

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
Departament de Genètica i Microbiologia

**ESTUDIO DE LA INESTABILIDAD  
CARIOTÍPICA DE LEVADURAS VÍNICAS**

David Carro Puente  
2004

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), mediante una beca de la Generalitat de Catalunya y otra del propio CSIC.

## Agradecimientos

Esta tesis es el trabajo de unos cuantos años, llenos de sensaciones, ilusiones, desengaños, risas, ...que en conjunto han constituido un período muy importante para mí.

En primer lugar me gustaría agradecer a Benjamín Piña el haberme admitido en su grupo de investigación, así como la constancia en la dirección, seguimiento y posterior corrección de la memoria que ahora tenéis en vuestras manos. A mi compañera y amiga Natàlia, con la que he compartido mucho tiempo en el laboratorio, muchas risas, complicidades y el día a día de nuestro trabajo de tesis (te deseo toda la suerte para tu *postdoc* y en todo lo que emprendas). A Demetrio con el que compartimos un largo período en el *lab* (muchoa suerte). A Dolors y Fátima con las que también coincidí en el laboratorio. A las últimas incorporaciones “estrogénicas” del lab; Laia (muchos ánimos en tu tesis y ... aún nos quedan unas risas), Tania (suerte en la tesis), Sergi (suerte).

A todos los compañeros y amigos del departamento, por todos los momentos compartidos...y por muchas cosas. A todos los amigos y compañeros del CID.

A todos los amigos por los momentos vividos y por todos los que nos quedan. Gracias de verdad.

A mis padres, por el apoyo constante a lo largo de mi vida, por ayudarme, quererme, mimarme y por ser como son. No encuentro palabras para deciros lo que siento por vosotros.

A Teresa, por lo que hemos compartido, por lo que nos queda por compartir, por su amor, por su apoyo, por tantas y tantas cosas inexplicables mediante unas líneas....a ella y a mis padres va dedicada esta tesis.

---

<b>1.Introducción</b> .....	4
1.1 Introducción general.....	4
1.2 Biodiversidad y ecología de las levaduras.....	4
1.3 Fermentación controlada o fermentación espontánea.....	4
1.4 Microbiología del cava.....	5
1.5 El género <i>Saccharomyces</i> .....	6
1.5.1 Taxonomía industrial de <i>Saccharomyces</i> .....	6
1.5.1.1 El grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	6
1.5.2 Características generales del género.....	7
1.5.2.1 Características fisiológicas del género.....	7
1.5.3 Constitución genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . El caso de las cepas vínicas.....	7
1.5.3.1 Citología y reproducción.....	7
1.5.3.2 Ciclo vital .....	9
1.5.3.3 DNA cromosómico.....	10
1.5.3.3.1 Elementos repetitivos y familias subteloméricas.....	11
1.5.3.3.2 Elementos extracromosomales.....	13
1.5.3.3.2.1 DNA mitocondrial.....	13
1.5.3.3.2.2 Factores Killer.....	15
1.5.3.4 Elementos extracromosomales.....	13
1.5.3.4.1 DNA mitocondrial.....	13
1.5.3.4.2 Factores Killer.....	15
1.6 Métodos moleculares de diferenciación de levaduras vínicas.....	15
1.6.1 Identificación de polimorfismos de secuencia de DNA.....	16
1.6.2 RFLP de mtDNA.....	16
1.6.3 Cariotipado de cepas.....	17
1.6.4 Polimorfismos de DNA ribosomal.....	17
1.6.5 Análisis de secuencias polimórficas amplificadas al azar por PCR (RAPD-PCR).....	17
1.6.6 Amplificación y caracterización de secuencias delta $\delta$ por PCR.....	18
1.6.7 PCR de secuencias polimórficas de DNA mitocondrial.....	18
1.7 Mejora genética de levaduras industriales.....	18
1.7.1 Floculación.....	19
1.7.2 Sobreproducción de glicerol.....	19
1.7.3 Sobreproducción de acetato de isoamilo.....	20
1.7.4 Eliminación de etilcarbanato.....	20
1.7.5 Fermentación maloláctica.....	20
1.7.6 Producción de ácido láctico.....	21
1.7.7 Disminución de acidez volátil.....	21
1.7.8 Degradación de polisacáridos.....	21
1.7.9 Liberación de aromas.....	21
1.7.10 Otras estrategias.....	22
1.8 Inestabilidad cariotípica; polimorfismos cromosómicos.....	22
1.8.1 Mecanismo molecular de la inestabilidad cariotípica.....	24
1.8.2 Recombinación e inestabilidad genética.....	25
1.8.2.1 Recombinación.....	25
1.8.2.2 Mecanismo de recombinación.....	25
1.8.2.3 Genética de la recombinación.....	28
1.8.2.4 Procesos recombinatorios asociados a inestabilidad genética.....	29
1.8.2.4.1 Recombinación ectópica .....	29
1.8.2.4.2 Recombinación de repeticiones directas.....	29
1.8.2.4.3 Intercambio desigual entre repeticiones en tándem.....	30

---

---

1.8.2.4.4 Otros tipos de eventos.....	30
1.9 Los Chips de DNA. El caso de las levaduras vínicas.....	32
1.9.1 Estudios genómicos.....	33
1.9.2 Estudios de expresión genética.....	33
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>3 Resultados.....</b>	<b>36</b>
3.1 Caracterización genética y análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.....	36
3.1.1 Origen y caracterización de la cepa DC5.....	36
3.1.2 Análisis de derivados monosporídicos de DC5 y de sus productos meióticos.....	37
3.1.2.1 Obtención de derivados meióticos de DC5.....	37
3.1.2.2 Contenido de DNA de la cepa DC5 y de sus derivados monoesporídicos.....	37
3.1.2.3 Esporulación de derivados F1 diploides. Obtención de derivados F2.....	38
3.1.3 Análisis de las propiedades metabólicas de DC5 y derivados F1 y F2.....	39
3.1.4 Análisis de la inestabilidad cariotípica de la cepa DC5.....	39
3.1.4.1 Inestabilidad mitótica.....	39
3.1.4.2 Inestabilidad meiótica.....	41
3.1.5 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F1.....	41
3.1.5.1 Inestabilidad mitótica.....	41
3.1.5.2 Inestabilidad meiótica.....	43
3.1.6 Análisis de la inestabilidad cariotípica de los derivados F2.....	44
3.1.7 Repetibilidad del ensayo.....	46
3.1.8. Análisis de la inestabilidad del cromosoma XII.....	48
3.1.9 Caracterización estructural del cromosoma XII.....	49
3.2. Inestabilidad cariotípica en mutantes <i>rad52</i> .....	50
3.2.1 Obtención del mutante $\Delta rad52$ .....	51
3.2.2 Estabilidad cariotípica de mutantes DC5 $\Delta rad52$ .....	53
3.2.3 Recombinación subtelomérica en $\Delta rad52$ .....	54
3.2.4 Capacidad fermentativa de mutantes <i>RAD52</i> .....	55
3.3. Caracterización estructural de polimorfismos de tamaño del cromosoma I.....	57
3.3.1 Identificación de variantes polimórficas de tamaño del cromosoma I en DC5.....	57
3.3.2 Caracterización estructural de variantes polimórficas del cromosoma I de DC5.....	57
3.3.2.1 Análisis del brazo derecho.....	60
3.3.2.2 Análisis del brazo izquierdo.....	60
3.3.3 Análisis de los ORFs presentes en el cromosoma I de la cepa DC5.....	60
3.3.4 Caracterización de los brazos cromosómicos de DC5.....	63
3.3.4.1 Análisis de secuencia del brazo derecho del cromosoma I.....	63
3.3.4.1.1 Análisis de las secuencias entre YAR023C y YAR031W.....	63
3.3.4.1.2 Análisis de las secuencias entre YAR031W y YAR053W.....	63
3.3.4.2 Análisis de secuencia del brazo izquierdo del cromosoma I.....	64
3.4 Genotipado molecular de cepas silvestres y enológicas de <i>S. cerevisiae</i> .....	66
3.4.1 Análisis de variabilidad de familias multigénicas.....	68
3.4.2 Análisis de las secuencias de transposones.....	71
3.4.3 Análisis de la variabilidad del cromosoma I.....	72

---

---

<b>4 Discusión</b> .....	76
4.1 Constitución genética de DC5 .....	76
4.1.1 Constitución genética .....	77
4.1.1.1 Análisis del contenido de DNA.....	77
4.1.1.2 Análisis de segregación fenotípica.....	77
4.2 Análisis de la inestabilidad cariotípica.....	77
4.2.1 Inestabilidad cariotípica de DC5 y derivados.....	77
4.2.1.1 Inestabilidad del cromosoma XII.....	79
4.2.2 Mecanismo de la inestabilidad cariotípica .....	80
4.2.3 Remediación genética de la inestabilidad cariotípica.....	81
4.3 Caracterización estructural del cromosoma I de la cepa DC5.....	81
4.4 Genotipado de cepas.....	82
4.5 Consideraciones finales: ventaja evolutiva de la inestabilidad cariotípica.....	83
<b>5 Conclusiones</b> .....	86
<b>6 Bibliografía</b> .....	90

## **Anexo I**

### **AI. Materiales y métodos**

AI.1 Cepas empleadas.....	102
AI.2 Medios de propagación y condiciones.....	102
AI.2.1 Medio YPD/YPS.....	102
AI.3 Medios de esporulación y condiciones.....	102
AI.4 Disección de tétradas.....	102
AI.5 Test metabólicos.....	103
AI.5.1 Medio YPS-BTB.....	103
AI.5.2 Medio YEPE.....	103
AI.5.3 Medio mínimo (MM).....	103
AI.5.4 Medio completo sintético (SC).....	103
AI.5.5 Medio BIGGY.....	103
AI.6 Fermentaciones experimentales.....	103
AI.7 Cultivos seriados.....	104
AI.8 Cálculo de tasa de reorganización.....	104
AI.9 Análisis del cariotipo.....	104
AI.10 Digestión in situ.....	105
AI.11 Electroforesis de inversor de campo (IPFGE).....	105
AI.12 <i>Southern blot</i> .....	105
AI.12.1 Transferencia.....	105
AI.12.2 Obtención de sondas para <i>southern</i> s.....	106
AI.12.3 <i>Southern</i> radiactivo.....	106
AI.12.4 <i>Southern</i> quimioluminiscente.....	106
AI.13 Medidas de contenido de DNA.....	106
AI.14 Análisis estadístico.....	107
AI.15 Protocolos de PCR.....	107
AI.15.1 Programas.....	107

---

---

AI.15.2 Cebadores empleados.....	107
AI.15.2.1 Cebadores empleados caracterización ORFs <i>FLO1</i> y <i>FLO9</i> .....	108
AI.15.2.2 Cebadores empleados para la obtención de sondas.....	108
AI.15.2.3 Cebadores quimeras amplificación cassettes resistencia KAN/NAT y disrupción <i>RAD52</i> .....	108
AI.15.2.4 Cebadores empleados en amplificación de <i>hbRAD52-nat</i> , <i>high homology RAD52-nat</i> ....	109
AI.16 Análisis de secuencias de DNA, diseños de <i>primers</i> , <i>blast</i> .....	109
AI.17 Plásmidos empleados.....	109
AI.18 Minichips.....	109
AI.18.1 Diseño e impresión.....	109
AI.18.2 Hibridación y análisis.....	110
AI.18.3 Procesado de los datos.....	110
AI.19 Chips de DNA.....	110
AI.19.1 Diseño e impresión.....	110
AI.19.2 Hibridación y análisis.....	111
AI.19.3 Procesado de los datos.....	111
AI.19.4 Coeficiente de variación.....	111

## **Anexo II**

### **AII. Artículos**

AII.1 Artículo I.....	112
AII.2 Artículo II.....	120
AII.3 Artículo III.....	134
AII.4 Artículo IV.....	148

---

## Índice

1.Introducción.....	3
1.1 Introducción general.....	3
1.2 Biodiversidad y ecología de las levaduras.....	3
1.3 Fermentación controlada o fermentación espontánea.....	3
1.4 Microbiología del cava.....	4
1.5 El género <i>Saccharomyces</i> .....	5
1.5.1 Taxonomía industrial de <i>Saccharomyces</i> .....	5
1.5.1.1 El grupo <i>Saccharomyces sensu stricto</i> .....	5
1.5.2 Características generales del género.....	6
1.5.2.1 Características fisiológicas del género.....	6
1.5.3 Constitución genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . El caso de las cepas vínicas.....	6
1.5.3.1 Citología y reproducción.....	6
.....	7
1.5.3.2 Ciclo vital .....	8
1.5.3.3 DNA cromosómico.....	9
1.5.3.3.1 Elementos repetitivos y familias subteloméricas.....	10
1.5.3.4 Elementos extracromosomales.....	12
1.5.3.4.1 DNA mitocondrial.....	12
1.5.3.4.2 Factores Killer.....	14
1.6 Métodos moleculares de diferenciación de levaduras vínicas.....	14
1.6.1 Identificación de polimorfismos de secuencia de DNA.....	15
1.6.2 RFLP de mtDNA.....	15
.....	16
1.6.3 Cariotipado de cepas.....	16
1.6.4 Polimorfismos de DNA ribosomal.....	16
1.6.5 Análisis de secuencias polimórficas amplificadas al azar por PCR (RAPD-PCR).....	16
1.6.6 Amplificación y caracterización de secuencias delta $\delta$ por PCR.....	17
.....	17
1.6.7 PCR de secuencias polimórficas de DNA mitocondrial.....	17
1.7 Mejora genética de levaduras industriales.....	17
1.7.1 Floculación.....	18
1.7.2 Sobreproducción de glicerol.....	18
1.7.3 Sobreproducción de acetato de isoamilo.....	19
1.7.4 Eliminación de etilcarbonato.....	19
1.7.5 Fermentación maloláctica.....	19
1.7.6 Producción de ácido láctico.....	20
1.7.7 Disminución de acidez volátil.....	20
1.7.8 Degradación de polisacáridos.....	20
1.7.9 Liberación de aromas.....	20
.....	20
1.7.10 Otras estrategias.....	21
1.8 Inestabilidad cariotípica; polimorfismos cromosómicos.....	21
1.8.1 Mecanismo molecular de la inestabilidad cariotípica.....	23
1.8.2 Recombinación e inestabilidad genética.....	24
1.8.2.1 Recombinación.....	24
1.8.2.2 Mecanismo de recombinación.....	24
1.8.2.3 Genética de la recombinación.....	27



1.8.2.4 Procesos recombinatorios asociados a inestabilidad genética.....	28
1.8.2.4.1 Recombinación ectópica .....	28
1.8.2.4.2 Recombinación de repeticiones directas.....	28
1.8.2.4.3 Intercambio desigual entre repeticiones en tándem.....	29
1.8.2.4.4 Otros tipos de eventos.....	29
.....	30
1.9 Los Chips de DNA. El caso de las levaduras vínicas.....	31
1.9.1 Estudios genómicos.....	31
1.9.2 Estudios de expresión genética.....	31

## 1.Introducción

### 1.1 Introducción general

Las primeras evidencias de producción de vino se remontan al VI milenio AC en la antigua Mesopotamia. Durante milenios, el proceso de vinificación se consideró una propiedad intrínseca, si no mágica, del mosto, hasta que en el año 1863 Louis Pasteur demostró su dependencia de la levadura. Este descubrimiento marca el comienzo de la era biotecnológica (Mortimer y Polsinelli, 1999; Pretorius, 2000).

### 1.2 Biodiversidad y ecología de las levaduras

La fermentación del mosto a vino comporta la biotransformación de los azúcares de la uva (como glucosa y fructosa), en alcohol y dióxido de carbono. Durante este complejo proceso bioquímico y ecológico ocurre un desarrollo secuencial de diferentes especies microbiológicas, marcado por las características del mosto en cada momento y por la microflora presente en la uva y en las instalaciones. Esta microflora se compone de hongos, bacterias y levaduras. Entre las levaduras, *Kloeckera* (*K.apiculata*) y *Hanseniaspora* (*H.uvarum*) representan entre el 50 y el 75 por ciento de las presentes en la superficie de la uva (Mortimer y Polsinelli, 1999; Pretorius, 2000), mientras que las cepas de *S.cerevisiae* representan un bajísimo porcentaje (Martini, 1993). Otros géneros presentes son *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodoturula*. La coexistencia de estas especies depende de un amplio abanico de factores físicos, químicos y bióticos (Lachance y Starmer, 1998). Estos factores incluyen la variedad de uva, temperatura, precipitaciones, suelo, fertilizaciones, irrigación, prácticas de viticultura, grado de desarrollo de la uva, daños físicos causados por insectos o tiempo, la aplicación de fungicidas y los métodos de vendimia y de transporte hasta la bodega.

### 1.3 Fermentación controlada o fermentación espontánea

*S.cerevisiae* es la única especie de la microflora presente en el mosto capaz de finalizar la fermentación vínica. Debido a la baja representación de esta especie en el mosto inicial, no es raro que el proceso tarde varios días en iniciarse, y que, en ocasiones, este inicio no se produzca (Querol *et al.*, 1994). Por esta razón, y ya en 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de inocular cultivos puros de levadura para iniciar fermentaciones vínicas (Pretorius, 2000). A nivel comercial, los primeros

---

cultivos puros de levaduras vínicas (Cepas Montrachet y Pasteur Champagne) en forma de levadura seca activa (LSA) no aparecieron en el mercado hasta el año 1965, y su uso no se generalizó hasta los años 80.

Actualmente existen dos tendencias en enología; aquella que confía en la microflora presente en la uva y bodegas para realizar la fermentación de forma espontánea, y aquella que prefiere una fermentación más controlada y segura utilizando inóculos comerciales. Mientras que la fermentación espontánea es la usada en bodegas pequeñas o artesanales, el uso de inóculos para una fermentación controlada está generalizado en las grandes industrias fermentativas. Tanto la fermentación espontánea como la controlada tienen sus partidarios y detractores.

Entre las características positivas, aportadas por las levaduras endógenas propias de la fermentación espontánea, cabe destacar una mejora de la calidad sensorial debida a la alta producción de glicerol y de otros polioles, y un incremento en la estabilidad del color de los vinos tintos provocada por oxidación de antocianinas y otros fenoles en ausencia de etanol. Estos efectos están facilitados no sólo por la gran variedad de especies de microorganismos presentes en el mosto, sino también por el simple hecho de que la aparición de concentraciones significativas de etanol se retrasa varios días, en los que ocurren diferentes reacciones químicas y enzimáticas (Pretorius, 2000). La mayor desventaja de la fermentación espontánea radica en la falta de predicibilidad y reproducibilidad del proceso, ya que depende de múltiples factores: de las levaduras presentes en el mosto, de la composición de éste y del protocolo utilizado.

En la fermentación controlada se añade al mosto una cepa seleccionada, en cantidad suficiente de masa celular para que se imponga al resto de la microflora, de manera que sea la principal responsable del proceso fermentativo. La ventaja de esta práctica radica en que el proceso es altamente predecible y reproducible. Es importante resaltar que a pesar de que las cepas inoculadas son las principales responsables del proceso, no impide el desarrollo de cepas naturales durante los estadios iniciales, ya que el mosto no se esteriliza. Así el papel de las especies no *Saccharomyces* puede ser importante, ya que estas producen metabolitos secundarios que pueden contribuir positivamente al producto final (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998).

## **1.4 Microbiología del cava**

La producción del cava es un proceso industrial que comprende dos fermentaciones. La primera consiste en la obtención de un vino base, generalmente blanco, a partir del mosto y se realiza en tanques de temperatura controlada a 15 -18 °C. En la segunda fase, se añade al vino base sacarosa y

---

levaduras acondicionadas, se embotella en envases resistentes a presión y se guarda en bodegas durante un periodo mínimo legal de nueve meses. Durante este tiempo ocurre la llamada segunda fermentación en la botella, en la cual el grado alcohólico aumenta unos dos grados y se produce un considerable aumento de presión en la botella (hasta 5 bar) debida a la producción de CO<sub>2</sub>. Mientras que para la primera fermentación del cava el uso de inóculos de levaduras seleccionadas es opcional, la segunda fermentación requiere necesariamente la adición de cepas seleccionadas, bien inóculos acondicionados de LSA (*levadura seca activa*, generalmente comercial) o como preinóculos de cepas propias seleccionadas por características fenotípicas y mantenidas año tras año en la empresa (Bartra, 1995).

## 1.5 El género *Saccharomyces*

### 1.5.1 Taxonomía industrial de *Saccharomyces*

La levadura *Saccharomyces* pertenece a la subdivisión de los ascomicetos, familia *Saccharomycetaceae*. El género fue definido por Meyen en 1838 y posteriormente redefinido por Rees en 1870, aunque desde entonces ha sufrido diversas reorganizaciones. En 1970 van der Walt definió cuatro grupos dentro del mismo: un grupo que engloba a cepas próximas a la cepa tipo de *Saccharomyces cerevisiae* y que se designa como *Saccharomyces sensu stricto*; un segundo grupo próximo a *S.bailii* y que corresponde al antiguo género *Zygosaccharomyces*; el tercero comprende las especies relacionadas con *S.rosei*, y el cuarto, de carácter heterogéneo, comprende especies poco relacionadas entre ellas (Barnett, 1992).

#### 1.5.1.1 El grupo *Saccharomyces sensu stricto*

Este grupo definido por Van der Walt en 1970, incluyó a 21 especies en el momento de su definición. Agrupa a levaduras que han sido explotadas industrial y científicamente, y su clasificación inicial se basaba en métodos de genética clásica y fenotípicos tales como utilización de azúcares, particularidades del ciclo vital (homo-heterotalismo) y relaciones antagónicas entre levaduras (como sensibilidad a factores killer) (Pretorius, 2000). Posteriores estudios moleculares tales como reasociación de DNA-DNA (Vaughan-Martini, 1991), de interfertilidad entre especies, polimorfismos cromosómicos por campo pulsante y el patrón de DNA mitocondrial (Naumov, 1996), demostraron que este grupo comprende cuatro especies diferentes: *S.bayanus*, *S.cerevisiae*, *S.paradoxus* y *S.pastorianus*. Los grados de homología existentes entre estas especies son de entre un 46-59% entre *S.cerevisiae* y *S.paradoxus* y de un 70% entre *S.bayanus* y *S.pastorianus*.

---

### 1.5.2 Características generales del género

*Saccharomyces* se caracteriza por poseer células vegetativas redondas u ovales o cilíndricas. Las células vegetativas son no filamentosas, predominantemente diploides o poliploides y su reproducción es por gemación multilateral. Esporula formando ascas generalmente con cuatro ascósporas en su interior (Barnett, 1992).

#### 1.5.2.1 Características fisiológicas del género

La característica principal de *Saccharomyces* es su capacidad vigorosa de fermentar D-glucosa, D-fructosa y D-manosa. La mayoría de cepas pueden utilizar además D-galactosa, tanto aeróbica como anaeróticamente, pero nunca lactosa. Tampoco pueden utilizar pentosas o polisacáridos como fuente de carbono, a excepción del almidón que puede ser utilizado por algunas cepas de *S. diastaticus*. Ninguna especie del género puede utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, ni hidrolizar la urea presente en el medio. Como una última característica sistemática, todas las especies del género presentan en su sistema de transporte electrónico la coenzima Q6 como única coenzima de ubiquinonas (Barnett, 1992).

### 1.5.3 Constitución genética de *Saccharomyces cerevisiae*. El caso de las cepas vínicas

#### 1.5.3.1 Citología y reproducción

*S. cerevisiae* posee una morfología generalmente elipsoidal, con una compartimentación subcelular típica de célula eucariota. Existen tres tipos de células vegetativas, denominadas  $a$ ,  $\alpha$  (ambas haploides) y  $a/\alpha$  (diploides). Las células  $a$  y  $\alpha$  conjugan entre sí para dar lugar a cigotos  $a/\alpha$ . En cepas denominadas heterotálicas, los cultivos  $a$  y  $\alpha$  son estables, es decir, no originan diploides a no ser que se mezclen células de estos dos tipos de conjugación. En cepas homotálicas, por el contrario, los cultivos haploides generan diploides  $a/\alpha$  de manera espontánea. Esto tiene lugar gracias al proceso de cambio de tipo de conjugación (*switch*), por el cual los descendientes de una célula  $a$  pueden convertirse en  $\alpha$  y viceversa (Figura 1-1).

El homotalismo viene determinado por la presencia en el genoma de los loci *HML $\alpha$* , *HMR $\alpha$* , *MAT* y la presencia de la Y/Z-endonucleasa (endonucleasa HO). En dicho modelo el locus *MAT* es bajo el cual ocurre la expresión de uno de los dos tipos de conjugación, mientras que los loci *HML $\alpha$*  y *HMR $\alpha$*  permanecen silenciados por los complejos *SIR*. La endonucleasa HO es la encargada, junto con un

proceso de transposición, de realizar el cambio de cassette de expresión ( $a$  ó  $\alpha$ ) en el locus *MAT* y por tanto de que la célula en cuestión exprese el gen para el factor  $a$  ó  $\alpha$  y tenga por lo tanto un tipo u otro de conjugación (Figura 1-1).

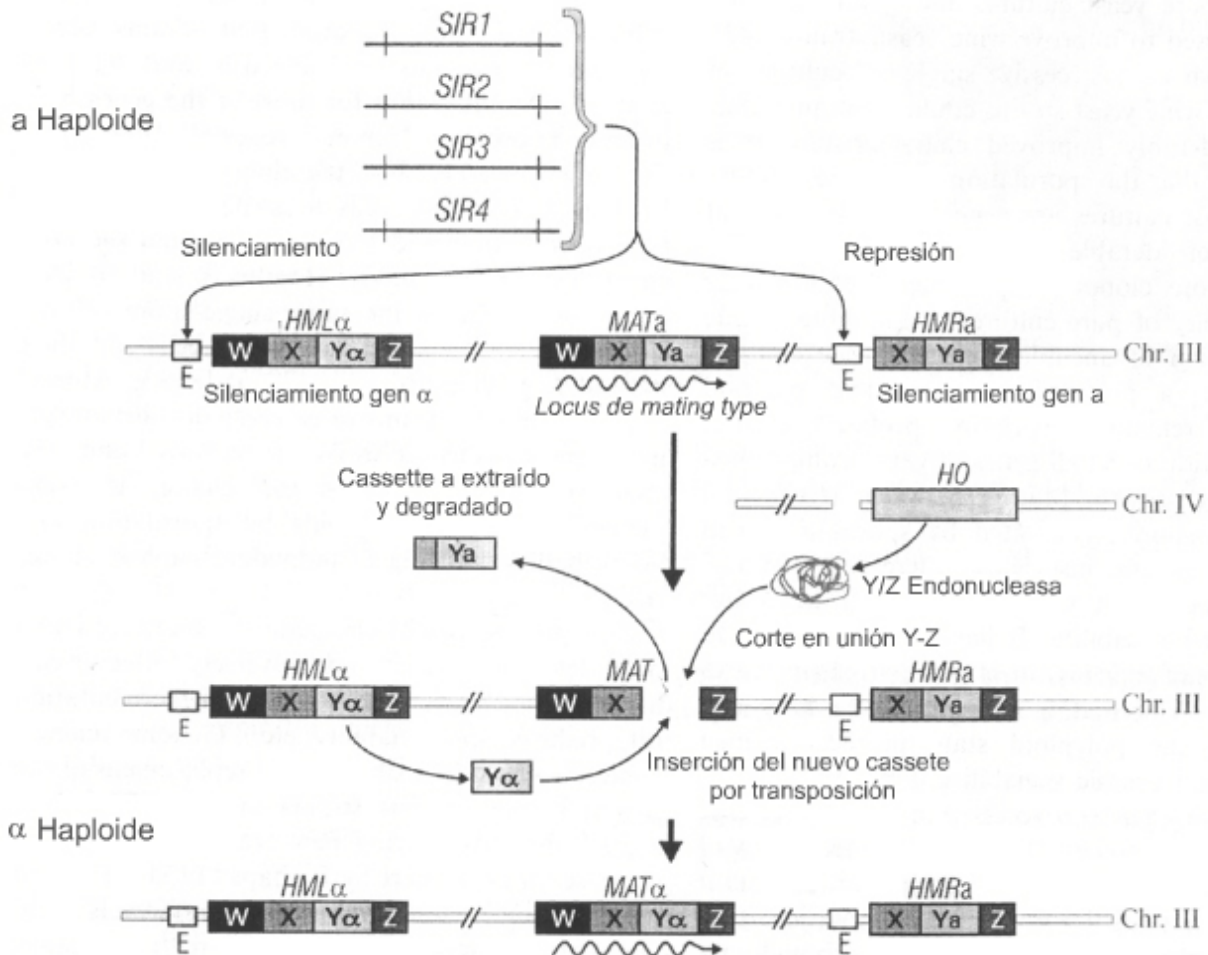


Figura 1-1. Modelo del cassette de cambio de tipo de conjugación (mating-type switching) en una cepa vínica homotálica. La cepa  $a$  expresa el cassette del tipo *a* (*Mat a*, factor de conjugación *a*) y posee silenciado el cassette  $\alpha$ . Cuando se produce el cambio de tipo de conjugación, se produce una expresión de la endonucleasa HO (endonucleasa Y/Z) produciéndose un doble corte de cadena entre las secuencias Y/Z del locus de expresión, cortando el cassette de expresión Ya. Paralelamente se produce una síntesis del cassette de expresión Y $\alpha$ , el cual será insertado en el locus de expresión mediante un proceso de inserción. La cepa ahora expresa activamente el factor de conjugación  $\alpha$  (Modificado de Pretorius, 2000).

### 1.5.3.2 Ciclo vital

En condiciones óptimas nutricionales una cepa diploide  $\alpha/a$  se reproduce mitóticamente por gemación aproximadamente cada 90 minutos. La emergencia de la gema puede producirse en cualquier punto de la superficie celular de la célula madre, excluyendo aquéllos donde se hayan originado gemas con anterioridad, que son reconocibles como cicatrices. Las células haploides crecen más despacio, duplicándose cada 100-120 min, y su gemación es axial, originándose cada gema justo al lado, pero no encima, del punto donde se originó la gema anterior. En condiciones de deficiencia de nitrógeno, las cepas diploides entran en meiosis, generando cuatro ascósporas haploides encapsuladas en un asca. En condiciones favorables, cada una de estas esporas germina e inicia su ciclo vegetativo. En cepas heterotálicas cada espora genera una colonia haploide estable que necesita otra colonia haploide de diferente tipo de conjugación para generar diploides y cerrar el ciclo. En cepas homotálicas una proporción de las células de la colonia cambia de tipo de conjugación y la misma colonia genera células diploides que, dada su mayor velocidad de crecimiento, terminan por dominar la colonia (Figura 1-2).

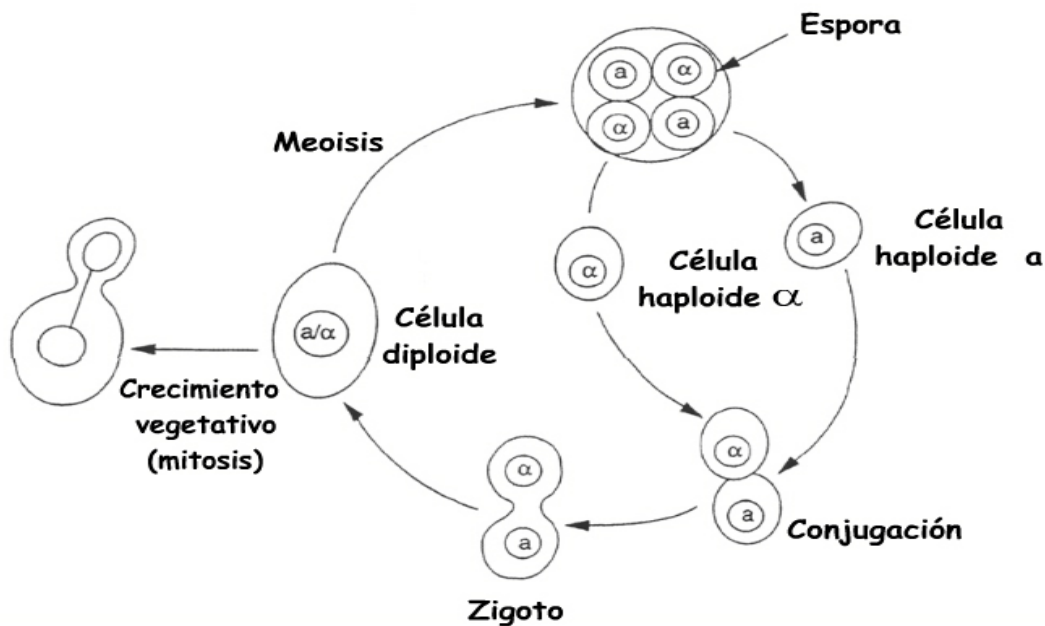


Figura 1-2. Ciclo vital de una levadura vínica homotálica. Una cepa diploide  $a/\alpha$  tras una meiosis produce cuatro ascósporas (dos esporas haploides  $a$  y dos esporas haploides  $\alpha$ ) encapsuladas en una asca. Tras germinar, pasan a ser células vegetativas. En crecimiento mitótico estas células cambian su tipo de conjugación, conjugan y dan como resultado nuevas células diploides. Dichas célula entran en un ciclo de vida vegetativo (mitosis), pudiendo esporular de nuevo y repetir el ciclo. En el caso de una cepa vínica heterotálica, los derivados meióticos permanecerían haploides tras germinar.

### 1.5.3.3 DNA cromosómico

Una cepa haploide de *S.cerevisiae* contiene aproximadamente de 13 a 14 Mb de DNA nuclear, distribuido en 16 cromosomas lineales de tamaños comprendidos entre 230 y 2200 Kb de longitud (Figura 1-3). El cromosoma mayor, cromosoma XII, es además el más variable ya que contiene el DNA ribosómico (rDNA), y su tamaño estándar oscila entre las 1.2 y 2.2 Mb. El rDNA codifica para los RNAs ribosomales 25S, 18S, 5.8S, y 5S, que constituyen una unidad funcional de 9.1 Kb que se repite en tándem entre 100 y 140 veces (Petes 1979; Chindamporn *et al.*, 1993; Pasero *et al.*, 1993) (Figura 1-4).

El genoma de *S.cerevisiae* está completamente secuenciado y contiene más de 6000 ORFs ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), de los que en parte se desconoce su función biológica (Goffeau *et al.*, 1996, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Tiene un contenido del 39-41 por ciento en guanina y citosina, y es mucho más compacto que el genoma de otras células eucariotas, debido a tener pocas secuencias de DNA repetitivo y pocos intrones (Goffeau *et al.*, 1996; Petrorius, 2000; Harrison *et al.*, 2002).

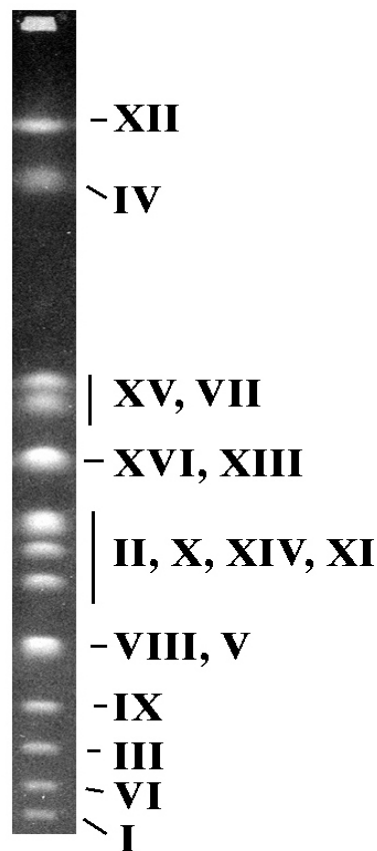


Figura 1-3. Cariotipo electroforético de la cepa de *S.cerevisiae* w303a (haploide). El cariotipo muestra el conjunto de cromosomas de dicha cepa en una electroforesis de campo pulsante (condiciones descritas en materiales y métodos). Cada uno de los números romanos corresponde a un determinado cromosoma. Puede observarse la presencia de los 16 cromosomas de esta cepa, desde el de mayor movilidad electroforética, cromosoma I, hasta el de menor movilidad, cromosoma XII



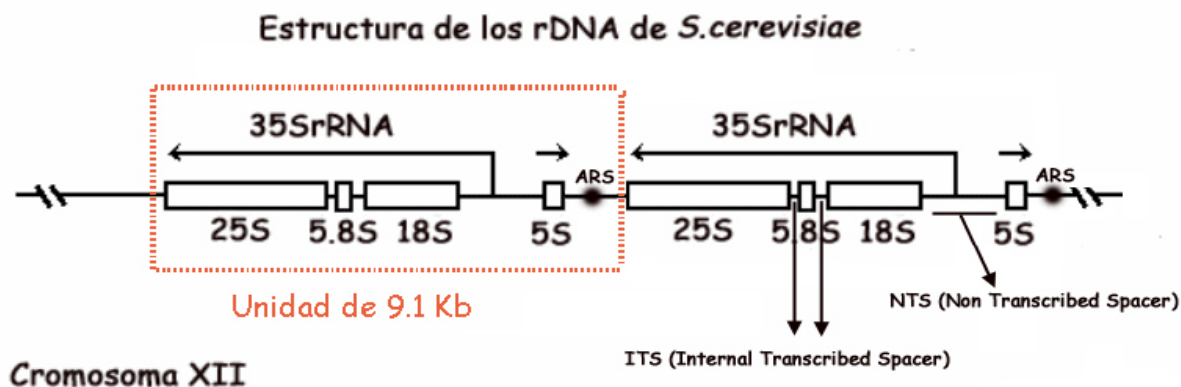


Figura 1-4. Estructura de los rDNAs en el cromosoma XII de *S.cerevisiae*. Cada unidad de 9.1 Kb codifica para los rRNA 25S, 5.8S, 18S y 5S. La transcripción de los tres primeros se realiza en forma del precursor 35S que posteriormente se procesa transcripcionalmente. Puede observarse como el sentido de transcripción del 35S es opuesto al del 5S. Se indica el ARS (*autonomously replicating sequence*) así como las secuencias ITS (*internal transcribed spacer*) y NTS (*non transcribed spacer*). (Modificado de *Munich Information Center For Protein Sequences*, MIPS).

La mayoría de cepas de laboratorio son exactamente haploides o diploides, mientras que las cepas vínicas son diploides o aneuploides, pudiendo ser ocasionalmente poliploides (Bakalinsky y Snow, 1990; Longo y Venzinhet, 1993; Benítez y Codón, 1995; Benítez *et al.*, 1996, Nadal *et al.*, 1999). La relativa abundancia de cepas industriales poliploides es explicada como una ventaja consistente en acumular la suficiente dosis génica de los genes relacionados con procesos fermentativos; estas cepas resultan así más adecuadas para dichos procesos y han sido seleccionadas sistemáticamente (Benítez *et al.*, 1996; Codón *et al.*, 1998). De todos modos, algunos autores apuntan que es la heterozigosis, más que la propia ploidía, la característica que marca más diferencias en cuanto a la capacidad fermentativa (Pretorius, 2000).

#### 1.5.3.3.1 Elementos repetitivos y familias subteloméricas

El genoma de *Saccharomyces* presenta una aparente redundancia genética en forma de bloques de secuencia duplicados (*Cluster Homology Regions*), localizados tanto en regiones teloméricas y subteloméricas como en sitios internos de los brazos cromosómicos (Goffeau *et al.*, 1996; Mewes *et al.*, 1997; Delneri *et al.*, 2000). A parte de estos grandes bloques de homología entre distintos cromosomas, existen una serie de genes relacionados funcionalmente, en muchos casos con alta homología de secuencia entre ellos, agrupados en familias multigénicas, como las familias *PAU*, *SUC*, *MAL*, *MEL*, *ADD* y *FLO*, cuyos genes se localizan principalmente en zonas subteloméricas (Rachidi *et al.*, 2000).

La familia *HXT* (transportadores de hexosa) está formada de unos 15 ORFs y se halla dispersa por todo el genoma (André 1995; Goffeau *et al.*, 1996; Delneri *et al.*, 2000). Gerstein *et al.* han descrito que en el genoma de *S.cerevisiae* existen un conjunto de secuencias potencialmente codificadoras, pero que poseen codones de *stop* prematuros. Estos pseudoOrfs han sido designados como "disabled" ORFs (dORFs). El número asciende a unos 221 y en muchos casos presentan un alto grado de homología con secuencias funcionales. Su localización es, en algunos casos, subtelomérica (Harrison *et al.*, 2002).

Los extremos de los cromosomas están compuestos por diferentes elementos repetitivos, como los elementos X' e Y' y secuencias teloméricas repetidas. Algunos de dichos elementos son altamente polimórficos, tanto en número como en localización, entre diferentes cepas de *S.cerevisiae* (Louis *et al.*, 1994). Los elementos X' son una composición de por lo menos cuatro pequeñas secuencias (de 45 a 140 pb) que se encuentran en los subtelómeros de los cromosomas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX de *Saccharomyces* (Louis *et al.*, 1994; [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Las secuencias Y' se encuentran en la mayoría de los telómeros de *S.cerevisiae*, salvo en los cromosomas I, III y XI y codifican potencialmente para una helicasa (Yamada *et al.*, 1998, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)). Estas secuencias forman repeticiones directas de entre una y cuatro copias en tándem y presentan un polimorfismo de tamaño descrito de 5.2 Kb y 6.7 Kb (Figura 1-5). La secuencia repetitiva telomérica de *S. cerevisiae* tiene un consenso laxo T<sub>1-3</sub>G y se encuentra repetida hasta 150 veces, alcanzando los 300pb de longitud como media (Louis *et al.*, 1994) (Figura 1-5). Como en todos los eucariotas, en *S. cerevisiae* esta secuencia es continuamente sintetizada por el enzima telomerasa. El hecho de que no sea estrictamente repetitiva se debe a las peculiaridades de este enzima en levadura.

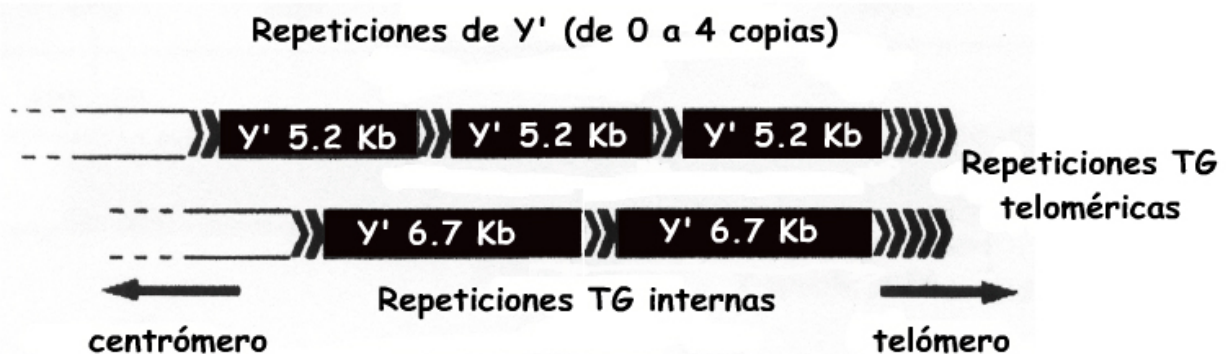


Fig 1-5. Estructura de las secuencias Y'. Estas secuencias se localizan en las zonas subteloméricas de algunos cromosomas, en forma de una a cuatro copias en tándem. Presentan dos tipos de polimorfismos; de número y de tamaño (5.2 Kb y 6.7 Kb respectivamente). No se dan combinaciones de ambas secuencias (5.2 Kb y 6.7 Kb). Codifican potencialmente para una helicasa (Modificado de Yamada *et al.*, 1998).

Existen otros elementos repetitivos en el genoma como los transposones Ty (de “*transposon yeast*”) hallándose de 35 a 55 copias en una cepa haploide (Kingsman y Kingsman, 1988). La estructura de estos elementos se compone de un núcleo central, constituido por los dos genes característicos de los retrotransposones, homólogos a los genes retrovirales *gag* y *pol* (Boeke y Corces, 1989), flanqueado por secuencias de 330 pb designadas como LTR (“*long terminal repeat*”). Dichas secuencias LTRs se encuentran también de manera independiente (es decir, no asociadas a Tys) dispersas por todo el genoma en un número aproximado de unas 100 copias por genoma haploide (Goffeau *et al.*, 1996; Pretorius, 2000). A estas secuencias LTR aisladas se las denomina como secuencias  $\delta$ . Dentro de los Tys de *Saccharomyces* encontramos cinco tipos de transposones, denominados Ty1, Ty2, Ty3, Ty4 y Ty5, de los que solamente los tres primeros son transposicionalmente activos. El Ty5 está formado por LTRs o inserciones degeneradas que han acumulado mutaciones, y se encuentra en copia única en el subtelómero del cromosoma III ([http://biochemie.web.med.unimuenchen.de/Yeast\\_Biology/11\\_Retroposons.htm](http://biochemie.web.med.unimuenchen.de/Yeast_Biology/11_Retroposons.htm)).

Los Tys presentan una distribución diferente en las distintas cepas de levadura. Las cepas de laboratorio y muchas industriales tienen una abrumadora mayoría de Ty1 y luego, en orden decreciente, Ty2 y Ty3. Sin embargo, en algunas cepas vínicas predomina Ty2 mientras que la proporción de Ty1 es muy baja (Benítez *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 1996; Nadal *et al.*, 1999).

#### 1.5.3.4 Elementos extracromosomales

*S. cerevisiae* presenta diversos elementos genéticos no mendelianos, tanto en núcleo (el plásmido 2  $\mu$ m), como en mitocondria (*mtDNA*) y citoplasma (factores killer y elementos priónicos tales como  $\psi$ ,  $\eta$  y *URE3*). El plásmido 2  $\mu$ m consiste en una molécula de DNA circular de 6.3 Kb del que se encuentran de 50 a 100 copias por célula. Este elemento circular (uno de los pocos elementos de este tipo en eucariotas) está presente en la mayoría de las cepas salvajes y en todas las cepas de laboratorio (cepas *cir<sup>+</sup>*). No se ha descrito ningún fenotipo asociado a la falta de este elemento (cepas *cir<sup>0</sup>*).

##### 1.5.3.4.1 DNA mitocondrial

Como en todos los eucariotas, la mitocondria de *S. cerevisiae* posee su propia dotación genética y su propia maquinaria de transcripción y traducción. El DNA mitocondrial (*mtDNA*) de *S. cerevisiae* consiste en una molécula circular de 75 Kb, con elevada proporción de A+T y que codifica los genes necesarios para la transcripción y traducción mitocondriales y para unos pocos componentes de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura 1-6) (Ricchetti *et al.*, 1999). La replicación del *mtDNA* no está limitada solamente a la fase S, sino que se produce a lo largo del ciclo celular. La

---

*mtDNA* polimerasa carece de actividad “*proofreading*”, por lo que la tasa de mutación en genes mitocondriales es alta (Guérin, 1991). Este alto error se halla compensado por la abundancia de moléculas presentes por célula, y por el hecho de que las cepas tienden a ser homoplásmicas, es decir, si existen moléculas diferentes esta heterogeneidad desaparece al cabo de 2 ó 3 divisiones (Piskur, 1994). Por otra parte, diversos agentes (como el etanol o el acetaldehído presentes en el medio, o el bromuro de etidio y otros) pueden provocar lesiones en el *mtDNA* e incluso la pérdida de éste (Martínez *et al.*, 1995; Ristow *et al.*, 1995; Ibeas *et al.*, 1997; Castrejón *et al.*, 2002).

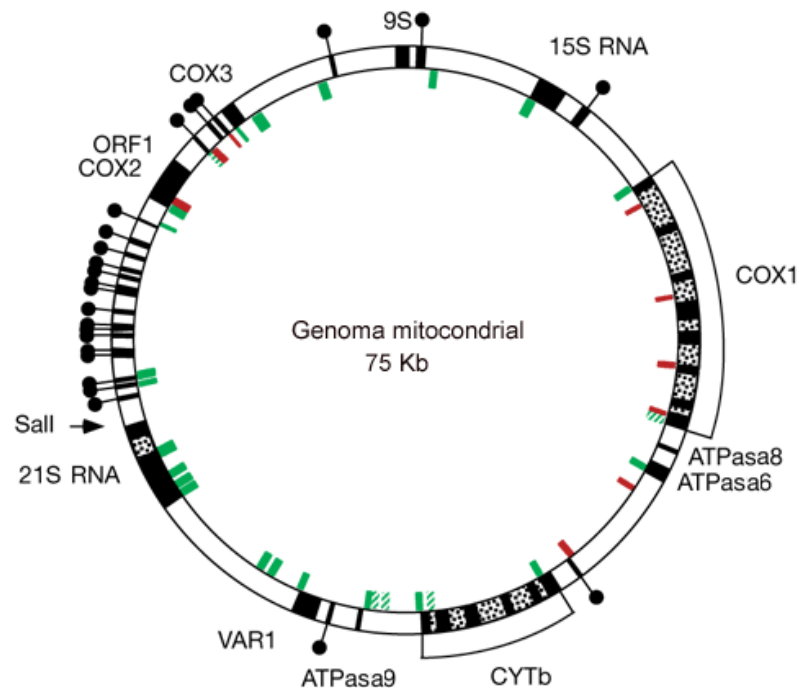


Figura 1-6. Mapa del DNA mitocondrial de *Saccharomyces*. El mapa está deducido de los datos de la secuencia completa. El tamaño de esta molécula es de 75 Kb. Las cajas negras indican exones codificantes, mientras que las punteadas indican intrones. En este mapa tan sólo aparecen los principales ORFs. Los fragmentos marcados con cajas verdes corresponden a secuencias de alta homología con el DNA nuclear (Modificado parcialmente de Ricchetti *et al.*, 1999).

*S.cerevisiae* puede sobrevivir sin *mtDNA*, aunque esto implica la pérdida de enzimas oxidativas, y por tanto, la imposibilidad de generar ATP por la vía oxidativa y de usar fuentes de carbono no fermentables. Como resultado estos mutantes (*rho<sup>0</sup>*), crecen más lentamente y forman colonias más pequeñas (*petite*) que las cepas salvajes *RHO<sup>+</sup>* (*grande*).

Además de su papel central en el metabolismo respiratorio, el genoma mitocondrial de *S.cerevisiae* está relacionado con otras funciones celulares. Debido al hecho de que la generación de

mutantes *petite* en cepas vínicas ocurre de forma espontánea, es importante remarcar que cepas con diferentes *mtDNA* difieren en características de floculación, de metabolismo lipídico, en producción de alcoholes de alto peso molecular y en formación de compuestos organolépticos. Así no se usan cepas vínicas *petite* industrialmente, por la influencia del *mtDNA* en dichos procesos (Pretorius, 2000).

#### 1.5.3.4.2 Factores *Killer*

El fenotipo *killer* en *Saccharomyces* se halla asociado a la presencia intracelular de partículas no infecciosas tipo *virus-like* (VLP). Las VLP presentes en cepas *killer* (cimocidales) contienen dos cadenas de RNA (*dsRNA*), designadas como genomas L y M (Wickner, 1996; Petering *et al.*, 1991). El genoma L, de un tamaño 4.5 Kb, codifica una RNA polimerasa-RNA dependiente y una proteína de cubierta que encapsula ambos genomas. El genoma M, de tamaño variable (de 1.3 Kb a 2 Kb), codifica para una proteína tóxica (cimocina) y un factor de inmunidad. Existen una serie de cepas inmunes (cepas neutras) cuyo genoma M no codifica para ninguna toxina. La cimocina es secretada por cepas cimocidales y es letal para cepas sensibles. Hasta el momento se han descrito cinco tipos de cepas *killer* de *S.cerevisiae*, siendo las cepas *killer* vínicas del tipo K2 o K28, debido probablemente a que la actividad cimoidal de estas variantes está favorecida por las condiciones ácidas del mosto (pH 2.8-3.8) (Wingfield *et al.*, 1990; Wickner, 1996). Las cepas *killer* poseen la ventaja ecológica de ser capaces de desplazar a otras, pero organolépticamente el factor *killer* no aporta ningún valor añadido al producto final.

## **1.6 Métodos moleculares de diferenciación de levaduras vínicas**

Los métodos clásicos, basados en pruebas de carácter fenotípico, se han empleado tradicionalmente como métodos de clasificación taxonómica dentro del género *Saccharomyces*. Entre ellos cabe destacar la utilización de diferentes azúcares, crecimiento sin niacina, utilización de L-lisina como fuente de nitrógeno única y crecimiento en 0.1 % de cicloheximida, entre otras (Barnett, 1992). Este tipo de pruebas son siempre largas, costosas y no siempre reproducibles (Querol *et al.*, 1992; Querol *et al.*, 1993). Muchas de las cepas industriales del grupo de *S.cerevisiae* no son distinguibles y/o identificables por métodos fenotípicos clásicos y de ahí surge la necesidad de la utilización de técnicas moleculares. La mayoría de las técnicas utilizadas en la actualidad se basan en la discriminación de polimorfismos de DNA (Querol *et al.*, 1992; Fernández-Espinar *et al.*, 2001). El inconveniente de las técnicas moleculares es que algunas de ellas no son extrapolables industrialmente debido a su elevado coste económico y/o tiempo en desarrollarlas (Fernández-Espinar *et al.*, 2001).

---

La enología actual, la cual utiliza mayoritariamente levadura seca activa (LSA) requiere de controles fiables, sensibles, rápidos y económicos. Hay dos aspectos fundamentales que es necesario controlar:

- 1.- Identificación inequívoca de que la cepa que vamos a inocular y que hemos multiplicado previamente es la cepa deseada.
- 2.- Control de calidad durante la producción, para asegurar que la cepa inoculada es la que está llevando a cabo el proceso (Querol *et al.*, 1992).

La técnica a elegir dependerá del coste económico, equipamiento, rapidez, poder de discriminación (capacidad de diferenciar el máximo número de cepas), la sensibilidad (capacidad de detección de una cepa minoritaria en una mezcla), la fiabilidad (reproducibilidad de la técnica en espacio y tiempo) y la divergencia (capacidad de sensibilidad a los cambios genéticos) (Vezinhet *et al.*, 1990).

#### 1.6.1 Identificación de polimorfismos de secuencia de DNA

El uso de sondas como herramientas de identificación y clasificación molecular ha sido propuesto por varios autores (Braus *et al.*, 1985; Degré *et al.*, 1989, Querol *et al.*, 1992). Esta técnica consiste en obtener fragmentos de restricción de DNA genómico e hibridarlos con sondas pertenecientes a genes de metabolismo primario tales como *HIS4*, *LEU2*, *TRP1*, *TRP2*, *TRP3* y *TRP4*, entre otros. Como quiera que para determinadas cepas analizadas no se obtienen resultados polimórficos utilizando ninguna de estas sondas (Braus *et al.*, 1985), se han propuesto otras correspondientes a secuencias repetitivas del genoma, como el DNA ribosomal (Pedersen, 1983), los Tys o la secuencias poliTG (Walmsley *et al.*, 1989).

#### 1.6.2 RFLP de mtDNA

Este método ha sido utilizado para la diferenciación de cepas industriales desde los años 80, aunque en los 90 es perfeccionado por Querol y colaboradores, de manera que no requiera purificación del mtDNA (Querol *et al.*, 1992). El DNA total es digerido con nucleasas que reconozcan cuatro bases de DNA e incluyan C/G dentro de su diana de reconocimiento (como *HinfI*, *RsaI*, *TaqI*, *DdeI*). Con ello, el DNA mitocondrial queda digerido en bandas discretas, mientras que el DNA nuclear se digiere totalmente, al ser comparativamente más rico en bases C/G. Con esta técnica se obtiene un patrón característico para cada cepa. Es una herramienta muy utilizada en la actualidad y con un gran poder discriminatorio (Guillamón *et al.*, 1994; López *et al.*, 2001).

### 1.6.3 Cariotipado de cepas

Esta técnica fue descrita por Carle y Olson en 1985, y ha ido mostrando su enorme utilidad como herramienta taxonómica (Vaughan-Martini *et al.*, 1993). La técnica consiste en separar electroforéticamente los cromosomas para obtener un cariotipo específico de cada cepa. Esta técnica es especialmente útil para la diferenciación de las cepas salvajes y/o industriales, ya que éstas presentan múltiples polimorfismos cromosómicos (De Jonge *et al.*, 1986; Johnston y Mortimer, 1988; Venzinhet *et al.* 1990). Un factor importante a tener en cuenta es el hecho de que muchas cepas salvajes presentan el fenómeno de inestabilidad genética, por lo que sus cariotipos pueden variar notablemente al cabo de unas cuantas generaciones.

### 1.6.4 Polimorfismos de DNA ribosomal

Las secuencias que se encuentran entre las subunidades de rDNA, llamadas ITS (*internal transcribed spacer*) y NTS (*nontranscribed spacer*) son altamente variables entre especies y cepas (Baleiras Couto *et al.*, 1996; Guillamón *et al.*, 1998; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999; Fernández-Espinar *et al.*, 2000). Tanto la amplificación de una región correspondiente a NTS, como la amplificación de regiones ITS y la posterior restricción de las amplificaciones, han demostrado su utilidad en la diferenciación de cepas. Han demostrado extremadamente su utilidad con cepas de *S.cerevisiae* y *S.pastorianus* (Molina *et al.*, 1993; Baleiras Couto *et al.*, 1995; Baleiras Couto *et al.*, 1996) (Figura 1-4)

### 1.6.5 Análisis de secuencias polimórficas amplificadas al azar por PCR (RAPD-PCR)

La técnica del RAPD consiste en la amplificación de fragmentos al azar del genoma de una cepa, utilizando oligonucleótidos cortos. Estos nucleótidos no suelen superar los 10 pb, obteniéndose un patrón diferente para cada nucleótido o combinaciones de éstos. Este patrón es característico para cada cepa (Baleiras Couto *et al.*, 1994; Baleiras Couto *et al.*, 1996; de Barros Lopes *et al.*, 1998). A pesar de la utilidad de la técnica, posee entre sus inconvenientes la de ser una técnica poco reproducible, tanto a lo largo del tiempo como entre diferentes laboratorios. Para alcanzar su máximo nivel de discriminación sobre un fondo genético determinado, requiere frecuentemente de un proceso de optimización con diferentes oligonucleótidos. Posee la gran ventaja de tener un coste muy bajo y de ser sencilla, factores que la hacen muy atractiva para la industria fermentativa.

### 1.6.6 Amplificación y caracterización de secuencias delta $\delta$ por PCR

Esta técnica consiste en la amplificación de las secuencias delta ( $\delta$ ), asociadas o no a transposones (Tys). Posee un buen poder discriminatorio en la clasificación de cepas, obteniéndose un patrón de amplificación específico para cada cepa o grupo de cepas (Fernández- Espinar *et al.*, 2001). Esta técnica es rápida y económica, lo que la hace muy conveniente para su aplicación industrial, aunque posee el inconveniente de ser muy dependiente de la calidad y cantidad del DNA molde, así como por el empleo de temperaturas de anillamiento muy bajas, lo que limita su reproducibilidad entre diferentes laboratorios (Fernández- Espinar *et al.*, 2001).

### 1.6.7 PCR de secuencias polimórficas de DNA mitocondrial

Este método se basa en la variación en número y posición de los intrones en el gen mitocondrial *COX1*, que codifica para una citocromo C oxidasa (Foury *et al.*, 1998; López *et al.*, 2003). Se utilizan una serie de *primers* de secuencias consenso de diferentes microorganismos y se realizan reacciones de PCR múltiples. Este método es rápido y económico. Presenta el inconveniente de que no es demasiado sensible en la identificación de una cepa en un proceso fermentativo (López *et al.*, 2003).

## **1.7 Mejora genética de levaduras industriales**

Las levaduras vínicas han sido seleccionadas tradicionalmente por su excepcional tolerancia a etanol, su resistencia al anhídrido sulfuroso y la capacidad de fermentar mostos eficientemente (que contienen del orden del 16%-18% de azúcares) sin producir productos organolépticos no deseados. Todas estas características así como otras no siempre coexisten en una cepa, por lo que en muchos casos es necesario o deseable su mejora genética.

Las primeras mejoras de cepas vínicas fueron realizadas a mediados de los años 80, como respuesta a la demanda industrial de nuevas cepas. Estas primeras mejoras genéticas fueron llevadas a cabo por genética clásica, por medio de mutagénesis, hibridación o citoducción (Dequin, 2001). Estos métodos son poco específicos y con ellos es difícil modificar una determinada propiedad sin alterar accidentalmente otras de manera imprevisible. Además, las levaduras vínicas presentan bajas tasas de esporulación y tasas de viabilidad de esporas bastante bajas, factor que refleja la complejidad genética de dichas cepas. Muchas de las esporas son incapaces a menudo de conjugarse. Poseen además altas dosis de aneuploidías y un alto grado de heterocigosis. Todas estas características hacen muy difícil su mejora por medios convencionales.

---



La creciente demanda de cepas comerciales por parte de la industria ha multiplicado en pocos años el número de cepas vínicas comercializadas. Paralelamente, se han ido desarrollando estrategias basadas en DNA recombinante para la mejora genética de cepas (Pérez-González *et al.*, 1993; Pretorius, 2000; Dequin, 2001). Las cepas vínicas suelen protótrofas, por lo que para seleccionar cepas recombinantes deben utilizarse marcadores dominantes tales como resistencia a G418 (geneticina), ClonNat® (nurseotricina), cobre, cicloheximida, formaldehído, fluoroacetato o trifluoroleucina (Cavalieri *et al.*, 1999; Bondoni *et al.*, 1999). El hecho de que algunos de los genes que confieren resistencia tenga un origen bacteriano limita enormemente su aplicación en la industria alimentaria, debido a la legislación vigente sobre organismos modificados genéticamente (OMG).

### 1.7.1 Floculación

La agregación asexual de las células en flocos y su posterior sedimentación, es una característica importante en las cepas vínicas y cerveceras. Es dependiente de una familia multigénica (genes *FLO*) dispersa por todo el genoma, habiéndose descrito como genes dominantes a *FLO1*, *FLO8* y *FLO5* (Dequin, 2001) y el proceso es además dependiente de calcio. El gen *FLO1*, uno de los genes dominantes de la familia, codifica para una proteína con un dominio lectina (Watari *et al.*, 1994; Bidard *et al.*, 1995). La estrategia más utilizada es la de transformar una cepa vínica no floculante con un plásmido multicopia que contiene *FLO1*, lo que la convierte en floculante (Bidard *et al.*, 1994). Otras variaciones de esta estrategia consistieron en la transformación plasmídica de fusiones génicas del tipo *pADH1-FLO1* (promotor de alcohol deshidrogenasa, muy potente) (Watari *et al.*, 1994) o *pHSP30-FLO1* (promotor *heat-shock protein 30*) (Verstrepen *et al.*, 2000).

### 1.7.2 Sobreproducción de glicerol

El glicerol es el tercer producto más frecuente tras el etanol y el CO<sub>2</sub> en el proceso fermentativo, llegándose a concentraciones de 6 a 13 g/l (Dequin, 2001). Confiere a los vinos *cuerpo* y una cualidad organoléptica dulce. Se obtuvieron cepas sobreproductoras de glicerol clonando el gen *GDP1* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) en un plásmido multicopia de tipo 2 $\mu$ m. Con esta estrategia se consiguió duplicar y hasta triplicar el nivel de glicerol. Otra estrategia empleada fue la transformación, también en plásmido multicopia, de fusiones del tipo *pADH1-GDP1* con lo que se obtuvieron cantidades del orden de 12 a 18 g/l de glicerol y un 1 por ciento menos de etanol en el producto final (Remize *et al.*, 1999).

---

### 1.7.3 Sobreproducción de acetato de isoamilo

El acetato de isoamilo confiere el aroma de plátano, considerado muy positivo en vinos jóvenes. Se produce por metabolización del alcohol isoamílico, relacionado a su vez con la síntesis de leucina. Para aumentar el nivel de este éster se siguieron diversas estrategias basadas en la sobreexpresión de *LEU4* (isoapropiamil sintasa) o de *ATF1* (alcohol acetiltransferasa) (Lilly *et al.*, 2000).

### 1.7.4 Eliminación de etilcarbanato

Se forma por la reacción espontánea de urea y de etanol a elevadas temperaturas en medio ácido. Es un supuesto carcinógeno que se encuentra en una amplio abanico de productos fermentados (vino, jerez, brandi, sake) y su concentración está legislada. La urea proviene de la lisis de la arginina por parte de la enzima arginasa, por lo que un abordaje biotecnológico se basó en la disrupción del gen correspondiente (*CAR1*) (Kitamoto *et al.*, 1991). También se abordó la expresión de ureasas de *Lactobacillus* (Visser *et al.*, 1999), aunque sin demasiado éxito.

### 1.7.5 Fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica es la transformación de ácido málico presente en el mosto en ácido láctico, mediante la descarboxilación de malato a acetato por la enzima maloláctica. Este proceso posee un papel clave en la deacidificación y estabilización del vino, contribuyendo por tanto de una forma esencial a la calidad organoléptica de este. Este proceso bioquímico no puede ser llevado a cabo por *S.cerevisiae*, por lo que se añade al mosto en fermentación, una serie de inóculos comerciales de bacterias malolácticas (*Lactococcus lactis* o *Leuconostoc oenos*) para dicha transformación. Esta estrategia presenta el inconveniente de que muchas veces la composición del vino (alto porcentaje de etanol, pH cercano a 3.3) no es óptima para el desarrollo de dichos microorganismos. Una de las estrategias moleculares seguidas para la transformación del malato es la expresión en *Saccharomyces* del gen o genes responsables de la fermentación maloláctica. La clonación del gen *mleS* de *Lactococcus lactis* (que codifica para la enzima maloláctica) en *Saccharomyces* dio buenos resultados a escala piloto (Ansanay *et al.*, 1993). Van Vuuren y colaboradores (2003) clonaron el gen maloláctico de *L.oenos* (*O.oeni*) en el locus *URA3* de una cepa de *S.bayanus* junto con el transportador de malato de *S.pombe*. En este caso el malato fue eliminado de manera muy eficiente por la cepa recombinante sin alterar de manera significativa el resto de propiedades enológicas de la misma.

---

### 1.7.6 Producción de ácido láctico

El balance equilibrado entre el azúcar y el ácido en el vino, es uno de los mayores requisitos para la calidad de éste. En muchas regiones enológicas, el mosto posee una cantidad de ácido muy baja, hecho que debe de ser corregido. Puede realizarse la corrección por la adición de ácido tartárico, pero su capacidad se halla limitada por la inestabilidad del tartrato potásico (Dequin, 2001). Para corregir la acidez, se construyó una cepa recombinante de *S. cerevisiae* productora de ácido láctico que expresaba el gen de la lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus lactis* (LDH). Esta cepa incrementa la acidez del medio de 0.2 a 0.3 unidades de pH (Dequin *et al.*, 2001).

### 1.7.7 Disminución de acidez volátil

El ácido acético es extremadamente negativo para la calidad de los vinos. Este compuesto volátil es producido espontáneamente por *S. cerevisiae*, aunque su producción puede bloquearse mediante la disrupción del gen *ALD6* (acetaldehído deshidrogenasa). Como efecto beneficioso añadido, la cepa modificada produce concentraciones elevadas de glicerol, succinato y 2,3-butanodiol (Remize *et al.*, 2000).

### 1.7.8 Degradación de polisacáridos

En la producción de vino se usan pectinasas y glucanasas comerciales para su clarificación. Este hecho facilita la licuación de la uva favoreciendo además la liberación de varios compuestos de la piel (que contribuyen positivamente al sabor) y la posterior clarificación del vino. La estrategia realizada consistió en el clonaje de pectinasas de *Erwinia* (Laing *et al.*, 1993), glucanasas bacterianas (González-Candelas *et al.*, 1995) y endo-exo glucanasas en *Saccharomyces* (Pérez-gonzález *et al.*, 1993; Dequin, 2001).

### 1.7.9 Liberación de aromas

Las glucosidasas de *Saccharomyces* y de la uva son inhibidas por la presencia de glucosa en el mosto y por su carácter ácido. La adición de preparados de glucosidasas fúngicas al vino favorece la hidrólisis de compuestos aromáticos glicoconjugados, mejorando la percepción organoléptica. Para aumentar la producción de estos compuestos, se clonaron glucosidasas fúngicas en *S. cerevisiae*, como las glucosidasas de *Candida* (Saha y Bothast, 1996) y de *A. oryzae* (Riou y Günata, 1998).

### 1.7.10 Otras estrategias

Radican en la modificación de rutas metabólicas propias de *Saccharomyces* con el objeto de aumentar el aroma del vino, como los mutantes de biosíntesis de ergosterol, que producen monoterpenos similares al de las flores de viña (Chambon *et al.*, 1990).

## 1.8 Inestabilidad cariotípica; polimorfismos cromosómicos

Muchas cepas vínicas presentan polimorfismos cromosómicos, consistentes en que dos cepas de la misma especie, o dos clones de la misma cepa, presenten diferencias de tamaño y/o número de bandas cromosomales en sus cariotipos (Benítez y Codón, 1995). Estos polimorfismos son consecuencia en algunos casos de una adaptación al medio industrial (Bakalinsky y Snow, 1990; Adams *et al.*, 1992; Longo y Venzinhet, 1993; Benítez y Codón, 1995; Miklos *et al.*, 1997; Gasent-Ramírez *et al.*, 1999; Nadal *et al.*, 1999; Pérez Ortín *et al.*, 2002b). La implementación del cariotipado de levaduras por electroforesis de campo pulsante facilitó la detección de polimorfismos cromosómicos, y las primeras descripciones correspondieron a polimorfismos detectados entre cepas haploides de laboratorio, paralelas al desarrollo de dicha técnica (Carle y Olson 1985; Johnston *et al.*, 1988). Sin embargo, es en cepas industriales y salvajes donde el polimorfismo cromosómico es más acusado y frecuente, dándose tanto en cepas cerveceras como en panaderas o vínicas (Venzinhet *et al.*, 1990; Rank *et al.*, 1991). En algunos casos se detectaron diferencias de hasta de un 45 % en el tamaño de un mismo cromosoma entre clones de la misma cepa (Bidenne *et al.*, 1992). Este fenómeno no se halla restringido a *S.cerevisiae*, ya que también es común en otras especies de hongos de dotaciones cromosómicas y tamaño genómico dispar (Zolan, 1995).

Uno de los mecanismos responsables de la aparición de polimorfismos cromosómicos es el de **inestabilidad cariotípica**, una de las formas de **inestabilidad genética**. La inestabilidad cariotípica es un fenómeno que se da tanto en mitosis como en meiosis, consistente en reorganizaciones cromosómicas, más o menos frecuentes, que dan como resultado la aparición de diferentes polimorfismos cromosómicos ente clones de una misma cepa o entre sus derivados meióticos. Este fenómeno es muy importante industrialmente, ya que una cepa con inestabilidad cariotípica puede no garantizar la reproducibilidad de las propiedades del producto final en un proceso industrial (Gasent-Ramírez *et al.*, 1999).

No se ha descrito ningún marcador fenotípico asociado a inestabilidad cariotípica en *Saccharomyces*, lo que dificulta su detección y complica su análisis. La inestabilidad cariotípica no ocurre

en cepas de laboratorio, salvo en aquellas sometidas a una fuerte presión selectiva (Adams *et al.*, 1992) o en determinados mutantes de replicación y recombinación (Chen *et al.*, 1998; Chen y Kolodner, 1999). En otras especies de levadura, como *Candida albicans*, la inestabilidad cariotípica tiene lugar espontáneamente asociada a cambios fenotípicos relacionados con la virulencia de la cepa (Rustchemko *et al.* 1993; Pérez-Martín *et al.* 1999).

Tal vez el estudio más detallado de la inestabilidad cromosómica en *S. cerevisiae* fue el publicado por Longo y Vezinhet en 1993. En este trabajo se estudiaron las recombinaciones cromosómicas en dos cepas en crecimiento vegetativo, una haploide de laboratorio y de una cepa vínica, hasta un total de 275 generaciones. Los cariotipados de derivados de ambas cepas demostraron que, mientras que el cariotipo de la cepa haploide era estable, el 50% (15/30) de los cariotipos de los derivados mitóticos de la cepa vínica presentaron nuevos polimorfismos cromosómicos presuntamente debidos a reorganizaciones en sus cromosomas, siendo más frecuentes en los cromosomas pequeños (cromosomas I y III) (Longo y Vezinhet, 1993) .

Adams y colaboradores (1992) sometieron a una cepa de laboratorio a crecimiento mitótico en un medio con cantidades limitantes de fosfato inorgánico, hasta completar de 700 a 1000 generaciones. Demostraron que la adaptación a este medio subóptimo fue acompañada por duplicaciones de largas porciones del genoma, detectando además deleciones a más baja frecuencia y otros tipos de eventos que conducen a la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos (Adams *et al.*, 1992).

Ibeas y Jiménez (1996) estudiaron la inestabilidad cariotípica de un híbrido entre una cepa de laboratorio y una cepa vínica, detectando inestabilidad cariotípica y afirmando que la presencia de cromosomas polimórficos de tamaño en dichos híbridos, son por sí mismos una fuente de inestabilidad (Ibeas y Jiménez, 1996).

Botsein y colaboradores sometieron a una cepa a 500 generaciones con limitación de la fuente de carbono (glucosa). Utilizando la técnica de CGH (*comparative genomic hybridization*) con matrices de DNA, pudieron observar como algunos de los cambios cromosomales se debían a amplificaciones en los transportadores de hexosa (Dunham *et al.*, 2002).

Un caso especial de inestabilidad cromosómica es el presentado por el cromosoma XII. Este cromosoma presenta variaciones de tamaño a muy alta frecuencia. Se ha demostrado que estas variaciones de tamaño son debidas a reorganizaciones estructurales basadas en la alteración del número de *clusters* de rDNA durante el crecimiento vegetativo (Pasero y Marilley, 1993; Chindaporn *et al.*, 1993; Rustchenko *et al.*, 1993).

Algunos polimorfismos cromosómicos quedan fijados en una determinada cepa a lo largo del

---

tiempo como consecuencia de una fuerte presión del medio de crecimiento industrial. Este es el caso de lo descrito por Guijo *et al.*, que encontraron polisomías del cromosoma XIII en levaduras de flor (levaduras vínicas de producción de jerez). Este cromosoma contiene los genes *ADH2* y *ADH3* (alcoholes deshidrogenasas) que intervienen en los procesos oxidativos del etanol en el envejecimiento de estos vinos (Guijo *et al.*, 1997), por lo que el aumento del número de copias probablemente mejoraba las características industriales de la cepa. Codón *et al.* describieron una amplificación del gen *SUC2* en cepas panaderas y de melazas, concluyendo que es un mecanismo adaptativo que otorga un mejor *fitness* industrial a dichas cepas (Codón *et al.*, 1997). Pérez-Ortín *et al.*, han descrito una translocación recíproca entre los cromosomas VIII y XVI, dando como resultado el alelo *SSU1-R* (el gen *SSU1* confiere resistencia a sulfito). En este alelo, *SSU1* está regulado por el promotor fuerte *EMC34* y ha quedado fijado en el fondo genético estudiado, ya que seguramente confiere una ventaja selectiva a la cepa en cuestión (Pérez Ortín *et al.*, 2002b).

Aunque los procesos de recombinación mitótica pueden explicar por sí mismos la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos en cepas industriales y salvajes, con ciclos de vida esencialmente asexuales, Mortimer y colaboradores propusieron el modelo del “Genome Renewal” como posible alternativa (Mortimer *et al.*, 1994). Este modelo propone que una cepa diploide que acumule mutaciones puede llegar a esporular en condiciones de crecimiento vegetativo, diploidizar y formar nuevos clones que pueden imponerse al resto si durante el proceso han adquirido alguna ventaja selectiva. La importancia de este proceso está actualmente sometido a debate (Miklos *et al.* 1997; Puig *et al.*, 2000).

### 1.8.1 Mecanismo molecular de la inestabilidad cariotípica

Existen diversos modelos para explicar el origen de polimorfismos cromosómicos y la inestabilidad cariotípica. El más aceptado es el que explica los cambios de tamaño de los cromosomas por recombinación homóloga no alélica (recombinación ectópica) entre secuencias repetidas dispersas en el genoma, como los elementos Ty, los elementos subteloméricos Y', y otros (Louis y Haber, 1990; Adams *et al.*, 1992; Biddenne *et al.*, 1992; Benítez y Codón, 1995; Benítez *et al.*, 1996; Codón *et al.*, 1997; Kupiec y Petes, 1988a y b; Rachidi *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2003). Algunas cepas vínicas presentarían este fenómeno con alta frecuencia en meiosis (Codón *et al.*, 1997), mientras que otras cepas lo presentarían también en crecimiento mitótico (Longo y Vezinhet, 1993; Nadal *et al.*, 1999). Aunque la base molecular de la recombinación que origina los polimorfismos cromosómicos es conocida, poco se sabe del origen de la recombinación mitótica espontánea (Aguilera *et al.*, 2000).

---

## 1.8.2 Recombinación e inestabilidad genética

### 1.8.2.1 Recombinación

La recombinación se define como el proceso de intercambio o de transferencia de información entre moléculas de DNA, clasificable en dos tipos básicos (Paques y Haber, 1999; Prado *et al.*, 2003):

- Recombinación homóloga (HR) (Figura 1-7).
- Recombinación no homóloga (*non homologous end joining*, NHEJ) (Figura 1-7).

La recombinación homóloga implica el intercambio de DNA entre secuencias idénticas o casi idénticas, de cientos de pares de bases, mientras que la recombinación no homóloga ocurre entre secuencias de DNA sin homología o con muy escasa homología.

El proceso de recombinación homóloga juega un papel central y crucial en el ciclo de vida de muchos organismos, tanto en mitosis como en meiosis. En meiosis, su función primaria es la de establecer una conexión física entre cromosomas homólogos para asegurar una correcta disyunción en la primera división meiótica, así como la de contribuir a la diversidad por creación de nuevos grupos de ligamientos génicos, o de partes de éstos (Roeder *et al.*, 1997; Prado *et al.*, 2003). En mitosis juega un papel primordial como mecanismo de reparación de lesiones del DNA, causados por diversos fenómenos (Kogoma, 1997; Cox, 2001).

La NHEJ juega un papel esencial en la reparación de determinadas dobles roturas de cadena del DNA (DSB, *double strand breaks*) y muchos de sus componentes son requeridos para la estabilización de DNA repetitivos presentes en los telómeros (Lewis y Resnick, 2000).

### 1.8.2.2 Mecanismo de recombinación

Todos los procesos de recombinación meiótica y mitótica se inician por una doble rotura del DNA (Aguilera *et al.*, 2000). En mitosis estas dobles roturas del DNA (DSBs) se producen fortuitamente como consecuencia de radiaciones ionizantes, agentes químicos, errores de replicación o distorsiones en el DNA (Prado *et al.*, 2003). Además existen DSB programadas como los que ocurren en *Saccharomyces* en el cambio de tipo de conjugación (*mating type switching*) o , en meiosis, los producidos por la acción de la endonucleasa Spo11p (Celerin *et al.*, 2000; Pecina *et al.*, 2002).

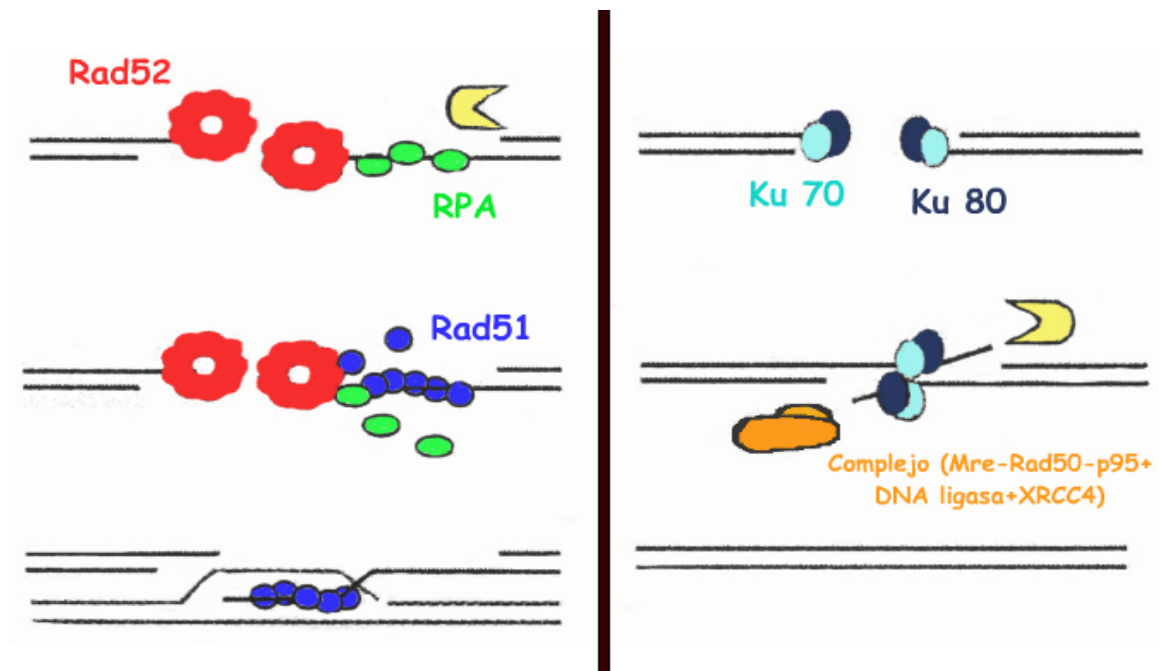


Figura 1-7 . Recombinación homóloga (HR) y no homóloga (NHEJ). A-HR) En la parte izquierda de la figura se muestra esquemáticamente el proceso de reparación y las dos proteínas y complejos clave en dicho proceso (Rad52p en rojo, Rad51p en azul y el complejo RPA en verde). Rad52p juega un papel esencial en dicho proceso y puede facilitar el desplazamiento de RPA por parte de Rad51p. B-NHEJ) En la parte derecha se muestra esquemáticamente el proceso de reparación no homóloga (NHEJ), con las dos proteínas y complejos clave en dicho proceso (Ku70-Ku80 en azul claro y fuerte respectivamente, y el complejo Mre-Rad50-p95-DNA ligasa-XRCC4) (Modificado de Haber, 1999).

En *Saccharomyces* la reparación de dichos *DSBs* ocurre preferentemente por un proceso de recombinación homóloga (HR). Este proceso de reparación, que implica recombinación, requiere de una larga homología y ocurre a partir de la cromátida hermana no dañada o del cromosoma homólogo. En todos los casos, la HR puede implicar la transferencia no recíproca de una molécula de DNA a otra (proceso de conversión génica) y/o transferencia recíproca de información entre dos moléculas de DNA (entrecruzamiento) (Prado *et al.*, 2003) (Figura 1-8).



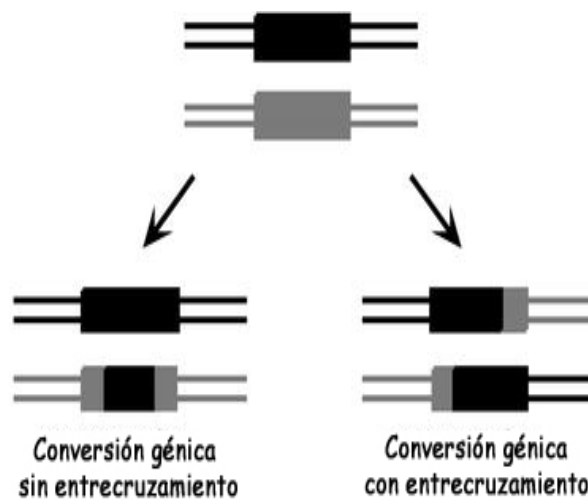


Figura 1-8. Resultados de los procesos de recombinación homóloga. En el proceso de conversión génica sin entrecruzamiento se produce una transferencia no recíproca entre las secuencias participantes, mientras que en el proceso de conversión génica con entrecruzamiento se produce una transferencia recíproca entre ambas secuencias (Modificado de Prado *et al.*, 2003).

Este proceso de recombinación homóloga puede llevarse a cabo por tres mecanismos básicos (Paques y Haber, 1999; Prado *et al.*, 2003) (Figura 1-9):

DSBR (*double stand break repair*)

SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*)

BIR (*break induced replication*).

En *S. cerevisiae*, el proceso de recombinación no homóloga (NHEJ) posee un papel secundario en la reparación DBSs, que son reparados preferentemente por recombinación homóloga (Paques y Haber *et al.*, 1999). La NHEJ consiste en la religación de los extremos cortados, sin requerir homología de secuencia y sin la intervención de extremos protuberantes. Frecuentemente implica la inserción y/o deleción de nucleótidos, resultando por tanto un sistema de reparación que introduce errores en el DNA.

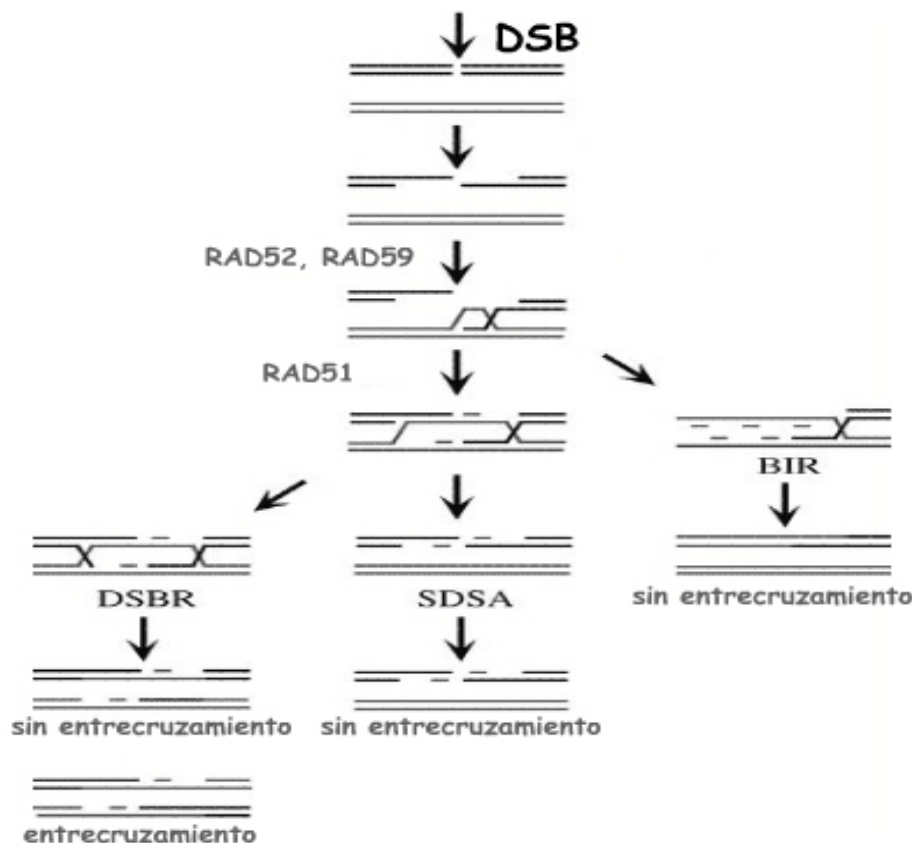


Figura 1-9 . Mecanismos de recombinación homóloga. La iniciación de la recombinación comienza por una rotura doble de cadena (DSB). En la cadena rota aparecen extremos 3' protuberantes, los cuales invaden la cadena homóloga y actúan como *primers* de síntesis. En el caso del proceso de Reparación de Doble Rotura (DSBR), tras la síntesis se forma una *Holliday Junction*, cuya resolución da como resultado un proceso de conversión génica (*gene conversion*) con o sin entrecruzamiento. En el caso de Síntesis Dependiente de Anillamiento de Cadena (SDSA) los fragmentos sintetizados *de novo* vuelven a la cadena a reparar, no existiendo por tanto entrecruzamiento. En el caso del mecanismo de Replicación Inducida por Rotura (BIR) la replicación es más larga sobre la cadena invadida, y no existe ningún tipo de entrecruzamiento. (Modificado de Prado *et al.*, 2003).

### 1.8.2.3 Genética de la recombinación

La figura 1-7 muestra el mecanismo de recombinación homóloga en *S.cerevisiae*. El proceso empieza con la unión a los extremos abiertos de la proteína de replicación A (RPA), la cual se une a la cadena de ssDNA, y la intervención de las proteínas del grupo de epistasia de *RAD52* (*RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55* y *RAD57*). Aparentemente, la reparación del DSB requiere el conjunto de las tres DNA polimerasas con sus respectivos factores asociados (Haber, 1999). Rad52p es la proteína clave en el proceso de recombinación homóloga, necesaria para dichos procesos (Paques y Haber 1999; Haber 1999; Prado *et al.*, 2003). Mutantes *rad52* muestran reducciones de hasta 100 veces en

recombinación alélica inducida por la endonucleasa HO, y de 20 a 1000 veces en recombinación espontánea (Prado *et al.*, 2003).

El proceso de recombinación no homóloga sigue un camino totalmente independiente; de hecho, los dos sistemas de reparación no tienen ningún factor clave en común. La NHEJ requiere el conjunto de las siguientes proteínas: yKu70p y yKu80p, DNA ligasa IV y las proteínas asociadas XRCC4p, Mre11p, Rad50p y Xrs2/p95 (Haber, 1999) (Figura 1-7).

#### 1.8.2.4 Procesos recombinatorios asociados a inestabilidad genética

Mientras que la NHEJ es un proceso recombinatorio que por naturaleza introduce alteraciones, al no depender de homología de secuencia, la recombinación homóloga (HR) es mucho más conservadora y en principio debería restaurar las secuencias originales, siempre que éstas estén disponibles. Sin embargo, la recombinación homóloga puede originar inestabilidad genética cuando se produce entre secuencias situadas en posiciones no alélicas (Prado *et al.*, 2003). Dentro de estos procesos encontramos diferentes situaciones de recombinación no alélica:

##### 1.8.2.4.1 Recombinación ectópica

Ocurre entre secuencias similares o idénticas situadas en posiciones no alélicas del genoma. Su frecuencia en mitosis es la misma que la de recombinación alélica (Kupiec y Petes, 1988ab) y requiere de los mismos genes. Esto implica que en crecimiento vegetativo la frecuencia de contacto entre cromosomas no homólogos es la misma que en el caso de los homólogos, a diferencia de lo que ocurre en meiosis donde la frecuencia de esta última es sensiblemente mayor (Prado *et al.*, 2003). Dentro de este tipo de recombinación podemos encontrar la que se produce entre cromosomas no homólogos o secuencias no alélicas de cromosomas homólogos, que dan lugar a translocaciones, y entre secuencias subteloméricas, lo que produce variabilidad telomérica (Zolan, 1995) (Figura 1-10).

##### 1.8.2.4.2 Recombinación de repeticiones directas

Este tipo de recombinaciones producen intercambio desigual de material genético si ocurren entre cromosomas o simples deleciones cuando son recombinaciones intracromosomales entre repeticiones de la misma orientación (*single strand annealing*, SSA) (Figura 1-11A). Su frecuencia se reduce de 10 a 100 veces en mutantes *rad52* (Prado y Aguilera, 1995). Este tipo de mecanismo es semejante el que se produce en las repeticiones de rDNAs, aunque en este caso son independientes de Rad52p (Ozenberger *et al.*, 1991; Prado *et al.*, 2003).

---

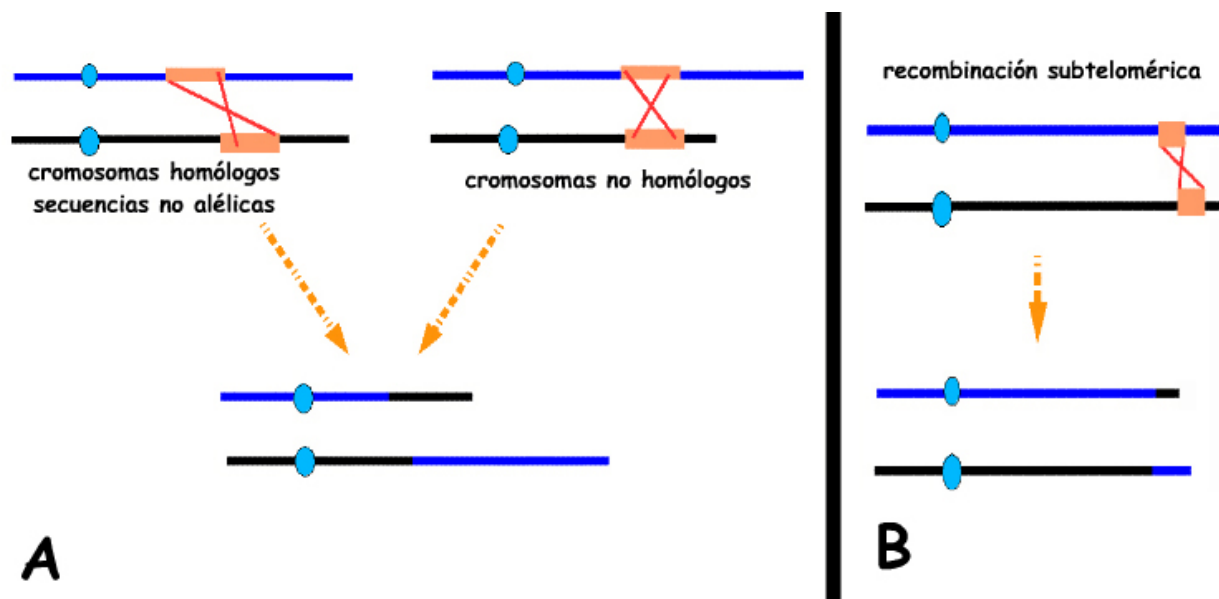


Figura 1-10. Procesos de recombinación homóloga ectópica (A) y homóloga ectópica en zonas subteloméricas (B). Las cajas de color naranja corresponden a secuencias idénticas o de alta homología entre ellas. Estas secuencias se encuentran en posiciones no alélicas de cromosomas homólogos o no homólogos. Debido al grado de homología de secuencia que presentan son el sustrato de recombinación homóloga. Para dicho proceso es fundamental la presencia de la proteína Rad52p. Puede observarse como en todos los casos esquematizados los procesos recombinatorios dan como resultado la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos. (Basado en Zolan, 1995).

#### 1.8.2.4.3 Intercambio desigual entre repeticiones en tándem

Estos procesos pueden ocurrir entre cromátidas hermanas o entre cromosomas homólogos. Provocan translocaciones recíprocas desiguales y por tanto la aparición de nuevos polimorfismos. Estos procesos son designados como intercambio desigual de cromátidas hermanas (“*unequal sister chromatid exchange*”, USCE) (Figura 1-11B) e intercambio desigual de cromosomas (“*unequal chromosome exchange*”, UCE) (Figura 1-11C).

#### 1.8.2.4.4 Otros tipos de eventos

Cuando se produce una doble rotura en el DNA (*DSB*) que no puede ser reparada, se produce una pérdida de material genético (acortamiento) o incluso puede perderse el cromosoma completo (Zolan, 1995). Si dicha rotura afecta a dos cromosomas puede resolverse por un proceso de translocación, que puede o no ser recíproca (Zolan, 1995) (Figura 1-12).

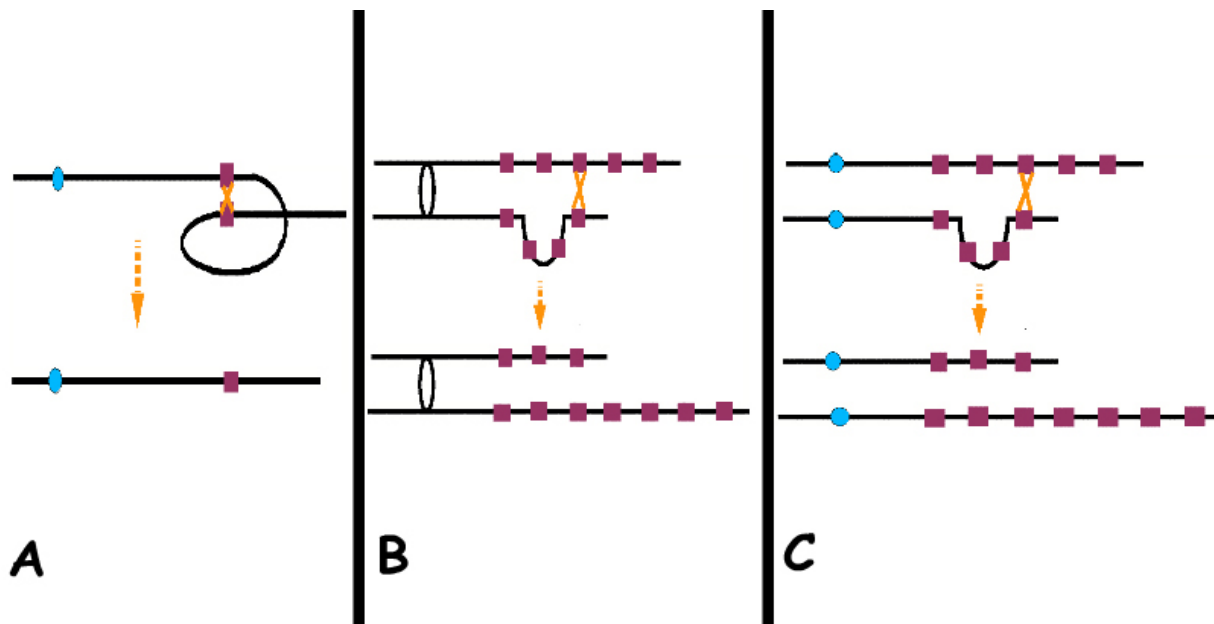


Figura 1-11. Recombinación de repeticiones directas. (A) Mecanismo de anillamiento intracromosomal entre repeticiones directas (SSA), dando como resultado deleciones en el cromosoma. (B) Mecanismo de intercambio desigual entre repeticiones directas de cromátidas hermanas (USCE). (C) Mecanismo de intercambio desigual entre cromosomas homólogos (UCE). Tanto los procesos B) como C) provocan translocaciones recíprocas desiguales y por consiguiente la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos (Modificado de Zolan, 1995).

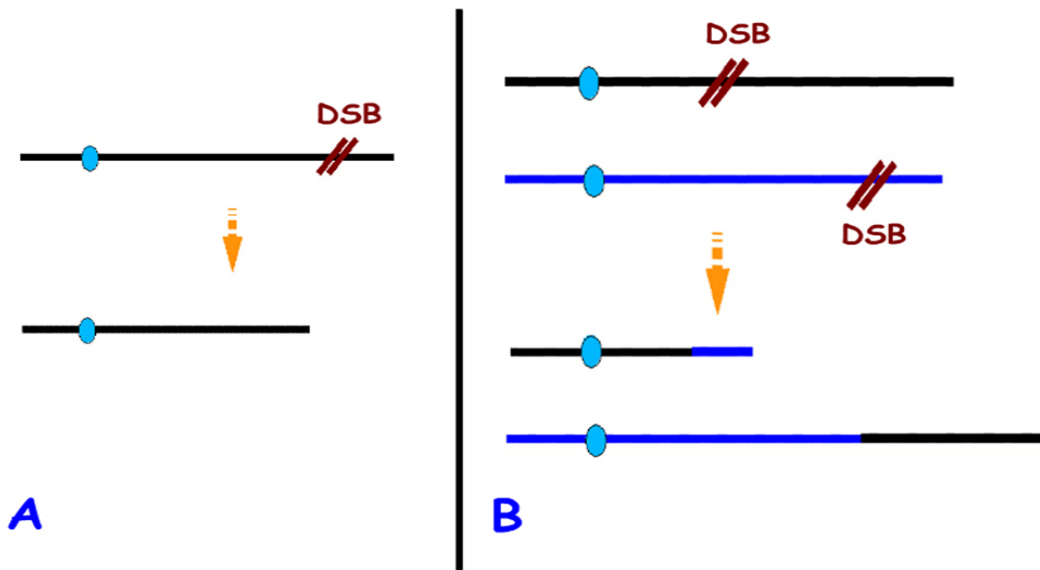


Figura 1-12. (A) Doble rotura de un cromosoma y acortamiento de éste ante la imposibilidad de ser reparado. (B) Proceso de dobles roturas en dos cromosomas no homólogos y reparación por translocación recíproca de material genético entre ambos. Todos estos procesos son responsables de la aparición de polimorfismos cromosómicos (Modificado de Zolan, 1995).

## 1.9 Los Chips de DNA. El caso de las levaduras vínicas

El hecho de que *S.cerevisiae* haya sido el primer organismo eucariota secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996), ha favorecido el desarrollo de las llamadas matrices de DNA (Kuipers, 1999). En el caso de *S.cerevisiae* dichas matrices contienen impreso todo el genoma (más de 6000 ORFs), bien sobre soportes miniaturizados generalmente de vidrio y designados como micromatrices (*microarrays*) o bien sobre soportes de mayor tamaño, generalmente de *nylon* y designados como macromatrices (*macroarrays*). En conjunto y debido a su miniaturización son designados frecuentemente como *chips* de DNA.

El desarrollo de estas técnicas genómicas posee una gran implicación para la biotecnología alimentaria, ya que permiten el control de las propiedades de los cultivos *starter* y las características de crecimiento de una cepa en un determinado medio industrial.

Muchos de los programas de mejora de microorganismos se hallan limitados por la falta de conocimiento del genoma, así como de sus procesos regulatorios y metabólicos. La genómica y la genómica funcional pueden resolver algunas de estas necesidades, mediante el genotipado de cepas industriales, así como determinando los posibles problemas de alteración genética que afecten a los productos finales (Pérez-Ortín *et al.*, 2002a).

### 1.9.1 Estudios genómicos

Los chips de DNA nos permiten desde la caracterización sistemática de genes descubiertos por secuenciación, detección de aneuploidías o deleciones parciales de cromosomas, identificación de copias de loci, hasta el genotipado completo de una cepa (Pérez-Ortín *et al.*, 2002a).

Pérez Ortín y colaboradores, realizaron la comparación de los DNA genómicos de una cepa de laboratorio y de la cepa vínica T73. Comparando los datos normalizados de ambas cepas detectaron importantes alteraciones cromosómicas, destacando una deleción importante en el cromosoma VIII. Además concluyeron que la comparación de datos de genotipado y de patrón de transcripción para una determinada cepa, puede constituir una herramienta molecular de alta sensibilidad para la identificación de cepas industriales.

### 1.9.2 Estudios de expresión genética

Se han elaborado bastantes estudios de expresión genética con *microarrays* en levaduras vínicas, ya que *S.cerevisiae* ha sido el primer organismo industrial utilizado en este tipo de estudios genómicos (Puig y Pérez-Ortín, 2000ayb). El conocimiento del patrón de expresión en diferentes condiciones de

---

crecimiento puede ayudarnos a entender el proceso fermentativo a un nivel molecular. El hecho de que las cepas de laboratorio no crezcan en condiciones reales de vinificación hace necesaria la puesta en marcha de dichos estudios. En un proceso típico fermentativo, las cepas vínicas deben de estar adaptadas a condiciones anaeróbicas y a altas concentraciones de etanol, así como a otra serie de factores relacionados con los procedimientos enológicos, lo que implica una situación de estrés para estas células. Como consecuencia de este estrés, encontramos un conjunto de respuestas celulares como alteraciones en la composición de membrana (tales como en ácidos grasos, esteroides y niveles de fosfolípidos, entre otras).

Las prácticas enológicas tales como uso de sulfato de cobre, bisulfito potásico, dióxido de azufre (anhídrido sulfuroso) y otros compuestos utilizados tanto en las uvas como en el proceso de estabilizar el vino y eliminar la microflora bacteriana, se traducen en patrones de expresión característicos tales como sobreexpresiones de genes relacionados con estos procesos (sulfuro (*SUL1-2*), amonio (*MEP2*), resistencia a sulfito) (Pérez-Ortín *et al.*, 2002a).

Cavalieri *et al.* estudiaron la expresión global de diferentes cepas vínicas. Los genes que presentaban una mayor sobreexpresión se correspondían con los implicados en la biosíntesis de aminoácidos y de purina (Cavalieri *et al.*, 2000; Querol *et al.*, 2003). Entre sus conclusiones destacan el hecho de que las poblaciones naturales de *S.cerevisiae* presentan diferencias alélicas importantes que afectan enormemente al patrón de expresión de una cepa y que por lo tanto, resulta de vital importancia realizar estudios de segregación e incluso de genotipado, como paso previo a estudios de expresión (Cavalieri *et al.*, 2000).

Infante y colaboradores han analizado el patrón de expresión de una cepa de levadura de flor utilizada en la producción del Jerez y lo han comparado con el patrón de una cepa de laboratorio. Entre sus conclusiones destacan que muchos de los genes sobreexpresados se corresponden con regiones amplificadas del genoma, por lo que concluyen que el incremento del número de copias es el factor determinante de la sobreexpresión de estos genes (Infante *et al.*, 2003; Querol *et al.*, 2003).

La aplicación de la tecnología de los chips de DNA a las levaduras vínicas es bastante reciente. El estudio completo de la fisiología en fermentaciones vínicas reales puede proporcionar bastantes pistas para la comprensión del proceso biotecnológico. Esto nos ayudará a comprender el porqué unas determinadas cepas son capaces de realizar este proceso biotecnológico y otras no, así como entender a nivel molecular los diferentes grados de resistencia a estrés fermentativo (Pérez-Ortín *et al.*, 2002a).

---

## 2. Objetivos

El objetivo global de este trabajo ha sido profundizar en el estudio del mecanismo de la inestabilidad cariotípica de cepas silvestres de *S.cerevisiae* y la caracterización genética de un conjunto de dichas cepas.

De forma más concreta los objetivos han sido los siguientes:

1. Análisis de la inestabilidad cariotípica en la cepa vínica silvestre DC5; evaluación y caracterización.
2. Análisis de la segregación del fenómeno inestabilidad cariotípica; obtención de derivados monoesporídicos de DC5 y análisis de la inestabilidad cariotípica en estos.
3. Caracterización del mecanismo molecular de la inestabilidad cariotípica mediante la construcción de mutantes de recombinación.
4. Caracterización estructural de los *clusters* de rDNA del cromosoma XII de la cepa DC5 y derivados; estudio de la implicación de éstos en la inestabilidad de dicho cromosoma.
5. Caracterización estructural de polimorfismos de tamaño del cromosoma I en derivados mitóticos de la cepa inestable DC5.
6. Obtención de cepas cariotípicamente más estables sin alterar su *fitness* industrial.
7. Genotipado de la cepa DC5 y de diversas cepas vínicas silvestres e industriales.