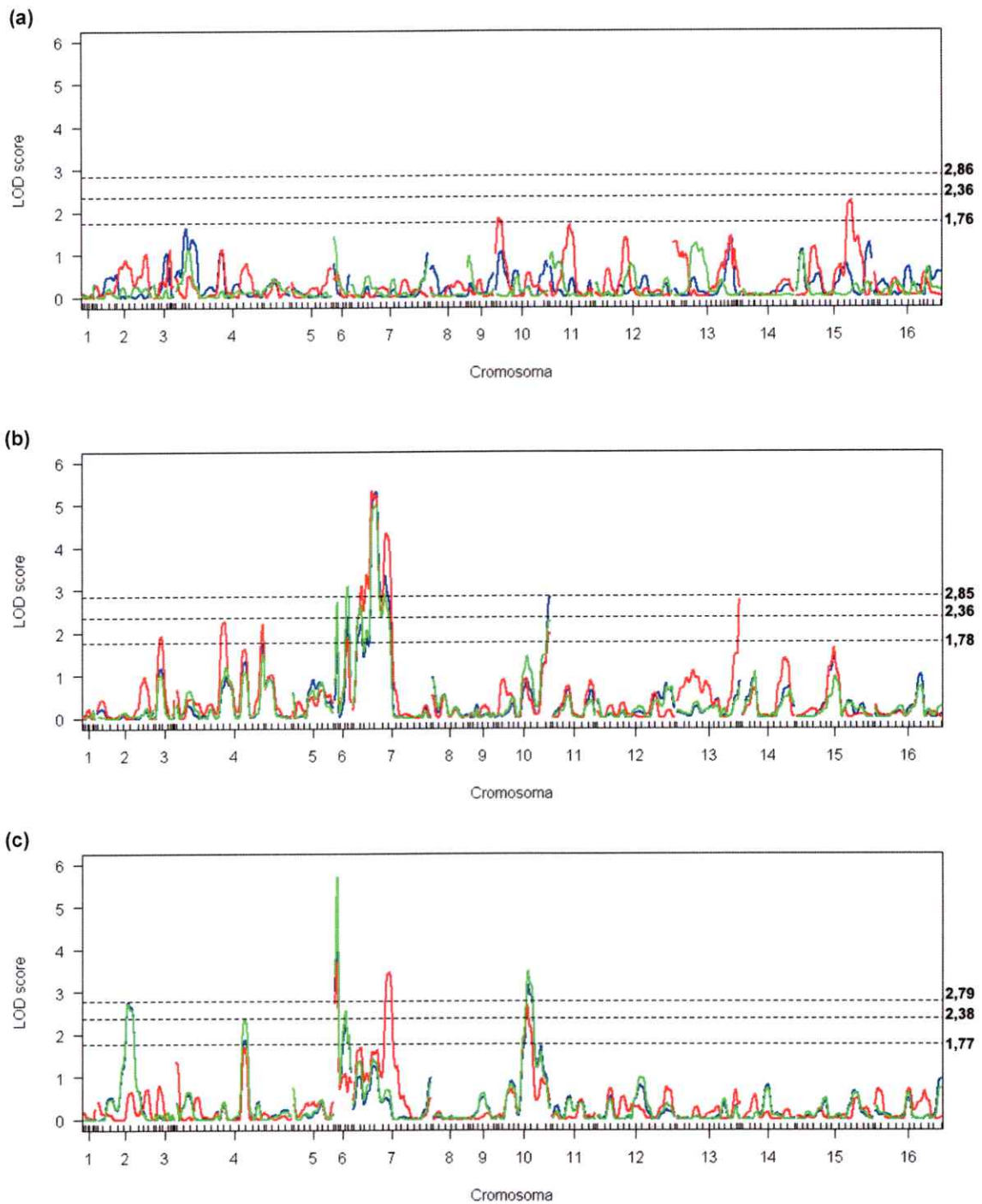
cromosoma VI, existe la posibilidad de que estos se encuentren ligados, y que por ello el *software* identifique éste segundo QTL y no el primero. Para evaluar dicha posibilidad, y también utilizando R/qtl, se evaluó el ligamiento y la asociación entre los marcadores existentes en el cromosoma VI (figura 17), en particular los existentes entre los dos marcadores correspondientes a los QTLs antes nombrados. Se observa que existe un mediano grado de ligamiento entre ambos QTLs (fracción de recombinación de 0,198), encontrándose asociados de forma estrecha (*LOD score* 8,16), por lo cual no es posible descartar que dado el ligamiento entre ellos estas dos regiones no correspondan a QTLs independientes, y por ende en ambos casos se tenga el mismo locus causal para el fenotipo estudiado.

Por otro lado, y de igual manera que para el análisis de ligamiento de fenotipificaciones en medio sólido, se determinó la existencia de interacciones entre los QTLs encontrados y los respectivos porcentajes de varianza fenotípica explicada por cada uno de ellos, encontrándose en esta ocasión casos de interacción entre pares de QTLs que explican bajos porcentajes de varianza fenotípica: dos para velocidad máxima (6,3% y 3,4%), y uno para adaptación (3,8%) (tabla 7a). Por su parte, los modelos de interacción generados para cada parámetro explican 34,8% (eficiencia), 50,3% (adaptación) y 38,6% (velocidad máxima) de la varianza fenotípica observada en cada caso.

Finalmente, para captan (cruce WExSA) en microcultivo no se encontró el QTL IV.902 previamente identificado en medio sólido (figura 16c y la tabla 7b). Por su parte, el QTL VI.65 previamente identificado en medio sólido aparece nuevamente para los parámetros de eficiencia (*LOD score* 5,23), adaptación (*LOD score* 3,70) y velocidad máxima (*LOD score* 5,70), confirmando su importancia antes vista en el caso de los

experimentos en medio sólido, explicando porcentajes de varianza fenotípica de 23,4%, 8,3% y 22,9%, respectivamente (tabla 7b). También se encontraron otros QTLs no observados en medio sólido (algunos marginalmente significativos), como son para los parámetros de eficiencia y velocidad máxima los QTLs II.469 (*LOD scores* 2,75 y 2,73, respectivamente) y X.669 (*LOD scores* 3,16 y 3,48, respectivamente), y para el parámetro de adaptación los QTLs X.465 (*LOD score* 2,68) y VII.526 (*LOD score* 3,47). Éste último también fue encontrado para el mismo parámetro en el caso del maneb en microcultivo. Sobre las interacciones encontradas, sólo se halló un caso (eficiencia), que al igual que los encontrados para maneb representa un bajo porcentaje de la varianza de 3,1% (tabla 7b). Por su parte, los modelos generados para cada parámetro explican 40,1% (eficiencia), 32,6% (adaptación) y 41,6% (velocidad máxima) de la varianza fenotípica observada en cada caso.

De la misma manera que para el análisis de fenotipificaciones en medio sólido, también se realizó a los datos de los controles (YNB) un análisis por separado, para constatar que los QTLs encontrados se deban efectivamente a los tratamientos con fungicidas y no a las condiciones experimentales empleadas. Si bien en el caso del cruce WAXNA no se obtuvo ninguna región sobre los límites de significancia (figura 18a), para el cruce WEXSA sí se observan QTLs significativos (figura 18b). Estos QTLs corresponden a VI.65 (*LOD score* 3,50) para eficiencia, VII.331 (*LOD score* 3,38) para adaptación, y VII.516 (*LOD score* 4,76) y VI.65 (*LOD score* 4,16) para velocidad máxima, los cuales coinciden con algunos de los observados con los tratamientos de maneb y captan, aunque comparativamente tienen *LOD scores* menores que ellos. Estos resultados sugieren que estos QTLs podrían estar implicados tanto en fenotipos de crecimiento como de resistencia a los fungicidas evaluados.



**Figura 16. Gráfico de *LOD score* en función de la posición en el genoma para los análisis de ligamiento de fenotipificaciones en microcultivo.** Los tres parámetros asociados al crecimiento, eficiencia (azul), adaptación (rojo) y velocidad máxima (verde), se muestran para el tratamiento con cada fungicida: (a) Tiabendazol: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,86 ( $p < 0,05$ ), 2,36 ( $p < 0,150$ ) y 1,76 ( $p < 0,500$ ). (b) Maneb: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,85 ( $p < 0,050$ ), 2,36 ( $p < 0,150$ ) y 1,78 ( $p < 0,500$ ). (c) Captan: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,79 ( $p < 0,050$ ), 2,38 ( $p < 0,150$ ) y 1,77 ( $p < 0,500$ ).



Tabla 7. Resultados obtenidos del análisis de ligamiento para las fenotipificaciones realizadas en microcultivo. (a) Maneb. (b) Captan.

(a)

Parámetro	Elemento del modelo	Posición	LOD score	p-value	Varianza fenotípica explicada (%)
Eficiencia	Q1	VII.331	5,32	0,000	20,3
	Q2	X.725	2,82	0,067	6,6
	Modelo	Q1 + Q2	-	-	34,8
Adaptación	Q1	VI.196	2,42	0,134	11,7
	Q2	VII.516	5,35	0,000	23,8
	Q3	XIII.875	2,75	0,066	23,0
	Interacción	Q1:Q3	-	-	6,3
	Interacción	Q2:Q3	-	-	3,4
	Modelo	Q1 + Q2 + Q3 + Q1:Q3 + Q2:Q3	-	-	50,3
Velocidad máxima	Q1	VI.196	3,08	0,037	13,5
	Q2	VII.331	5,00	0,001	23,4
	Interacción	Q1:Q2	-	-	3,8
	Modelo	Q1 + Q2 + Q1:Q2	-	-	38,6

(b)

Parámetro	Elemento del modelo	Posición	LOD score	p-value	Varianza fenotípica explicada (%)
Eficiencia	Q1	II.469	2,75	0,061	7,0
	Q2	VI.65	5,23	0,000	23,4
	Q3	X.669	3,16	0,025	9,3
	Interacción	Q2:Q3	-	-	3,1
	Modelo	Q1 + Q2 + Q3 + Q2:Q3	-	-	40,2
Adaptación	Q1	VI.65	3,70	0,006	8,3
	Q2	VII.516	3,47	0,011	14,8
	Q3	X.465	2,68	0,066	3,5
	Modelo	Q1 + Q2 + Q3	-	-	32,6
Velocidad máxima	Q1	II.469	2,73	0,069	11,4
	Q2	VI.65	5,70	0,000	22,9
	Q3	X.669	3,48	0,008	6,0
	Modelo	Q1 + Q2 + Q3	-	-	41,6

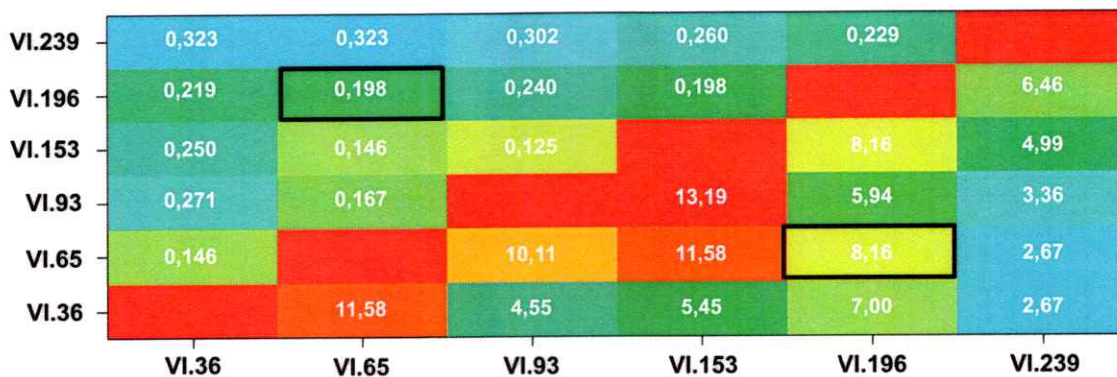
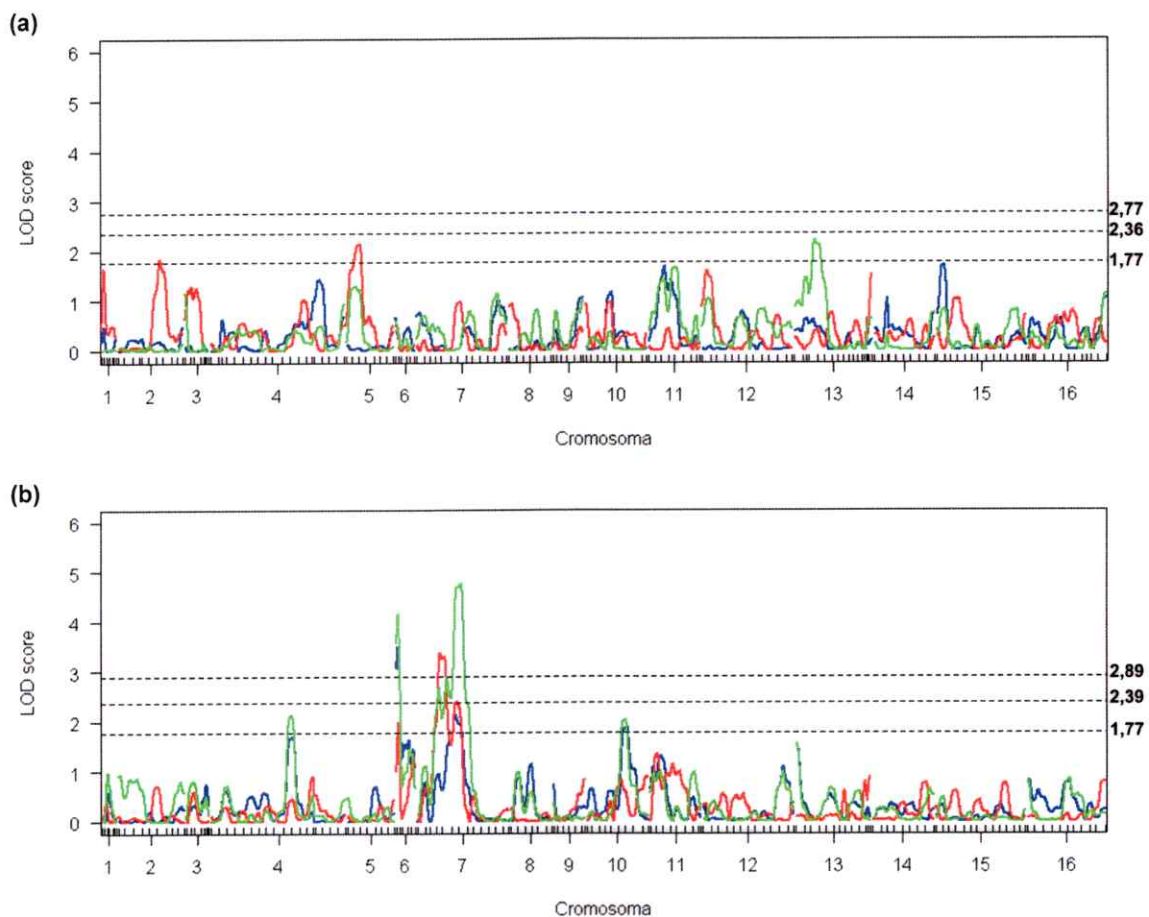


Figura 17. Ligamiento y asociación entre los marcadores presentes en el cromosoma VI. Las fracciones de recombinación estimadas se muestran sobre la diagonal, y los *LOD scores* se muestran bajo la diagonal. La escala de colores representa dichos valores, en que el color rojo indica pares de marcadores que parecen estar ligados (baja fracción de recombinación, o alto *LOD score*), mientras que el celeste indica pares que no están ligados (alta fracción de recombinación, o bajo *LOD score*). Los valores de ligamiento y asociación entre los marcadores VI.65 y VI.196 se encuentran marcados dentro de rectángulos negros.



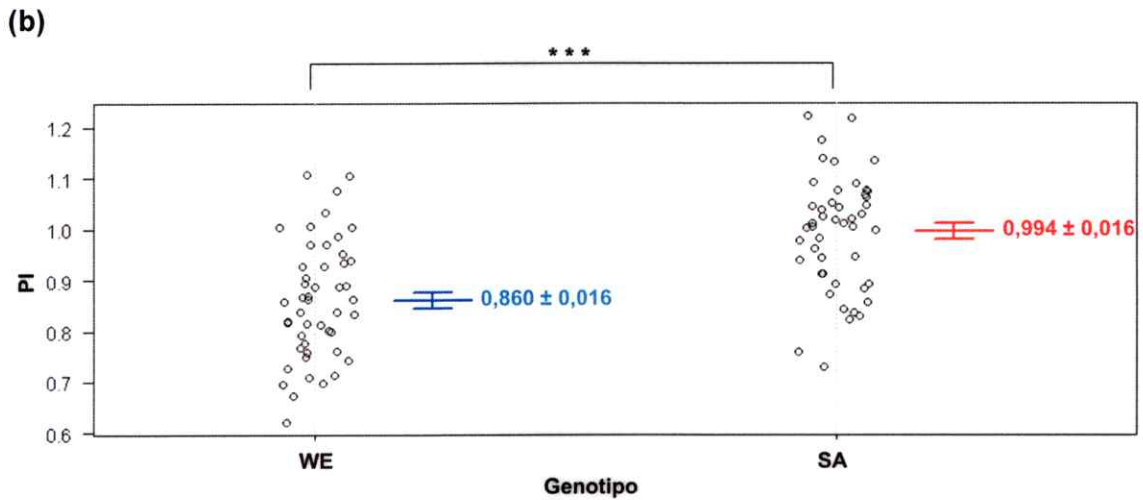
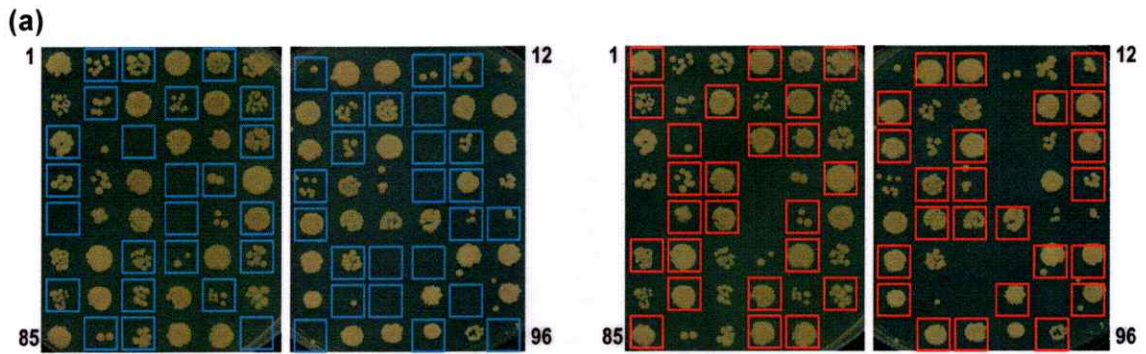
**Figura 18. Gráfico de *LOD score* en función de la posición en el genoma para los controles en microcultivo.** Los tres parámetros asociados al crecimiento, eficiencia (azul), adaptación (rojo) y velocidad máxima (verde), se muestran para cada condición control: (a) Cruce WxNA: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,77 ( $p$ -value < 0,050), 2,36 ( $p$ -value < 0,150) y 1,77 ( $p$ -value < 0,500). (b) Cruce WExSA: Las líneas punteadas corresponden a los *LOD scores* de corte de 2,89 ( $p$ -value < 0,050), 2,39 ( $p$ -value < 0,150) y 1,77 ( $p$ -value < 0,500).

### **3.8. Identificación y validación del gen *RIM15* como uno de los genes involucrados en la resistencia a maneb y captan**

#### **3.8.1. Comprobación de la vinculación existente entre el QTL VI.65 con los fenotipos en estudio**

Tras los análisis de ligamiento realizados, en los cuales se encontró una serie de QTLs que podrían explicar la diferencia de resistencia a los fungicidas en las cepas en estudio, se analizó en detalle el principal QTL identificado en este estudio tanto en medio sólido como microcultivo. Éste QTL (VI.65) presentó en medio sólido para maneb *LOD scores* de 7,22 (8 µg/ml) y 6,84 (10 µg/ml), y para captan de 6,06 (15 µg/ml) y 11,13 (20 µg/ml), mientras que en microcultivo para captan de 5,23 (eficiencia), 3,70 (adaptación) y 5,70 (velocidad máxima). Antes de identificar genes candidatos dentro de este QTL, fue necesario comprobar la vinculación existente entre el marcador ligado al QTL, el cual corresponde al locus YFL034W, y los fenotipos en estudio (resistencia a ambos fungicidas).

Para realizar dicha comprobación se utilizaron valores fenotípicos (LPI) obtenidos de la fenotipificación en medio sólido (figura 19), a los cuales se les realizó una prueba t de Student para determinar si existía una diferencia significativa entre los promedios de LPI de segregantes que portan el alelo resistente (SA) y segregantes que portan el alelo sensible (WE). Realizado este análisis se encontró una diferencia significativa (*p-value* = 2,364e-11) para dichos promedios, comprobándose de esta forma la existencia de la relación entre la resistencia al fungicida de los segregantes en medio sólido, y el alelo que portan.



**Figura 19. Vinculación entre el QTL VI.65 y los fenotipos en estudio.** (a) Alelos presentes para el marcador YFL034W en cada uno de los segregantes del cruce WExSA. Las placas corresponden a un experimento con maneb 10  $\mu$ g/ml, y en ellas se marcan los segregantes que poseen el alelo WE ( $n = 48$ , azul) y SA ( $n = 48$ , rojo). (b) *Effect plot* en que se grafican los índices fenotípicos (PI) en función del genotipo para los segregantes de las fotos mostradas en (a). Las barras indican el promedio  $\pm$  error estándar. Se encontró una diferencia significativa entre los promedios (\*\*\*,  $p$ -value < 0,001; prueba t de Student no pareada).

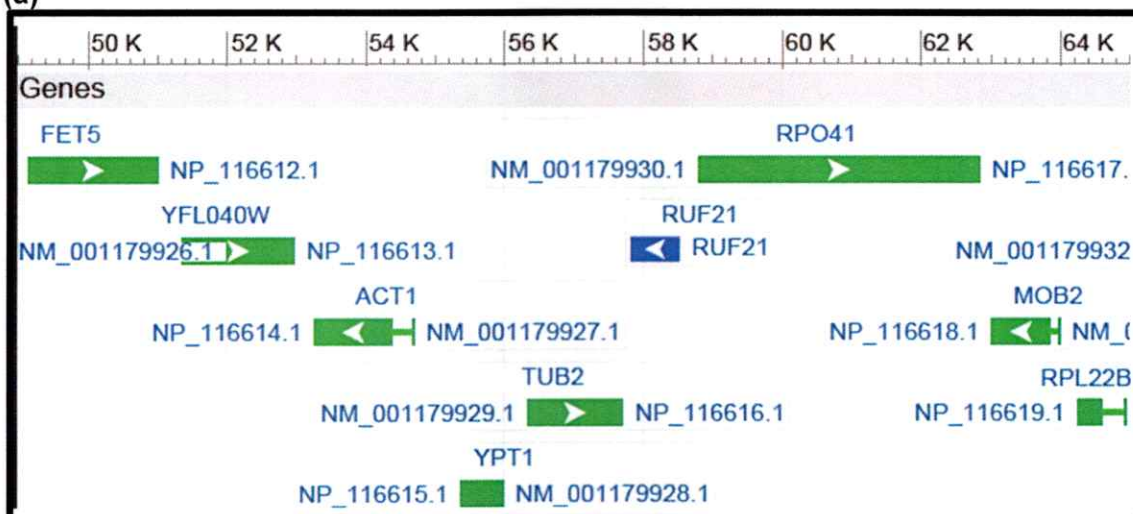
### 3.8.2. Identificación de genes candidatos en el QTL VI.65

Ya comprobada la participación del QTL VI.65 en la resistencia a maneb y captan, se estudió la región genómica adyacente al marcador YFL034W para así poder identificar posibles genes candidatos dentro de dicho QTL. Debido a que los marcadores más cercanos, YFL049W (VI.36) e YFL022C (VI.93), se encuentran cada uno a aproximadamente a 30 kb de distancia del marcador YFL034W, se decidió acotar la búsqueda a una distancia media a cada uno de ellos (esto es, 15 kb hacia cada lado del cromosoma) desde la posición VI.65 (figura 20).

Con el objetivo de identificar diferencias en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas entre los alelos de las cepas SA y WE que pudieran explicar las diferencias fenotípicas observadas, se realizaron alineamientos para todos los loci encontrados en la región de 30 kb estudiada. En la mayoría de las secuencias nucleotídicas estudiadas se encontraron mutaciones, las cuales en general correspondían a mutaciones silenciosas o bien a mutaciones sin sentido conservativas, por lo cual es improbable que sean las causantes de las diferencias de resistencia a los fungicidas evaluados (tabla 8). Distinto es el caso del gen *RIM15* (YFL033C), para el cual se observa que el alelo WE presenta una inserción de dos pares de bases en comparación al alelo SA (g.463-464insCA), lo que causa un corrimiento en el marco de lectura y la subsecuente existencia de un codón de término prematuro, produciendo una proteína trunca (figura 21). Debido a esta diferencia entre los productos proteicos del gen *RIM15* para las dos cepas en estudio es que se eligió este gen como candidato de ser el locus responsable del QTL VI.65.



(a)



(b)

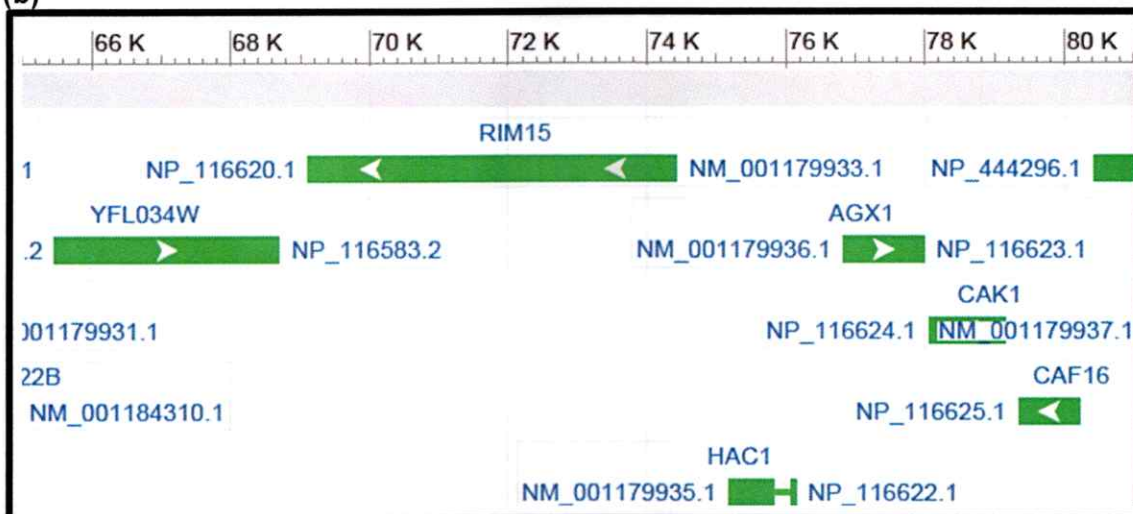


Figura 20. Determinación de genes candidatos para el QTL VI.65. Los genes candidatos estudiados corresponden a aquellos presentes a una distancia de la posición VI.65 de (a) 15 kb hacia el inicio del cromosoma (VI.50) y (b) 15 kb hacia el final del cromosoma (VI.80). Las imágenes fueron obtenidas desde el sitio web de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/850510>).

**Tabla 8. Diferencias encontradas entre secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las cepas SA y WE.** Las secuencias de los loci YFL034C-A (*RPL22B*) e YFL034C-B (*MOB2*) no fueron analizadas debido a que no se disponía de sus secuencias nucleotídicas completas. Para el locus YFL033C (*RIM15*) se muestran sólo las mutaciones previas al codón de término prematuro que se genera en el alelo WE. El criterio para determinar si las sustituciones son o no conservativas es el mismo que el entregado por el software ClustalOmega, basado en la utilización de una tabla Blosum62 (Nelson y Cox, 2006).

Locus	Diferencias entre secuencias nucleotídicas (SA>WE)	Diferencias entre secuencias aminoacídicas (SA>WE)
YFL028C ( <i>CAF16</i> )	Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.54A&gt;G</li> <li>• g.111A&gt;T</li> <li>• g.576G&gt;A</li> <li>• g.699T&gt;C</li> </ul>	Sin diferencias de secuencia
YFL029C ( <i>CAK1</i> )	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.769A&gt;G</li> </ul> Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.549T&gt;A</li> <li>• g.855A&gt;G</li> <li>• g.918C&gt;T</li> <li>• g.1093C&gt;T</li> </ul>	Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N257D</li> </ul>
YFL030W ( <i>AGX1</i> )	Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.36C&gt;T</li> <li>• g.162T&gt;C</li> <li>• g.177T&gt;G</li> <li>• g.426A&gt;G</li> <li>• g.510G&gt;A</li> <li>• g.1098T&gt;C</li> </ul>	Sin diferencias de secuencia
YFL031W ( <i>HAC1</i> )	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.268G&gt;A</li> <li>• g.358A&gt;G</li> </ul> Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.219T&gt;C</li> <li>• g.285C&gt;T</li> <li>• g.336C&gt;T</li> </ul>	Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• E90K</li> <li>• T120A</li> </ul>
YFL033C ( <i>RIM15</i> )	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.154T&gt;C</li> <li>• g.155T&gt;C</li> <li>• g.392G&gt;A</li> <li>• g.393C&gt;T</li> </ul> Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.273T&gt;C</li> <li>• g.384T&gt;C</li> <li>• g.447A&gt;G</li> </ul> Inserciones/delecciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.463-464insCA</li> </ul>	Sustituciones no conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• L52P</li> </ul> Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• S131N</li> </ul> Delecciones: <ul style="list-style-type: none"> <li>• V165_H1780del (proteína trunca)</li> </ul>
YFL035W ( <i>RPO41</i> )	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.1453G&gt;A</li> <li>• g.2329T&gt;A</li> <li>• g.3925G&gt;C</li> </ul>	Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• G485S</li> <li>• S777T</li> <li>• V1309L</li> </ul>

(continúa en página siguiente)



Locus	Diferencias entre secuencias nucleotídicas (SA>WE)	Diferencias entre secuencias aminoacídicas (SA>WE)
YFL035W (RPO41)	Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.168A&gt;G</li> <li>• g.171A&gt;G</li> <li>• g.213T&gt;C</li> <li>• g.1030C&gt;A</li> <li>• g.1230A&gt;G</li> <li>• g.1437G&gt;A</li> <li>• g.1493G&gt;A</li> <li>• g.2229G&gt;T</li> <li>• g.2433A&gt;G</li> <li>• g.2445T&gt;C</li> <li>• g.2638C&gt;T</li> <li>• g.2829C&gt;T</li> <li>• g.2841C&gt;T</li> <li>• g.2905C&gt;T</li> <li>• g.2913A&gt;G</li> <li>• g.4049C&gt;T</li> </ul>	
YFL037W (TUB2)	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.1337A&gt;G</li> </ul>	Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Q446R</li> </ul>
YFL038C (YPT1)	Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.393G&gt;T</li> </ul>	Sin diferencias de secuencia
YFL039C (ACT1)	Sin diferencias de secuencia	Sin diferencias de secuencia
YFL040W	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.130T&gt;C</li> <li>• g.254G&gt;A</li> <li>• g.675A&gt;T</li> <li>• g.1489G&gt;A</li> </ul> Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.399G&gt;A</li> <li>• g.432T&gt;C</li> <li>• g.621A&gt;G</li> <li>• g.1074C&gt;T</li> <li>• g.1299T&gt;C</li> <li>• g.1389G&gt;A</li> </ul>	Sustituciones no conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• S44P</li> <li>• C85Y</li> </ul> Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• E225D</li> <li>• G497S</li> </ul>
YFL041W (FET5)	Mutaciones con cambio de sentido: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.43G&gt;A</li> <li>• g.688G&gt;A</li> <li>• g.1276A&gt;G</li> <li>• g.1342A&gt;G</li> <li>• g.1387C&gt;T</li> <li>• g.1607G&gt;A</li> </ul> Mutaciones silenciosas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• g.63T&gt;C</li> <li>• g.222T&gt;A</li> <li>• g.243T&gt;C</li> <li>• g.315C&gt;T</li> <li>• g.681T&gt;C</li> <li>• g.825T&gt;C</li> <li>• g.999G&gt;A</li> <li>• g.1272C&gt;T</li> <li>• g.1419G&gt;C</li> </ul>	Sustituciones conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• V15I</li> <li>• D230N</li> <li>• N426D</li> <li>• N448D</li> <li>• L463F</li> </ul> Sustituciones no conservativas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• G536D</li> </ul>

(a)

```
SA 421 ACGACCTTGAAGCACGTGGTATCTTAATCAGGGATGGCCACA--CACAGTTGCCCTCTC 480
WE 421 ACGACCTTGAAGCACGTGGTATCTTGATCAGGGATGGCCACACACACAGTTGCCCTCTC 478
*****

SA 481 ACACGATGTGGATAGTCAAGCCTCGCACAAACGACTGGTCAGACTTTTATGCCAACGAAG 540
WE 479 ACACGATGTGGATAGTTAAGCCTCGCACAAACGACTGGTCAGACTTTTATGCCAACGAAG 538
*****
```

(b)

```
SA 1 MFNRSNTAGGSQAMKEGLGINKLSPISNSNPSSLTSSNYEKYLQLATEKNLCMILELEL 60
WE 1 MFNRSNTAGGSQAMKEGLGINKLSPISNSNPSSLTSSNYEKYLQLATEKNPCMILELEL 60
*****

SA 119 DGKVRYSQPWNTITGVADDSGSSPTYIADLILGSDQDKGVFQKATDMLLMNDDTSCTIT 120
WE 119 DGKVRYSQPWNTITGVADDSGSSPTYIADLILGSDQDKGVFQKATDMLLMNDDTSCTIT 120
*****

SA 121 FKIKAADYEGSAGCDDESTITTLARGILIRDGHTQLPSHTMWIVKPRTNDSDFYANED 180
WE 121 FKIKAADYEGNAGCDDESTITTLARGILIRDGHTHSCPLTRCG----- 164
*****_*****; *
```

Figura 21. Alineamiento de secuencias de *RIM15* y Rim15p. (a) Alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen *RIM15*. En azul se muestra la zona en donde se encuentra la inserción de dos nucleótidos en el alelo WE (nucleótidos 464-665) y el triplete de término existente en rojo. El resto de la secuencia no presenta diferencias, resultando en un porcentaje de identidad del 98,80%. (b) Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la proteína Rim15p. Se muestra la zona en que existe homología entre ambas proteínas. La proteína trunca de la cepa WE tiene sólo 164 aminoácidos, mientras que la proteína de la cepa SA tiene 1780 aminoácidos. El porcentaje de identidad entre ambas es del 93,90%.

### 3.8.3. Participación del gen *RIM15* en la resistencia a maneb y captan

El gen *RIM15* codifica una proteína quinasa serina/treonina (Rim15p) que participaría en la regulación de la división celular, proliferación, y esporulación en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Broach, 2012). Este gen ya ha sido encontrado anteriormente como responsable de la variación en otros fenotipos en estudio (Bergström y col., 2014), por lo cual representa un buen candidato para ser el locus responsable del QTL VI.65.

Con el objeto de comprobar si las diferencias observadas entre las cepas WE y SA en la resistencia a maneb y captan se deben al gen *RIM15*, se evaluó la existencia de diferencias fenotípicas debidas a los distintos alelos de dicho gen presentes en cada cepa. Para ello se realizó un análisis de hemicigosidad recíproca, en el cual se compararon dos cepas híbridas que sólo se diferencian por el alelo presente en un único locus hemicigoto, en este caso *RIM15*. Las cepas parentales (SA y WE), el híbrido (CC28F) y los recíprocos hemicigotos (YJM7 e YJM8) fueron crecidos en medio sólido en presencia de cada fungicida (maneb 10 µg/ml y captan 10 µg/ml). Como se observa en la figura 22, el recíproco hemicigoto YJM8 (que porta sólo el alelo del parental resistente SA) tiene un mayor nivel de resistencia a ambos fungicidas en comparación con el recíproco hemicigoto YJM7 (que porta sólo el alelo del parental sensible WE). Este resultado demuestra la participación del gen *RIM15* en la resistencia a maneb y captan, debido a que la presencia del alelo resistente en hemicigosis confiere al híbrido el fenotipo del parental resistente (SA), mientras que el alelo sensible le confiere el fenotipo del parental sensible (WE).

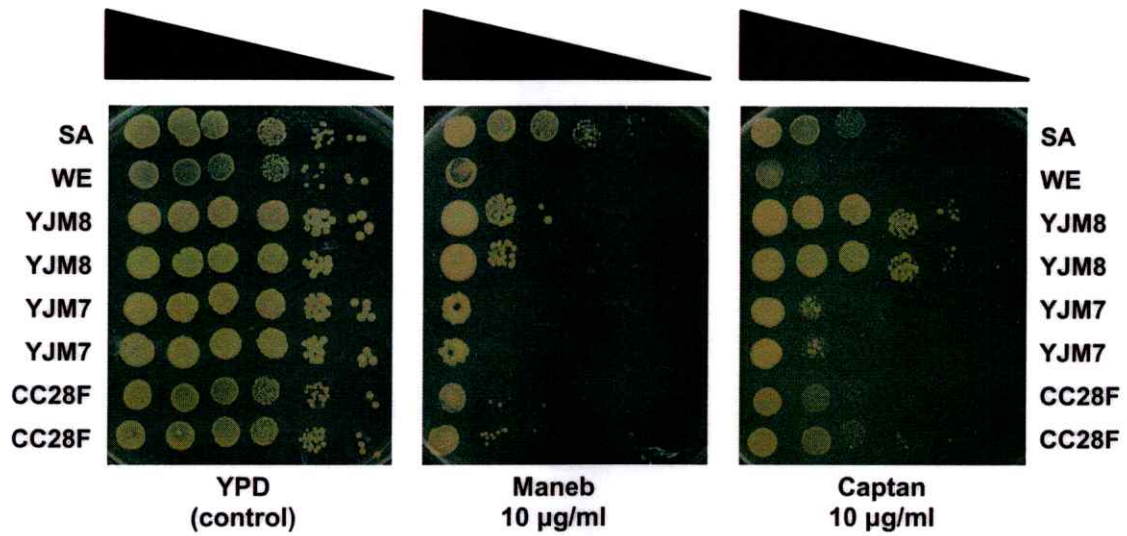


Figura 22. Resistencia diferencial a maneb y captan entre el híbrido y los recíprocos hemicigotos para el gen *RIM15*. Para cada placa las diluciones seriadas de células de levadura se encuentran de izquierda (mayor concentración de células) a derecha (menor concentración de células), lo cual se encuentra representado por los triángulos negros ubicados en la parte superior de la figura. Se encuentran por duplicado tanto el híbrido (CC28F) como el recíproco hemicigoto que tiene el alelo del parental sensible (YJM7) y el recíproco hemicigoto que tiene el alelo del parental resistente (YJM8). También se encuentran los parentales WE (sensible) y SA (resistente).

#### 4. DISCUSIÓN Y PROYECCIONES

Gran parte de los rasgos fenotípicos de un individuo están determinados por múltiples regiones del genoma, además de interacciones gen-gen y gen-ambiente (Mackay y col., 2009), presentando como consecuencia variaciones cuantitativas dentro de una población (Klug y Cummings, 1999). La metodología predominante en estudios de genética cuantitativa para la búsqueda de las bases moleculares que subyacen dichas variaciones es el mapeo por ligamiento de QTLs (Travisano y Shaw, 2013; Massouras y col., 2012). Durante los últimos años, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en un organismo modelo para estudios que implican mapeos de QTLs (Dujon, 2010).

*S. cerevisiae* es además una levadura de importancia a nivel industrial y artesanal, dado su rol en la producción de pan y de diversas bebidas alcohólicas. Uno de sus nichos naturales son los viñedos y el mosto de fermentación, siendo la principal especie responsable de la fermentación alcohólica en el complejo proceso microbiológico que implica la transformación del mosto de uva en vino (Bisson, 1994; Pretorius, 2000). Una práctica industrial enológica habitual es el uso de fungicidas en viñedos, cuyo uso tiene impacto sobre la diversidad de levaduras presentes en las uvas (Milanović y col., 2013). Diversos estudios sobre los efectos de los fungicidas en hongos y levaduras han sido llevados a cabo (Li y col., 1996; Teixeira y col., 2007; Fai y Grant, 2009; Casalone y col., 2010; Shohat-Tal y Eshel, 2011; Vadkertiová y Sláviková, 2011; Milanović y col., 2013), y la existencia de variación natural a los mismos ya ha sido mostrada para el fungicida tiabendazol (Warringer y col., 2011).

Si bien se puede sugerir que la exposición de poblaciones de levaduras a distintos fungicidas ha causado variación natural a nivel fenotípico (mayor resistencia o

sensibilidad), actualmente poco se conoce respecto a las regiones genómicas involucradas en dicha variación. El mapeo por ligamiento de QTLs aparece entonces como una buena aproximación, dado su éxito en encontrar genes que subyacen la variación natural a varios fenotipos tanto en *S. cerevisiae* (Cubillos y col., 2011; Salinas y col., 2012; Jara y col., 2014) como en otras especies del género *Sacharomyces sensu stricto* como lo es *S. paradoxus* (Liti y col., 2009b).

#### **4.1. Estandarización de un método cuantitativo para evaluar diferencias fenotípicas**

Para determinar QTLs, es necesario disponer de un método eficiente de fenotipificación de gran cantidad de segregantes de *S. cerevisiae*. Un avance de gran importancia en este sentido fue el desarrollo de una metodología automatizada para el estudio de perfiles fenotípicos a gran escala utilizando cambios cuantitativos en el crecimiento de levaduras (Warringer y Blomberg, 2003), la cual ha sido utilizada con éxito desde entonces hasta la fecha para estudios de diversa índole (Warringer y col., 2003; Liti y col. 2009a; Warringer y col., 2011; Cubillos y col., 2011; Salinas y col., 2012). Sin embargo, esta técnica requiere ser estandarizada según las necesidades y disponibilidad de recursos puntuales de cada laboratorio. En el presente trabajo fue de importancia fundamental determinar las condiciones óptimas para realizar el microcultivo usado como método de fenotipificación. Esto puede depender tanto del fenotipo a ser estudiado (como en el caso del tiempo total y la temperatura), como también del *software* y el equipo que sean utilizados; un ejemplo claro de esto último es el caso de la agitación. En el trabajo original de Warringer y Blomberg (2003) en que se utilizó un equipo Bioscreen analyser C (Thermic Labsystems Oy, Finlandia) se observó que el modo de agitación es crítico, y que la agitación continua producía

acumulación de células en la periferia de los pocillos, al igual que en el presente trabajo, produciéndose curvas de crecimiento atípicas y no reproducibles. La solución encontrada por ellos y repetida en trabajos posteriores que ocuparon los mismos equipos (Warringer y col., 2003; Warringer y col., 2011; Liti y col. 2009a; Salinas y col., 2012; Cubillos y col., 2011) consistió en realizar una agitación a la mayor intensidad del equipo con un minuto de agitación por cada otro minuto sin agitación, distinto al caso del presente trabajo en que se determinó como lo óptimo el no tener ningún tipo de agitación. Esto reafirma la idea de que la reproducibilidad de la metodología depende de los equipos utilizados y que, por ende, requiere siempre de una estandarización particular que dependa de los mismos.

Además de la determinación de condiciones óptimas de microcultivo, es necesario disponer de un protocolo de tratamiento de datos que permita obtener la mayor cantidad de información de la manera más simple y en el menor tiempo posible. El tratamiento de datos generado originalmente por Warringer y Blomberg (2003), si bien es útil, es también engorroso de llevar a cabo. Varias mejoras se realizaron a dicho protocolo original, como son la utilización de segundas derivadas para obtener el parámetro de adaptación, y de regresiones sigmoideas de las curvas de crecimiento obtenidas. Respecto a esto último, el *software* utilizado (GraphPad Prism) incluye varias opciones de regresiones sigmoideas (Motulsky, 2007), entre las cuales la llamada *Sigmoideal dose-response(variable slope)* fue la que mejor se ajustó a la gran mayoría de las curvas generadas durante el presente trabajo y, por ende, fue la utilizada. La generación de nuevas ecuaciones que den cuenta de regresiones modeladas específicamente para ajustarse al crecimiento de *S. cerevisiae* sería un importante avance para obtener resultados que reflejen de forma más precisa las

cinéticas de crecimiento obtenidas, más aún si dichas ecuaciones pueden ser utilizadas en *softwares* científicos como son GraphPad Prism, SigmaPlot, Origin, R, y otros. Un ejemplo de lo anterior es la ecuación conocida como *the beta growth function*, la cual fue generada para el estudio del crecimiento de cultivos en agricultura, y que se encuentra disponible para su uso en GraphPad Prism (Yin y col., 2003).

#### **4.2. Evaluación de resistencia a fungicidas en cepas parentales y poblaciones recombinantes**

Al evaluar las cepas parentales utilizadas, representativas de cuatro de los cinco linajes puros descritos para *S. cerevisiae* (Litti y col., 2009), se observaron diferencias de resistencia a los fungicidas en estudio seleccionados (tiabendazol, maneb y captan). Las concentraciones determinadas para cada fungicida están en concordancia con los  $IC_{50}$  que se encuentran reportados para dichos fungicidas (Fai y Grant, 2009). Éstas concentraciones son un orden de magnitud mayor para tiabendazol, lo cual concuerda con que este fungicida presenta un alto riesgo de resistencia debido a que es un inhibidor de sitio único, mientras que los otros dos fungicidas presentan bajo riesgo de resistencia al tener actividad de contacto multisitio (Fishel y Dewdney, 2012). Sin embargo, dichas concentraciones debieron ser reducidas en microcultivo, debido probablemente a diferencias en la biodisponibilidad de los fungicidas entre las dos condiciones de cultivo.

Al realizar las fenotipificaciones en poblaciones recombinantes, tanto en medio sólido como en microcultivo, se observaron diferencias significativas de crecimiento, encontrando individuos altamente resistentes o sensibles para cada fungicida. La resistencia a fungicidas en poblaciones recombinantes presentó distribuciones



continuas en ambas condiciones de cultivo, tal como ya había encontrado Warringer y col. (2011) para tiabendazol en microcultivo, lo cual confirmó el carácter poligénico del rasgo en estudio (Klug y Cummings, 1999). En el caso del microcultivo, esto se cumplió para los tres parámetros asociados al crecimiento en estudio (eficiencia, adaptación y velocidad máxima).

#### **4.3. Correlación entre parámetros asociados al crecimiento**

La metodología de fenotipificación en microcultivo permitió realizar el estudio por separado de los tres parámetros asociados al crecimiento y evaluar la existencia de asociaciones entre ellos. El análisis estadístico reveló que existe una fuerte correlación entre eficiencia y velocidad máxima, pero no entre adaptación y eficiencia, ni entre adaptación y velocidad máxima, lo cual fue refrendado al comparar las varianzas poblacionales obtenidas.

Éstos resultados confirman los obtenidos por Warringer y col. (2011), quienes encontraron una fuerte correlación entre eficiencia y velocidad máxima, mientras que no encontraron correlación entre la adaptación con ninguno de los otros dos parámetros estudiados. En dicho estudio además se determinó que la correlación existente entre eficiencia y velocidad máxima depende fuertemente del ambiente más que ser limitada únicamente por el rendimiento en biomasa como ha sido sugerido en otros trabajos (Wong y col., 2009). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están también en línea con informes sobre mutantes de pérdida de función artificiales en *S. cerevisiae* (Bell, 2010), con lo cual se refuta la hipótesis respecto a una compensación evolutiva entre tasa y eficiencia de proliferación (Novak y col., 2006). Lo anterior sugiere que la eficiencia y la velocidad máxima tienen estructuras genéticas

subyacentes similares, mientras que son distintas fisiológica y evolutivamente con la adaptación (Warringer y col., 2011).

#### **4.4. QTLs obtenidos para la resistencia a fungicidas**

Diversos QTLs que subyacen la variación natural a fungicidas en *S. cerevisiae* fueron obtenidos durante el presente trabajo, encontrándose distintos conjuntos de QTLs con los dos métodos de fenotipificación llevados a cabo. La metodología de fenotipificación por microcultivo tiene la ventaja de agregar mayor precisión al ser un método cuantitativo, lo cual se vio reflejado en la obtención de un mayor número de QTLs. Sumado a ello, permitió obtener QTLs para los tres parámetros asociados al crecimiento estudiados por separado, los cuales coincidieron en mayor medida entre eficiencia y velocidad máxima, reafirmando la asociación existente entre ambos parámetros. De todos los QTLs encontrados, el QTL VI.65 fue identificado como el más interesante para ser estudiado, ya que explica por si solo un alto porcentaje de las varianzas fenotípicas observadas para la resistencia a maneb y captan tanto en microcultivo como en especial en medio sólido, lo cual sugiere que en dicha región genómica se encuentra un gen de efecto mayor respecto a la resistencia a ambos fungicidas.

Aun cuando fue posible identificar con éxito una serie de QTLs responsables de la resistencia a los fungicidas evaluados, entre ellos el VI.65 como el más preponderante, éstos no representan necesariamente a todos los QTLs posibles de encontrar. Al observar las varianzas fenotípicas explicadas por lo modelos generados para cada caso, estas llegan como máximo a un 58,5% para captan 20 µg/ml en medio sólido (tabla 6c). El resto de la varianza fenotípica no explicada por los QTLs encontrados en

cada situación puede estar dada por interacciones con el ambiente, interacciones génicas, u otros QTLs no identificados (Mackay y col., 2009).

Respecto a la posibilidad de que existan interacciones génicas, y si bien no pudo identificarse ninguna en medio sólido, sí se encontraron algunas entre los QTLs obtenidos en microcultivo, explicando entre 3,1% y hasta el 6,3% de la varianza fenotípica. Sin embargo, algunas interacciones pueden escapar al análisis llevado a cabo. En particular, cabe destacar el rol central que pueden llegar a cumplir los efectos epistáticos, los cuales si bien son comunes entre las mutaciones que afectan a un mismo rasgo cuantitativo, y pueden llegar a ser tan grandes como los de los QTLs principales, muchas veces son estadísticamente difíciles de detectar incluso en organismos modelos por tener efectos marginales pequeños (Mackay y col., 2009).

Por su parte, respecto a la posibilidad de que existan otros QTLs no identificados que subyacen el fenotipo en cuestión, hay que hacer notar que la estrategia llevada a cabo se basa en que existan diferencias alélicas entre las cepas parentales del cruce evaluado y que, por ende, si existe un gen importante para la resistencia a un fungicida pero que no posee diferencias a nivel de secuencia entre ambas cepas, este gen no podrá ser encontrado en el análisis. De lo anterior se desprende que el evaluar distintos cruces podría llevar a la identificación de nuevos QTLs también involucrados en la variación natural al fenotipo en cuestión, y que es una posibilidad para posteriores trabajos de la misma línea que el presente. Lo anterior remarca también la necesidad de utilizar cepas parentales que posean la mayor diferencia genética posible entre ellas. Las cepas de laboratorio sólo capturan una pequeña fracción de la variación fenotípica presente en poblaciones naturales por lo cual, si bien han sido útiles en el mapeo de loci causantes de algunas características, proporcionan una pobre

comprensión de la relación entre el fondo genético y los QTLs, subestimando la compleja arquitectura genética de los rasgos poligénicos en levaduras (Cubillos y col., 2011). Es por ello que la utilización de cepas representativas de linajes puros identificados por el Proyecto de Resecuenciación del Genoma de *Saccharomyces* (SGRP) (Liti y col., 2009a) es una poderosa herramienta para estudiar la variación natural en *S. cerevisiae*, como lo fue en el presente trabajo para la exitosa identificación de QTLs que subyacen la variación natural de resistencia a fungicidas.

#### **4.5. Diferencias entre resultados obtenidos en medio sólido y microcultivo**

Como se mencionó anteriormente, diferentes resultados se obtuvieron en medio sólido y en microcultivo. Una de las posibles razones que explicaría este hecho es la diferencia entre los medios de cultivo utilizados. Las células de levadura crecen a mayor velocidad en presencia de medio rico, el cual les proporciona muchos de los metabolitos que deben sintetizar cuando se cultivan bajo condiciones de crecimiento mínimos (Bergman, 2001; Saghbini y col., 2001), por lo cual la utilización de éste último podría causar *per se* una situación de estrés celular. Sin embargo, su uso permite la identificación de QTLs con pequeños efectos que en medio completo no sería posible observar. Lo anterior fue estudiado por Thatcher y col. (1998), quienes determinaron que si bien se estima que alrededor del 60% de los mutantes de delección exhiben una reducción marginal del *fitness*, para el 20% de los mutantes no se observa cambio alguno en el *fitness* marginal durante el cultivo en medio rico. Esto podría dar cuenta del mayor número de QTLs encontrados para maneb y captan en microcultivo que en medio sólido, validando así el arreglo experimental utilizado.

Por otra parte, es importante hacer notar que la condición misma de crecimiento en microcultivo corresponde a una situación de estrés para las células. El cultivo en un

volumen pequeño de 200  $\mu$ l lleva a un cambio en la fisiología celular, probablemente debido a una limitación de oxígeno y nutrientes (propiciadas además por la falta de agitación), lo cual resulta a su vez en una menor respiración y una menor eficiencia en la utilización de fuente de carbono y energía, y un impacto en el balance redox (Warringer y Blomberg, 2003). Es entonces de esperar que se encuentren diferencias no sólo con el medio sólido sino que también con cultivos líquidos en volúmenes mayores, lo que debe tenerse en cuenta cuando se comparen resultados obtenidos.

Lo anterior queda de manifiesto al observar lo ocurrido al realizar el análisis de ligamiento a los respectivos controles, ya que si bien en medio sólido no se identificó ningún QTL, en el control WExSA en microcultivo sí se obtuvieron. En el caso del QTL VI.65, el cual fue observado tanto para dicho control como para las condiciones con fungicida (aunque comparativamente con *LOD scores* menores en el caso del control), esta situación sugiere que dicho QTL podría estar implicado tanto en fenotipos de resistencia a fungicidas como en fenotipos de tolerancia a estrés. Las razones antes expuestas apuntan a que, si bien la metodología de fenotipificación utilizando microcultivos genera una condición de estrés en las células la cual hay que tener en consideración al momento de interpretar los resultados obtenidos, aún así es una forma eficaz, y sobre todo más eficiente, a la hora de mapear QTLs.

#### **4.6. Mecanismos de acción de fungicidas y genes causales candidatos de la resistencia a ellos**

##### **4.6.1. Tiabendazol**

Los fungicidas de la clase benzimidazol actúan sobre la biosíntesis de  $\beta$ -tubulina, inhibiendo el ensamblaje de esta durante la mitosis a través de interacciones

benzimidazol-tubulina (Li y col., 1996; Fishel y Dewdney, 2012), por lo cual han sido utilizados para producir pérdidas de cromosomas durante la mitosis (Wood, 1982) y en estudios de reguladores del ciclo celular que interactúan con vías que modulan la estabilidad de microtúbulos (Shohat-Tal y Eshel, 2011). También han sido estudiados sus efectos en otras levaduras distantes evolutivamente, como es el caso de *Schizosaccharomyces pombe* (Monahan y col., 2008; Ukimori y col., 2012). Sin embargo, ningún gen relacionado con la biosíntesis de  $\beta$ -tubulina pudo ser identificado como el locus causal del único QTL identificado para tiabendazol (XI.322).

#### **4.6.2. Maneb**

Poco se sabe acerca del modo y blancos de acción de los fungicidas de la clase ditiocarbamato, más allá de que presentan actividad de contacto multisitio (Fishel y Dewdney, 2012). Un fungicida de esta clase que guarda estrecha similitud molecular con mane b es mancozeb, el que se postula es metabolizado a un radical isotiocianato que inactiva el grupo sulfhidrilo en algunos aminoácidos, lo cual afecta la actividad de proteínas susceptibles, entre las que pueden encontrarse algunas relacionadas con el metabolismo lipídico (Teixeira y col., 2007). Respecto a tiram, otro fungicida de la misma clase, ha sido reportado como un agente pro-oxidante, principalmente por su reactividad tiol (Dias y col., 2010), causando estrés oxidativo y una rápida disminución del contenido de glutatión en *S. cerevisiae* (Elskens y Penninckx, 1997).

Existen trabajos en que se han determinado genes responsables de la resistencia a mancozeb, identificándose una pequeña red de factores de transcripción (Yap1p y Rpn4p) y transportadores de múltiples fármacos de membrana plasmática (Flr1p y Tpo1p) (Teixeira y col., 2007; Dias y col., 2010). De entre ellos, el gen *FLR1* (YBR008C) codifica un miembro de membrana plasmática de la familia de *H<sup>+</sup>-drug*

*antiporters* de 12 segmentos (DHA12) de la superfamilia facilitadora principal (MFS) (Sá-Correira y Tenreiro, 2002), el cual se encuentra involucrado en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos (Alarco y col., 1997; Brôco y col., 1999; Nguyen y col., 2001; Tenreiro y col., 2001). Este gen se encontraría involucrado en la resistencia a mancozeb mediante su regulación positiva bajo el control coordinado de las proteínas Yap1p, Rpn4p, Pdr3p e Yrr1p (Teixeira y col., 2007; Monteiro y col., 2011).

Datos preliminares del laboratorio han mostrado que con mancozeb y maneb se obtiene resultados similares. En este contexto, el gen *FLR1* que se encuentra aproximadamente en la posición II.253 podría ser un buen candidato para ser el locus causal del QTL II.308 encontrado en el presente trabajo. Al comparar las secuencias aminoacídicas de la proteína Flr1p de las cepas DBVPG6765 (WE) y Y12 (SA), se observa que existen cuatro sustituciones aminoacídicas conservativas y una no conservativa. Por su parte, el gen *PDR3* (YBL005W) también se encuentra en una posición cercana (II.219), existiendo cuatro sustituciones aminoacídicas conservativas entre las cepas, por lo cual si bien el gen *FLR1* parece un mejor candidato, no se puede descartar del todo al gen *PDR3*. Respecto a los genes que codifican las otras proteínas involucradas, ninguno de ellos se encuentra cercano a alguno de los QTLs identificados. La validación de los genes candidatos *FLR1* y/o *PDR3* por medio de, por ejemplo, un análisis de hemicigosidad recíproca, podría aportar una nueva confirmación de la importancia de dichos genes en la resistencia a fungicidas de la clase ditiocarbamato, en particular a maneb.

#### **4.6.3. Captan**

Los fungicidas de la clase ftalimida también presentan actividad de contacto multisitio (Fishel y Dewdney, 2012). En el caso de captan, éste puede implicar su

degradación en tiofosgeno, el cual es altamente reactivo con tioles y otros grupos funcionales (Gordon, 2001). También ha sido propuesto que su modo de acción principal resulta de la reacción con grupos sulfhidrilo (Lukens, 1969), reduciendo la germinación de esporas de hongos, el crecimiento y el consumo de oxígeno (Owens y Novotny, 1959; Richmond y Somers, 1963). Ningún gen se encuentra identificado como responsable de la resistencia a captan en *S. cerevisiae*. En el presente trabajo se encontraron una serie de QTLs entre los cuales el QTL VI.65 presentó los mayores porcentajes de varianza fenotípica explicada tanto en medio sólido como en microcultivo, y para el cual se identificó al gen *RIM15* como el probable locus causal.

#### **4.7. Identificación de *RIM15* como un gen involucrado en la resistencia a maneb y captan**

En un mapeo por ligamiento el locus causal sólo puede ser asignado a una región de gran tamaño, pudiendo identificarse dentro de ella posibles genes candidatos (Mackay y col., 2009). En levaduras, el análisis de hemicigosidad recíproca se utiliza para comprobar la participación de un gen candidato, ya que se puede controlar cualquier interacción con el fondo genético, incluyendo la dominancia dependiente de éste fondo, mediante la comparación de dos cepas híbridas que sólo se diferencian por el alelo presente en un único locus hemicigoto (el cual corresponde al gen de interés) (Steinmetz y col., 2002). Lo anterior se debe a que no se espera que existan diferencias fenotípicas como resultado de las interacciones entre la dominancia de la delección (haploinsuficiencia) y el fondo genético del híbrido porque ambos hemicigotos tienen un fondo genético fijo, excepto en el locus de interés (Kim y col., 2012). Esta estrategia fue utilizada para comprobar la participación del gen *RIM15*, identificado como el locus causal del QTL VI.65, en la resistencia a maneb y captan. Este análisis



reveló que el alelo resistente en hemicigosis confiere al híbrido el fenotipo del parental resistente (SA), mientras que el alelo sensible le confiere el fenotipo del parental sensible (WE). Este resultado obtenido en medio sólido ha sido confirmado también en microcultivo en el laboratorio tras la finalización del presente trabajo (Cubillos, comunicación personal).

El gen *RIM15* codifica una proteína quinasa serina/treonina (Rim15p) que se sugiere participa en la regulación de la división celular, proliferación, y esporulación en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, rasgos que se consideran altamente relacionados con el *fitness* en *S. cerevisiae* (Broach, 2012; Bergström y col., 2014). Como se discutió previamente, los resultados del presente trabajo apuntan a que este gen podría estar involucrado no sólo en la resistencia a los fungicidas maneb y captan en particular, sino también en la adquisición de tolerancia al estrés en general, sobre todo considerando que estos dos fungicidas tienen actividad del tipo contacto multisitio y que, por ende, tienen variados blancos de acción (Fishel y Dewdney, 2012). La proteína Rim15p estaría relacionada con la entrada al estado de quiescencia, siendo la adquisición de tolerancia al estrés una de las características más sobresalientes de las células de levadura cuando entran en este estado (Watanabe y col., 2012). Esta respuesta se da mediante la vía de Ras/PKA, la cual desempeña un papel central en la regulación del crecimiento *versus* quiescencia en respuesta a la calidad y cantidad de la fuente de carbono disponible, principalmente mediante la estimulación de la acumulación de masa y la inhibición de la respuesta al estrés (Broach, 2012). Sumado a esto, los mutantes de *RIM15* son particularmente sensibles a la inanición de nitrógeno (Pedruzzi y col., 2003; Klosinska y col., 2011), lo cual también está en línea con lo planteado.

Durante el tiempo en que se desarrolló el presente trabajo fueron publicados los resultados del trabajo de Bergström y col. (2014), los cuales se enmarcan dentro del Proyecto de Resecuenciación del Genoma de *Saccharomyces* (SGRP) siguiendo el trabajo desarrollado anteriormente por Liti y col. (2009a). En dicho trabajo se secuenciaron 42 cepas de *S. cerevisiae* y de su pariente más cercano *S. paradoxus*, en las cuales se estudiaron las implicaciones fenotípicas de la variación natural de pérdida de función en poblaciones naturales de dichas especies de levaduras. En este contexto, los autores encontraron como un interesante caso de estudio para las implicaciones fenotípicas derivadas de la pérdida de la función al gen *RIM15*, en el cual identificaron la inserción de dos pares de bases en la cepa DBVPG6765 (WE). Esta variante no se encuentra presente en otras cepas representativas del linaje WE ni de los otros linajes de *S. cerevisiae*, como tampoco en la cepa referencia de *S. paradoxus* (CBS432). Debido a que, como ya se mencionó, se especula que la proteína Rim15p participa en la regulación de la división celular, proliferación, y esporulación en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Broach, 2012), los autores estudiaron si dicha variante afecta estos procesos celulares mediante la estrategia de recíprocos hemicigotos utilizando los híbridos DBVPG6765xYPS128, DBVPG6765xY12 y DBVPG6765xDBVPG6044 (mismas cepas utilizadas en el presente trabajo como representativas de los linajes NA, SA y WA, respectivamente). El resultado obtenido, para todos los casos, fue que el alelo DBVPG6765 del gen *RIM15* tiene un impacto negativo en la capacidad de la célula de entrar en meiosis y formar esporas en respuesta a carencia de nutrientes.

Adicionalmente, se ha observado selección contra el alelo de la cepa DBVPG6765 en la región genómica que contiene a *RIM15* durante la generación de la población

tetraparental SGRP-4X (Cubillos y col., 2013). También se ha encontrado un bajo nivel de expresión de *RIM15* en esta cepa en estudios que han utilizado la técnica de RNA-seq (Skelly y col., 2013). Curiosamente, una variante de pérdida de función en *RIM15* distinta a la portada por la cepa DBVPG6765 se ha descrito en un grupo de cepas de levadura modernas del linaje SA conocido como el "grupo K7" (Azumi y Goto-Yamamoto, 2001), vinculada a una disminución de la capacidad para entrar en quiescencia y un aumento asociado de la tasa de producción de etanol (Watanabe y col., 2012). La cepa Y12 (SA) utilizada en el presente trabajo no pertenece al grupo K7 ni presenta dicha variante de pérdida de función. Respecto al alelo que porta la cepa DBVPG6765, los estudios muestran que ésta tiene efectos fuertemente negativos sobre rasgos que se consideran altamente relacionados con el *fitness*, a los cuales se le suma en el presente trabajo el atribuirle un rol mayor en la sensibilidad a los fungicidas maneb y captan. Esto hace necesario realizar más estudios que permitan dilucidar por qué esta cepa de *S. cerevisiae* porta dicha variante no funcional altamente deletérea.

#### **4.8. Proyecciones**

El presente trabajo posee amplias proyecciones para estudios genómicos y de mapeo de QTLs en *S. cerevisiae*. En primer lugar, el método cuantitativo estandarizado de fenotipificación en microcultivo demostró ser eficaz y eficiente para la búsqueda de QTLs que subyacen la variación natural en *S. cerevisiae*, como la resistencia a fungicidas, lo cual lo posiciona como una herramienta útil para posteriores estudios del mismo tipo. Además, se confirmó que cepas de diversos linajes de *S. cerevisiae* presentan diferencias en la resistencia a los fungicidas en estudio, observándose también diferencias significativas en las poblaciones recombinantes, y confirmando que

la resistencia a fungicidas tiene un carácter poligénico al presentarse distribuciones continuas tanto en medio sólido como en microcultivo. Además, se encontró una fuerte asociación entre los parámetros de eficiencia y velocidad máxima, lo cual apoya la hipótesis que ambos parámetros asociados al crecimiento tienen estructuras genéticas subyacentes similares, mientras que son distintas fisiológica y evolutivamente con la adaptación, refutando una posible compensación evolutiva entre tasa y eficiencia de proliferación.

Los resultados obtenidos también ofrecen proyecciones en las áreas de la industria y la biotecnología. Estudios previos ya han mostrado que el análisis poligénico de la biodiversidad en levaduras puede proporcionar importantes herramientas genéticas para realizar ingeniería metabólica (Hubmann y col., 2013a). Ejemplo de lo anterior es el análisis de capacidad máxima de acumulación de etanol y tolerancia a altos niveles del mismo (Pais y col., 2013) en conjunto con la identificación de alelos múltiples que interactúan confiriendo alto rendimiento de etanol y bajo de glicerol en la fermentación alcohólica (Hubmann y col., 2013b), estudios que han mostrado su potencial aplicación industrial para la producción de bioetanol. En el caso del presente trabajo, la identificación de *RIM15* como un gen relacionado con la variación natural de resistencia a fungicidas en particular y posiblemente también con la tolerancia a estrés, lo colocan como un candidato para selección asistida por marcadores y/o ingeniería metabólica, en particular para la industria vitivinícola. Lo anterior remarca la utilidad que tiene la estrategia de mapeo de QTLs para la obtención de loci que son responsables de la variación natural y subyacen fenotipos de interés en estudios tanto de ciencia básica como aplicada.

## CONCLUSIONES

- Cepas de diversos linajes de *S. cerevisiae* presentan diferencias de resistencia a los fungicidas en estudio. Las cepas YPS128 (NA) y DBVPG6765 (WE) exhibieron mayor resistencia a tiabendazol, Y12 (SA) e YPS128 (NA) a captan, e Y12 (SA) a maneb.
- Las poblaciones recombinantes estudiadas exhiben diferencias significativas de resistencia a fungicidas, existiendo individuos altamente resistentes o sensibles para cada fungicida evaluado.
- La resistencia a fungicidas en poblaciones recombinantes presenta distribuciones continuas tanto en medio sólido como en microcultivo, demostrando el carácter poligénico del rasgo en estudio.
- Existe una fuerte asociación entre los parámetros asociados al crecimiento de eficiencia y velocidad máxima, pero no entre adaptación y eficiencia, ni entre adaptación y velocidad máxima, sugiriendo que eficiencia y velocidad máxima tienen estructuras genéticas subyacentes similares, mientras que son distintas fisiológica y evolutivamente con la adaptación.
- El método de fenotipificación en microcultivo demostró ser eficaz para la búsqueda de QTLs que subyacen la variación natural de resistencia a fungicidas.
- Diversos QTLs subyacen la variación natural de resistencia a fungicidas, destacando el QTL VI.65 como el más importante entre ellos.
- El gen *RIM15* sería uno de los genes responsables de la variación natural de resistencia a los fungicidas maneb y captan en *S. cerevisiae*.

## REFERENCIAS

- Alarco, A.M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N., Raymond, M. 1997. AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J Biol Chem.* 272:19304-13.
- Azumi, M., Goto-Yamamoto, N. 2001. AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast.* 18:1145-1154.
- Bell, G. 2010. Experimental genomics of fitness in yeast. *Proc Biol Sci.* 277:1459-1467.
- Bergman, L.W. 2001. Growth and Maintenance of Yeast. *En* P.N. MacDonald (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 177, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols. pp. 9-14. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Bergström, A., Simpson, J.T., Salinas, F., Barré, B., Parts, L., Zia, A., Nguyen Ba, A.N., Moses, A.M., Louis, E.J., Mustonen, V., Warringer, J., Durbin, R., Liti, G. 2014. A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Mol Biol Evol.* 31:872-88.
- Bisson, L.F. 1994. The biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnol.* 18:63-96.
- Brent, K. J., Hollomon, D. W. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed? Online ed, 2<sup>nd</sup> rev. Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), CropLife Int'l., Brussels.
- Broach, J.R. 2012. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* 192:73-105.
- Brôco, N., Tenreiro, S., Viegas, C.A., Sá-Correia, I. 1999. FLR1 gene (ORF YBR008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on pdr3 transcriptional regulator. *Yeast.* 15:1595-608.
- Broman, K.W., Wu, H., Sen, S., Churchill, G.A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics.* 19:889-90.
- Broman, K.W., Sen, S. 2009. *A Guide to QTL Mapping with R/qtl.* 1<sup>th</sup> ed. pp 258-267. Springer, New York.
- Canals, M. 2010. Curso de estadística universitaria. pp 77-89, 135-136. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Casalone, E., Bonelli, E., Polsinelli, M. 2010. Effects of mancozeb and other dithiocarbamate fungicides on *Saccharomyces cerevisiae*: the role of mitochondrial petite mutants in dithiocarbamate tolerance. *Folia Microbiol (Praha).* 55:593-7.

Churchill, G.A., Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*. 138:963-71.

CONICYT (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica). 2007. El sector vitivinícola en Chile. Capacidades de investigación y áreas de desarrollo científico-tecnológico. Salviat Impresores S.A., Santiago de Chile.

Cubillos, F.A., Vásquez, C., Faugeron, S., Ganga, A., Martínez, C. 2009a. Self-fertilization is the main sexual reproduction mechanism in native wine yeast populations. *FEMS Microbiol Ecol*. 67:162-70.

Cubillos, F.A., Louis, E.J., Liti, G. 2009b. Generation of a large set of genetically tractable haploid and diploid *Saccharomyces* strains. *FEMS Yeast Res*. 9:1217-25.

Cubillos, F.A., Billi, E., Zörgö, E., Parts, L., Fargier, P., Omholt, S., Blomberg, A., Warringer, J., Louis, E.J., Liti, G. 2011. Assessing the complex architecture of polygenic traits in diverged yeast populations. *Mol Ecol*. 20:1401-13.

Cubillos, F.A., Parts, L., Salinas, F., Bergström, A., Scovacricchi, E., Zia, A., Illingworth, C.J., Mustonen, V., Ibstedt, S., Warringer, J., Louis, E.J., Durbin, R., Liti, G. 2013. High-resolution mapping of complex traits with a four-parent advanced intercross yeast population. *Genetics*. 195:1141-55.

Demogines, A., Smith, E., Kruglyak, L., Alani E. 2008. Identification and dissection of a complex DNA repair sensitivity phenotype in Baker's yeast. *PLoS Genet*. 4:e1000123.

Dias, P.J., Teixeira, M.C., Telo, J.P., Sá-Correia, I. 2010. Insights into the mechanisms of toxicity and tolerance to the agricultural fungicide mancozeb in yeast, as suggested by a chemogenomic approach. *OMICS*. 14:211-27.

Dujon, B. 2010. Yeast evolutionary genomics. *Nat Rev Genet*. 11:512-24.

Elskens, M.T., Penninckx, M.J. 1997. Thiram and dimethyldithiocarbamic acid interconversion in *Saccharomyces cerevisiae*: a possible metabolic pathway under the control of the glutathione redox cycle. *Appl Environ Microbiol*. 63:2857-62.

Fai, P.B., Grant, A. 2009. A rapid resazurin bioassay for assessing the toxicity of fungicides. *Chemosphere*. 74:1165-70.

Fay, J.C., Benavides, J.A. 2005. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*1:66-71.

Fishel, F.M., Dewdney, M.M. 2012. Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification Scheme of Fungicides According to Mode of Action. Pesticide Information Office, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. PI94.

Flint, J., Mackay, T.F. 2009. Genetic architecture of quantitative traits in mice, flies, and humans. *Genome Res*. 19:723-33.

Gardner, E.J., Simmons, M.J., Snustad, D.P. 1991. Principles of genetics. 8<sup>th</sup> ed. pp 562-563. John Willey & sons, New York.

Gordon, E. B. 2001. Captan and Folpet; Handbook of Pesticide Toxicology: Volume 2, Agents. 2<sup>nd</sup> ed. En Kreiger, R. (ed). pp. 1711- 1742. Academic Press, Inc, San Diego, California.

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. 1996. An introduction to genetic analysis. 6<sup>th</sup> ed. pp 841-842. W. H. Freeman and Company, New York.

Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., Guillamón, J.M. 2013. Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. PLoS One. 8:e67166.

Hill, W.G. 2005. Genetics. A century of corn selection. Science. 307:683-4.

Hill, W.G. 2010. Understanding and using quantitative genetic variation. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 365:73-85.

Horsfall, J.G. 1975. Fungi and fungicides: The story of a nonconformist. Annu Rev Phytopathol. 13:1-14.

Hubmann, G., Foulquié-Moreno, M.R., Nevoigt, E., Duitama, J., Meurens, N., Pais, T.M., Mathé, L., Saerens, S., Nguyen, H.T., Swinnen, S., Verstrepen, K.J., Concilio, L., de Troostembergh, J.C., Thevelein, J.M. 2013a. Quantitative trait analysis of yeast biodiversity yields novel gene tools for metabolic engineering. Metab Eng. 17:68-81.

Hubmann, G., Mathé, L., Foulquié-Moreno, M.R., Duitama, J., Nevoigt, E., Thevelein, J.M. 2013b. Identification of multiple interacting alleles conferring low glycerol and high ethanol yield in *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation. Biotechnol Biofuels. 6:87.

Jara, M., Cubillos, F.A., García, V., Salinas, F., Aguilera, O., Liti, G., Martínez, C. 2014. Mapping genetic variants underlying differences in the central nitrogen metabolism in fermenter yeasts. PLoS One. 9:e86533.

Kim, H.S., Huh, J., Riles, L., Reyes, A., Fay, J.C. 2012. A noncomplementation screen for quantitative trait alleles in *Saccharomyces cerevisiae*. G3 (Bethesda). 2:753-60.

Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D., Broach, J.R. 2011. Yeast cells can access distinct quiescent states. Genes Dev. 25:336-349.

Klug, W.S., Cummings, M.R. 1999. Conceptos de genética. 5<sup>a</sup> ed. pp 99-104. Prentice Hall Iberia, Madrid.

Lander, E.S., Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics. 121:185-99.



- Li, J., Katiyar, S.K., Edlind, T.D. 1996 . Site-directed mutagenesis of *Saccharomyces cerevisiae* beta-tubulin: interaction between residue 167 and benzimidazole compounds. FEBS Lett. 385:7-10.
- Li, J., Wang, L., Wu, X., Fang, O., Wang, L., Lu, C., Yang, S., Hu, X., Luo, Z. 2013. Polygenic molecular architecture underlying non-sexual cell aggregation in budding yeast. DNA Res. 20:55-66.
- Liti, G., Barton, D.B., Louis, E.J. 2006. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. Genetics. 174:839-50.
- Liti, G., Carter, D.M., Moses, A.M., Warringer, J., Parts, L., James, S.A., Davey, R.P., Roberts, I.N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I.J., Bergman, C.M., Bensasson, D., O'Kelly, M.J., van Oudenaarden, A., Barton, D.B., Bailes, E., Nguyen, A.N., Jones, M., Quail, M.A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R., Louis, E.J. 2009a. Population genomics of domestic and wild yeasts. Nature. 458:337-41.
- Liti, G., Haricharan, S., Cubillos, F.A., Tierney, A.L., Sharp, S., Bertuch, A.A., Parts, L., Bailes, E., Louis, E.J. 2009b. Segregating YKU80 and TLC1 alleles underlying natural variation in telomere properties in wild yeast. PLoS Genet. 5:e1000659.
- Lukens, R.J. 1969. Heterocyclic nitrogen compounds. In: Fungicides: An advanced treatise. Volume II, Chemistry and physiology. D.C. Torgeson, ed. Academic Press, New York.
- Mackay, T.F., Stone, E.A., Ayroles, J.F. 2009. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. Nat Rev Genet. 10:565-77.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª ed. pp 475-477. Pearson educación, Madrid.
- Massouras, A., Waszak, S.M., Albarca-Aguilera, M., Hens, K., Holcombe, W., Ayroles, J.F., Dermitzakis, E.T., Stone, E.A., Jensen, J.D., Mackay, T.F., Deplancke, B. 2012. Genomic variation and its impact on gene expression in *Drosophila melanogaster*. PLoS Genet. 8:e1003055.
- Milanović, V., Comitini, F., Ciani, M. 2013. Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. Int J Food Microbiol. 161:240-6.
- Monahan, B.J., Villén, J., Marguerat, S., Bähler, J., Gygi, S.P., Winston, F. 2008. Fission yeast SWI/SNF and RSC complexes show compositional and functional differences from budding yeast. Nat Struct Mol Biol. 15:873-80.
- Monteiro, P.T., Dias, P.J., Ropers, D., Oliveira, A.L., Sá-Correia, I., Teixeira, M.C., Freitas, A.T. 2011. Qualitative modelling and formal verification of the FLR1 gene mancozeb response in *Saccharomyces cerevisiae*. IET Syst Biol. 5:308-16.
- Morton, N.E. 1955. Sequential tests for the detection of linkage. Am J Hum Genet. 7: 277-318.

Morton, V., Staub, T. 2008. A Short History of Fungicides. Online, APSnet Features. doi: 10.1094/APSnetFeature-2008-0308.

Motulsky, H.J. 2007. Prism 5 Statistics Guide. GraphPad Software Inc.. San Diego CA. [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2006. Lehninger. Principios de bioquímica. 4ª ed. pp 107-110. Editorial Omega, Barcelona.

Nguyên, D.T., Alarco, A.M., Raymond, M. 2001. Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem.* 276:1138-45.

Nordborg, M., Weigel, D. 2008. Next-generation genetics in plants. *Nature.* 456:720-3.

Novak, M., Pfeiffer, T., Lenski, R.E., Sauer, U., Bonhoeffer, S. 2006. Experimental tests for an evolutionary trade-off between growth rate and yield in *E. coli*. *Am Nat.* 168:242-251.

Owens, R.G., Novotny, H.M.. 1959. Mechanisms of action of the fungicide captan [N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide]. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* 20:171-190.

Pais, T.M., Foulquié-Moreno, M.R., Hubmann, G., Duitama, J., Swinnen, S., Goovaerts, A., Yang, Y., Dumortier, F., Thevelein, J.M. 2013. Comparative polygenic analysis of maximal ethanol accumulation capacity and tolerance to high ethanol levels of cell proliferation in yeast. *PLoS Genet.* 9:e1003548.

Pedruzzi, I., Dubouloz, F., Cameroni, E., Wanke, V., Roosen, J., Winderickx, J., De Virgilio, C. 2003. TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell.* 12:1607-13.

Pretorius, I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast.* 16:675-729.

R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Richmond, D.V., Somers, E. 1963. Studies on the fungitoxicity of captan. III. Relation between the sulfhydryl content of fungal spores and their uptake of captan. *Ann. Appl. Biol.* 52:327-336.

Rockman, M.V. 2012. The QTN program and the alleles that matter for evolution: all that's gold does not glitter. *Evolution.* 66:1-17.

Russell, P.E. 2005. A century of fungicide evolution. *J Agric Sci.* 143:11-25.

Sá-Correia, I., Tenreiro, S. 2002. The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *J Biotechnol.* 98:215-26.

Sagbini, M., Hoekstra, D., Gautsch, J. 2001. Media Formulations for Various Two-Hybrid Systems. *En P.N. MacDonald (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 177, Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols.* pp. 15-39. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Salinas, F., Cubillos, F.A., Soto, D., Garcia, V., Bergström, A., Warringer, J., Ganga, M.A., Louis, E.J., Liti, G., Martinez, C. 2012. The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 7:e49640.

Sax, K. 1923. The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics.* 8:552-60.

Shohat-Tal, A., Eshel, D. 2011. Cell cycle regulators interact with pathways that modulate microtubule stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 10:1705-13.

Skelly, D.A., Merrihew, G.E., Riffle, M., Connelly, C.F., Kerr, E.O., Johansson, M., Jaschob, D., Graczyk, B., Shulman, N.J., Wakefield, J., Cooper, S.J., Fields, S., Noble, W.S., Muller, E.G., Davis, T.N., Dunham, M.J., Maccoss, M.J., Akey, J.M. 2013. Integrative phenomics reveals insight into the structure of phenotypic diversity in budding yeast. *Genome Res.* 23:1496-504.

Spiegel, M.R., Stephens, L.J. 2002. *Estadística.* 3ª ed. pp 244-259, 314-318, 368-369. McGraw-Hill/Interamericana, México D.F.

Steinmetz, L.M., Sinha, H., Richards, D.R., Spiegelman, J.I., Oefner, P.J., McCusker, J.H., Davis, R.W. 2002. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature.* 416:326-30.

Strachan, T., Read, A.P. 1999. *Human Molecular Genetics.* 2<sup>nd</sup> ed. Chapter 11, Genetic mapping of mendelian characters. Wiley-Liss, New York.

Thatcher, J.W., Shaw, J.M., Dickinson, W.J. 1998. Marginal fitness contributions of non-essential genes in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:253-257.

Teixeira, M.C., Dias, P.J., Simões, T., Sá-Correia, I. 2007. Yeast adaptation to mancozeb involves the up-regulation of FLR1 under the coordinate control of Yap1, Rpn4, Pdr3, and Yrr1. *Biochem Biophys Res Commun.* 367:249-55.

Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Sá-Correia, I. 2001. Transcriptional activation of FLR1 gene during *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to growth with benomyl: role of Yap1p and Pdr3p. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:216-22.

Travisano, M., Shaw, R.G. 2013. Lost in the map. *Evolution.* 67:305-14.

Ukimori, S., Kawabata, N., Shimada, H., Imano, R., Takahashi, K., Yukawa, M., Tsuchiya, E., Ueno, M. 2012. A double mutant between fission yeast telomerase and RecQ helicase is sensitive to thiabendazole, an anti-microtubule drug. *Biosci Biotechnol Biochem.* 76:264-9.

Vadkertiová, R., Sláviková, E. 2011. Influence of Pesticides on Yeasts Colonizing Leaves. *Z Naturforsch C.* 66:588-94.

Warringer, J., Blomberg, A. 2003. Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 20:53-67.

Warringer, J., Ericson, E., Fernandez, L., Nerman, O., Blomberg, A. 2003. High-resolution yeast phenomics resolves different physiological features in the saline response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:15724-9.

Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F.A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., Liti, G., Moses, A., Blomberg, A. 2011. Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet.* 7:e1002111.

Watanabe, D., Araki, Y., Zhou, Y., Maeya, N., Akao, T., Shimoi, H. 2012. A loss-of-function mutation in the PAS kinase Rim15p is related to defective quiescence entry and high fermentation rates of *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl Environ Microbiol.* 78:4008-16.

Wilkening, S., Lin, G., Fritsch, E.S., Tekkedil, M.M., Anders, S., Kuehn, R., Nguyen, M., Aiyar, R.S., Proctor, M., Sakhanenko, N.A., Galas, D.J., Gagneur, J., Deutschbauer, A., Steinmetz, L.M. 2014. An Evaluation of High-Throughput Approaches to QTL Mapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 196:853-65.

Wong, W.W., Tran, L.M., Liao, J.C. 2009. A hidden square-root boundary between growth rate and biomass yield. *Biotechnol Bioeng.* 102:73-80.

Wood, J.S. 1982. Mitotic chromosome loss induced by methyl benzimidazole-2-yl-carbamate as a rapid mapping method in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 2:1080-7.

Yin, X., Goudriaan, J., Lantinga, E.A., Vos, J., Spiertz, H.J. 2003. A flexible sigmoid function of determinate growth. *Ann Bot.* 91:361-71.