



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR E
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Caracterización y mejora de levaduras de flor aisladas
en la Denominación de Origen Montilla-Moriles**

TESIS DOCTORAL

MIRIAM MARÍN MENGUIANO, 2014.

El **Dr. José Ignacio Ibeas Corcelles**, Profesor Titular del Área de Genética del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por la licenciada **Miriam Marín Menguiano** titulado '**Caracterización y mejora de levaduras de flor aisladas en la Denominación de Origen Montilla-Moriles**' ha sido realizado íntegramente por ella bajo mi dirección, reuniendo las condiciones de originalidad y calidad científica necesarias para constituir una Tesis Doctoral y optar al grado de Doctora por la Universidad Pablo de Olavide, de Sevilla.

Y para que así conste, expido el presente certificado.

Fdo. José Ignacio Ibeas Corcelles

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	15
1.- Los vinos de la Denominación de Origen Montilla-Moriles.....	17
1.1.- D.O. Montilla-Moriles.....	17
1.2.- Breve reseña histórica.....	18
1.3.- Proceso de elaboración de los vinos generosos de la D.O. Montilla-Moriles.....	21
1.3.1.- Etapa fermentativa.....	22
1.3.2.- Envejecimiento.....	23
1.4.- Tipos de vino.....	25
1.4.1.- Vinos con crianza biológica.....	25
1.4.1.1.- Vinos tipo Fino.....	26
1.4.1.2.- Vinos tipo Amontillados.....	26
1.4.2.- Vinos con crianza físico-química.....	26
1.4.2.1.- Vinos tipo Oloroso.....	26
1.4.2.2.- Vinos tipo Dulce.....	27
2.- Levaduras responsables de la crianza biológica.....	27
OBJETIVOS.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1.- Organismos utilizados durante el trabajo.....	35
1.1.- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
1.2.- <i>Escherichia coli</i>	36
1.3.- <i>Ustilago maydis</i>	36
2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	36
2.1.- Medios para el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> y condiciones de cultivo.....	37
2.2.- Medios para el crecimiento de <i>U. maydis</i> y condiciones de cultivo.....	38
2.3.- Medios para el crecimiento de <i>E. coli</i> y condiciones de cultivo.....	39
3.- Recogida de muestras.....	39
4.- Métodos genéticos.....	40

4.1.- Deleción de genes.....	40
4.2.- Transformación de microorganismos.....	41
4.2.1.- Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	41
4.2.2.- Transformación de <i>U. maydis</i>	41
4.2.3.- Transformación de <i>E. coli</i>	42
4.3.- Extracción de ácidos nucleicos.....	42
4.3.1.-Extracción de ADN genómico.....	42
4.3.2.-Extracción de ADN plasmídico.....	43
4.3.3.- Extracción de ARN.....	43
4.4.- Inducción de mutantes rho-.....	43
4.5.- Inducción de mutantes rho- con bromuro de etidio.....	43
4.6.- Fusión de protoplastos.....	43
4.7.- Ensayo de esporulación en <i>S. cerevisiae</i>	44
4.8.- Conjugación.....	44
5.- Métodos microbiológicos.....	44
5.1.- Análisis de producción resistencia de factor killer.....	44
5.2.-Fermentación y asimilación de azúcares.....	45
5.3.- Tiempo de generación.....	45
5.4.- Velocidad de formación de flor.....	46
5.5.- Competencia entre levaduras de flor.....	46
5.6.- Crianza biológica en laboratorio.....	46
6.- Métodos moleculares.....	47
6.1.- Cariotipo electroforético de levaduras (CHEF).....	47
6.2.- RFLP de ADN mitocondrial.....	47
6.3.- Análisis de microsatélites.....	48
6.4.- Análisis del fragmento 5.8S-ITS.....	48
6.5.- Manipulación de ácidos nucleicos.....	49

6.5.1.- Precipitación de ADN.....	49
6.5.2.- Digestión con enzimas de restricción.....	49
6.5.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	49
6.5.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	49
6.5.5.- Electroforesis y extracción de ADN de geles de agarosa.....	49
6.6.- Hibridación de ARN y detección por northern blot.....	50
7.- Métodos celulares.....	50
7.1.- Citometría de flujo.....	50
7.2.- Hidrofobicidad celular.....	51
7.3.- Formación de biofilm sobre superficie líquida.....	51
8.- Métodos bioquímicos.....	52
8.1.- Extracción de proteínas.....	52
8.1.1.- Citosólicas.....	52
8.1.2.- Sobrenadantes.....	52
8.1.3.- Componentes de la superficie celular.....	52
8.2.- Cuantificación de proteínas.....	53
8.3.- Inmovilización de glicoproteínas a las columnas de ConA.....	53
8.4.- 2D-DIGE.....	53
8.4.1.- Marcaje DIGE de las proteínas y separación mediante geles 2D.....	53
8.4.2.- Software de análisis de 2D-DIGE.....	54
9.- Ensayos de infección en plantas de maíz.....	54
CÁPÍTULO I: IDENTIFICACIÓN DE LAS LEVADURAS DE FLOR AISLADAS EN LA D.O. MONTILLA-MORILES.....	55
INTRODUCCIÓN.....	57
1.- Métodos de identificación de levaduras.....	59
1.1.- Métodos convencionales.....	59
1.2.- Análisis de regiones ribosomales para la identificación de levaduras a nivel de especie.....	60

1.3.- Métodos moleculares para la identificación de levaduras a nivel de cepa..	61
1.3.1.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).....	62
1.3.2.- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit).....	63
1.3.3.- Análisis de zonas repetitivas del genoma mediante PCR.	63
2.- Levaduras de flor en la D.O. Montilla-Moriles.....	65
3.- Taxonomía de las levaduras de flor.....	66
RESULTADOS.....	69
1.- Bodegas de la D.O. Montilla-Moriles incluidas en el estudio.....	71
1.1.- Bodega Robles.....	71
1.2.- Bodega Alvear.....	72
1.3.- Bodega Cooperativa La Unión.....	72
1.4.- Bodega Pérez Barquero.....	72
1.5.- Bodega Toro Alvalá.....	72
2.- Sistema de muestreo y análisis del estado de la flor.....	73
3.- Análisis de la viabilidad de las levaduras de flor.....	74
4.- Estudio de las distintas cepas aisladas mediante el estudio de su huella genética.....	76
4.1.- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit).....	76
4.2.- Análisis de microsatélites.....	78
4.3.- Cariotipado electroforético (CHEF).....	80
5.- Distribución de las cepas aisladas por bodegas.....	81
6.- Identificación taxonómica de las cepas aisladas.....	84
6.1.- Fermentación y asimilación de azúcares.....	84
6.2.- Análisis del fragmento 5.8S-ITS.....	85
DISCUSIÓN.....	89

CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN DE LAS LEVADURAS DE FLOR AISLADAS EN LA D.O. MONTILLA-MORILES.....	97
INTRODUCCIÓN.....	99
1.- Ciclo de vida de la levadura <i>Saccharomyces</i>	101
2.- Características genéticas de las levaduras de flor.....	102
3.- Características metabólicas de las levaduras de flor.....	105
RESULTADOS.....	107
1.- Caracterización microbiológica.....	109
1.1.- Tiempo de generación.....	109
1.2.- Velocidad de formación de flor.....	112
1.3.- Análisis de producción y resistencia/sensibilidad de factor killer.....	114
1.4.- Ensayos de competencia entre levaduras de flor.....	116
2.- Caracterización enológica. Crianza biológica.....	117
3.- Caracterización celular.....	119
3.1.- Contenido de ADN.....	119
3.2.-Hidrofobicidad celular.....	120
4.- Caracterización genética.....	121
4.1.- Inducción de mutantes petite (rho-).....	121
4.2.- Análisis del gen FLO11.....	122
5.- Caracterización de las cepas A identificadas en las diferentes bodegas.....	125
DISCUSIÓN.....	127
CAPÍTULO III: MEJORA DE LAS LEVADURAS DE FLOR AISLADAS EN LA D.O. MONTILLA-MORILES.....	133
INTRODUCCIÓN.....	135
1.- Mejora genética de las levaduras vínicas.....	137
1.1.- Selección natural de cepas de levaduras vínicas con características de interés.....	137

1.2.- Mejora genética clásica.....	138
1.1.1.- Generación de híbridos.....	138
1.1.1.1.- Conjugación directa.....	139
1.1.1.2.- Hibridación por <i>rare mating</i>	139
1.1.1.3.- Fusión de protoplastos.....	140
1.1.1.4.- Citoducción.....	140
1.1.2.- Mutagénesis al azar.....	141
1.3.- Mejora por ingeniería genética.....	141
2.- El biofilm en las levaduras de flor.....	142
2.1.- Agregación celular.....	142
2.2.- Formación del biofilm.....	143
2.2.1.- Biofilm en <i>Candida albicans</i>	143
2.2.2.- Biofilm en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
2.3.- Implicación en patogénesis.....	145
3.- <i>Ustilago maydis</i> modelo para el estudio del biofilm en superficie líquida.....	146
RESULTADOS.....	149
1.- Obtención nuevas cepas a partir de las levaduras aisladas.....	151
1.1.- Obtención de híbridos por fusión de cepas de flor.....	151
1.2.- Intercambios de mitocondrias entre cepas de flor.....	156
1.2.1.- Transferencia mitocondrial desde una cepa de flor a una cepa de laboratorio.....	156
1.2.2.- Transferencia mitocondrial desde las cepas K ^a , K ^b y K ^d a las cepas de flor ρ-.....	160
1.2.2.1.- Análisis molecular de las cepas KA ^b , KA ^d , KB ^a , KB ^{*d} , KD ^{*a} y D ^b	162
1.2.2.2.- Caracterización de la cepa D ^b	164
1.2.2.3.- Caracterización de las cepas KA ^b y KB ^a	165

2.- Aproximación proteómica para la identificación de proteínas implicadas en la formación de biofilm de <i>Ustilago maydis</i>.....	167
2.1.- Búsquedas <i>in silico</i> de adhesinas en el genoma de <i>U. maydis</i>.....	167
2.2.- Estudio comparativo de proteínas secretadas entre células formando biofilm y células en cultivo.....	167
2.3.- 2D-DIGE para la identificación de proteínas implicadas en adhesión y filamentación.....	169
2.4.- Caracterización de los mutantes $\Delta pdi1$, $\Delta suc2$ y $\Delta abf1$.....	175
2.4.1.- Formación de biofilm.....	175
2.4.2.- Efecto en fitopatogénesis.....	176
DISCUSIÓN.....	179
CONCLUSIONES.....	187
ANEXO I. Tablas.....	191
ANEXO II. Oligonucleótidos.....	211
ANEXO III. Abreviaturas y siglas.....	215
BIBLIOGRAFIA.....	219

Introducción general

1.- Los vinos de la Denominación de Origen Montilla-Moriles.

1.1.- D.O. Montilla-Moriles.

La característica que hace únicos los vinos generosos de la D.O. Montilla-Moriles y la D.O. Jerez es la sinergia existente entre el singular suelo de la zona, el clima, las variedades de uvas utilizadas y principalmente el exclusivo proceso de producción (Bravo-Adad, 1986). La D.O. Montilla-Moriles se extiende por gran parte del sur de la provincia de Córdoba. Limitada por los ríos Genil, Guadajoz, Guadalquivir y las Sierras de la Subbética. Las zonas de producción comprenden las localidades de Montilla, Moriles, Doña Mencía, Montalbán, Monturque, Nueva Carteya y Puente Genil, en su totalidad y en parte los municipios de Aguilar de la Frontera, Baena, Cabra, Castro del Río, Espejo, Fernán-Núñez, La Rambla, Lucena, Montemayor y Santaella. Dentro de la zona de producción se distingue la subzona de calidad superior, constituida por terrenos delimitados y seleccionados por sus especiales cualidades edafológicas: son los ‘alberos’ de la Sierra de Montilla y de Los Moriles Altos (Figura 1).



Figura 1.- Mapa ilustrativo de las localidades que engloba la zona de producción de la D.O. Montilla-Moriles así como las subzonas de calidad superior (modificado de <http://www.montillamoriles.es/conoce-montilla-moriles/la-denominación-de-origen/localización>).

El suelo es un factor condicionante para el viñedo, y por tanto para la composición de la uva de cara a la vinificación. Este actúa como reserva hídrica para la vid e influye en el viñedo a través de sus propiedades fisicoquímicas. Los suelos de la zona se denominan ‘albarizas’ y se caracterizan por ser ricos en carbonato cálcico, pobres en materia orgánica natural, poco fértiles, de composición mineralógica simple, con estructura grumosa y con alto poder para retener la humedad. Con respecto al clima de la zona de la D.O. Montilla-Moriles, este se clasifica en general como semi-

continental mediterráneo, registrándose las temperaturas más altas en los meses de julio y agosto. Desde el punto de vista vitícola, podría clasificarse el clima de la zona de los más cálidos del mundo durante el ciclo vegetativo, con escasas precipitaciones y una elevada intensidad de luz solar, lo que incide en el desarrollo de la vid causando la maduración rápida del fruto, que determina su composición y las características de los todos los vinos resultantes. Las variedades de uvas con la que se elaboran los vinos protegidos de la de denominación son: Pedro Ximénez, Airén, Baladí, Verdejo, Moscatel de grano menudo, Moscatel de Alejandría, Torrontés, Chardonnay, Sauvignon Blanc y Macabeo (<http://www.montillamoriles.es/viticultura/las-variedades>).

El pliego de condiciones de la D.O. Montilla-Moriles aparece publicado en B.O.J.A. número 249 a 22 de diciembre del 2011 (<http://www.juntadeandalucia.es/boja/2011/249/35>).

1.2.- Breve reseña histórica.

De origen incierto, el vino siempre ha ocupado un lugar destacado tanto en la mitología como en la cotidianidad del hombre puesto que no sólo era una bebida reconfortante sino también considerada como espirituosa. Esto último ha sido el hilo conductor del devenir del vino a lo largo de las primeras civilizaciones que disfrutaron de su existencia.

Los historiadores creen que el comienzo de la elaboración del vino tuvo lugar en el Caúcaso y en Mesopotamia hace unos 8000 años (Robinson, 1994). Evidencias arqueológicas sitúan a la especie *Vitis vinífera sylvestris* entre el Neolítico y la Edad del Bronce, aunque este hecho no tiene porque relacionarse con la elaboración del vino en sí. La primera evidencia arqueológica del machacado de uva con intención de extraer mosto se observa en una representación del reinado de Udimu y data, aproximadamente, del 3000 a.C..

El vino tuvo siempre relación con la alta sociedad rozando lo sagrado, y son múltiples los hallazgos en tumbas funerarias de faraones, Tutankamon entre otros, donde se han encontrado ánforas con vino así como otros motivos vitícolas (Figura 2). El vino consumido en Egipto fue inicialmente traído desde Palestina hasta que se comenzaron a plantar viñedos allí, consiguiendo finalmente en algunas regiones vino de una calidad excelente.

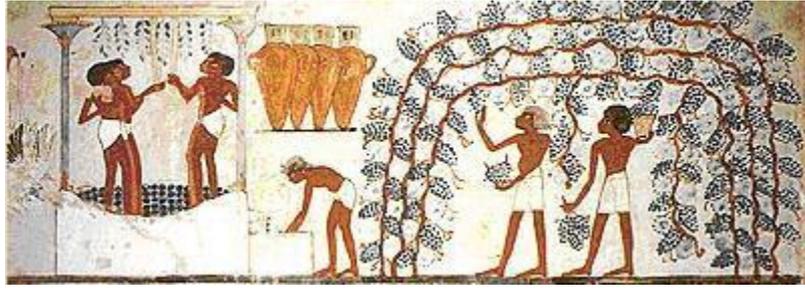


Figura 2.- Pintura presente en una tumba tebana de la XVII dinastía, donde se observa la recolección y producción de vino en el antiguo Egipto (1400 a.C.).

Desde Egipto y Fenicia el vino llegó a Grecia. Fue en la antigua Grecia dónde el vino se divinizó, atribuyéndole un sitio entre los mismos dioses, ejemplo de ello es Dionisio, el dios del vino en la mitología griega, al que posteriormente los romanos denominarían Baco. Se piensa que los griegos expandieron el cultivo de la vid hacia la zona mediterránea.

Durante del imperio romano el vino tuvo su máxima expansión por toda Europa. Son frecuentes los hallazgos arqueológicos de época romana en la mayoría de los pueblos que integran la D.O. Montilla-Moriles, demostrando la antigüedad del cultivo de la vid en la primitiva fundación de origen íbero. Los romanos fueron los que más extendieron y profundizaron la cultura del vino tanto por razones económicas como estratégicas. Entre otras aportaciones a la cultura del vino, los romanos introdujeron la técnica del injerto en cepas de vides, y empezaron a usar cubas de madera para transportar el vino. Aunque estas cubas eran más ligeras y menos frágiles que las ánforas, en ellas no eran capaces de mantener vinos de alta calidad durante años, para lo que seguían usando las ánforas, llegando a almacenar vinos en ellas durante 15 a 25 años. A Roma ya se importaban vinos desde Grecia, Egipto o Hispania. Restos de cerámica cordobesa en el conocido Monte Testaccio de Roma afirman que desde Córdoba se abastecía Roma, tanto en vino cordobés como en otro producto también autóctono, el aceite. Ya en el siglo II a.C., cuando la Península Ibérica comenzó a formar parte del imperio romano, los vinos de esta región eran bien conocidos.

Con la caída del imperio romano, los viñedos pasan a ser propiedad de reyes, conventos y monasterios. La Iglesia en este momento constituía una institución hegemónica espiritual y política, y fue la encargada de seguir profundizando en el cultivo del vino, puesto que para ella el vino era un elemento constitutivo y muy importante dentro de su dogma, su liturgia y sus sacramentos. La producción de vino es llevada a cabo por monjes europeos hasta el final de la alta Edad Media. En esta época se almacenan por primera vez los vinos en barriles de madera ubicados en los sótanos, surgiendo el concepto de bodega.

A principios del siglo VIII los pueblos islámicos se extendieron hasta ocupar la Península Ibérica y formar Al-Ándalus. Durante la dominación árabe el vino no

desaparece, aunque se cuidaban de ocultar su consumo, dado su prohibición por el Corán. Fue allá por el año 996 cuando Alhaken II ordenó arrancar dos tercios del viñedo cordobés gritando al pueblo: ‘ve a rezar borracho’. Pero bien sea por la gran predilección que tenían los musulmanes hacia las pasas, o quizás por la esperanza de una rectificación religiosa que aboliera la ley seca, no acabaron con todos los viñedos.

Siglos más tarde, durante la Reconquista, se replantaron los viñedos que habían sido devastados por las guerras, y estos fueron repartidos entre los caballeros conquistadores. Durante la Córdoba medieval el consumo de vino era abundante y no solía faltar en la mesa, incluso era utilizado como remedio contra la peste medieval. Surgen entonces vinos hoy conocidos como el Ribera del Duero, entre otros. El vino de Jerez adquiere fama en la zona y a partir de 1680 se establece un importante comercio con los ingleses, algunos de los cuales deciden establecerse en Jerez y fundar bodegas como Osborne o Garvey.

Ya en la época moderna, alrededor del siglo XVIII, se asientan las bases de una buena parte de la vitivinicultura contemporánea. Durante esta época comienzan a utilizarse las botellas de vidrio producidas en las áreas industriales catalanas para el envasado del vino y el empleo de tapones de corcho elaborados principalmente en el municipio onubense de Cortegana. Dos grandes avances que afectaron a la comercialización del vino, aislándolo del oxígeno presente en la atmósfera y permitiendo de esta forma que el vino fuera adquiriendo un *bouquet* característico.

Parece que la aparición del vino Fino como tal, acompañó el auge del comercio de Indias entre Cádiz y América, donde el vino era previamente encabezado con aguardiente para evitar su posterior deterioro a bordo, durante las grades temporadas que pasaba en alta mar. Se piensa que un almacenaje prolongado no previsto, o una reducción del volumen de alcohol añadido durante el encabezado, probablemente para reducir costes, provocó la aparición del velo de flor que aportaba al vino cualidades organolépticas específicas que deleitaron paladares. A esto le acompañó la puesta en marcha de nuevas leyes que permitían el almacenaje del vino, ya que hasta el momento los viticultores debían vender las añadas para el mantenimiento de su sostén económico.

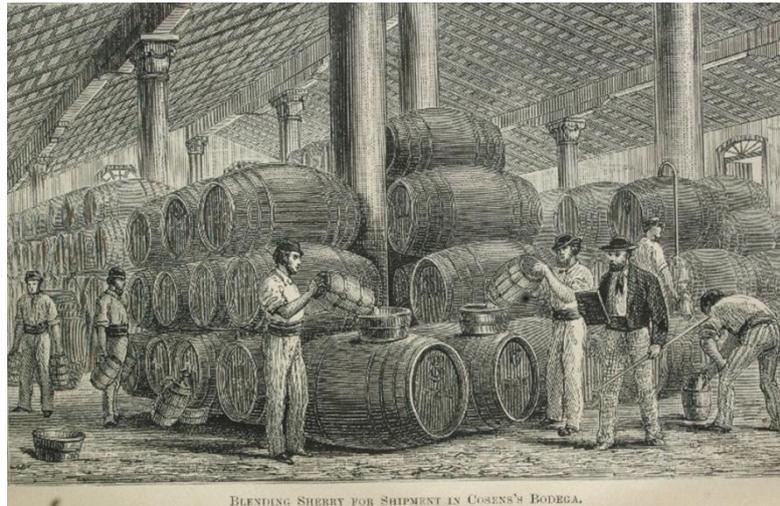


Figura 3.- Representación del trabajo llevado a cabo para la mezcla de vino Fino previa al envío en la bodega Cosens. (Del editor inglés Henry Vizetelly).

A mediados del siglo XIX los viticultores europeos decidieron exportar variedades autóctonas de América del Norte que fueron incorporadas a los viñedos franceses. Entre estas muestras había larvas de una mosca áfida denominada *Phylloxera vastatrix*. Éstas pueden viajar ayudadas por los vientos hasta 20 km de distancia, lo que originó una verdadera plaga de *Phylloxera*. Los viñedos del viejo mundo se vieron afectados por esta plaga durante una década y concretamente los viñedos del marco de Montilla-Moriles también sufrieron el ataque de este insecto. Estos últimos se repusieron con cepas autóctonas principalmente de la variedad Pedro Ximénez, siempre sobre portainjertos americanos, por lo que hoy día es la variedad mayoritaria de la región.

1.3.- Proceso de elaboración de los vinos generosos de la D.O. Montilla-Moriles.

Los vinos de Montilla-Moriles, pertenecientes a la categoría de vinos generosos, se elaboran en dos etapas sucesivas. En primer lugar la uva debe fermentar mediante el empleo de levaduras fermentativas, produciendo un vino joven y seco, que luego será sometido a un tratamiento postfermentativo denominado envejecimiento en el que adquiere las características propias de estos vinos.

Las principales categorías en la que podemos agrupar los vinos generosos de esta región son: Fino, Amontillado y Oloroso. Aunque todos ellos envejecen mediante un sistema de criaderas y soleras, se diferencian en el proceso específico que llevan a cabo para su maduración, siendo la crianza biológica exclusiva para el vino Fino, la crianza físico-química para los Olorosos y una doble crianza, primero con una fase de crianza biológica seguida de una segunda fase de crianza físico-química, para vinos Amontillados.

1.3.1.- Etapa fermentativa.

La variedad de vid más empleada en la D.O. Montilla-Moriles es la variedad Pedro Ximénez. Las condiciones climatológicas de esta región, con altas temperaturas y baja humedad, hacen que sea esta comarca la primera en comenzar la vendimia, allá por el mes de agosto. Esta se realiza a mano, durante la noche y a primeras horas de la mañana, cuando la temperatura es más idónea.

Una vez recolectadas las uvas, estas se prensan a baja presión obteniéndose lo que se denomina mosto de primera yema, destinado generalmente a vinos tipo Fino. A esto le sigue un aumento de presión para obtener el mosto de segunda yema, y un tercer prensado a más presión que dará las llamadas prensas. El alcohol obtenido de la fermentación de estas últimas prensas será utilizado para el encabezamiento posterior de los vinos. Antes de pasar a la fermentación de los mostos, estos se someten a un proceso de decantación natural durante unas 24 horas que se denomina desfangado, con el que se eliminan restos de partes sólidas.

En el mosto inicial está presente toda la flora autóctona de la superficie de la uva, que se compone de hongos de los géneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomycodes* y *Saccharomyces*, además de bacterias como *Acetobacter*, *Pediococcus* o *Lactobacillus*. Previamente a la fermentación del mosto, se corrige la acidez del mismo con la adición de 1.5 g/l de ácido tartárico y se le adicionan sulfitos que actúan como antioxidantes de estos mostos y de los vinos, inhibiendo oxidasas, y como antiséptico selectivo contra bacterias y algunas levaduras no deseables.

El proceso de fermentación se lleva a cabo actualmente en depósitos de acero inoxidable con una capacidad aproximada de 40000 l, donde parámetros como la temperatura y la concentración de azúcar, son controlados de forma constante (Suárez-Lepe, 1997). Para llevar a cabo este proceso de fermentación, es frecuente la inoculación de forma dirigida de estos depósitos con una cepa de levadura autóctona seleccionada por su alto poder fermentativo perteneciente a la especie *S. cerevisiae*, a la que se denomina como pie de cuba, o bien se inocula con levaduras fermentativas comerciales. Esta fermentación dirigida permite disminuir el tiempo de inicio de la fermentación, favoreciendo el crecimiento rápido en el mosto de las levaduras fermentativas inoculadas, reducir la posibilidad de contaminación bacteriana y poder llevar a cabo un control durante la fermentación. Sin embargo, son todavía muchas las bodegas que elaboran sus vinos mediante fermentación espontánea, más aún en vinos como los de Montilla-Moriles, en los que sus características fundamentales no se adquieren en esta etapa, sino en el envejecimiento posterior.

Una ventaja que conlleva la fermentación espontánea es que la diversidad microbiológica puede aportar al vino una complejidad que desaparece cuando una única levadura es la responsable de todo el proceso. En la fermentación alcohólica espontánea participan diferentes especies de levaduras que están presentes en las viñas y posteriormente en los tanques de fermentación sólo durante unas cuantas semanas al

año, incluso en presencia de dióxido sulfuroso en el mosto (Constantí et al., 1998; Beltran et al., 2002). Normalmente levaduras de los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida* predominan en los estados tempranos de la fermentación alcohólica. Luego, *Pichia* y *Metschnikowia* prevalecen en los estadios medios. Finalmente, y debido al aumento de la graduación alcohólica a medida que avanza la fermentación, las levaduras del género *Saccharomyces* son las que predominan por presentar una mayor resistencia a altas concentraciones de etanol (Fleet and Heard, 1993). Estas levaduras pertenecen principalmente a la especie *S. cerevisiae* y presentan la capacidad de fermentar con rapidez mostos con un 20-25% de azúcar y una alta tolerancia a etanol, CO₂, SO₂ y temperatura. Además producen una baja concentración de metabolitos no deseables en el vino resultante (acidez volátil, H₂S, etc.) y una alta concentración de aquellos que contribuyen favorablemente a las cualidades organolépticas (acetaldehído, alcoholes y ésteres volátiles, etc.).

Algunas otras levaduras, como *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Schizosacchaomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* pueden también estar presentes durante la fermentación alcohólica e incluso en el vino mismo, lo cual puede causar algunos defectos organolépticos (Ribéreau-Gayon et al., 2000).

El mosto ya fermentado es catado y analizado por expertos para determinar el tipo de envejecimiento a que será sometido. Los fermentados más finos y ligeros, normalmente procedentes de mostos de primera yema, son destinados a vinos con crianza biológica, y los de mayor cuerpo y color, principalmente mostos de segunda yema, a olorosos.

El vino joven producto de la fermentación y destinado a producir vinos Finos es fortificado con alcohol hasta 15-15.5% v/v de alcohol altamente rectificado con una riqueza de 95.5-96% v/v. Este proceso de adición de alcohol se denomina encabezado. Concretamente en Montilla-Moriles, las condiciones climáticas y las características de la uva Pedro Ximénez, hacen que en la mayoría de los casos no se requiera la fortificación, ya que el porcentaje de alcohol natural de los vinos obtenidos es superior al 15% v/v (Pozo-Bayón and Moreno-Arribas, 2011). En el caso de vinos destinados a producir olorosos, siempre se lleva a cabo la fortificación que eleva la concentración de alcohol del vino a niveles de un 18% v/v.

1.3.2.- Envejecimiento.

El envejecimiento de estos vinos se lleva a cabo en dos fases, una primera realizada en un sistema estático de botas de roble americano denominada sobretablas, donde el vino sufre una fermentación maloláctica, y en el caso de vinos destinados a Fino o Amontillados, con una graduación alcohólica de entorno a un 15% v/v, desarrolla sobre su superficie una capa de levaduras que se conoce como velo de flor. La segunda fase se desarrolla en un sistema dinámico denominado de criaderas y soleras.

El envejecimiento dinámico tiene lugar también en botas de roble americano de capacidad variable, e implica el apilamiento de las distintas botas en varias filas, llamadas criaderas (escalas), lo que surgiría probablemente como consecuencia de la optimización del espacio disponible en las bodegas, y del aprovechamiento de la gravedad para el movimiento del vino. Normalmente este sistema está compuesto por varias criaderas y una solera (Figura 4). Todas las barricas de una misma fila contienen vino del mismo tipo y edad, y se mantienen de forma organizada para facilitar la mezcla progresiva. Las barricas son llenadas hasta ocupar el vino dentro de ellas unas cuatro o cinco partes de su capacidad total, permitiendo el desarrollo sobre la superficie del vino del velo de flor, en el caso de los vinos Finos o Amontillados. La fila que está en contacto con el suelo, denominada solera, contiene el vino más viejo de todo el sistema. De las botas de esta última fila se extrae el vino que posteriormente será embotellado y comercializado, nunca excediéndose la extracción en más del 40% del contenido de la bota por año, y pudiendo sacar vino tres o cuatro veces en este periodo.

La cantidad de vino extraída de la solera es reemplazada con el mismo volumen de vino desde la fila superior, primera criadera, que a su vez es reemplazada por vino procedente de la fila superior a esta, segunda criadera y así hasta la última criadera. En la fila más alta, que contiene el vino más joven, el volumen es reemplazado por vino procedente de sobretablas. Normalmente el número de filas guarda una correlación positiva con la calidad final del vino.

El proceso a través del cual tiene lugar la transferencia de vino desde una fila a la siguiente se denomina saque-rocío. Esto está precedido de una serie de operaciones destinadas a homogenizar el nivel de envejecimiento en cada estado (Berlanga et al., 2004). El vino extraído de cada barril es combinado en un tanque antes de transferirlo a los barriles de la fila siguiente, operación que debe realizarse cuidadosamente para evitar alterar el velo de flor formado en la superficie del vino, en el caso de los vinos Finos. Este proceso dinámico genera uniformidad en el carácter del vino transferido al siguiente estado del sistema de criaderas y soleras y, en general, permite que año tras año el vino tenga similares características sensoriales, independientemente de las características particulares de las vendimias anuales (añadas). Además, en el caso de los vinos Finos, el sistema de saque y rocío, por mezcla de vinos viejos con vinos jóvenes, complementa la transferencia de nutrientes entre ambos vinos, lo que favorece la formación y el mantenimiento del velo de flor, aparte de proporcionar aireación, que es altamente beneficiosa para el vino y las levaduras de flor (Berlanga et al., 2001, 2004).

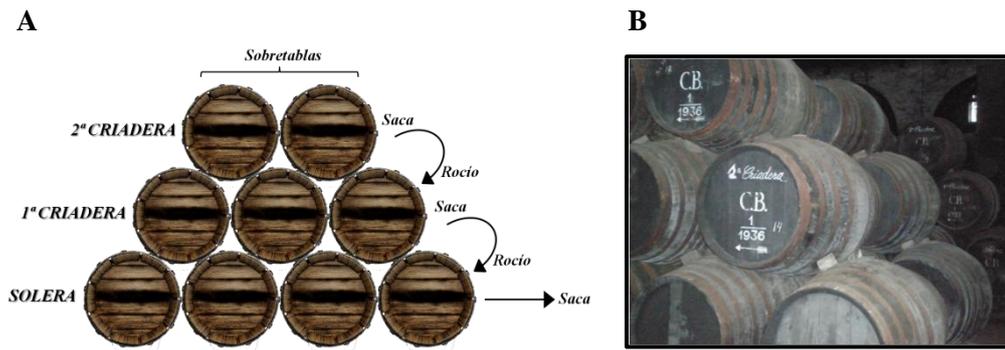


Figura 4.- A. Representación esquemática del sistema de maduración basado en criaderas y soleras. B. Imagen tomada en la bodega Alvear donde puede observarse las distintas botas agrupadas en sobretablas formando el sistema de criaderas y soleras.

Todos los vinos sacados de todas las soleras de la bodega se mezclan entre sí en las proporciones adecuadas para garantizar un producto final constante, se homogenizan, se estabilizan, se filtran y se embotellan. Los vinos de la D.O. Montilla-Moriles permanecen en el sistema de criaderas y soleras durante un tiempo mínimo de dos años, y las botas de roble presentan una capacidad máxima de 1000 litros, siendo la capacidad más común la de 500 litros.

Los vinos con envejecimiento biológico constituyen uno de los tipos de vinos más distintivos de nuestro país, principalmente los producidos en el sur, en las regiones de Jerez y en la que nos engloba en este trabajo, Montilla-Moriles. Otras regiones del mundo productoras de vinos generosos con gran reconocimiento son Francia (Jura), Italia (Cerdeña y Sicilia), Hungría (Tokay), USA (California), Portugal (Oporto) y varias regiones del sur de África y Australia (Charpentier et al., 2009; Fleet, 2007; Kovacs et al., 2008; Pirino et al., 2004; Sipiczki, 2008).

1.4.- Tipos de vino.

1.4.1.- Vinos con crianza biológica.

La característica principal de este tipo de crianza es el desarrollo de un biofilm en la superficie del vino denominado velo de flor. La formación de este la llevan a cabo levaduras que pueden crecer en presencia de un alto contenido en alcohol y desarrollan esta película sobre la superficie del vino para adaptarse a estas condiciones. En el velo de flor el metabolismo de estas levaduras vira hacia un metabolismo oxidativo en el que la principal fuente de carbono es el etanol (Ibeas et al., 1997; Mauricio et al., 1997; Moreno-García et al., 2014). Las condiciones óptimas para la formación del velo de flor se dan a una temperatura de entre 15 y 20°C, un porcentaje de etanol de 15.5% v/v y la presencia de una superficie de contacto con el aire. Durante esta fase el vino sufre una transformación a consecuencia de la actividad metabólica de estas levaduras, lo que

dotará al vino de sus características organolépticas finales. Por otro lado el velo aísla completamente al vino de la atmosfera y, por ende, del oxígeno presente en ella, evitando por tanto la oxidación del mismo y generando unas condiciones reductoras que mantienen el vino Fino con su color amarillo pálido característico.

1.4.1.1.- Vinos tipo Fino.

Para el desarrollo de los vinos tipo Fino, los mostos procedentes de la fermentación con un grado alcohólico de entre 12%-15% v/v se encabezan con alcohol vínico hasta un 15.5% v/v. Estos pasarán un periodo de entre uno y dos años en sobretablas, aproximadamente. Concluido este tiempo, antes de pasar a sus soleras específicas, se analizarán de nuevo, mediante la cata de cada barril, para confirmar su evolución hacia vino Fino.

El vino Fino podría determinarse como un vino de color oro pajizo, pálido, de aroma punzante y delicado, suavemente avellanado, seco y de gran paladar, con una graduación alcohólica final de unos 15% v/v de alcohol.

1.4.1.2.- Vinos tipo Amontillados.

En el caso de los vinos Amontillados que como ya hemos comentado anteriormente sufren un envejecimiento mixto, al concluir una primera y larga fase de crianza biológica, y tras una segunda selección en la que se descartan para su evolución como Fino, se encabeza hasta el 17% v/v de alcohol, perdiéndose en estas condiciones el velo de flor. De esta forma el vino completa su maduración vía envejecimiento oxidativo, alterando tanto su color como sus características organolépticas.

Los vinos Amontillados poseen un color ámbar y un aroma avellanado, suave y lleno al paladar, seco y con una graduación alcohólica comprendida entre 16 y 18% v/v.

1.4.2.- Vinos con crianza físico-química.

Durante la crianza físico-química, debido a la ausencia del velo de flor por el alto porcentaje de alcohol presente y a la aireación durante los procesos de saca y rocío, se establece una mayor presencia de oxígeno en el vino acentuándose los procesos oxidativos en él y dotándoles del color oscuro y aroma característico que presentan. Es peculiar de este tipo de crianza la cesión que tiene lugar de componentes de la madera de la bota al vino.

1.4.2.1.- Vinos tipo Oloroso.

En los vinos olorosos, el envejecimiento es exclusivamente oxidativo. Para el desarrollo de este tipo de vinos, los vinos jóvenes son encabezados hasta alcanzar valores mínimos de 17% v/v, al comienzo del envejecimiento en el sistema de criaderas y soleras, lo que evita la formación de velo de flor. La oxidación dinámica, asociada con la mezcla fraccionada, da a estos vinos sus características organolépticas únicas.

Los vinos Olorosos se caracterizan por ser vinos de color oro, muy aromáticos, de mucho cuerpo, secos o ligeramente abocados y con graduación alcohólica entre 18 y 20% v/v.

1.4.2.2.- Vinos tipo Dulce.

Otro tipo de vino de alta calidad es el vino dulce hecho con las variedades de Pedro Ximénez y Moscatel. Estos son producidos tras secar la uva al sol durante 5-10 días. Con esta pasificación se consigue un mosto azucarado muy oscuro, que es parcialmente fermentado, al ser la fermentación detenida por la adición de alcohol rectificado, o por alcanzar de forma natural una elevada concentración de etanol. El resultado final son vinos de alta graduación alcohólica con un contenido de azúcar de hasta 500g/l.

La mezcla de estos vinos con vinos generosos como Finos y Olorosos da lugar a nuevos vinos conocidos como vinos Generosos de Licor como el Pale Cream, Medium o Cream.

2.- Levaduras responsables de la crianza biológica.

Las levaduras de maduración, comúnmente denominadas levaduras de flor, se caracterizan por tener la capacidad de agregarse y formar una película blanca, rugosa y gruesa sobre la superficie del vino, denominada velo de flor (Figura 5). Estas levaduras pueden encontrarse de forma permanente en las bodegas, aunque es en los periodos de primavera y otoño cuando se encuentran en mejor estado.

Una vez encabezados los vinos tras la fermentación, esta levadura desplaza a las levaduras fermentativas, que no soportan la elevada graduación alcohólica de estos vinos (Infante et al., 2003). Aunque las levaduras de flor pertenecen a la especie *S. cerevisiae*, estas son diferentes a las que se desarrollaron durante la etapa fermentativa, incapaces de crecer en condiciones aeróbicas en este vino, tanto por su metabolismo como por su constitución genética (Esteve-Zarzoso et al., 2001). Históricamente se han descrito cuatro razas como las mayoritarias de esta especie presentes en el velo de flor: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*, según sus características fisiológicas y moleculares (Martínez et al., 1995, 1997; Ibeas et al., 1997b). Estas razas han sufrido diferentes clasificaciones taxonómicas a lo largo de los últimos años, como se detalla en el capítulo 1.

Las levaduras de flor, como consecuencia de su metabolismo, producen acetaldehído y acetoína, y consumen alcohol, glicerina, ácidos orgánicos y aminoácidos, disminuyendo la acidez volátil y aumentando el contenido de alcoholes superiores (isobutanol e isoamílico) (Martínez et al, 1998; Muñoz et al, 2006; Pozo-Bayón and Moreno-Arribas, 2011).

La formación de velo de flor supone para las levaduras un cambio en tamaño, forma e hidrofobicidad como mecanismo de defensa y adaptación a las condiciones en las que se encuentran, es decir, una alta graduación alcohólica, altas concentraciones de

acetaldehído, estrés oxidativo debido al metabolismo de fuentes de carbono no fermentables, estrés hídrico y con frecuencia altas concentraciones de metales como el cobre y fuentes de nitrógeno de difícil asimilación como la prolina.

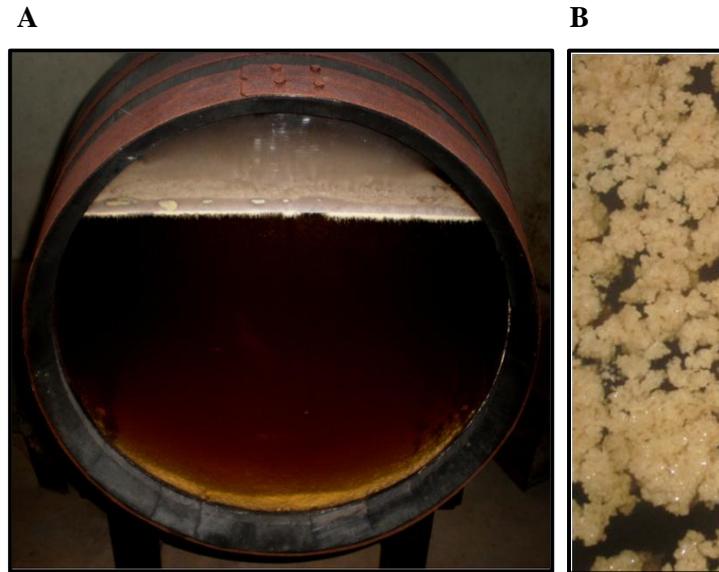


Figura 5.- A. Imagen tomada en la bodega Cooperativa La Unión de una bota en fase de envejecimiento biológico que presenta una tapa transparente permitiendo ver el velo de flor formado en la superficie del vino. **B.** Imagen del velo de flor en la superficie del vino tomada desde arriba.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

- 1) Identificar molecularmente las levaduras de flor aisladas en diferentes bodegas de la D.O. Montilla-Moriles.
- 2) Caracterizar las levaduras de flor identificadas en este trabajo.
- 3) Mejorar las levaduras de flor aisladas mediante la combinación de sus genomas.

Materiales y métodos

1.- Organismos utilizados durante el trabajo.

1.1.- *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo pueden verse en la Tabla I.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
L5684	<i>MATa ura3-52 leu2Δ</i>	Fink, GR.
133d	<i>MATa ura3-52</i>	Fidalgo et al. 2006
YNN295	<i>MATa ura3-52 lys2Δ his7Δ ade1Δ ade2Δ trp1Δ</i>	Fidalgo et al.2006
K5-5A rho-	<i>MATa his4d-15, ade2-1, can1, kar1-1</i>	Ibeas (1995)
MMY1	<i>MATa ura3-52 Cyh^R, Gal⁻</i>	Genética US
MMY2	<i>MATa ura3-52 Cyh^R, Gal⁻</i>	Genética US
MMY3	<i>MATa/α ura3-52/ura3-52 Cyh^R/Cyh^R, Gal⁻/Gal⁻</i>	Genética US
1101	<i>MATa his4 kar 1-1 kil-K1</i>	R. Esteban (U. Salamanca)
1384	<i>Mata his4 kil-K2</i>	R. Esteban (U. Salamanca)
47G	<i>Cepa killer sensible a K₁ y K₂</i>	R. Esteban (U. Salamanca)
A	<i>Silvestre</i>	Bodega Alvear
B	<i>Silvestre</i>	Bodega Alvear
C	<i>Silvestre</i>	Bodega Robles
D	<i>Silvestre</i>	Bodega Robles
E	<i>Silvestre</i>	Bodega Alvear
K ^a	<i>K5-5A rho- con mitocondria de la cepa A</i>	Este trabajo
K ^b	<i>K5-5A rho- con mitocondria de la cepa B</i>	Este trabajo
K ^d	<i>K5-5A rho- con mitocondria de la cepa D</i>	Este trabajo
KA ^b	<i>Hibrido Kar^b/Cepa A</i>	Este trabajo
KA ^d	<i>Hibrido Kar^d/Cepa A</i>	Este trabajo
KB ^a	<i>Hibrido Kar^a/Cepa B</i>	Este trabajo
KB ^{*d}	<i>Hibrido Kad^b/Cepa B</i>	Este trabajo
KD ^{*a}	<i>Hibrido Kar^a/Cepa D</i>	Este trabajo
D ^b	<i>Cepa D con mitocondria de la cepa B</i>	Este trabajo
KA	<i>Híbrido K5-5A/Cepa A</i>	Este trabajo
KB	<i>Híbrido K5-5A/Cepa B</i>	Este trabajo
A ^{ρ-}	<i>Silvestre, rho-</i>	Este trabajo
B ^{ρ-}	<i>Silvestre, rho-</i>	Este trabajo
D ^{ρ-}	<i>Silvestre, rho-</i>	Este trabajo
A _{hyg} ^R	<i>Cepa A higromicina resistente</i>	Este trabajo
A _{gen} ^R	<i>Cepa A geneticina resistente</i>	Este trabajo
A _{nat} ^R	<i>Cepa A nourseotricina resistente</i>	Este trabajo
B _{gen} ^R	<i>Cepa B geneticina resistente</i>	Este trabajo

D_{hyr}^R	<i>Cepa D higromicina resistente</i>	Este trabajo
D_{gen}^R	<i>Cepa D genética resistente</i>	Este trabajo
D_{nat}^R	<i>Cepa D nourseotricina resistente</i>	Este trabajo
R1-4	<i>Híbridos B/A obtenidos por rare mating</i>	Este trabajo
F1-12	<i>Híbridos B/A obtenidos por fusión de protoplastos</i>	Este trabajo

Tabla I.- Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

1.2.- *Escherichia coli*.

Todas las cepas bacterianas de *E. coli* utilizadas en este trabajo pertenecen a la estirpe DH5 α (*supE44 ΔlacU (F80 lacZ ΔM15) hsdR17 recA endA gyrA96 thi-1 relA1*).

1.3.- *Ustilago maydis*.

Las estirpes de *U. maydis* utilizadas en este trabajo se recogen en la Tabla II. Los ensayos de patogénesis se realizaron en plantas de *Zea mays*, variedades Gaspar Flint y Golden Bantan.

CEPA	GENOTIPO	ORIGEN
FB1	<i>a1 b1</i>	Banuett and Herskowitz (1989)
FB2	<i>a2 b2</i>	Banuett and Herskowitz (1989)
CL13	<i>a1 bW2 bE1</i>	Bölker et al. (1995)
FB1 Δ <i>pmt4</i>	<i>a1 b1 Δpmt4</i>	Fernández-Álvarez et al. (2009)
FB1 <i>biz1^{erg1}</i>	<i>a1 b1 biz1^{erg1}</i>	Flor-Parra et al. (2006)
FB1 <i>biz1^{erg1}Δpmt4</i>	<i>a1 b1 biz1^{erg1}Δpmt4</i>	Este trabajo
CL13 Δ <i>pdi1</i>	<i>a1 bW2 bE1 Δpdi1</i>	Este trabajo
CL13 Δ <i>suc2</i>	<i>a1 bW2 bE1 Δsuc2</i>	Este trabajo
CL13 Δ <i>abf1</i>	<i>a1 bW2 bE1 Δabf1</i>	Este trabajo

Tabla II.- Estirpes de *U. maydis* utilizadas en este trabajo.

2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Todos los medios se prepararon con agua Milli-Q. En los medios sólidos se empleó una concentración de agar del 2%. Las fuentes de carbono se añadieron a los medios, posteriormente al autoclavado, a una concentración final del 1%, salvo que se especifique lo contrario.

2.1.- Medios para el crecimiento de *S. cerevisiae* y condiciones de cultivo.

YPD (medio rico): Extracto de levadura (Pronadisa), 0.5 %; peptona (Pronadisa), 1%; glucosa (Panreac), 2%.

YPD-AM (medio completo pH 4.5): YPD sólido pH 4.5. Después de esterilizar añadir 0.003% de azul de metileno (Merck). Agitar suavemente y verter en placas de Petri.

Medios completos para fermentación: Extracto de levadura (Pronadisa), 0.5 % y los azúcares empleados: glucosa (Panreac) (YED), sacarosa (Sigma) (YES), maltosa (Sigma) (YEM), galactosa (Sigma) (YEG), lactosa (Sigma) (YEL) al 2%. En el caso de rafinosa (Sigma) (YER), ésta se añade al 4%.

YPE (medio completo con etanol): La composición es como el YPD sin glucosa y con el porcentaje de etanol requerido en cada experimento. Una vez autoclavado se añade el etanol para análisis (Merck) hasta alcanzar la proporción final deseada.

YNB (medio mínimo): Base nitrogenada sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco), 0.17%; sulfato amónico (Panreac), 0.5%; glucosa, 2%.

Medios mínimos con distintas fuentes de carbono: La composición es la misma que en el medio YNB pero se sustituye la glucosa por sacarosa (YNBS), maltosa (YNBM), lactosa (YNBL), galactosa (YNBG) o rafinosa (YNBR) al 2%, glicerol (Panreac) al 3% v/v (YNBGI). Para el caso del medio con etanol (Merck) (YNBE), éste se añade al porcentaje deseado después de autoclavar.

Medio de preesporulación 1: Extracto de levadura, 1%; peptona, 1%; glucosa 1%.

Medio de preesporulación 2: Extracto de levadura, 0.8%; peptona, 0.3%; glucosa 10%.

Medio de esporulación 1: Acetato potásico, 1%; extracto de levadura, 1%; glucosa, 0.05%.

Medio de esporulación 2: Acetato potásico, 0.5%.

Medios osmoestabilizados: Para osmoestabilizar los medios de cultivo se le añadió Sorbitol (Sigma) 1.2M antes de autoclavar.

Medios con antibióticos: Para añadir los antibióticos (Sigma) se fundieron los medios y se dejaron enfriar hasta una temperatura de 65°C, momento en el cual se le añadió la solución de antibiótico a la concentración deseada, se mezcló bien y se extendió en placas de Petri.

Medios para la selección del intercambio de mitocondrias desde las cepas de flor a la cepa Kar rho-:

- **Doble selección:** YNE 3% sorbitol 1.2 M, canavanina 80 µg/ml, adenina, histidina, 1:40 YPD, amonio sulfato 0.5%.

- **Selección de las cepas Kar rho-:** YNB sorbitol 1.2 M, canavanina 80 µg/ml, adenina, histidina, glucosa 3%, 1:40 YPD, amonio sulfato 0.5%.
- **Selección de las cepas de flor:** YPE 3% v/v, sorbitol 1.2 M.
- **No selección:** YPD sorbitol 1.2 M.

Medios para la selección del intercambio de mitocondrias desde las cepas Kar^a, Kar^b, Kar^d a las cepas de flor rho-:

- **Doble selección:** YNE 3% v/v (pH 6-6.5) sorbitol 1.2 M..
- **Selección de las cepas Kar^a, Kar^b, Kar^d:** YPE 3% v/v, sorbitol 1.2 M..
- **Selección de las cepas de flor rho-:** YNB, sorbitol 1.2 M..
- **No selección:** YPD sorbitol 1.2 M.

Para solidificar estos medios, se añadió agar (Merck) al 2%. Todos los medios se autoclavaron a 121°C durante 21 min.

Mosto sintético: medio YNB sin amonio sulfato ni aminoácidos al 0.17%, sulfato amónico (Panreac) al 0.5%, glucosa (Sigma) al 3%, y inositol (Sigma) 1.8%.

Vino utilizado: El vino empleado en este trabajo fue suministrado por la bodega a un porcentaje próximo al 15% v/v de etanol. Una vez en el laboratorio se filtró y ajustó el alcohol al porcentaje deseado según los requerimientos del experimento en concreto.

Las cepas utilizadas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se han crecido generalmente a 28°C en medios sólidos y líquidos, a excepción de algunos experimentos donde se indique lo contrario.

2.2.- Medios para el crecimiento de *U. maydis* y condiciones de cultivo.

YVDU (medio rico): Extracto de levadura (Difco), 1% y bactopectona (Difco), 2%. Se autoclava y se añadió glucosa (Sigma) al 1%.

YVPSL (medio rico): Extracto de levadura (Difco), 1%; bactopectona (Difco), 0.4% y sacarosa (Scharlab), 0.4%.

CM (medio completo): Casaminoácidos (Difco), 0.25%; extracto de levadura (Difco), 0.1%; solución de vitaminas, 1%; solución de sales (Holliday, 1974), 6.25% y nitrato amónico, 0.15%. Ajustar pH a 7. La fuente de carbono se añade tras autoclavar al 1% (CMD: glucosa como fuente de carbono; CMA: arabinosa).

Agar de regeneración (AR): Extracto de levadura (Difco), 1 %; bactopectona (Difco), 2%; sacarosa, 2%; sorbitol (Sigma), 18.2% y agar, 1.5%. Esterilizar por autoclavado.

Solución de sales Holliday (1974): KH₂PO₄, 1.6%; Na₂SO₄, 0.4%; KCl, 0.8%; MgSO₄ · 7 H₂O, 0.41%; CaCl₂ · 2 H₂O, 0.13% y elementos traza, 0.8% .

Elementos traza: Ácido bórico, 0.006%; MnCl · 4 H₂O, 0.014%; ZnCl₂, 0.04%; Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0.004%; FeCl₃ · 6 H₂O, 0.01% y CuSO₄ · 5 H₂O, 0.004%.

Solución de vitaminas: Tiamina (Sigma T-4625), 0.01%; Riboflavina (Sigma R-4500), 0.005%; Piridoxina (Sigma P-9755), 0.005%; ácido pantoténico de calcio (Sigma P-2250), 0.02%; ácido aminobenzoico (Sigma A99878), 0.005%; ácido nicotínico (Sigma N-4126), 0.02%; cloruro de colina (Sigma C-1879), 0.02% y mio-inositol (Sigma I-5125), 0.1%.

Los inóculos se realizaron en YEPSL, excepto cuando se indique específicamente otro medio. Las células se crecieron a 28 °C tanto en medio sólido como líquido. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación (250 rpm) y en buenas condiciones de aireación (no más de 1/5 del volumen total del recipiente utilizado).

En el caso de la inducción de promotores regulables, para los experimentos de expresión regulada por el promotor *crg1* (Bottin et al., 1996) se crecieron las células en medio no inductor (medio con glucosa) hasta una DO_{600nm} de 0.5. Se lavaron con agua tres veces y se transfirieron las células al medio inductor (arabinosa). El tiempo de inducción fue de aproximadamente 8 horas.

2.3.- Medios para el crecimiento de *E. coli* y condiciones de cultivo.

Medio completo para bacterias (sólido) (LB): Triptona (Pronadisa), 1%; extracto de levadura (Pronadisa), 0.5%; cloruro sódico (Merk) 0.5%; agar (Pronadisa), 2%.

La estirpe bacteriana utilizada DH5 α se ha crecido siempre a 37°C tanto en medios sólidos como líquidos.

3.- Recogida de muestras.

La recogida de muestras se realizó introduciendo una pipeta estéril por el registro de cada bota y extrayendo de ella unos 10 ml de vino y la flor que quedaba pegada a la pipeta. En primer lugar las muestras fueron sometidas a un análisis, a juicio personal, donde se determinó de calidad de la flor, su flotabilidad así como su color atribuyéndole a cada una de las muestras los siguientes caracteres: no flor, mala, regular, buena y muy buena.

Una vez las muestras en el laboratorio se homogeneizaron mediante el empleo de un ultrasonicador SONOPULS HD-2070 para separar los posibles agregados y evitar que estos formaran una colonia mixta y posteriormente fueron sometidas a un análisis de viabilidad. Para ello se aplicó a la muestra azul de metileno (diluyendo 1:10 la muestra en la solución de tinción), que permite diferenciar las células vivas de las muertas ya que estas últimas presentan su membrana permeable al mismo y se tiñen de azul. De este modo se determinó el porcentaje de viabilidad de las de las distintas botas.

A continuación se reaislaron unos 30 µl de muestra en placas de YPD. Estas placas fueron incubadas a 30°C. De estas placas fueron seleccionadas diez colonias al azar del total de la muestra, que se utilizaron para los análisis posteriores.

4.- Métodos genéticos.

4.1.- Delección de genes.

En el caso de *S. cerevisiae* las delecciones fueron realizadas a través de la amplificación de los genes que confieren resistencia presentes en los plásmidos bacterianos pUG6, pAG25 y pAG32 (geneticina, higromicina y nourseotricina, respectivamente). En todos los casos el gen a delecionar ha sido la leucina por lo que los oligonucleótidos utilizados para amplificar las resistencias fueron siempre LEU2KO5 y LEU2KO3 (Tabla AII.1). Con el producto de la PCR se transformaron las células de *S. cerevisiae* como se describe más adelante. Los oligonucleótidos LEU2-2 y LEU2-1 (Tabla AII.1), se emplean una vez ha ocurrido la transformación para comprobar la misma.

En *U. maydis* la metodología para la delección de genes consiste en el diseño de una construcción de ADN compuesta por tres fragmentos: dos moléculas de ADN flanqueantes (de aproximadamente 1 Kb de tamaño cada una) a la pauta abierta de lectura (ORF) del gen a delecionar que se clonan, flanqueando a su vez, a un gen marcador de resistencia para alguno de los antifúngicos: carboxina, higromicina o nourseotricina. En primer lugar, se amplificaron cada uno de los fragmentos flanqueantes al gen de interés por PCR con *Taq* polimerasa mediante oligonucleótidos específicos que varían en función del gen a delecionar (Tabla AII.2). A los oligonucleótidos que van a dar lugar a la parte del fragmento que va a ser ligada con el marcador de resistencia se le adicionó un sitio de restricción para la enzima SfiI que permite la ligación con el gen marcador mediante la T4 DNA ligasa (Roche) en una proporción fragmento 5': resistencia: fragmento 3' de 1:1:1. La ligación se incubó a 4°C durante toda la noche. La banda deseada fue separada y purificada mediante electroforesis en gel de agarosa utilizando el kit *Gel Extraction* (Qiagen). Seguidamente se clonó en pGEM-T-*Easy* (Promega) según el protocolo de la casa comercial. Se incubó durante toda la noche a 4°C. Finalmente, se transformó la ligación en células competentes de *E. coli* DH5α y estas fueron sembradas en placas de medio LB con ampicilina e IPTG X-Gal. Se tomaron 10-15 colonias de color blanco e inocularon en medio líquido LB con ampicilina, se les extrajo el ADN plasmídico mediante minipreparación y se comprobó por restricción el éxito de la clonación. Para la delección del gen en estudio se amplificó toda la construcción por PCR con *Long Expand Template* empleando oligonucleótidos de los extremos de la misma, se precipitó y se transformó en *U. maydis*.

4.2.- Transformación de microorganismos.

4.2.1.- Transformación de *S. cerevisiae*.

En el caso de las levaduras *S. cerevisiae* estas fueron transformadas mediante el empleo de acetato de litio. Para ello se inocularon 5 ml de YPD con la cepa a transformar y se incubaron a 30°C con agitación hasta que alcanzó una DO_{600nm} de 0.8-0.9. Se centrifugaron a 4500 rpm durante 3 min (Beckman Coulter, Allegra X-22R) se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 15 ml de agua destilada estéril. Este lavado con agua estéril se volvió a repetir y a continuación se resuspendieron en 500 μ l de AcLi 100 mM preparado en fresco. Se centrifugaron 15 seg a máxima velocidad, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en 200 μ l de AcLi 100 mM. Se alicuotó 50 μ l de muestra en tubos de 1.5 ml (una alícuota por cepa a transformar) y posteriormente se centrifugaron durante 15 segundos a máxima velocidad. Se retiró el sobrenadante y se añadieron por orden 240 μ l de PEG (50%), 36 μ l de AcLi (1M) y 25 μ l de DNAss (2 mg/ml) previamente calentado a 95°C y conservado en hielo. Se vortearon las muestras durante 1 min e incubaron a 30°C durante 30 min. Seguidamente se volvieron a incubar las muestras a 42°C de 15 a 45 min, según la cepa, y tras esta incubación se centrifugó a 8000 rpm durante 15 seg. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 6 ml de YPD que se incubaron a 30°C durante 2 h. Por último las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm durante 3 min, retirando el sobrenadante y resuspendiendo en lo que quedaba de medio para a continuación sembrarlas en el medio selectivo.

4.2.2.- Transformación de *U. maydis*.

La transformación de las distintas estirpes de *U. maydis* se realizaron a partir de protoplastos obtenidos según el protocolo que se detalla a continuación. Se tomaron las células de un cultivo de 50 ml creciendo en fase exponencial (DO_{600nm} de 0.8) crecido en YEPSL. Se recuperó la biomasa centrifugando todo el cultivo durante 5 min a 4500 rpm. Las células se lavaron con SCS (1 M sorbitol, 20 mM citrato de sodio pH 5.8, H₂O Milli-Q) una vez y se resuspendieron en 5 ml de SCS con Lallzyme (0.02 g/ml). Para la eliminación de la pared celular se incubaron a 28°C en agitación hasta que el porcentaje de células saliendo de la pared celular fue del 80 % (aproximadamente 10 min). A continuación, se añadieron 10 ml de SCS frío y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min. Lavamos la muestra un par de veces con SCS y otra con STC (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM CaCl₂, H₂O Milli-Q). Finalmente se resuspendieron los protoplastos con suavidad en 500 μ L de STC, alicuotando en tubos de 1.5 ml 50 μ L de muestra por tubo y se conservándolos a -80°C hasta su uso.

Para la realizar la transformación de *U. maydis* se descongelaron los protoplastos en hielo unos 20 min antes de iniciar el protocolo. Una vez descongelados los protoplastos, se le añadió una mezcla que contenía 9 μ l del ADN a transformar y 1 μ l de heparina (10 mg/mL; Sigma H-1636). Se incubaron durante 25 min en hielo. Durante este tiempo de incubación, se preparó la primera capa de las placas de agar de regeneración para la selección de los transformantes. Estas se prepararon a partir de 12 ml de agar de regeneración fundido (60°C) con carboxina, higromicina o

neourseotricina, según la selección elegida, al doble de la concentración final y se extendieron en placas de Petri. Transcurridos los 25 minutos de incubación de los protoplastos, se añadió a éstos 500 µL de STC 40 % de polietilenglicol (STC/40%PEG) y se incubó la mezcla en hielo durante 15 min. Durante el tiempo de incubación se añadió a las placas previamente preparadas otros 12 ml de agar de regeneración (60°C), esta vez sin antibióticos. El objeto de preparar las placas de medio selectivo en dos capas es la de dar tiempo a los protoplastos para regenerar antes de entrar en contacto con el antifúngico. Se sembró la mezcla de protoplastos en placas de agar de regeneración con el antifúngico y se incubaron a 28°C.

Tras 4-6 días de incubación, los transformantes que se obtuvieron fueron reaislados en placas de YPDU con el antifúngico para después ser inoculada una colonia independiente en YEPSL o YPDU y proceder a realizar una extracción de ADN genómico tal como se explica a continuación.

4.2.3.- Transformación de *E. coli*.

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron por choque térmico (Ausubel et al., 1997).

4.3.- Extracción de ácidos nucleicos.

4.3.1.- Extracción de ADN genómico.

La extracción de ADN se realizó a partir de 2 ml de cultivo creciendo durante toda la noche, se recogió el residuo de las células y se resuspendió en 200 µl de tampón de lisis (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8). Se añadieron 100 µl de bolitas de vidrio (Sigma) y se resuspendieron en vórtex durante 1 min. Se añadieron 100 µl de fenol y 100 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se resuspendió la mezcla en vórtex durante 1 min. Se centrifugaron 2 min a 13000 rpm recogiendo el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 ml. Se repitió de nuevo el paso anterior. Seguidamente se añadió 1 ml de etanol absoluto y se centrifugaron las muestras durante 5 min a 13000 rpm. Se eliminó todo el etanol para resuspender el precipitado en 400 µl de TE junto con 3 µl de RNasa (10 mg/ml). Se incubaron 5 min a 37°C. Para concentrar el ADN se precipitaron las células con etanol absoluto. Para ello se añadieron 40 µl de acetato sódico 3 M pH 5.2 y 1 ml de etanol absoluto. Se incubaron 15 min a -20°C y se centrifugaron otros 15 min a 13000 rpm. Tras la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de etanol 70% en agua bidestilada para lavar la muestra de sales. Se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Eliminamos el sobrenadante y finalmente resuspendimos el ADN genómico extraído en agua bidestilada. La comprobación de la eficiencia del proceso se realizó mediante electroforesis de 1 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 0.8 % de concentración tamponado con TAE o TBE.

4.3.2.-Extracción de ADN plasmídico.

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron con el Kit High Pure Plasmad Isolation (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.3.3.- Extracción de ARN.

Las extracciones de ARN se realizaron utilizando el Kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.4.- Inducción de mutantes rho-.

Para el análisis del efecto que el etanol tiene en la inducción de mutantes rho-, matraces de 100 ml con 25 ml de medio YPD e YPE15% v/v, se inocularon con 200 µl de un cultivo estacionario temprano de cada una de las cepas a estudiar. A tiempo 0 se tomaron muestras que tras ser contadas y calculada su viabilidad se sembraron en placas de YPD (aproximadamente 400 células/placa), siendo este el control para el tiempo 0, a continuación, se incubaron los matraces a 25°C con agitación hasta alcanzar la fase estacionaria, momento en el cual se tomó una segunda muestra de la que de nuevo se calculó el número de células y la viabilidad, y que también se sembró en placa de YPD.

Las placas sembradas se incubaron a 30°C y tras cuatro días se replicaron a placas con medio YPD e YPGI. El conteo de colonias en una y otra placa reflejó el porcentaje de mutantes rho- originados en cada caso.

4.5.- Inducción de mutantes rho- con bromuro de etidio.

De un cultivo líquido estacionario en YPD se tomaron 30 µl y se colocaron en una placa de YPD. Se dejó caer la gota de forma que dejara un rastro sobre el medio y se dejó secar. Una vez seca, se añadieron en el centro del rastro 5 µl de bromuro de etidio (10mg/ml) y se incubó a 30°C durante 24 h. A continuación, se tomó biomasa de una zona próxima a la gota de bromuro de etidio y se aislaron colonias en YPD. Una vez crecidas las colonias, se replicaron a medio YPGI y se seleccionaron las colonias rho⁻.

4.6.- Fusión de protoplastos.

Para las fusiones de protoplastos realizadas en *S. cerevisiae* se crecieron las células en 25 ml de YPD, por separado y en agitación durante toda la noche. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se lavaron las células dos veces con agua destilada estéril fría, resuspendiéndolas finalmente en 10 ml de buffer de pretratamiento (sorbitol 1.2 M; Tris 0.1 M; EDTA 0.02M) al que se le añadió 50 µl de β-mercaptoetanol. Las células se incubaron durante 15 min a 30°C con una agitación de 70 rpm. Esta agitación se mantuvo en todas las sucesivas incubaciones a 30°C de este protocolo. Seguidamente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, se lavaron con 10 ml de sorbitol 1.2 M y fueron resuspendidas en 10 ml de sorbitol 1.2 M al que se le añadió 100 µl de una solución de zimolyasa 20T (MBL), estéril, a 5 mg/ml. A

continuación se midió la DO_{600nm} que presentaban las células y se incubaron a 30°C entre 30-60 min hasta que el valor de su DO_{600nm} disminuyó en un 10% como mínimo. Los protoplastos ya formados fueron centrifugados a 2000 rpm durante 5 min y lavados dos veces con 10 ml de sorbitol 1.2 M. Se contó el número de células y se mezclaron 1×10^7 de cada uno de los parentales a fusionar. A esta mezcla se añadió en orden 2 ml de PEG al 60% y 200 μ l de $CaCl_2$ 1 M y se incubó durante 15 min a 30°C, transcurridos los cuales se añadió 6 ml de sorbitol 1.2 M y se incubó de nuevo durante 15 min más. Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y se lavó con 1 ml de sorbitol 1.2 M. Fueron realizadas diluciones (1:50, 1:100) y se añadieron 100 μ l de cada una de ellas y también de la mezcla directamente en 5 ml de YPD preparado en sorbitol 1.2 M con un 2% en agar en estado fundido. Este último se vertió sobre placas de medio de selección que se incubaron de 3 a 7 días a 30°C.

4.7.- Ensayo de esporulación en *S. cerevisiae*.

Para el ensayo de esporulación las cepas seleccionadas se crecieron en medio líquido de preesporulación 1 a 25°C durante 48 h 100 μ l de dicho cultivo se sembraron en placas de medio de esporulación 1 y se incubaron a 30°C durante 5 días. Con el fin de variar las condiciones de esporulación se utilizaron los medios de preesporulación y esporulación 2, y combinaciones de éstos con los citados anteriormente, disminuyendo la temperatura de incubación a 20°C y aumentando el tiempo a 15 días. La presencia de esporas se determinó mediante la observación de una preparación microscópica y en caso de duda se recurrió a la tinción de esporas, para lo cual se fijó la preparación por calor y se le añadieron unas gotas de verde malaquita, que se mantienen sobre el porta durante 5 min, se lavó el porta con agua destilada y se le añadieron unas gotas de safranina manteniéndolas 1 min sobre el porta. Finalmente se lavó de nuevo con agua destilada, se secó y se observó al microscopio. Las células no esporuladas aparecen de color rojo y las esporas de color verde.

4.8.- Conjugación.

Para la conjugación de *S.cerevisiae*, las levaduras seleccionadas y las cepas indicadoras (MMY1a y MMY2a) se inocularon en medio YPD, durante 24 h a 30°C. Se mezcló 10 μ l de cada uno de los precultivos de las cepas seleccionadas con 10 μ l de cada una de las cepas indicadoras sobre una placa de YPD y se incubó a 30°C durante 5 h tras las cuales se observó al microscopio la presencia o no de cigotos. La placa se mantuvo en la estufa 48 h. A continuación se replicó a una placa de medio SD con 5 μ g/ml de cicloheximida. El crecimiento de un diploide en el medio selectivo indica que la levadura cruzada es de sexo contrario a la cepa indicadora con la que conjugó.

5.- Métodos microbiológicos.

5.1.- Análisis de producción resistencia de factor killer.

Para determinar la resistencia/sensibilidad a las toxinas K_1 y K_2 , se inoculó un césped de las cepas a analizar en una placa de medio YPD-AM (pH 4.5, 0.003% azul de

metileno), sobre el cual se colocó una gota de un cultivo exponencial de las cepas productoras de las toxinas K₁ (1101) y K₂ (1384). Para determinar la producción de toxinas se inoculó un césped de las cepas productoras de las toxinas y de la cepa 47G (sensible), y sobre ellas se colocó una gota de un cultivo exponencial de las cepas a analizar. Las placas se incubaron a 20°C hasta que se manifestó el efecto mediante la aparición de un halo de inhibición del crecimiento y coloración azul de las células que crecen alrededor del halo. Se añadió al experimento la cepa YNN295 como control negativo ya que no presenta sensibilidad ni produce ninguna de las dos toxinas analizadas.

5.2.-Fermentación y asimilación de azúcares.

Para la realización del análisis de fermentación, las colonias seleccionadas se inocularon en YPD a 30°C durante 24 h. A continuación, 100 µl de cada precultivo se inocularon en tubos con los medios YED, YER, YES, YEM e YEG que contenían campanas Durham. Los tubos se incubaron a 28°C durante 15 días. La flotación de la campana en el interior del tubo como consecuencia de la acumulación de CO₂ indica que la levadura en cuestión tiene la capacidad de fermentar dicho azúcar (Lodder, 1970).

Para la realización del análisis de asimilación, las colonias seleccionadas se replicaron a los medios YNBD, YNBR, YNBS, YNBM e YNBG y se incubaron las placas a 28°C durante 10 días, observando diariamente el crecimiento o no en cada uno de los medios utilizados.

5.3.- Tiempo de generación.

Para realizar las diferentes curvas de crecimiento, por un lado las células se inocularon en matraces de 100 ml con 25 ml de medio específico de cada levadura hasta alcanzar una DO_{600nm} inicial de 0.05 medida en un Biophotometer plus (Eppendorf). Se incubaron a diferentes temperaturas con agitación, y se procedió a la medida periódica de la DO_{600nm} hasta alcanzar la fase estacionaria. En otros casos las curvas se realizaron en placas mutipocillos en un volumen de 200 µl, inoculando con cultivos puros exponenciales a una DO_{600nm} inicial de 0.05. La lectura de las densidades ópticas se realizó en un lector de placas multipocillos (Synergy HT, BioTek).

En ambos casos, se determinó el tiempo medio de duplicación (tiempo de generación, T) durante el aumento exponencial de turbidez, de acuerdo con la expresión:

$$T = \frac{\Delta T * \ln 2}{\ln_{DO \text{ final}} - \ln_{DO \text{ inicial}}}$$

Los diferentes experimentos para hallar el tiempo de generación en varias condiciones, se realizaron por triplicado en cada una de ellas.

5.4.- Velocidad de formación de flor.

Para determinar la velocidad que cada cepa seleccionada tiene para formar flor, tubos con 3 ml de vino a 14, 14.5, 15 y 15.5% v/v de alcohol se inocularon con el mismo número de levaduras procedentes de un cultivo exponencial de una selección de las cepas aisladas, se incubaron a 20, 22.5 y 25° C y se determinó diariamente el estado de la flor que se registró como sin velo, islotes, fino, bueno, y muy bueno.

5.5.- Competencia entre levaduras de flor.

Los ensayos de competencia se realizaron a temperaturas de 20°C y 22.5°C. Para ellos se utilizó 300 ml de vino filtrado al 14, 15 y 15.5% v/v de alcohol, inoculados con un total de 3×10^8 células de las dos cepas a competir. Para cada experimento se puso a competir las dos levaduras en 3 concentraciones celulares diferentes (experimento realizado por triplicado), variando el porcentaje de las cepas a competir (25%/75%, 50%/50% y 75%/25%). Se realizó una muestra a tiempo cero para determinar molecularmente la cantidad exacta inoculada de cada cepa y evitar así errores empíricos. Se hizo un seguimiento de la formación de flor en los matraces y se tomaron muestras cada 40 días hasta los cinco meses aproximadamente. De cada matraz, en cada tiempo de muestreo, se aislaron colonias y se eligieron al azar 10 de ellas. A cada una de estas colonias se les realizó análisis de microsatélite para dilucidar qué cepa había formado el velo de las dos que se habían inoculado. En los casos donde estas cepas compartían el mismo microsatélite se realizó un análisis de RFLPmit para diferenciarlas.

5.6.- Crianza biológica en laboratorio.

El experimento se llevó a cabo inoculando garrafas de 16 l con 14 l de vino al 15% v/v cedido por la bodega, con células procedentes de un cultivo exponencial para que hubiese una concentración final de 10^6 células por ml. Cada cepa ensayada se inoculó por triplicado. Todas las garrafas se incubaron sin agitación en una habitación con una temperatura constante de 20°C. En las garrafas que no formaron velo a los 79 días, éste fue trasplantado desde velo ya formado en matraces de 25 ml. Los parámetros analizados fueron cantidad de alcohol, acidez volátil, cantidad de acetaldehído, pH, hierro libre y sulfuroso. Las muestras fueron tomadas en distintos momentos a lo largo de un año.

Estas vinificaciones fueron también desarrolladas en la bodega y fueron recogidas muestras para el análisis de los parámetros: cantidad de alcohol, acidez volátil, cantidad de acetaldehído, acetato de etilo y glicerina, hasta aproximadamente los 200 días post-inoculación.

6.- Métodos moleculares.

6.1.- Cariotipo electroforético de levaduras (CHEF).

Se inoculó un matraz con 20 ml de medio completo y se incubó a 30°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 4. Se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 5 ml de EDTA 50mM pH8. Se centrifugó de nuevo a 3500 rpm durante 5 min, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado con 0.6 ml de tampón CPES y se añadió 0.5 ml de una solución de agarosa (GTG grade, FMC) al 1% en tampón CPE previamente fundida y mantenida a 55°C. Se homogenizó y se cargaron tres pocillos del molde por cada muestra, se incubó a 4°C durante 15 min. Se extrajeron las muestras solidificadas del molde y se cubrieron con 5 ml de tampón CPE incubándose a 30°C durante 4 h. Se retiró el tampón y se añadieron 5 ml de una solución de Proteinasa K (Boehringer) (1 mg/ml) en tampón TESP y se incubó a 50°C durante 12 h. Seguidamente se eliminó el tampón TESP con una pipeta y se lavó 3 veces a 50°C y 2 veces a temperatura ambiente con 5 ml de tampón TE. Finalmente se eliminó todo el tampón y se añadieron 5 ml de EDTA 50mM pH 8 y se conservó la muestra a 4°C.

Para realizar la electroforesis, se preparó una solución de agarosa (GTG grade, FMC) al 0.9% en TBE 0.5X, se fundió y se preparó el gel, guardando 2 ml de la solución a 60°C antes de verter. Se cargó una tercera parte de cada muestra en el gel ya solidificado y se taparon los pocillos con agarosa.

La electroforesis se realizó en un equipo CHEF (*Clamped Homogeneous Electric Fields*) DR II (Bio Rad) siguiendo en cepas de *Saccharomyces* el siguiente programa: pulsos de 70 s durante 16 h y pulsos de 120 s durante 12 h, con una diferencia de potencial de 200V y a una temperatura de 14°C. Finalizada la electroforesis se tiñó el gel en una solución de bromuro de etidio 0.5 mg/ml durante 15 min, se destiñó en tampón TBE 0.5X y se fotografió.

6.2.- RFLP de ADN mitocondrial.

Se inocularon 5 ml de medio YPD líquido con cada muestra, y se incubó en agitación continua a 30°C durante 48 h. Se centrifugó en tubos estériles durante 5 min a 4500 rpm. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con 0.5 ml de solución RFLP I (sorbitol 1 M, EDTA 0.1 M pH 7.5). Se pasó a un tubo eppendorf estéril. Se preparó una solución de Zymoliasa 20T (MBL) en sorbitol 1M a una concentración de 2 mg/ml, y se añadieron 100 µl de esta solución a cada muestra. Se homogeneizó y se incubó en baño a 37°C durante 1 h. Se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm (Thermo Scientific, Heraeus Pico), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 0.5 ml de solución RFLP II (Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM pH 7.5). Se añadió 50 µl de SDS al 10%, se homogeneizó y se incubó en baño durante 30 min a 65°C. Se añadieron 0.2 ml de acetato potásico 5M, se agitó y se incubó en hielo durante 30 min. Se centrifugó el tubo durante 5 min a 13000 rpm. Se tomaron 650 µl del sobrenadante y se pasaron a un nuevo eppendorf al que se añadió un

volumen de 2-propanol (Panreac) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se centrifugó el tubo durante 10 min a 13000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado 2 veces con 400 µl de etanol 70% frío. Se eliminó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 50 µl de tampón TE.

Se tomaron 15 µl de la muestra y se añadió 2 µl de ARNasa A (Sigma) (10mg/ml), 2 µl de tampón, 0.5 µl de agua y 0.5 µl de enzima y se digirió a 37°C durante 2 h. El total de la digestión se cargó en un gel de agarosa (Pronadisa) al 0.9% en TBE y se realizó la electroforesis con un voltaje constante de 80 voltios.

6.3.- Análisis de microsatélites.

Para la obtención de microsatélites se tomó con un palillo un poco de biomasa y se resuspendió en un tubo de 1.5 ml con 50 µl de agua estéril. Se incubaron las muestras a 95°C durante 15-20 min y se vorteoó durante 1 min. Estas muestras se sometieron al estudio de tres locus de microsatelite: SC8132X, SCYOR267C y SCPTSY7, dado el alto grado de polimorfismo que presentan (Vaudano and García-Moruno, 2008). La amplificación por PCR fue realizada con pares de olicognucleotidos específicos para cada región de microsatélite (Tabla AII.3) y contenía 3 µl de extracto de ADN, 3.1 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.4 mmol L⁻¹ de cada dNTP, 2µl de tampón de PCR 10X, 2 U de polimerasa *Taq* (Bioline), 10 pmol de cada primer para los locus SCYOR267C, 15 pm de los primers para el locus SC8132X y 40 pmol de los primers para el locus SCPTSY7. El protocolo utilizado para la amplificación múltiple de los tres locus fue: 4 min a 94°C, 28 ciclos de 30 seg a 94°C, 45 seg a 56°C, 30 seg a 72°C y, finalmente, 10 min a 72°C. Los productos fueron corridos en un gel al 2.5% de agarosa en TBE a 100 V durante 80 min.

6.4.- Análisis del fragmento 5.8S-ITS.

Para el estudio del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la región 5.8S-ITS, se amplificó este con la polimerasa *Taq* a partir de 1 µl de ADN mitocondrial, utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (Tabla AII.4). Posteriormente unos 0.5 o 10 µg del ADN amplificado fue digerido con las enzimas de restricción HinfI y HaeIII. Tanto los productos de la PCR como sus fragmentos de restricción fueron separados en geles de agarosa al 1.4 y 3%, respectivamente. Los geles fueron posteriormente teñidos con bromuro de etidio.

Para la secuenciación del fragmento 5.8S-ITS se siguió el protocolo descrito por Esteve-Zarzoso y colaboradores (2004) con algunas modificaciones. A partir de 1 µl de ADN mitocondrial se amplificó con la polimerasa *Taq* la región 5.8S-ITS con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (Tabla AII.4) (Fernández-Espinar et al., 2000). Los productos de PCR fueron precipitados con etanol y finalmente resuspendidos en 50 µl de agua. Se determinó la concentración de las distintas muestras y se enviaron a secuenciar a la empresa Secugen. Las secuencias obtenidas fueron trabajadas con el

programa ApE.exe y alineadas posteriormente con el programa CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

6.5.- Manipulación de ácidos nucleicos.

6.5.1.- Precipitación de ADN.

Para la precipitación de ADN se adicionó a la solución que contenía el ácido nucleico 0.1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%. La mezcla fue incubada durante 15 min como mínimo a -20°C y posteriormente centrifugada a máxima revolución a 4°C durante 15 min. Se retiraron completamente los sobrenadantes y se secaron los precipitados para evitar la presencia de etanol. Una vez seco, los precipitados fueron resuspendidos en 50 μl de TE 1X.

6.5.2.- Digestión con enzimas de restricción.

Las digestiones con enzimas de restricción se llevaron a cabo en el tampón y temperatura indicados por el fabricante añadiendo 1 U de enzima para cantidades de ADN inferiores a 1 mg ó 5 U para cantidades superiores. El tiempo de digestión normalmente fue de 2 h.

6.5.3.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración tanto de ADN como de ARN se determinó mediante espectrofotometría a $\text{DO}_{260\text{nm}}$ con un equipo NanoDrop-1000 *Spectrophotometer*.

6.5.4.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

De forma rutinaria las reacciones contenían 500 nM de cada oligonucleótido, 10 ng de ADN molde, 200 μM de cada dNTP y 1 unidad activa de polimerasa en 50 μl de solución tamponada. Tanto el tiempo de elongación como la temperatura de anillamiento, se ajustaron en cada caso siguiendo el protocolo suministrado por cada polimerasa. Para amplificaciones de alta fidelidad se utilizaron las enzimas *Expand Log Template* (Roche), mientras que para el resto de las amplificaciones se usó la polimerasa *Taq* (Bioline)

6.5.5.- Electroforesis y extracción de ADN de geles de agarosa.

Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa a una concentración que podía variar entre 0.9 y 2.5% dependiendo de los requerimientos del experimento en cuestión. El tampón empleado para la electroforesis fue siempre TBE. Los geles eran posteriormente teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg/ml) durante 15 min para la visualización de las bandas.

La extracción de ADN de los geles de agarosa se realizó cortando la banda deseada de los mismos y utilizando a continuación el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

6.6.- Hibridación de ARN y detección por *northern blot*.

Se recogió la biomasa procedente de 25 mL de cultivo de células creciendo en fase exponencial para extraerle el ARN total. Para el análisis por *northern blot*, se emplearon 10 µg de ARN de cada una de las muestras completando con agua DEPC hasta un volumen máximo de 10 µl. A continuación se añaden 2 µl de tampón MOPS 10 X (para 100 ml: 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.5, 2 ml de EDTA 0.5 M pH 8, y 5 ml de SDS al 10 %; completar con agua DEPC y autoclavar), 4 µl de formaldehído (Sigma) y 12.5 µl de formamida desionizada (Sigma). Se incubó 10 min a 65 °C, 1 min en hielo y se centrifugó 10 segundos a 13000 rpm a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 2 µl de bromuro de etidio 1 mg/ml y 2.5 µl de tampón de carga. Se cargaron los 33 µl de cada muestra en un gel de agarosa al 1 % con 6 % de formaldehído y 10 % de MOPS 10X. La electroforesis se realizó a 120 V. Se lavó el gel con agua DEPC durante 15 min, y dos veces, 15 min cada una, con SSC 10X (20X SSC: 3 M NaCl, 0.3 M citrato de sodio dihidratado).

La transferencia se realizó en membranas de nylon (Hybond-XL+; Amersham) durante 10 h, aproximadamente. Posteriormente radiamos la membrana con luz ultravioleta (700 x 102 PJ/cm²). Como control de carga utilizamos el ARNr, para lo cual se incubó la membrana con una solución de ácido acético al 5% en agua destilada durante 15 min. Eliminamos ésta, y añadimos una solución de 0.04% de azul de metileno en acetato sódico 0.5 M hasta visualizar las bandas correspondientes al ARNr. Una vez escaneada la membrana, ésta se destiñó empleando SDS al 1 %.

Para visualizar las bandas de ARN se preparó una sonda que hibridaría con las 400 pb del extremo 5' del gen *FLO11* y de igual forma para gen control utilizado, *SCRI*. Se realizó una reacción de PCR para la amplificación. Posteriormente, se purificó la banda obtenida por el kit *Gel Extraction Kit* (Qiagen). Se marcaron 30 ng de la sonda con deoxicitidina-5-trifosfato [$\alpha_{32}P$] (dCTP $\alpha_{32}P$). Prehibridamos la membrana en 30 mL de church buffer (0.5 M de tampón fosfato pH 7.2, 7% SDS y 1 mM EDTA) a 65°C durante 30 min. Finalmente se añadió 1/3 del volumen de la sonda de NaOH 2 M. La mezcla total se añadió al tampón de prehibridación. Dejamos hibridar la membrana un mínimo de 6 h a 65°C. Transcurrido este tiempo lavamos la membrana con una solución de SDS 2% y SSC 2%, en agua DEPC, durante 5 min. Lavamos una vez más la membrana con otra solución de SDS 0.1% y SSC 1%, en agua DEPC, durante 20 min. Finalmente se reveló la membrana con un escáner *Typhoon PhosphoImager* (Amersham).

7.- Métodos celulares.

7.1.- Citometría de flujo.

La citometría de flujo se empleó para analizar la medida del contenido de ADN por célula. Se tomaron 3 ml de un cultivo exponencial en medio rico y se centrifugó durante 3 min a 4500 rpm. Se lavaron las células con agua estéril y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 ml de etanol 70% a -20°C,

incubándose a esta temperatura durante 30 min. La muestra así fijada se puede mantener a 4°C por un período de 6 meses. Se tomaron aproximadamente 5×10^5 células y centrifugaron durante 1 min para retirar el etanol. Se resuspendieron en 1 ml de citrato sódico 50mM, se centrifugó 5 min a 13000 rpm, el precipitado se resuspendió en 0.5 ml del mismo tampón conteniendo 50 µg de ARNasa y se incubó a 37°C durante 2 h, tiempo suficiente para eliminar el ARN que puede interferir en la medida del ADN ya que el fluorocromo (Ioduro de propidio) (Sigma) no es específico de ADN sino que se une a ácidos nucleicos. A continuación, se le añadió a la muestra 0.5 ml de citrato sódico 50mM conteniendo ioduro de propidio (0.4 mg/ml) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Transcurrido este tiempo se disgregaron las células mediante la utilización de un emisor de ultrasonidos y se procedió a la medida del contenido de ADN, para lo cual se utilizó un FACScan (Becton & Dickinson, Mountain View, California). El contenido de ADN se obtiene por la medida de la cantidad de fluorescencia emitida por el ioduro de propidio al ser excitado por el laser. El laser emite a 488 nm y el ioduro de propidio excitado emite a 639 nm (máximo).

7.2.- Hidrofobicidad celular.

Las células se incubaron en medio líquido YNB hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (DO_{600nm} entre 0.8 y 1), anotándose la DO_{600nm} de cada cultivo al comienzo del experimento. A 1.2 ml de cultivo se le añadió 600 µl de octano y se mezcló enérgicamente usando un vórtex a máxima potencia durante 3 min. Tras dejarlo reposar 1 min, se tomó la DO_{600nm} de la fase acuosa. La diferencia entre la densidad óptica antes y después de mezclar con el octano nos dio el porcentaje de hidrofobicidad celular según la siguiente fórmula:

$$\% \text{Hidrofobicidad} = 100 \times 1 - (DO_{600nm} \text{ tras octano} / DO_{600nm} \text{ inicial})$$

7.3.- Formación de biofilm sobre superficie líquida.

Para la formación de biofilm sobre superficie líquida el medio en cuestión, el cual varió según el experimento, fue inoculado con 100 µl de un cultivo en exponencial. Se mantuvo en estático a temperatura ambiente y se fue anotando el desarrollo del biofilm sobre la superficie líquida fijando 6 categorías en función del estado del biofilm. A cada una de estas categorías se le adjudicó un valor numérico (Tabla 1).

Estado del biofilm	Valor asignado
Viejo/caído	6
Comienza a caerse	5
Toda la superficie está cubierta por el biofilm	4
Casi toda la superficie está cubierta por el biofilm	3
Islas grandes o bordes cubiertos	2
Islas pequeñas o muy poco en los bordes	1
Sin biofilm	0

Tabla 1.- Categorías asignadas en función del estado del biofilm.

8.- Métodos bioquímicos.

8.1.- Extracción de proteínas.

8.1.1.- Citosólicas.

Para la extracción de proteínas citosólicas se partió de un cultivo de 50 ml a DO_{600nm} de 0.8. Se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min a 4°C, se lavó con agua y para la rotura se resuspendió en 75 μ l de tampón RIPA (Por cada 10 ml de tampón: 0.4 ml Tris-CIH pH 6.8, 1% β -mercaptoetanol, 2% SDS, 0.025% azul de bromofenol, 20% glicerol, 5 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF y 1/2 pastilla de cóctel de inhibidor de proteasas cOmplete miniTM, EDTA-free, Roche). Se añadió el equivalente a 200 μ l de bolitas de cristal (Glassbeads, Sigma) y se lisó en una Fast-Prep 4 veces durante 60 s cada una con 2 min en hielo entre los ciclos. Los lisados se completaron con 225 μ l de tampón RIPA y se eluyó pinchando los tubos y centrifugando a 4°C durante 20 s a 500 rpm para obtener un extracto total de la muestra o bien durante 30 min a máxima potencia para obtener la fracción más soluble. Los extractos se congelaron a -80 °C para un uso posterior.

8.1.2.- Sobrenadantes.

Para la extracción de proteínas 25 ml de cultivo fueron crecidos hasta DO_{600nm} deseada (dependiendo del experimento está podía variar) y se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 min. Inmediatamente se procedió a la filtración del sobrenadante de esta centrifugación pasando el mismo por filtros de 0.22 μ m (Biofil) para evitar así la presencia de células. Al sobrenadante filtrado se le añadió una solución DOC (2g de deoxicolato sódico en 100 ml de agua) a una concentración de 0.02% final y se incubó durante 30 min en hielo. A continuación se le añadió ácido tricloracético (Sigma) a una concentración final del 10% y se mantuvieron durante toda la noche en hielo a 4°C. Seguidamente se centrifugaron durante 12 min a 14000 rpm a 4°C, se lavaron con acetona (Sigma) y se volvieron a centrifugar otros 12 min a 14000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se secaron los precipitados durante 10 min a 60°C. Una vez secos se resuspendieron en un volumen variable de TS (Tris-HCl 30 mM pH 8.5, CHAPS 4%, urea 7 M y tiourea 2 M).

8.1.3.- Componentes de la superficie celular.

Para la extracción de proteínas adheridas a la superficie celular se siguió lo descrito por Thomas y colaboradores (2006). La extracción de estas proteínas se realizó de igual modo tanto si se trataba de células creciendo en cultivo, como células creciendo en biofilm. Las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en un tampón de amonio carbonato (1.89 g/l con un pH de 8.64) más 1% v/v de β -mercaptoetanol. Las células fueron incubadas a 37°C en este tampón durante 45 min, con una agitación de 50 rpm. Se centrifugaron a 3500 rpm durante 3 min y se seleccionó el sobrenadante que fue precipitado como se describe en el apartado anterior.

8.2.- Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas fue determinada usando el kit RC DCTM Protein Assay (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante y realizando curvas patrón de BSA (Sigma) y el mismo tampón en el que iban las muestras a cuantificar.

8.3.- Inmovilización de glicoproteínas a las columnas de ConA.

Se rompieron las células como indica el apartado 8.1.1., a diferencia del tampón de rotura que en este caso está compuesto por Tris-HCl 20 mM, NaCl 0.5 M y 10 µl de inhibidores de proteasas, pH 7.4. Una vez se recogieron las fracciones citosólicas éstas fueron completadas con 1 volumen de Tampón *binding* 2X (20 mM Tris- HCl, 0.5 M NaCl, 2 mM MnCl₂ y 2 mM CaCl₂, pH 7.4). Para el ensayo de afinidad se utilizaron columnas HiTrap Con A 4B 1m (GE Healthcare), éstas fueron primero lavadas con 10 volúmenes de agua Milli-Q y posteriormente equilibradas con 10 volúmenes de Tampón *binding* (20 mM Tris- HCl, 0.5 M NaCl, 1 mM MnCl₂ y 1 mM CaCl₂, pH 7.4) a 1 ml/min utilizando un sistema FPLC (ÄKTA FPLCA, GE Healthcare), que te permite mantener un flujo constante y controlado. A continuación se aplicaron las muestras por las columnas ya equilibradas, a no más de 0.1 ml/min, utilizando una bomba peristáltica. Se lavó la columna con 10 volúmenes de Tampón *binding* y se eluyó con 5 volúmenes de Tampón de Elución (0.5 M metil- α -D-manopiranoside, 20 mM tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.4), a 0.1 ml/min, en el mismo sistema FPLC usado anteriormente para los lavados y equilibrados. Las fracciones eluidas resultantes se concentraron con el empleo de centricones 3K (Millipore) hasta un volumen final de 200-400 µl que posteriormente fue precipitado con el kit 2D Clean-Up (Amerschan Biosciences) y cuantificado.

8.4.- 2D-DIGE.

8.4.1.- Marcaje DIGE de las proteínas y separación mediante geles 2D.

Las proteínas totales se precipitaron con el kit 2D Clean-Up (Amerschan Biosciences) y fueron resuspendidas en el tampón TS (Tris-HCl 30 mM pH 8.5, CHAPS 4%, urea 7 M y tiourea 2 M). Se cuantificó la concentración total de proteínas y una misma cantidad de proteínas totales fueron marcadas con dos fluoróforos diferentes Cy3-Dye y Cy5-Dye, para ello se utilizó el kit CyDye DIGE Fluor minimal labeling (GE Healthcare, Life Sciences). Las diferentes muestras fueron marcadas de forma aleatoria por los distintos fluoróforos para que esto no pudiese intervenir en los resultados. Como control interno se utilizó una mezcla de todas las cepas a la misma concentración de proteínas, la cual se marcó con el fluoróforo Cy2-Dye. Este control interno se utilizó para todos los geles.

La primera dimensión se llevo a cabo en un IPGphor (Pharmacia Biotech) utilizando *strips* 4-7 NL (Immobiline DryStrip pH 4-7 NL, 24 cm, GE Healthcare Life sciences). Las condiciones de carrera fueron las indicadas por el fabricante para *strips* de 24 cm pH4-7 NL, alcanzando el paso 4 (S4) las 5:36 h de duración. Al final de la

carrera se registraron 59068 Vhr y el programa tuvo una duración total de 10:36 h más las 15 h iniciales de rehidratación. Seguidamente se equilibraron de los *strips* incubándolos primero durante 15 min a temperatura ambiente en el tampón de equilibrado I (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, 6 M de urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS y 10 mg/ml de DTT), y seguidamente otros 15 min en el tampón de equilibrado II (Tris-HCl 50 mM pH 8.5, 6 M de urea, 30% v/v de glicerol, 2% p/v de SDS y 25 mg/ml de iodoacetamida).

La segunda dimensión se realizó en una fuente de electroforesis Ettan Dalt Six Elect (Amersham Biosciences), que nos permitió correr todos los geles a la vez. Durante los primeros 30 min se fijaron 5W/gel y el resto del tiempo 17W/gel hasta que el frente de banda llegó al final de los cristales, aproximadamente unas 5 h. El tampón de electroforesis utilizado contenía Tris-HCl 250 mM, glicina 1.92 M y SDS al 1%.

Para la realización de los geles bidimensionales sin marcaje DIGE, se siguieron las mismas indicaciones anteriores, a excepción del uso de los fluoróforos Cy3-Dye, Cy3-Dye y Cy5-Dye. En algunos casos concretos los *strips* utilizados presentaban otro rango diferente especificado en el experimento en cuestión. Estos geles fueron visualizados con fueron teñidos con plata (Silver Stain Kit, Pierce).

8.4.2.- Software de análisis de 2D-DIGE.

El escaneo de los geles fue realizado con un Typhoon-9410, filtrando los 3 canales en los que emitían los diferentes fluoróforos empleados para el marcaje (Cy5-rojo, Cy3-verde y Cy2-azul). Posteriormente, los *spots* fueron visualizados y trabajados con el software DeCyder 2D (v 7.0, GE Healthcare Fife Sciences). Los geles fueron seguidamente teñidos con EZ-Blue (Sigma). Una vez seleccionados los puntos de interés estos se cortaron del gel y fueron identificados por espectrometría de masas.

9.- Ensayos de infección en plantas de maíz.

Los ensayos de patogénesis se realizaron en plantas de *Zea mays*, variedades Gaspar Flint y Golden Bantan. Se infectaron plantas de maíz aproximadamente siete días después de la siembra de las semillas en macetas con sustrato universal. Las plantas se crecieron en una habitación termoregulada (28-30°C), humedad entre el 60-90 % y un fotoperiodo de 12 h. Se inocularon alrededor de 10⁷ células/ml en la base del tallo o en las flores femeninas. La cuantificación de la sintomatología se registró a partir de los 10 días de la inoculación.

Capítulo I:

Identificación de las
levaduras de flor aisladas en
la D.O. Montilla-Moriles

Introducción

Desde que se conoce que el velo de flor está compuesto por levaduras, estas han sido objeto de estudio por parte de investigadores interesados en su origen y función durante la elaboración de los vinos Finos. Estos estudios se han realizado principalmente sobre las levaduras de flor presentes en los vinos de Jerez y se han centrado en aspectos poblacionales (Martínez et al., 1995; Ibeas et al., 1997b; Esteve-Zarzoso et al., 2001) y metabólicos (Martínez et al., 1998; Mauricio et al., 2001), el análisis de los factores que afectan a la viabilidad de las levaduras (Ibeas and Jiménez, 1997; Ibeas et al., 1997a; Castrejón et al., 2002; Aranda et al., 2002; Fierro-Risco et al., 2013), el estudio genético de la formación de flor (Santa María and Vidal, 1973; Guijo et al., 1997; Infante et al., 2003; Ishigami et al., 2006; Fidalgo et al., 2006; Zara et al., 2009), la generación de nuevas cepas híbridas a partir de las levaduras de flor (Jiménez and Benítez, 1988; Ibeas and Jiménez, 1996) o a su clasificación (Fernández-Espinar et al., 2000; Esteve-Zarzoso et al., 2004) entre otros.

Sin embargo, son escasos, y ya relativamente obsoletos, los trabajos que estudian las levaduras de flor de la otra gran Denominación de Origen productora de vinos Finos, la D.O. Montilla-Moriles, en la que se centraron los primeros trabajos sobre estas levaduras. Vamos a describir en este capítulo algunos de los sistemas empleados para la identificación de levaduras a nivel de especie y de cepa, y mostraremos los resultados de su aplicación en el estudio de las poblaciones presentes en cinco bodegas de la D.O. Montilla-Moriles.

1.- Métodos de identificación de levaduras.

1.1.- Métodos convencionales.

Clásicamente los estudios de identificación de las diferentes especies de levaduras, así como de las cepas que pertenecen a una misma especie, se basan tanto en criterios morfológicos como fisiológicos (Kreger-van Rij, 1984; Barnett et al., 1990). Las pruebas morfológicas, consisten en el análisis macroscópico de las colonias, analizando su tamaño, forma, color, etc. y microscópico de las células de levaduras estudiando su forma, tamaño, sistema de división, etc. El principal inconveniente en la aplicación de estos estudios surgió con el descubrimiento del estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme en los ascomicetos y basidiomicetos, o sea, la relación anamorfo/teleomorfo. Esto generó la llamada dualidad de la nomenclatura binomial actual, por ejemplo en los casos *Brettanomyces/Dekkera* o *Cryptococcus/Filobasidiella* entre otros, que siendo organismos de una misma especie se nombran de una forma en su estado vegetativo (anamorfo) y de otra en su estado sexual (teleomorfo) (Orberá, 2004).

Las principales pruebas fisiológicas utilizadas para la identificación de levaduras son los análisis de fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia (Kurtzman et al., 2011). El problema que generan estas pruebas es que los resultados obtenidos en ellas no son siempre estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse

por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes (Boekhout and Kutzman, 1996; Loureiro and Querol, 1999). Por otro lado, las pruebas de fermentación de azúcares no son muy fiables debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata como para que sea atrapado por la campana Durham, lo que ha provocado que especies consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse (Boekhout and Kutzman, 1996).

Otros métodos empleados para la identificación de levaduras implican técnicas como la electroforesis de proteínas (Van Vuuren and Van der Meer, 1987; Vacanneyt et al., 1991), el análisis de los patrones de isoenzimas (Duarte et al., 1999), la Resonancia Magnética Nuclear, el número de unidades de isopreno en la coenzima Q o la cromatografía de ácidos grasos de la cadena larga de la pared celular (Moreira da Silva et al., 1994). Sin embargo, todas estas técnicas dependen también del estado fisiológico de las levaduras, por lo que su reproducibilidad es de nuevo bastante cuestionable (Golden et al., 1994), provocando ambigüedades e incorrecciones en los resultados a la hora de clasificar a las cepas.

Además de todo lo mencionado, para que un resultado de identificación sea fiable, es necesario realizar entre 50 y 100 pruebas de las descritas anteriormente, lo que hace este método lento, tedioso y caro, sumado a la necesidad de tener cierta experiencia para interpretar los resultados (Fleet, 1993). Todo esto generó el diseño de kits sencillos de diagnóstico basados en pocas pruebas, pero específicos para ciertas levaduras, que se aplican hoy en día en campos concretos como la clínica o la industria agroalimentaria.

Con el objetivo de mejorar tanto la fiabilidad de las identificaciones, como el tiempo necesario para obtener los resultados, desde hace años se están desarrollando pruebas moleculares basadas en la amplificación, restricción y, actualmente sobretodo, en la secuenciación de ciertas regiones génicas o intergénicas. Estos métodos complementan a las pruebas convencionales descritas anteriormente, aportando nuevos datos que están permitiendo la resolución de problemas de clasificación, y con ello la identificación de nuevas especies. La principal ventaja de estas técnicas es que no dependen del estado fisiológico de las cepas a analizar. A continuación se describen brevemente algunos de los métodos más usados, empleados en este trabajo.

1.2.- Análisis de regiones ribosomales para la identificación de levaduras a nivel de especie.

Los genes ribosomales 5.8S, 18S, y 26S, se agrupan en tándem formando unidades de transcripción que se repiten en el genoma entre 100 y 200 veces (Figura 1.1). En cada unidad de transcripción existen además otras regiones que se transcriben pero no son procesadas, y que por tanto no forman parte de la molécula de ARNr final, son los espaciadores internos (ITS) y externos (ETS). Las unidades codificantes están a su vez separadas por los espaciadores intergénicos IGS también llamados NTS. El gen 5S aparece adyacente a esta unidad de transcripción, localizado en la misma unidad de

repetición en tandem en el caso de las levaduras. Los genes ribosómicos 5.8S, 18S, y 26S así como los espaciadores ITS y NTS constituyen poderosas herramientas para la identificación de especies (Kurtzman and Robnett, 1998), debido a la similitud existente entre unidades de transcripción repetidas dentro de una misma especie, mayor que entre distintas especies, debido a entrecruzamientos desiguales o conversión génica (Li, 1997).

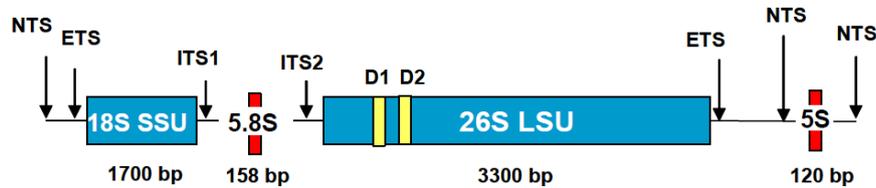


Figura 1.1.- Esquema de la organización de los genes ribosomales.

Usando la información de estas regiones se han desarrollado distintos métodos para la identificación de especies de levaduras como la secuenciación de regiones ribosomales, entre ellas los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman and Robnett, 1998), o el gen 18S (James et al., 1997), y el análisis de restricción y/o la secuenciación de regiones ribosomales como la que incluye el gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2 (White et al., 1990).

Para diferenciar a nivel de cepa no son exclusivas las técnicas de análisis de regiones ribosómicas, también son de gran utilidad técnicas como PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) basada en la realización de una PCR seguida de una electroforesis en gradiente de desnaturalización (Muyzer et al., 1993), o la PCR a tiempo real que posee las ventajas de tener una alta especificidad y sensibilidad, así como la posibilidad de cuantificar, sin necesidad de un análisis posterior de las muestras mediante electroforesis (Heid et al., 1996; Mackay et al., 2002).

1.3.- Métodos moleculares más frecuentes para la identificación de levaduras a nivel de cepa.

En muchos casos, como el que nos ocupa en la mayor parte de este trabajo, el interés del investigador no es diferenciar entre distintas especies, o dar un nombre concreto a una levadura aislada, sino distinguir diferentes levaduras de una misma especie. Por ejemplo en un mosto fermentando con un inóculo, la levadura inoculada coexistirá con decenas de levaduras de la especie *S. cerevisiae* presentes en el mismo, siendo necesaria la diferenciación entre ellas para determinar la evolución de dicho inóculo. Son muchas las técnicas de biología molecular empleadas para la identificación de levaduras a nivel de cepa. A continuación se exponen aquellas con un uso preferente en el campo de las levaduras vínicas, especialmente para *S. cerevisiae*.

1.3.1.- Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

El término original PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) fue utilizado por Schwartz y Cantor (1984) para cualquier método de separación en gel que emplease campos eléctricos múltiples y alternos. Existen muchas variantes de la PFGE, las cuales implican cambios en las características y posibilidades de los equipos (la disposición geométrica de los electrodos, homogeneidad, método para la reorientación de los campos eléctricos e intensidad del campo), y en cuanto a los resultados que se pueden obtener (velocidad de migración del ADN, resolución de las bandas de ADN y la relación geométrica de los carriles de las muestras) (Birren and Lai, 1993). De entre todos los tipos de PFGE, la variante CHEF (*Clamped Homogeneous Electric Field*) es la más utilizada para el proceso de identificación por presentar un mayor poder de separación (separa moléculas inferiores a 50 kb sin distorsión y hasta moléculas de 7 mb), los carriles electroforéticos son perfectamente rectilíneos y el patrón de separación es independiente de la posición del gel (Chu et al., 1986; Graves and Swaminathan, 2001).

En el CHEF, el campo eléctrico es generado por varios electrodos organizados a lo largo de un contorno hexagonal y es pulsado alternamente, generando así un ángulo de reorientación del ADN de aproximadamente 120° (Figura 1.2). El empleo de esta técnica requiere que las levaduras crezcan en un medio líquido y posteriormente se combinan con agarosa fundida y se colocan en pequeños moldes. La célula embebida se somete a lisis *in situ*, de forma que el ADN liberado queda inmovilizado en la matriz de agarosa. Los bloques son insertados en geles de agarosa donde se someten a los campos eléctricos. Los cromosomas se ven forzados a cambiar continuamente su dirección de migración, evitando de esta manera que queden retenidos en el entramado del gel de agarosa, y permitiendo separar los fragmentos de ADN de gran tamaño (Lai et al., 1989). Los parámetros que condicionan la resolución de las bandas son los intervalos de variación de la fuerza del campo eléctrico, la concentración de agarosa, la temperatura y el ángulo entre los campos eléctricos.

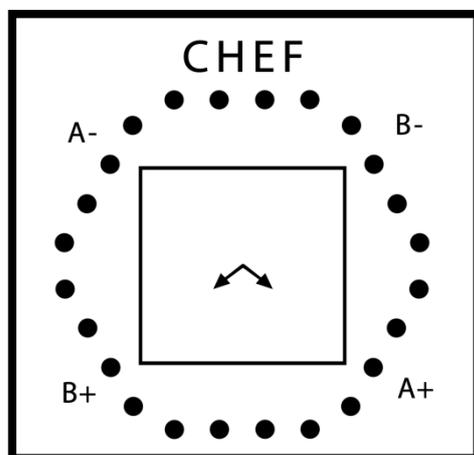


Figura 1.2.- Distribución de los electrodos en el equipo CHEF utilizado en PFGE. Flechas cortas muestran los vectores de fuerza de campo de los campos eléctricos alternantes. Símbolos A+ y A-, B+ y B- indican posiciones de los pares de electrodos de los campos eléctricos alternantes (Joppa et al., 1992).

El análisis de cariotipos empleando estos sistemas se ha considerado como una técnica potente para diferenciar cepas de *S. cerevisiae*. El polimorfismo observado es el resultado de la adición o eliminación de largos fragmentos de ADN en cromosomas homólogos durante la evolución del genoma de las levaduras (Wolfe and shields, 1997; Casaregola et al., 1998; Keogh et al., 1998). Sin embargo, el tiempo requerido para la preparación de las muestras y la duración de la electroforesis hace que la técnica sea poco recomendable para el análisis de poblaciones que impliquen un gran número de muestras.

1.3.2.- Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit).

Las levaduras presentan un alto grado de variabilidad en el tamaño del ADN mitocondrial, el cual puede variar entre los 6 y los 25 μ m, siendo en la mayoría de las especies de forma circular (Belloch et al., 1997). Como ventajas para su uso en taxonomía podríamos destacar su pequeño tamaño, su elevado número de copias y que la electroforesis de su ADN digerido con endonucleasas de restricción, permite la visualización en gel de fragmentos de hasta 2 kb (Belloch et al., 1997). Sin embargo, presenta la limitación de que requiere el aislamiento de las mitocondrias y de su ADN, lo cual lo hacía impracticable para su uso en la identificación de gran cantidad de muestras. Esta dificultad fue superada por el método diseñado por Querol y colaboradores en 1992 para el análisis de restricción del ADN mitocondrial, sin necesidad de aislamiento ni purificación previa. La simplificación de la técnica se basa en las diferencias existentes en el contenido de GC entre el ADN nuclear y el ADN mitocondrial presente en levaduras. Este último posee un 75% de pares A+T (Gray, 1989) y unas 200 regiones ricas en GC. Con esta composición, las enzimas de restricción del tipo GCAT no reconocen las regiones ricas en GC ni ricas en AT. Dado el bajo número de sitios de restricción para estas enzimas en el ADN mitocondrial, y el alto número de puntos de corte en el ADN nuclear, este último se rompe en fragmentos de pequeño tamaño, lo que permite visualizar claramente las bandas correspondientes al ADN mitocondrial como bandas definidas, superpuestas a la sombra de la degradación del ADN nuclear. No todos las enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y es muy dependiente de la especie. En el caso concreto de *S. cerevisiae* las enzimas más apropiadas para diferenciar a nivel de cepa son HinfI y HaeIII (Guillamón et al., 1994).

Esta técnica rápida permite el análisis de un gran número de cepas en poco tiempo, y es ideal por su seguridad y economía.

1.3.3.- Análisis de zonas repetitivas del genoma mediante PCR.

Las técnicas basadas en la PCR de zonas repetitivas permiten detectar polimorfismos de fragmentos de ADN sin necesidad de utilizar enzimas de restricción, por lo que se establecen como las técnicas más rápidas para discriminar entre cepas de levaduras vínicas (Saiki et al., 1985,1988).

Entendemos por zonas repetitivas del genoma los microsátélites (segmentos inferiores a 10 pb), y los minisátélites (segmentos entre 10 y 100 pb), que son pequeñas secuencias de ADN que se repiten en tándem de forma abundante y variable a lo largo del genoma, y poseen una alta tasa de mutación, lo que les dota de su carácter altamente polimórfico. Su repetición consecutiva las hace dianas potenciales para la identificación molecular a nivel de cepa, por mostrar mucha variabilidad.

El análisis de estas regiones consiste en la amplificación de fragmentos empleando oligonucleótidos específicos para estas secuencias repetitivas, y una temperatura de hibridación para el cebador de 55°C. Esto hace que se unan de forma específica en zonas concretas del genoma, de ahí su elevada reproducibilidad. Los productos generados por la PCR presentan unos tamaños comprendidos entre 700 y 3500 pb, por lo que se pueden visualizar en geles de agarosa.

En el genoma eucariota las secuencias de los microsátélites son muy frecuentes, bien distribuidas y mucho más polimórficas que los minisátélites, constituyendo por tanto la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen. Los primeros oligonucleótidos para la identificación de cepas vínicas de *S. cerevisiae* fueron desarrollados por Gallego y colaboradores (1998), y a partir de ese momento otros grupos como González-Techera y colaboradores (2001) diseñaron nuevos cebadores tanto para identificación como para monitorización de cepas comerciales de *S. cerevisiae*. Vaudano y García-Moruno (2008) describieron un sistema rápido, con alto rendimiento y asumible incluso con poco presupuesto para discriminar cepas vínicas de *S. cerevisiae*, empleando un protocolo de PCR múltiple de regiones de microsatélite altamente polimórficas como son SC8132X (cromosoma XVI), SCYOR267C (Cromosoma XV) y SCPTSY7 (cromosoma XIII) y el posterior análisis de los patrones de bandas.

Técnicas alternativas a estas basadas también en la PCR, y con amplio uso en la identificación a nivel de cepas dentro de una misma especie, son la técnica RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), que implica la amplificación por PCR del ADN genómico empleando un único cebador de pocos nucleótidos, con su secuencia diseñada al azar (Williams et al., 1990), o la amplificación de secuencias δ , exclusiva para levaduras del género *Saccharomyces*, ya que estos elementos sólo están presentes en ellas. Otra técnica es la AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), basada en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción de una digestión total de ADN, los cuales serían posteriormente separados en geles de acrilamida y visualizados por auto-radiografía o en equipos de secuenciación automáticos (Vos et al., 1995). Esta última técnica ha tenido un amplio uso en los últimos años para el estudio de algunos hongos patógenos (Massart et al., 2004; Sudhadham et al., 2011; Li et al., 2013), así como para las levaduras vínicas, donde han sido varios los trabajos que han empleado esta técnica para la identificación de cepas diferentes (Curtin et al., 2007; Lopandic et al., 2008).

Como veremos a lo largo de los resultados de este capítulo, y se ha propuesto en algunos trabajos previos, es necesaria la combinación de varias de estas técnicas para ampliar la diferenciación a nivel de cepa cuando se analizan poblaciones de levaduras (Martínez et al., 1995; Baleiras Couto et al., 1996; Ibeas et al., 1997b; Pramateftaki et al., 2000; Fernández-Espinar et al., 2001).

2.- Levaduras de flor en la D.O. Montilla-Moriles.

Actualmente se conoce poco acerca de las levaduras vínicas de la D.O. Montilla-Moriles. Guijo y colaboradores describieron en 1986 el aislamiento de levaduras de mostos en fermentación y de velos de flor en la maduración de vinos de uvas variedad Pedro Ximénez, llevados a cabo en la región de Montilla-Moriles, y su posterior identificación a través del análisis de varios aspectos morfológicos y fisiológicos, siguiendo lo descrito por Kreger-van Rij (1984). El objetivo de este trabajo fue el estudio de las características fermentativas de varias especies de levaduras aisladas, con el propósito de seleccionar y mejorar estas cepas para ser empleadas en ambos procesos, y evitar el uso de levadura seca activa. Se llegaron a aislar cuatro especies diferentes en mostos durante la fermentación y tres especies en el velo de flor, empleando la nomenclatura establecida en ese momento (Tabla 1.1).

Especies	Total de colonias aisladas	Fermentación	Velo
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>cerevisiae</i>)	22	20	2
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>capensis</i>)	16	9	7
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>chevalieri</i>)	10	2	8
<i>S. exiguus</i>	4	4	-
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>aceti</i>)	4	-	4
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>bayanus</i>)	3	-	3
<i>Torulaspota delbrüeckii</i>	2	-	2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1	-	1
<i>S. cerevisiae</i> (race <i>globosus</i>)	3	-	3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1	1	-
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	1	1	-

Tabla 1.1.- Distribución de las levaduras aisladas durante la fermentación y el envejecimiento de los vinos en la zona de Montilla-Moriles (Guijo et al., 1986).

En ese mismo año, el grupo de Rodríguez-Navarro y colaboradores llevó a cabo un estudio en la misma D.O. en el que aislaron una 1500 colonias procedentes de los tres estados que se suceden en la producción del vino Fino (fermentación, biofilm en depósitos de fermentación y biofilm en barriles de envejecimiento). Todas ellas fueron asignadas al género *Saccharomyces* en base a su reproducción vegetativa por gemación multilateral, formación de esporas, la no asimilación de nitrato, la incapacidad de crecer en presencia de 100 ppm de cicloheximida, y la no utilización de lactosa (Sancho et al., 1986). Según la clasificación establecida previamente por van der Walt (1970), estos aislados pudieron agruparse en cinco especies: *S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. capensis*,

S. aceti y *S. bayanus*, pero como veremos posteriormente en la actualidad todas, a excepción de *S. bayanus* que es una especie independiente, son sinónimos de *S. cerevisiae* (Kurtzman et al., 2011). Posteriormente el grupo de Sancho realizó una caracterización genética de levaduras aisladas en la región de Montilla-Moriles (Naumov et al., 1994). En el año 2005 se publicó un trabajo en el que se describe el estudio de algunas levaduras aisladas previamente en la región de Montilla-Moriles, concretamente un análisis de restricción del fragmento 5.8S-ITS y la secuenciación del mismo en tres levaduras de la zona (Naumova et al., 2005).

Existen otros estudios más recientes que han sido desarrollados en vinos pertenecientes a la D.O. Montilla-Moriles, como el estudio del contenido en minerales en los vinos Finos (Álvarez et al., 2007) o en metales en los vinos tipo Olorosos (Paneque et al., 2009), pero son escasos los trabajos que han profundizado en el estudio de las levaduras vínicas en esta Denominación de Origen aplicando las actuales técnicas de identificación. Sin embargo, si existen varios trabajos a cerca de la identificación de levaduras de flor en la D.O. Jerez (Martínez et al., 1995; Ibeas et al., 1997b; Martínez et al., 1997a; Esteve-Zarzoso et al., 2001) en los que se concluye que son cuatro las razas de levaduras de flor *S. cerevisiae* presentes en la etapa de crianza biológica del vino Fino en esta región: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. Estos trabajos coinciden en cuanto a las razas descritas, aunque no lo hacen en la distribución de las mismas en las bodegas analizadas. Así, Martínez y colaboradores describen en 1997 que en una bodega de Jerez, la raza *beticus* predominaba en vinos jóvenes, mientras que *montuliensis* era la mayoritaria en vinos viejos. Sin embargo, Ibeas y colaboradores (1997b), analizando diversas dependencias de una bodega en El Puerto de Santa María describieron la coexistencia de las cuatro razas mencionadas anteriormente, incluso dentro de una misma bota, pero siendo la raza *beticus* la que mostraba mayor presencia, tanto en vinos jóvenes como viejos. Originalmente estas razas fueron consideradas por Iñigo y Arroyo en 1964 como especies independientes dentro del género *Saccharomyces*, denominándose *S. rouxii*, *S. montuliensis*, *S. beticus* y *S. cheresiensis*. En la actualidad han sido reclasificadas de nuevo, como se mostrará con más detalle en el siguiente apartado.

La existencia de nuevas técnicas analíticas permitirán que este trabajo sea el primer estudio profundo de las poblaciones de levaduras de flor de la D.O. Montilla-Moriles, realizado además en diferentes bodegas de la misma.

3.-Taxonomía de las levaduras de flor.

Las levaduras vínicas, empleadas tanto para la fermentación de los mostos como para la crianza biológica en el caso de los vinos Finos, se agrupan en distintas especies dentro del género *Saccharomyces*, familia *Saccharomycetae*, orden *Saccharomycetales*, clase *Saccharomycetes* y filo *Ascomycetos*. El género que hoy conocemos como *Saccharomyces* ha sido subdividido y reagrupado en diversas ocasiones desde que se definió en 1870. Actualmente se considera que este género agrupa las siguientes especies: *S. arboricolus*, *S. bayanus* var. *bayanus*, *S. bayanus* var. *uvarum*, *S.*

cariocanus, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus* (Kurtzman et al., 2011), siendo la especie tipo *S. cerevisiae*. Con importancia en la industria vitivinícola se agrupan dentro de este género especies con una gran capacidad fermentativa, en presencia o ausencia de oxígeno, para la producción de etanol y que, previamente, se habían denominado como *Saccharomyces sensu stricto* (Vaughan-Martini and Martini, 1998), inicialmente constituido por cuatro especies: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*.

Dentro de las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica, las principales especies son *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (variedad *uvarum*) (Sipiczki, 2002). Dentro de la especie *S. cerevisiae*, existe una gran diversidad, e incluso en algunos momentos se procedió a subdividir la especie en seis grupos llamados *cerevisiae*, *diastaticus*, *ellipsoideus*, *oviformis*, *cheresanus* y *logos*, que más o menos coinciden con los diferentes aplicaciones industriales de estas variedades (Naumov, 1996). Actualmente existen algunas dificultades para distinguir entre las diversas cepas de *S. cerevisiae* presentes en un mosto no estéril, constituyendo esta problemática uno de los principales retos de la genética en la enología actual.

Con respecto a las levaduras de flor, incluso empleando las técnicas moleculares disponibles, continúa existiendo controversia en su clasificación. Como hemos comentado anteriormente, estas levaduras fueron inicialmente consideradas como especies dentro del género *Saccharomyces*: *S. rouxi*, *S. montuliensis*, *S. beticus* y *S. cheresiensis* (Iñigo and Vázquez, 1964). Posteriormente fueron reagrupadas en cuatro razas dentro de la especie *S. cerevisiae*, en función de sus características morfológicas y sus propiedades fisiológicas, según su capacidad de fermentar y asimilar distintas fuentes de carbono (Lodder, 1970; Kreger van Rij, 1984; Barnett et al., 1990). La primera de estas razas fue después considerada como *Zygosaccharomyces rouxii* en varias revisiones taxonómicas del género *Saccharomyces* (Kreger-van Rij 1984; Barnett 1992; Kurtzman and Fell, 1998). Con respecto a *S. montuliensis* ha sido recientemente reclasificada como *Torulasporea delbrueckii* (Kurtzman et al., 2011; Alexandre, 2013). Finalmente, las levaduras *S. beticus* y *S. cheresiensis* hoy día ya no son consideradas como razas o subespecies de *S. cerevisiae*, sino como sinónimos de la misma, según el último estudio taxonómico llevado a cabo por Kurtzman y colaboradores (2011).

Por otro lado, en los últimos años se ha aplicado a las levaduras de flor un análisis de secuenciación del fragmento 5.8S-ITS, cuyos resultados incluyen a todas ellas en un grupo diferente al resto de grupos de la especie *S. cerevisiae*, designadas como ‘no flor’ (Esteve-Zarzoso et al., 2004). La principal diferencia entre ellas radica en una delección de un fragmento de 24 pb dentro de la región ITS1 en las cepas de flor, fragmento que sí está presente en las cepas no formadoras de flor (Fernández-Espinar et al., 2000). El trabajo de Naumova y colaboradores (2005), en el que se secuenció la región 5.8S-ITS en tres cepas aisladas en Montilla-Moriles, ratifica esta diferencia al indicando que dos de las cepas aisladas dentro del sistema de soleras y criaderas presentaban la delección de 24 pb en el fragmento ITS1, mientras que una tercera aislada

de vino joven no presentaba dicha deleción, ya que probablemente se tratase de una levadura de fermentación. Esteve-Zaroso y colaboradores (2004) proponen, por tano, una nueva nomenclatura donde las cuatro razas de levaduras de flor constituyen ahora una única y nueva raza dentro del taxón *S. cerevisiae* denominadas ‘levaduras de flor’, más que como diferentes especies, aunque como veremos más adelante, estas levaduras se pueden diferenciar entre ellas molecularmente, y tienen características fisiológicas que las distinguen.

Resultados

El objetivo principal de este capítulo es el de conocer las poblaciones de levaduras de flor presentes en diferentes bodegas de la D.O. Montilla-Moriles. Vamos a describir en él las bodegas estudiadas, la estrategia de muestreo de las mismas, las técnicas empleadas para la identificación de las levaduras y los resultados obtenidos.

1.- Bodegas de la D.O. Montilla-Moriles incluidas en el estudio.

En la D.O. Montilla-Moriles están inscritos aproximadamente unos 50 operadores que poseen registro de elaboración de vino con Denominación de Origen. Tras consultar con varios de ellos y proponerles la participación en el proyecto fueron cinco las bodegas que accedieron a colaborar. Tres de estas bodegas se encuentran situadas en el municipio de Montilla (Alvear, Cooperativa la Unión y Pérez Barquero), otra en la carretera Córdoba-Málaga (Robles) y la quinta en Aguilar de la Frontera (Toro Alvalá). En cada una de estas bodegas se consultó a los responsables para seleccionar botas que contuvieran vinos con características organolépticas estándar, así como botas con vinos con características especiales. De cada una de las bodegas se eligieron hasta 9 botas que varían en sus características y localización dependiendo de la bodega como se describe a continuación.

1.1.- Bodega Robles.

La bodega Robles se caracteriza por producir, entre otros, vino Fino ecológico. Por tanto, además del objetivo general planteado, que pretende identificar diferentes levaduras en la región, es esta bodega se planteó un muestreo en el que se estudió si la procedencia del vino, con tratamiento ecológico o convencional, influye de alguna forma en el tipo de levadura de flor que se desarrolla sobre él durante el envejecimiento. Para ello se seleccionó una bota de cada escala de un cachón en el que se envejece el vino tradicional de esta bodega (botas 1, 2 y 3) y una bota de cada escala de dos cachones empleados en la producción de vino ecológico (botas 4, 5, 6, 7, 8 y 9) (Figura 1.1). Todas las botas que han sido analizadas se ubican en el mismo edificio, que se encuentra semienterrado, lo que permite mantener las condiciones de temperatura más constantes a lo largo del año, en torno a 20-22°C.

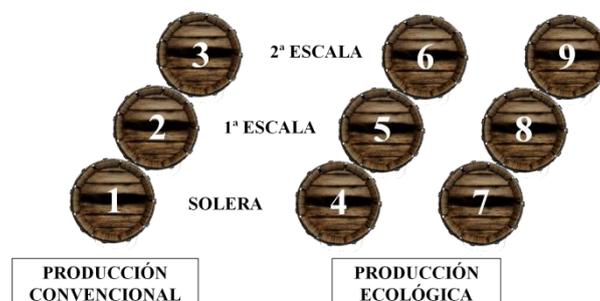


Figura 1.1.- Representación esquemática de la distribución de las botas elegidas para el muestreo en la bodega Robles.

1.2.- Bodega Alvear.

En la bodega Alvear se seleccionó una bota de cada escala, en dos cachones diferentes (botas 1, 2, 3, 4, 5 y 6) que producían el vino característico de la misma, dos toneles que poseen un volumen de vino de unos 900 litros y que producen un vino con características destacadas por los enólogos de la empresa, ambos contiguos en la solera de un mismo cachón (botas 7 y 8), y una bota que por su posición se abre con mayor frecuencia en las visitas a la bodega y presenta generalmente un estado óptimo de la flor (bota 9). Todas las botas que han sido analizadas se ubican en el mismo edificio.



Figura 1.2.- Representación esquemática de la distribución de las botas elegidas para el muestreo en la bodega Alvear.

1.3.- Bodega Cooperativa La Unión.

En la bodega Cooperativa La Unión se seleccionaron siete botas localizadas en la solera de diferentes cachones, situadas todas en el mismo edificio, y sin ninguna propiedad particular.

1.4.- Bodega Pérez Barquero.

La bodega Pérez Barquero fue incorporada al estudio en el segundo muestreo realizado. En esta bodega se analizaron nueve botas localizadas en la solera de tres cachones diferentes, seleccionados por el personal de la bodega y ubicados en diferentes edificios de la empresa.

1.5.- Bodega Toro Alvalá.

La bodega Toro Alvalá también se incorporó al estudio en el segundo muestreo. En ella se seleccionó una bota de cada escala en dos cachones diferentes (botas 4, 5, 6, 7, 8 y 9), y tres botas independientes seleccionadas por el personal de la bodega. Dos de estas botas estaban fuera del sistema saque-rocío desde hacía cuatro años (botas 1 y 2), y la otra está sometida a muestreos constantes como referencia analítica (bota 3). Todas las botas están ubicadas en el único edificio dedicado al envejecimiento de vinos que posee la empresa y que, como en el caso de la bodega Robles, se encuentra semienterrado para reducir las variaciones de temperatura.

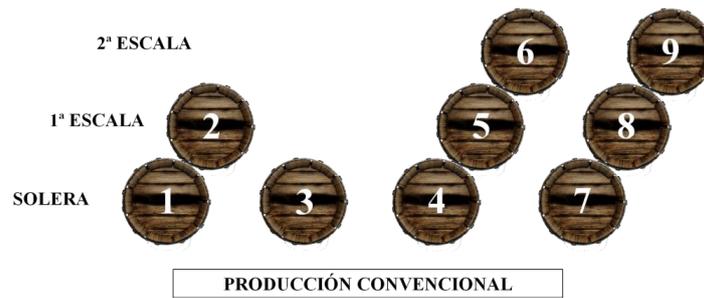


Figura 1.3.- Representación esquemática de la distribución de las botas elegidas para el muestreo en la bodega Toro Alvalá.

2.- Sistema de muestreo y análisis del estado de la flor.

Con el propósito de identificar la mayor cantidad de levaduras de flor diferentes de las que componen las poblaciones de la flor del vino, y dado que no todas ellas están igualmente adaptadas a las diferentes condiciones ambientales, se decidió realizar cuatro muestreos a lo largo de un año, para examinar de esta forma los posibles cambios provocados por el efecto del clima sobre las mismas. Las muestras se tomaron en los meses de abril, junio, noviembre y marzo, abarcando aproximadamente las cuatro estaciones. Observando la evolución anual de la temperatura registrada en la zona de la D.O. Montillas-Moriles, podemos ver cómo se han cubierto tres rangos de temperatura transcurridos en el año, con el objetivo de analizar el posible desplazamiento estacional de las levaduras en el caso de que lo hubiese (Figura 1.4).

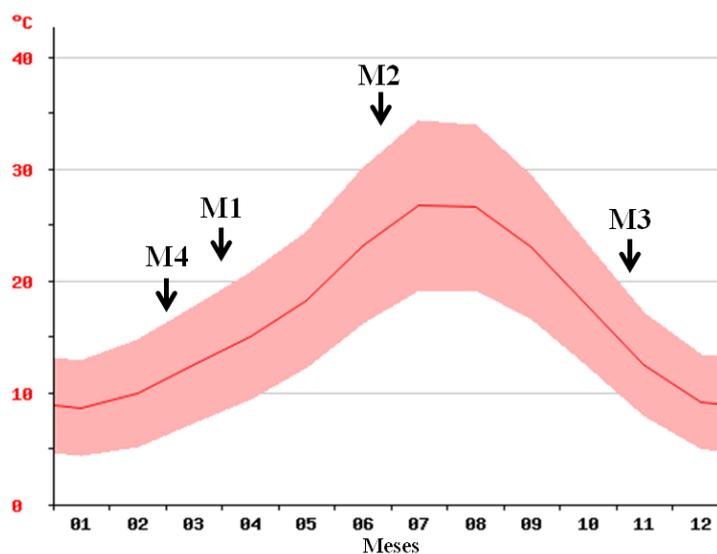


Figura 1.4.- Evolución anual de la temperatura en la región de Montilla. Las flechas indican los muestreos realizados en las distintas bodegas a lo largo de un año, siendo M1 el primer muestreo realizado en abril del 2010, M2 el segundo en junio del 2010, M3 el tercero en noviembre del 2010 y M4 el último en marzo del 2011.

De cada una de las botas analizadas se tomó una muestra introduciendo una pipeta estéril por el registro de la misma y se extrajeron unos 10 ml de vino. Como puede observarse en la Figura 1.5B, la flor que se quedaba adherida a las paredes de la pipeta se depositó junto con el vino en un tubo estéril. En ese momento se determinó tanto la cantidad de la flor, como su color y la flotabilidad de la misma sobre la superficie de la muestra de vino en el tubo. Analizando estos parámetros se le atribuyeron a cada muestra de flor, de forma subjetiva, los siguientes caracteres: sin flor, mala, regular, buena y muy buena. Estos datos se encuentran recogidos en la Tabla 1.1. que muestra, como ejemplo, el estado de la flor en la bodega de Alvear en los cuatro muestreos realizados. Los datos correspondientes al resto de las bodegas se han incluido en el Anexo I como Tablas AI.1, 2, 3 y 4. En la Figura 1.5C pueden observarse muestras recién recogidas con velos clasificados como buenos.

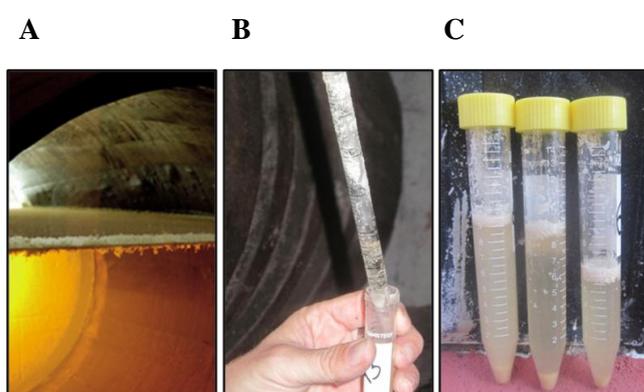


Figura 1.5.- Toma de muestras. **A.** Velo de flor desarrollado en la superficie del vino durante su crianza biológica. **B.** Deposito de una muestra recogida de la bota en un tubo estéril con parte de la flor adherida a la pared de la pipeta. **C.** Muestras de vino procedentes de botas en el momento de la recogida donde pueden observarse velos clasificados como buenos.

ALVEAR	Estado de la flor			
	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	Bueno	N.M	Bueno	Muy bueno
Bota 2	Bueno	Regular	Malo	Regular
Bota 3	Bueno	Sin flor	Sin flor	Sin flor
Bota 4	Malo	Regular	Regular	Regular
Bota 5	Bueno	Bueno	Malo	Bueno
Bota 6	Regular	Regular	Regular	N.M
Bota 7	Regular	N.M	Malo	Bueno
Bota 8	Regular	Regular	Regular	Regular
Bota 9	Regular	Regular	Regular	Bueno

Tabla 1.1.- Estado de la flor en las muestras tomadas de la bodega Alvear en los cuatro muestreos realizados. N.M.: No muestreada.

3.- Análisis de la viabilidad de las levaduras de flor.

Una forma un poco más precisa de medir el estado de la flor en una bota es analizar la viabilidad de las células que la componen. Para ello, una vez en el

laboratorio se determinó la viabilidad de las muestras empleando una tinción con azul de metileno, que nos permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que estas últimas presentan su membrana permeable al mismo y se tiñen de azul. El porcentaje de viabilidad observado en las distintas muestras de cada bodega se muestra en la Figura 1.6 y se recoge en las Tablas AI.5, 6, 7, 8 y 9 del Anexo I. En ellas podemos observar como por lo general las viabilidades más bajas aparecen en el muestreo de junio, mientras las más altas lo hacen en noviembre y marzo. En la bodega Alvear podemos observar un perfil de la gráfica diferente, puesto que en esta bodega en el mes de noviembre sólo tres botas presentan una viabilidad por encima del 5% y la viabilidad más alta se observa en el mes abril.

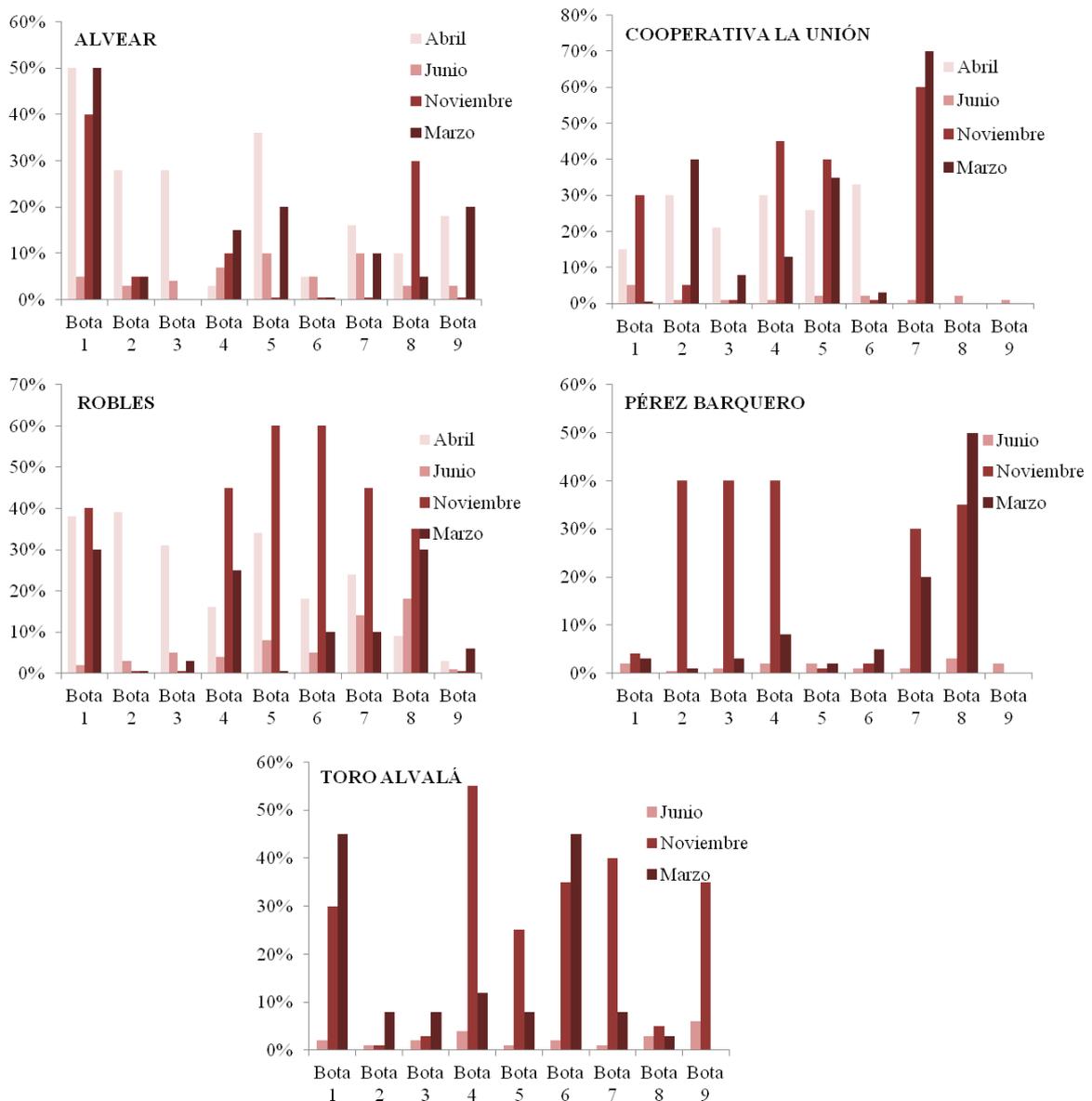


Figura 1.6.- Porcentaje de viabilidad hallado en cada bota, en cada muestreo, según la bodega analizada.

Finalmente, de cada muestra se aislaron colonias en placas de medio rico YPD, y de estas se seleccionaron al azar diez colonias del total de la muestra que se utilizaron para los análisis posteriores.

4.- Estudio de las distintas cepas aisladas mediante el análisis de su huella genética.

Como se ha comentado en la introducción, en los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas que, basadas en la secuencia de ADN de fragmentos concretos del genoma nuclear y mitocondrial, permiten distinguir entre especies de levaduras del género *Saccharomyces*, así como técnicas para diferenciar variedades dentro de una misma especie.

En este trabajo, para diferenciar entre las distintas variedades o cepas de levaduras que constituyen la flor del vino se seleccionaron como técnicas analíticas el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit), el polimorfismo en la longitud de varias regiones de microsatélites, y el cariotipo electroforético (CHEF). El empleo de estas técnicas nos permite identificar diferentes variedades a nivel molecular, con independencia al grupo taxonómico al que pertenezcan, y que a partir de este momento, y a lo largo del trabajo, denominaremos cepas.

4.1.- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial (RFLPmit).

Esta técnica fue aplicada a diez colonias aisladas de cada bota en cada muestreo. Una vez extraído el ADN total, este se digirió con la enzima HinfI (G^AANTC) por ser la que presentó un grado más alto de variabilidad en las digestiones de diferentes levaduras de flor en trabajos previos realizados en otras bodegas (Martínez et al., 1995; Ibeas et al., 1997b). A medida que se fueron analizando las muestras se fueron identificando diferentes patrones de bandas, a los que se les fue asignando un número. Tras analizar todas las muestras, unas 1700, identificamos únicamente cuatro patrones diferentes de RFLPmit. En la Figura 1.7 se muestran estos patrones, y marcadas en rojo, las principales diferencias que presentan los patrones 1, 2 y 4 con respecto al patrón 3. Como se puede observar, el patrón de RFLPmit que presenta más diferencias es el patrón 2 con siete bandas distintas. Los patrones 1 y 4 presentan únicamente dos bandas diferentes cada uno respecto al patrón 3.

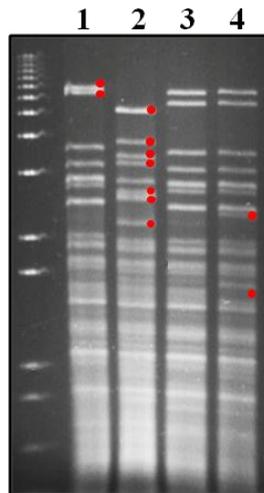


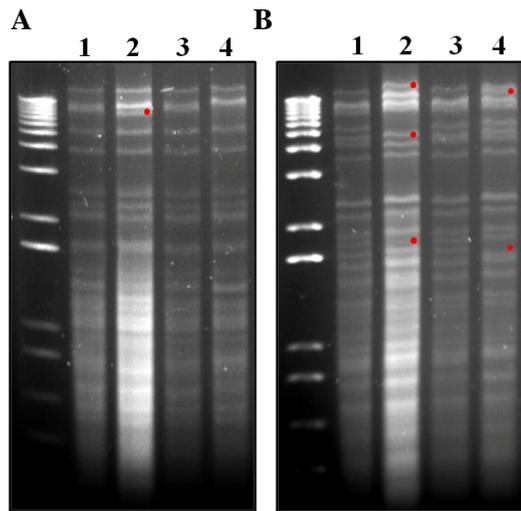
Figura 1.7.- Patrones de bandas obtenidos a partir del análisis de RFLPmit en las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. En rojo aparecen marcadas las principales diferencias que muestran los patrones 1, 2 y 4 con respecto al patrón número 3. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Los porcentajes de cada uno de los patrones obtenidos en los cuatro muestreos, para cada una de las bodegas se recogen en la Tabla 1.2, observándose en ella una imposición en todas las bodegas, excepto en la bodega Alvear, del patrón de RFLPmit denominado como 1.

BODEGAS	Patrón de RFLPmit			
	1	2	3	4
ALVEAR	30,9	69,1		
ROBLES	95		1,8	3,2
COOPERATIVA LA UNIÓN	84,1		15,9	
PÉREZ BARQUERO	99,2		0,8	
TORO ALVALÁ	97,7	0,4	1,9	

Tabla 1.2.- Porcentaje de cada uno de los patrones de RFLPmit obtenidos en las bodegas estudiadas.

Puesto que el patrón de bandas obtenido depende de la presencia o ausencia de una secuencia concreta, reconocida por la enzima de restricción empleada para digerir el ADN, y por tanto, diferentes enzimas de restricción pueden variar el nivel de resolución de esta técnica, realizamos digestiones de 60 cepas que presentaban los patrones de RFLPmit denominados 1, 2, 3 y 4 producidos por la enzima *HinfI*, con las enzimas *AluI* ($AG^{\wedge}CT$) y *RsaI* ($GT^{\wedge}AC$) (Figura 1.8A y 1.8B). En el caso de *AluI* se obtuvieron únicamente dos patrones diferentes mientras que con *RsaI* se obtuvieron tres patrones. Estos datos reafirman el empleo de la enzima *HinfI* para determinar los distintos patrones de los muestreos realizados, ya que es la enzima de restricción que permite detectar mayor variabilidad.



Enzimas		
Hinf I	Alu I	Rsa I
1	1	1
2	2	2
3	1	1
4	1	3

Figura 1.8.- Patrones de bandas obtenidos a partir del análisis de RFLPmit en la cepas ya determinadas como 1, 2, 3 y 4. **A.** Empleando la enzima AluI. **B.** Empleando la enzima RsaI. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). En rojo aparecen marcadas las diferencias observadas entre los distintos patrones.

Tabla 1.3.- Número de patrones obtenidos respecto a los ya descritos para la enzima HinfI.

4.2.- Análisis de microsatélites.

El análisis de microsatélites se ha implantado en los últimos años como una de las técnicas más resolutivas a la hora de determinar el polimorfismo existente dentro de una misma especie. En este trabajo, a cada una de las colonias reaisladas de cada bota en cada muestreo se le determinó el polimorfismo que presentaba respecto a tres regiones de microsatélites con alto grado de polimorfismo entre las levaduras vínicas de la especie *S. cerevisiae*, SC8132X, SCYOR267C y SCPTSY7 (Vaudano and García-Moruno, 2008). Para ello se realizó una PCR múltiple con las tres parejas de oligonucleótidos que amplifican estas regiones de microsatélites. El análisis de todas las muestras tomadas de las diferentes bodegas generó únicamente cuatro patrones diferentes a los que denominamos a, b, c y d (Figura 1.9). Estos patrones comparten algunas bandas de tamaño similar, aunque la mayoría de ellas presentan una movilidad electroforética diferente.

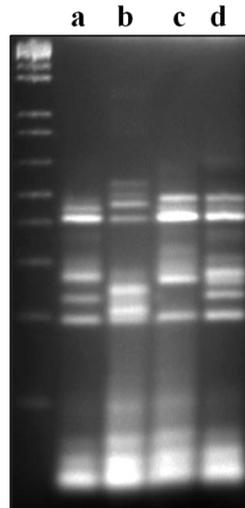


Figura 1.9.- Patrones de bandas obtenidos a partir del análisis del polimorfismo de las regiones de microsatélites SC8132X, SCYOR267C y SCPTSY7 en las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Los porcentajes de cada uno de los patrones obtenidos mediante análisis de microsatélite en los cuatro muestreos, se recogen en la Tabla 1.4, observándose también en este caso el predominio de uno de ellos, el patrón a, en cuatro de las cinco bodegas analizadas.

BODEGAS	Patrón de microsatélite			
	a	b	c	d
ALVEAR	30,3	69,1		0,6
ROBLES	96,7		3,3	
COOPERATIVA LA UNIÓN	85,6			14,4
PÉREZ BARQUERO	96			4
TORO ALVALÁ	98,5	0,4		1,1

Tabla 1.4.- Porcentaje de cada uno de los patrones obtenidos por análisis de microsatélite en las bodegas estudiadas.

El siguiente paso fue establecer la correspondencia entre cada uno de los cuatro patrones obtenidos del análisis de RFLPmit con HinfI (1, 2, 3 y 4), con los cuatro patrones procedentes del estudio del polimorfismo de las regiones de microsatélites ensayadas (a, b, c y d), obteniendo como resultado los datos que se muestran en la Tabla 1.5. Determinamos de esta forma la presencia de cinco cepas diferentes, presentando todas ellas distintas combinaciones entre su patrón de RFLPmit digerido con HinfI, y el

patrón de sus microsatélites. Denominamos a estas cepas como A, B, C, D y E según las distintas combinaciones observadas.

CEPAS	RFLPmit (HinfI)	Microsatélites
A	1	a
B	2	b
C	3	a
D	4	c
E	1	d

Tabla 1.5.- Patrones obtenidos a partir del estudio de RFLPmit y el análisis de microsatélites para cada una de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles.

4.3.- Cariotipado electroforético (CHEF).

Para realizar el cariotipado mediante CHEF, se eligieron 50 aislamientos totales que englobaban muestras de todas las bodegas a las que ya se les había realizado el análisis de RFLPmit y el análisis de microsatélites, y en todas las combinaciones encontradas. A estas cepas se les realizó un cariotipado electroforético obteniendo en ese caso sólo tres patrones diferentes a los que denominamos I, II y III, encontrándose las diferencias entre ellos únicamente en una banda (Figura 1.10). Estos patrones obtenidos fueron asignados a las cepas ya determinadas como puede observarse en la Tabla 1.6.

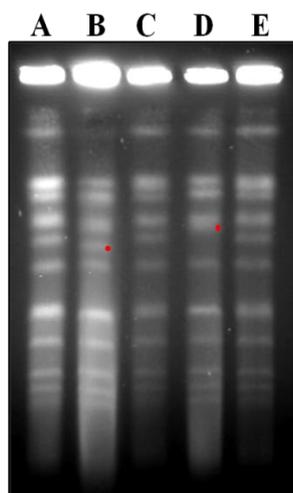


Figura 1.10.- Patrones obtenidos por CHEF de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. En rojo aparecen marcadas las diferencias observadas entre los distintos patrones.

CEPAS	Patrón de CHEF
A	I
B	II
C	I
D	III
E	I

Tabla 1.6.- Relación entre los patrones de CHEF identificados, denominados I, II y III, y las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles.

Cada una de las distintas cepas aisladas, y denominadas como A, B, C, D y E presentaban una combinación específica de patrones obtenidos en los tres análisis

moleculares realizados para el estudio de su huella genética. A continuación se muestra un resumen con los distintos resultados obtenidos para cada una de las cepas (Tabla 1.7), así como todos los patrones identificados de RFLPmit, microsatélites y CHEF (Figura 1.11).

CEPAS	RFLPmit (HinfI)	Microsatélites	CHEF
A	1	a	I
B	2	b	II
C	3	a	I
D	4	c	III
E	1	d	I

Tabla 1.7.- Relación de los distintos patrones obtenidos por RFLPmit, análisis de las regiones de microsatélites SC8132X, SCYOR267C y SCPTS7, y CHEF, con cada una de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles.

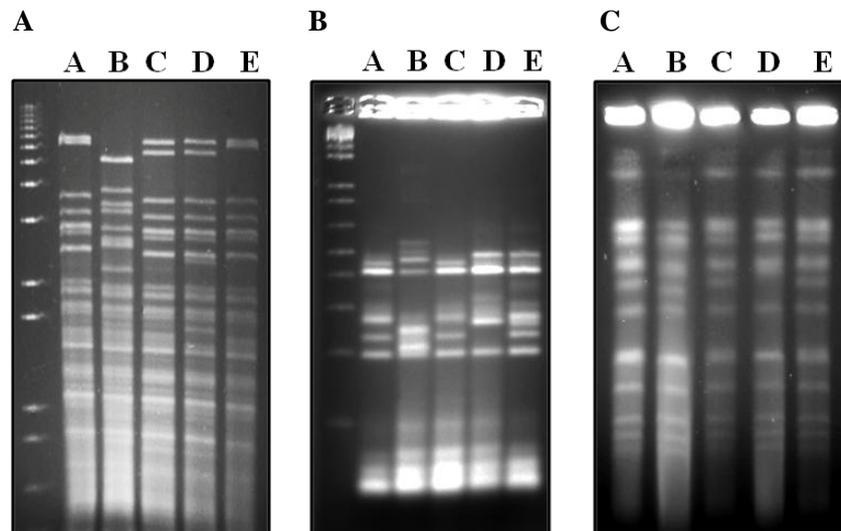


Figura 1.11.- Patrones obtenidos para cada una de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. **A.** RFLPmit. **B.** Microsatélites. **C.** CHEF. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

5.- Distribución de las cepas aisladas por bodegas.

Una vez identificadas las cepas presentes en todas las bodegas analizadas procedimos a elaborar un mapa de distribución de las mismas que se muestra en la Tabla 1.8. En el Anexo I, en las Tablas AI. 10, 11, 12, 13 y 14, se puede ver con más detalle esta distribución en función de los patrones obtenidos, resultado del análisis de microsatélites y RFLPmit.

B O T A S	ROBLES				ALVEAR				COOPERATIVA LA UNIÓN				PÉREZ BARQUERO				TORO ALVALÁ			
	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4	M1	M2	M3	M4
1	A	A	A	A	A	N.M.	B	B	A	A	A	A	N.M.	A	A	A	N.M.	A	A	A
2	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	N.M.	A	A	A	N.M.	A	A	A
3	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A70 E30	A	A	N.M.	A	A90 E10	A	N.M.	A	A	A
4	A	A	A	A	B	A70 B30	A	A	A60 E40	E	A70 E30	A60 E40	N.M.	A	A	A	N.M.	A	A90 B10	A
5	A	N.M.	A	A90 C10	B	B	B90 A10	A	C	A80 E20	C	C80 A20	N.M.	A	A80 C20	A	N.M.	A70 E30	A70 C30	A80 C20
6	A	N.M.	A50 C50	A	B	B60 A40	B	N.M.	C	A70 E30	A50 C50	A	N.M.	A	A	A	N.M.	A	A	A
7	A	D	A	A	B	N.M.	A90 B10	A60 B20 E20	N.M.	E	A	A	N.M.	E70 A30	A	A	N.M.	A	A	A
8	A	A	A	A	A	A	A70 B30	A	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	A	A	A	N.M.	A	A	A
9	A	A	A	A	B	B	B	B	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	A	N.M.	N.M.	N.M.	A	A	N.M.

Tabla 1.8.- Distribución de las cepas A, B, C, D y E, aisladas en las distintas bodegas por botas, según los patrones obtenidos de cada una de ellas en el estudio de RFLPmit y el análisis de microsatélites, en cada uno de los muestreos realizados (M1 es el muestreo realizado en abril del 2010, M2 en junio del 2010, M3 en noviembre del 2010 y M4 en marzo del 2011). Una sola letra indica que el 100% de las muestras corresponden a dicha cepa. (N.M. son botas no muestreadas).

Como se puede comprobar en la tabla anterior, de las cinco cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles, la cepa A es la mayoritaria en cuatro de las cinco bodegas estudiadas, a excepción de la bodega Alvear donde la mayoritaria es la cepa B. El resto de cepas, C, D y E, se encuentran en baja proporción, y por ejemplo la cepa D sólo aparece en una bodega. En la Tabla 1.9 se muestran los porcentajes de cepas aisladas en cada una de las bodegas.

BODEGAS	Cepa A	Cepa B	Cepa C	Cepa D	Cepa E
ROBLES	95.3		1.8	2.9	
ALVEAR	28.2	71.5			0.3
COOPERATIVA LA UNIÓN	79.6		13		7.4
PERÉZ BARQUERO	95.2		0.8		4
TORO ALVALÁ	96.5	1.2	0.8		1.5

Tabla 1.9.- Porcentaje de las cepas aisladas por bodegas.

Agrupando los datos obtenidos en todas las bodegas, podemos concluir que en la D.O. Montilla-Moriles las levaduras responsables de la crianza biológica de sus vinos son en un 79% del tipo A, seguido de un 14% del tipo B y en menor proporción se encuentran los tipos C, D y E (3%, 1% y 3%, respectivamente).

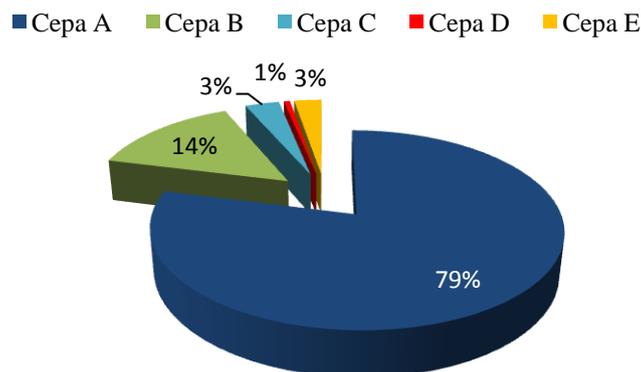


Figura 1.12.- Distribución de las cepas aisladas dentro de la D.O. Montilla-Moriles.

6.- Identificación taxonómica de las cepas aisladas.

Una vez aisladas las distintas cepas de flor en las diferentes bodegas de la D.O. Montilla-Moriles, y con el objetivo de conocer el grupo taxonómico al que pertenecen, aplicamos dos procedimientos diferentes. El primero de ellos basado en las pruebas convencionales de fermentación y asimilación de azúcares, empleado de forma tradicional para identificar a las cepas de flor, y el otro basado en el análisis de la secuencia de un fragmento de ADN que codifica para el ARNr 5.8S y el espaciador interno ITS1.

6.1.- Fermentación y asimilación de azúcares.

Las cepas aisladas se sometieron a pruebas de fermentación y asimilación de distintos azúcares con el fin de situarlas dentro de un grupo taxonómico concreto como describe Iñigo y Vázquez (1964) y Barnett y colaboradores (1990), y se aplica luego en estudios de levadura de flor como el de Ibeas (1996) y Martínez y colaboradores (1995).

Tras tres semanas de crecimiento en medios con los distintos azúcares a fermentar obtuvimos los resultados mostrados en la Tabla 1.10. De las cinco cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles, todas se corresponden con la especie *S. cerevisiae* raza *beticus*, hoy día considerada como sinónimo de *S. cerevisiae*, excepto la cepa B, que se identifica como *S. cerevisiae* raza *montuliensis*, ahora reclasificada como *Toluraspota delbrueckii*.

CEPAS	AZÚCAR A FERMENTAR						GRUPO TAXONÓMICO
	GALACTOSA	GLUCOSA	LACTOSA	MALTOSA	RAFINOSA	SACAROSA	
A	-	+	-	-	+	+	<i>beticus</i>
B	-	+	-	-	-	-	<i>montuliensis</i>
C	-	+	-	-	+	+	<i>beticus</i>
D	-	+	-	-	+	+	<i>beticus</i>
E	-	+	-	-	+	+	<i>beticus</i>

Tabla 1.10.- Patrones de fermentación de azúcares presentados por las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles y grupo taxonómico en el que se engloban en función de ellos, según la nomenclatura clásica.

Para la asimilación de azúcares se realizó un ensayo de crecimiento en gotas, en medios conteniendo diferentes azúcares. Como se puede observar en la Figura 1.13 ninguna de las cepas fue capaz de asimilar los azúcares galactosa, lactosa y maltosa. Sin embargo, los azúcares glucosa, rafinosa y sacarosa fueron asimilados por todas las cepas, en mayor o menor medida.

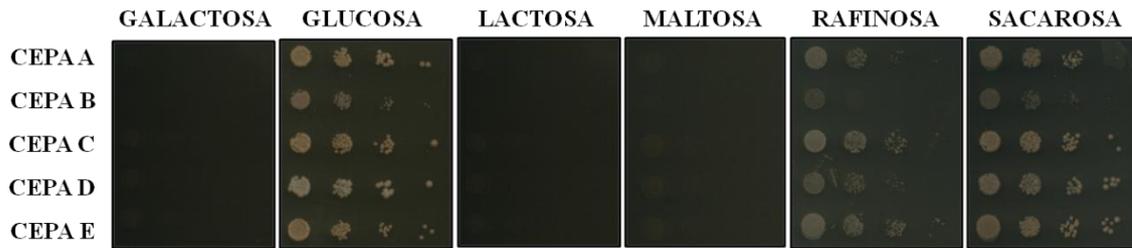


Figura 1.13.- Crecimiento de las distintas cepas aisladas en medios con los azúcares indicados como única fuente de carbono.

Podemos observar el mismo resultado para la asimilación de azúcares que para la fermentación, donde cada una de las cepas fermenta y asimila los mismos azúcares a excepción de la cepa B que, aunque asimila rafinosa y sacarosa, no es capaz de fermentarlas.

6.2.- Análisis del fragmento 5.8S-ITS.

El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la región 5.8S-ITS permite distinguir entre especies de levaduras, e incluso entre cepas de una misma especie (Fernández-Espinar et al., 2000). La aplicación de esta técnica a las levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles muestra que todas ellas presentan un mismo patrón, similar al de otras levaduras de flor aisladas anteriormente en la región de Jerez.

Con el objetivo de profundizar en este estudio procedimos a la secuenciación de este fragmento en las cepas aisladas, y su posterior comparación con una cepa de flor de referencia, CECT 11758. El alineamiento de estas secuencias (Figura 1.14), muestra que son idénticas, observándose en algunos casos diferencias puntuales localizadas en regiones altamente repetitivas, que se consideran irrelevantes por asumirse como errores en la secuenciación de estas zonas complejas (Esteve-Zarzoso, comunicación personal).

```

Cepa A   GNAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
Cepa B   G-AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
Cepa C   G-AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
Cepa D   GNAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
Cepa E   G-AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
CECT 11758 G-AGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGAGTCCAGCCGGGCTGCGCTTAAGT
*
*
*
Cepa A   GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
Cepa B   GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
Cepa C   GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
Cepa D   GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
Cepa E   GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
CECT 11758 GCGCGGTCTTGCTATTCCAACCGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTATAGGACAATTA
*
*
*
Cepa A   AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
Cepa B   AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
Cepa C   AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
Cepa D   AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
Cepa E   AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
CECT 11758 AACCGTTTCAATACAACACACTGTGGAGTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCA
*
*
*
Cepa A   TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
Cepa B   TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
Cepa C   TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
Cepa D   TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
Cepa E   TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
CECT 11758 TTCGAGCAATCGGGCCAGAGGTAACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTT
*
*
*
Cepa A   TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
Cepa B   TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
Cepa C   TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
Cepa D   TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
Cepa E   TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
CECT 11758 TTGTCAAAAACAAGAATTTTCGTAAGTGGAAATTTTAAATATTAATAACTTTCAACAA
*
*
*
Cepa A   CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
Cepa B   CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
Cepa C   CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
Cepa D   CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
Cepa E   CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
CECT 11758 CCGATCTCTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGACGCAATGCGATACGTAATGTGAAT
*
*
*
Cepa A   TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
Cepa B   TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
Cepa C   TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
Cepa D   TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
Cepa E   TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
CECT 11758 TGCAGAAATCCGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATCCAGG
*
*
*
Cepa A   GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
Cepa B   GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
Cepa C   GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
Cepa D   GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
Cepa E   GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
CECT 11758 GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCTCTCAAACATTTCTGTTGGTAGTGAGTGATAC
*
*
*
Cepa A   TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATG--TTTTTTTTTTTTTCC
Cepa B   TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATG--TTTTTTTTTTTTTCC
Cepa C   TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATG--TTTTTTTTTTTTTCC
Cepa D   TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTTTTTCC
Cepa E   TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTTTTTTTCC
CECT 11758 TCTTTGGAGTTAACTTGAATTTGCTGGCCTTTTCATTGGATG--TTTTTTTTTTTTTCC
*
*
*
Cepa A   AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
Cepa B   AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
Cepa C   AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
Cepa D   AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
Cepa E   AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
CECT 11758 AAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTAGGTTTTAC
*
*
*
Cepa A   CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
Cepa B   CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
Cepa C   CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
Cepa D   CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
Cepa E   CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
CECT 11758 CAACTGCGGCTAATCTTTTTTATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGC
*
*
*

```

Figura 1.14.- Alineamiento de la secuencia del fragmento 5.8S-ITS de las cepas A, B, C, D y E, con la secuencia del 5.8S-ITS de la levadura de flor CECT 11758.

En el análisis de distintas cepas de flor, Fernández-Espinar y colaboradores (2000) describen la existencia de una deleción específica de 24 pb, entre los nucleótidos 131 y 154, dentro del ITS1. El análisis de las secuencias de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles muestra que dichas cepas también poseen esta deleción (Figura 1.15). Así, siguiendo la nomenclatura establecida por Esteve-Zarzoso y colaboradores (2004), consideramos que las cinco cepas aisladas en esta Denominación de Origen pertenecen al grupo ‘levaduras de flor’ de la especie *S. cerevisiae*.

```

Cepa A      GCTTAAGTGCGCGGTCTT-----GCTATTCCAAACGGTGAG
Cepa B      GCTTAAGTGCGCGGTCTT-----GCTATTCCAAACGGTGAG
Cepa C      GCTTAAGTGCGCGGTCTT-----GCTATTCCAAACGGTGAG
Cepa D      GCTTAAGTGCGCGGTCTT-----GCTATTCCAAACGGTGAG
Cepa E      GCTTAAGTGCGCGGTCTT-----GCTATTCCAAACGGTGAG
CBS2247     GCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAG
CBS5635     GCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAG
CBS459      GCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATTCCAAACGGTGAG
CBS1171T    GCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGCTATCCAAACGGTGAG
    
```

Figura 1.15.- Alineamiento de la región que comprende la deleción de 24 pb en las levaduras de flor. Las cepas A, B, C, D y E son las aisladas en la D.O. Montilla-Moriles y el resto son cepas no formadoras de flor empleadas como referentes en Esteve-Zarzoso et al., (2004).

Discusión

El objetivo principal de este capítulo ha sido el de conocer las poblaciones de levaduras responsables del envejecimiento biológico de los vinos Finos de la D.O. Montilla-Moriles. Tras un exhaustivo estudio de cinco de las bodegas que integran esta Denominación de Origen: Alvear, Robles, Cooperativa La Unión, Pérez Barquero y Toro Alvalá, determinamos que existen cinco cepas diferentes, basándonos en el polimorfismo de su ADN mitocondrial, el de regiones de microsatélites y el análisis molecular de su cariotipo. A estas cinco cepas las hemos denominado A, B, C, D y E. La presencia de patrones de RFLPmit, microsatélites y CHEF compartidos entre ellas, indica que estas cepas podrían estar relacionadas, posiblemente con orígenes comunes.

La mayor parte de las cepas de flor aisladas hasta el momento se han clasificado en cuatro grupos taxonómicos: dos razas *beticus* y *cheresiensis* pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, actualmente consideradas como sinónimos de la especie *S. cerevisiae* (Kurtzman et al., 2011); otra raza anteriormente denominada como *S. cerevisiae montuliensis* que recientemente ha sido reclasificada como *Torulaspora delbrueckii* (Kurtzman et al., 2011; Alexandre, 2013), y una última raza antaño denominada como *S. cerevisiae rouxii*, ahora *Zygosaccharomyces rouxii* (Kreger-van Rij 1984; Barnett 1992; Kurtzman and Fell, 1998). Esta clasificación estaba basada en estudios morfológicos y metabólicos de fermentación y asimilación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que diferencian estas cuatro razas principales (Iñigo and Vázquez, 1964; Barnett et al., 1990). Los estudios de asimilación y fermentación de ciertos azúcares que hemos llevado a cabo en este trabajo agrupan a las cinco cepas identificadas dentro de los grupos taxonómicos *beticus* (cepas A, C, D y E) y *montuliensis* (cepa B) (Martínez et al., 1995; Ibeas, 1996). Ambos grupos no se encuentran equilibrados en esta denominación de origen, sino que es la raza *beticus* la dominante integrando el velo de flor en un 86%, y en una minoría del 14% se encontraría la raza *montuliensis*. Otros autores, a través del análisis de patrones moleculares de la flora de bodegas enmarcadas dentro de la D.O. Jerez, identifican una raza dominante integrando el velo de flor como en nuestro caso, encontrándose otras razas en minoría (Ibeas et al., 1997b; Esteve-Zarzoso et al., 2001). Concretamente el trabajo desarrollado por Ibeas y colaboradores (1997) en diferentes bodegas de la empresa Osborne, puso de manifiesto el predominio en estas bodegas de la raza *beticus* en un 80%. En este caso, existían cinco cepas, MY138, MY91, C5, C7 y CU2 dentro de este grupo taxonómico. Al comparar los patrones de las cinco cepas aisladas en nuestro estudio con las diferentes cepas aisladas en el trabajo de Ibeas y colaboradores (1997), MY138, ET7, MY91, C5, C7, CU2 y LA6, hemos podido comprobar que la cepa mayoritaria MY138, presenta los mismos patrones de bandas obtenidos en el análisis RFLPmit y en el análisis de microsatélite que la cepa A aislada en Montilla-Moriles (Figura 1.16 y 1.17, respectivamente). Esto podría indicar que independientemente de la distribución geográfica, y con ello de las condiciones ambientales y de los vinos, ambas cepas poseen las características necesarias para imponerse al resto. Cabría pensar que estas cepas fueron importadas a la zona de Montilla-Moriles desde Jerez por los enólogos que se trasladaron allí o que hayan surgido en ambas Denominaciones de Origen y se han impuesto por su carácter competitivo. La segunda cepa más abundante

en la D.O. Montilla-Moriles es la cepa B clasificada como *montuliensis*. Esta cepa comparte el mismo patrón de RFLPmit que las cepas ET7 y LA6 caracterizadas como *montuliensis* en la D.O. Jerez (Ibeas, 1996) (Figura 1.16), sin embargo, estas últimas difieren en cuanto al patrón obtenido en el análisis de microsatélite, tanto entre ellas como con respecto a la cepa B. Podemos pensar por tanto que esta mitocondria debe tener un papel importante para que se haya conservado en dos zonas geográficamente separadas. En ambas Denominaciones de Origen existen otras cepas aisladas que se encuentran en menor proporción con respecto a las mayoritarias, que difieren entre ellas, y que en ambos casos no deben presentar características competitivas porque no logran imponerse en ninguna circunstancia.

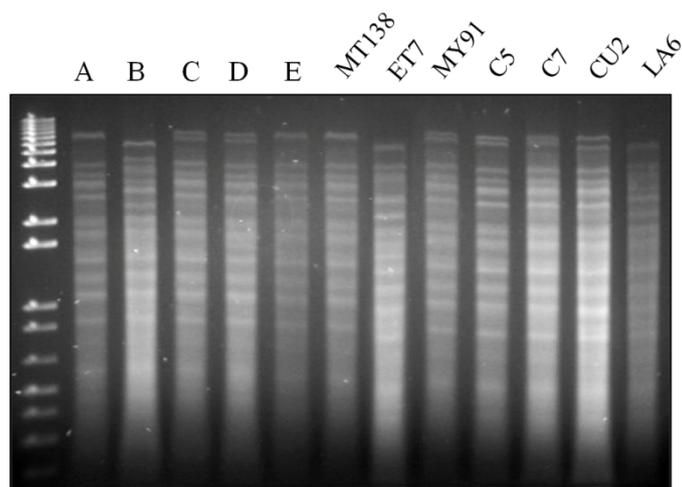


Figura 1.16.- Patrones de RFLPmit obtenidos para las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a los patrones de las cepas aisladas en bodegas de la empresa Osborne por Ibeas et al., 1997. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder*.

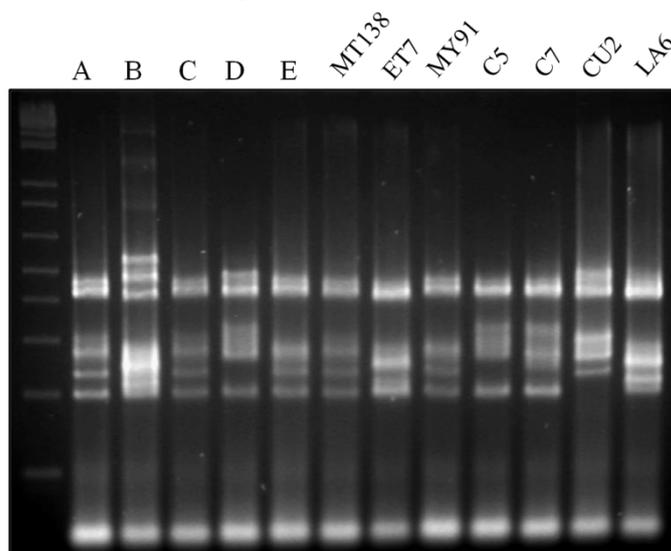


Figura 1.17.- Patrones de microsatélites obtenidos para las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a los patrones de las cepas aisladas en bodegas de la empresa Osborne por Ibeas et al., 1997. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

El análisis molecular de la región 5.8S-ITS de las cepas aisladas en esta región muestra que las cinco cepas identificadas poseen la misma secuencia de nucleótidos en el dominio D1/D2 que la cepa de referencia empleada, y que todas ellas presentan también la delación del fragmento de 24 pb que Estévez-Zarzoso y colaboradores (2004) emplean para situar a estas levaduras dentro del grupo denominado ‘levadura de flor’ perteneciente a la especie *S. cerevisiae*. Aún a sabiendas de esto, para mantener una coherencia con trabajos previos, y puesto que como veremos más adelante, se observan diferencias entre ellas en características de interés enológico, mantendremos la nomenclatura previa, en la que estos cuatro grupos eran considerados razas dentro de la especie *S. cerevisiae*, y emplearemos la nomenclatura de cepas para las distintas levaduras aisladas en este trabajo.

El análisis de la distribución de las distintas cepas muestra que, en cuatro de las cinco bodegas analizadas, la cepa predominante es la cepa A, a excepción de la bodega Alvear donde predomina la cepa B. Ambas cepas suponen en cada bodega un porcentaje que oscila entre los 70-97% de las cepas identificadas, encontrándose el resto de cepas aisladas en proporciones que oscilan entre 0.3-13%. En su conjunto, la cepa que predomina en la D.O. Montilla-Moriles según el total de bodegas analizadas es la cepa A, perteneciente a la raza *beticus*, con un 79%.

Uno de los objetivos paralelos de este trabajo fue el de realizar el seguimiento a las distintas botas seleccionadas de cada bodega, para detectar posibles desplazamientos estacionales de las levaduras. Para ello se realizaron cuatro muestreos, tratando de cubrir las cuatro estaciones, en los meses de abril, junio, noviembre y marzo. Por regla general, observamos a lo largo de los muestreos una prevalencia de la cepa predominante en cada bota. Sin embargo, en 9 botas de las 45 analizadas, la cepa mayoritaria cambia de un muestreo al siguiente (Tabla 1.8), aunque sin ninguna relación aparente entre el mes de muestreo y las cepas predominantes en las botas. Hay que destacar en ese sentido la presencia de las cepas minoritarias C, D y E. Las cepas D y E aparecen como cultivos puros o dominantes en determinadas botas sólo en el muestreo de junio. Por el contrario, la cepa C aparece en determinadas botas en todos los muestreos excepto en junio. De especial relevancia es la bota 5 en las bodegas Cooperativa La Unión y Toro-Alvalá, en las que esta levadura domina, o está presente en todos los muestreos, excepto en el de junio, lo que podría indicar una mayor sensibilidad de esta cepa a la temperatura.

Con respecto a la viabilidad hallada en cada una de las botas en los diferentes muestreos, podemos observar como el perfil de la gráfica obtenido para la bodega Alvear es diferente al resto (Figura 1.6). Mientras que en el resto de bodegas la viabilidad más alta, llegando a valores del 60%, se observa en el mes de noviembre de forma generalizada, en el caso de la bodega Alvear las viabilidades más altas se registran en marzo y abril, siendo las viabilidades del mes de noviembre en la mayoría de las botas inferior al 5%. Sólo en tres botas dentro de la bodega Alvear observamos mayor viabilidad en noviembre, lo que consideraríamos un comportamiento tipo para el resto de bodegas, en las que la cepa predominante es la A. De estas tres botas dos de

ellas presentan como cepa mayoritaria la cepa A, por lo que podría establecerse una relación entre el predominio de la cepa A con las viabilidades mayores en los meses de noviembre, atribuida a las temperaturas registradas, o a otros condicionantes que puedan suceder en dicho mes en la bodega. Un dato que comparten todas las bodegas, independientemente a la cepa mayoritaria que presenten, es el registro de las viabilidades más bajas en junio, lo cual viene acompañado de un estado denominado ‘regular’ de la flor, probablemente debido a las altas temperaturas registradas, que ocasionan el deterioro de la flor (Ibeas et al., 1997a).

Autores como Mesa y colaboradores (2000), encontraron una correlación entre cepas con patrones específicos y escalas de envejecimiento, aislando algunas cepas sólo en soleras y otras sólo en las primeras criaderas. En tres de las bodegas estudiadas en este trabajo se han analizado botas pertenecientes a distintas escalas de envejecimiento con el objetivo de determinar el efecto de la vejez del vino en la cepa presente. Es el caso de las bodegas Alvear, Robles y Toro Alvalá. En las dos últimas, la cepa predominante es la cepa A, y parece no existir ninguna correlación entre las cepas aisladas en ellas y las escalas de envejecimiento, ya que las cepas B, C y E, aparecen en baja proporción indistintamente de la escala. En la bodega Robles aparece además una bota de solera que sólo en un muestreo presenta exclusivamente la cepa D. Esta cepa no ha vuelto a aparecer en ningún muestreo en el resto de botas ni de bodegas.

En la bodega Alvear, donde la cepa predominante es la B, podríamos establecer un patrón de distribución respecto a la disposición de la bota puesto que en las botas de soleras de esta bodega es donde únicamente se ha encontrado la cepa A como cepa mayoritaria, con un par de botas como excepción. Este hallazgo es opuesto a lo descrito por Martínez et al., (1997c) quienes correlacionan cepas y escalas atribuyendo *beticus* a las escalas más jóvenes, ya que es más rápida formando velo, y *montuliensis* a las más envejecidas, por presentar la capacidad de producir y tolerar más acetaldehído. En la bodega Alvear la raza *montuliensis* (cepa B) se localiza tanto en soleras como en primera y segundas criaderas, mientras que raza *beticus* mayoritariamente en soleras, a excepción de dos botas de primera y segunda criadera donde aparece en un porcentaje de 10% y 40%, respectivamente. Una posible causa para la localización de la cepa A en solera, podría ser la existencia de un desplazamiento de esta cepa por parte de la cepa B, o que, en esta región, la cepa A esté mejor adaptada al crecimiento en vinos más envejecidos que la cepa B.

Con respecto a la variabilidad de cepas en las botas analizadas en cada bodega, podríamos decir que es la bodega Toro Alvalá la que presenta mayor variabilidad, hallando cuatro cepas diferentes en todo el muestreo de la bodega, mientras que en el resto de bodegas sólo aparecen tres cepas diferentes en cada una de ellas. De las bodegas que presentan tres cepas distintas, estas sólo son mayoritarias en botas independientes en la bodega Cooperativa La Unión. En esta bodega sólo se muestrearon botas de solera, por lo que no podemos establecer ninguna relación entre las cepas identificadas y las escalas a las que pertenecen. En cuanto a la distribución de cepas dentro de una misma bota, hay que mencionar que un 12% aproximadamente de las

muestras analizadas están formadas por cultivos mixtos de dos levaduras diferentes, estando en todos los casos presentes la cepa A.

La bodega Robles, única productora de Fino ecológico, nos ha permitido realizar una comparativa entre las levaduras presentes en ese vino frente a un vino de elaboración convencional. Los resultados obtenidos muestran que la cepa predominante es la cepa A, tanto en unos como en otros, aunque sólo en los vinos ecológicos se ha detectado la presencia de las cepas C y D, que por su escasa representación en estos vinos, y su aparición en otras bodegas con elaboración convencional, no consideramos relacionadas con el sistema de producción.

Finalmente, con respecto a la temperatura, factor determinante en el estado de la flor por su efecto combinado con el etanol (Ibeas et al., 1997a; Ibeas and Jiménez, 1997), comentar que la existencia de dos bodegas, Robles y Toro Alvalá, excavadas en el suelo, y con temperaturas que oscilan entre los 20 y 22°C a lo largo de todo el año, no ha revelado la presencia de cepas mayoritarias diferentes al resto de las bodegas estudiadas.

Capítulo II:

Caracterización de las levaduras de flor aisladas en la D.O. Montilla-Moriles

Introducción

Aunque desde el punto de vista sistemático, y empleando el análisis de la secuencia del fragmento 5.8S-ITS, todas las levaduras de flor son iguales, y constituyen un único grupo dentro de la especie *S. cerevisiae*, su comportamiento durante la fase de envejecimiento de los vinos Finos no lo es. Ya se han mencionado trabajos en los que se demostraba que cepas aisladas en la D.O. Jerez, se comportaban de forma diferente cuando se analizaban distintos parámetros fisiológicos y enológicos (Martínez et al., 1995; Ibeas, 1996). Es por ello, que en este capítulo procederemos a la caracterización de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles, atendiendo a diferentes parámetros de interés para los productores de vino Fino, con el fin de seleccionar las mejores cepas para la producción de estos vinos y tratar de realizar mejoras en dichas cepas.

1.- Ciclo de vida de la levadura *Saccharomyces*.

En la naturaleza habitualmente encontramos a las levaduras del género *Saccharomyces* como organismos unicelulares, generalmente diploides, que se dividen asexualmente por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, a continuación tiene lugar la división del núcleo, se completa la pared entre ambas y por último se separan las dos células. Este ciclo asexual ocurre tanto en cultivos de células haploides como diploides o aneuploides (Figura 2.1). Durante la fase sexual, y generalmente ante condiciones adversas, las células de una levadura diploide generan ascas con cuatro esporas haploides resultantes de la meiosis como estructura de resistencia. Estas esporas pueden presentar dos tipos sexuales α o a , que vienen determinados por su genotipo en el locus MAT (*mating-type*), situado en el cromosoma III. Las dos formas de este locus, MAT a y MAT α , difieren en la secuencia nucleotídica, el tamaño y en los genes que incluyen (Metzenberg and Glass, 1990). Las esporas al germinar pueden tener un crecimiento vegetativo por reproducción asexual y mantenerse en este ciclo hasta que, mediante apareamiento con otra célula haploide del tipo opuesto, se forme un cigoto diploide.

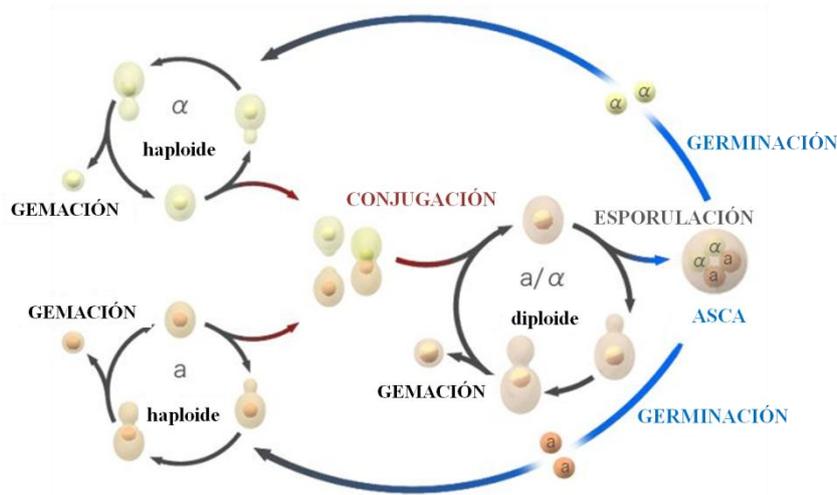


Figura 2.1.- Ciclo de vida de *Saccharomyces*.

Las levaduras vínicas son predominantemente homotálicas, de manera que tras la esporulación se produce una división mitótica en la que la célula hija puede cambiar

de sexo y conjugar con una célula de sexo contrario, formando una célula diploide que es homocigota para todos los genes, excepto para el locus MAT (autodiploidización) (Thornton and Eschenbruch, 1976). En el caso de las levaduras de flor, estas muestran una gran heterogeneidad en su ciclo de vida. En un 10% de los casos se ha visto que su ciclo de vida es heterotálico, necesitando la unión de dos células de sexo opuesto para efectuar la reproducción sexual (Mortimer et al., 1994), y se ha sugerido también, en menor proporción, un tercer ciclo de vida semi-homotálico en el que dos de las esporas resultantes de la meiosis son de sexo α , y las otras dos son incapaces de conjugar (Pirino et al., 2004; Budroni et al., 2005; Carrascosa et al., 2011).

2.- Características genéticas de las levaduras de flor.

Los primeros trabajos acerca de las características genéticas que presentan las cepas vínicas encargadas de la maduración del vino, fueron realizados en Montilla-Moriles a finales del siglo XX (Sancho et al., 1986). En estos trabajos se aislaron y caracterizaron cepas durante la fermentación y el envejecimiento biológico, hallando únicamente distintas razas de *S. cerevisiae*, y observando un fuerte aislamiento sexual entre dichas razas, cuyo fin podría ser el evitar la distribución al azar de las características metabólicas seleccionadas naturalmente. Este comportamiento se ha observado también entre otras cepas vínicas de fermentación (Jiménez and Benítez, 1988). Según Puig y colaboradores (2000), la variabilidad genética descrita en las cepas vínicas se asocia a fenómenos de recombinación mitótica, reparación y conversión génica ocurridos durante el crecimiento, y no al resultado de esporulación y recombinación meiótica. Estudios realizados sobre las levaduras de flor en la D.O. Jerez confirman esta hipótesis al demostrar que la mayor parte de las ellas no esporulan o lo hacen pobremente, y los productos meióticos son, a menudo inviables (Martínez et al., 1995; Ibeas, 1996).

En cuanto al contenido de ADN, el genoma de *S. cerevisiae* es relativamente pequeño, con poco ADN repetitivo y genes mayoritariamente sin intrones. Una cepa haploide contiene aproximadamente 12-13 mb de ADN nuclear, distribuidos en 16 cromosomas que varían en tamaños desde 250 a 2000 kb (Pretorius, 2000). Sin embargo, el número de bandas observadas en los cariotipos electroforéticos mediante CHEF, varía de 14 para cepas de laboratorio a más de 20 en cepas industriales, debido tanto a diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos, como a la presencia de reordenaciones y aneuploidías (Codón et al., 1998).

Con respecto a su dotación cromosómica, las cepas industriales son generalmente diploides o aneuploides, y ocasionalmente poliploides (Codón and Benitez, 1995; Guijo et al., 1997). La presencia de dichas aneuploidías o poliploidías puede otorgar ciertas ventajas adaptativas en ambientes muy variables, o puede ser una forma de incrementar la dosis génica de algunos genes importantes para la fermentación (Bakalinsky and Snow, 1990) y también la causa de los problemas detectados para completar el ciclo sexual. Como ejemplo de esto, Guijo y colaboradores en 1997 analizaron la estructura cromosómica de varias cepas vínicas de fermentación y

maduración de vino de Montilla-Moriles (Tabla 2.1), destacando entre las aneuploidías halladas un alto grado de polisomía para el cromosoma XIII, en el que se localizan los genes de la alcohol y acetaldehído deshidrogenasas, fundamentales en la producción y consumo de etanol y acetaldehído (Torcotte et al., 2010).

Cromosoma	Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
	F-12	F-21	F-23	F-25	G-1	E-1
I	2	2	2	3	3	4
II	2	2	2	4	3	2
III	2	2	2	2	2	2
IV	2	2	2	3	3	2
V	2	2 ó 3	2	3	3	2
VI	2	2	2	4	3	4
VII	2 ó 3	2 ó 4	2 ó 3	4	2	2
VIII	2	2	2	3	3	2
IX	2	2	2	3	3	2
X	2	2	2	3	2	2
XI	2	2	2	3 ó 4	3	2
XII	2	2	2	4	3	2
XIII	4	3	3	4	4	4 ó más
XIV	2	2	2	4	3	2
XV	2	2	3	4	3	2
XVI	2	2	2	4	2	2

Tabla 2.1.- Número de copias de cada cromosoma en cepas de *S. cerevisiae* aisladas de velo (F,G) o durante la última fase de la fermentación (E). (Guijo et al., 1997).

Estas diferencias en el número de cromosomas se han asociado a translocaciones cromosómicas debidas a recombinaciones homólogas, tanto asimétricas como ectópicas, entre secuencias de elementos Ty, δ o Y' que originan cepas mejor adaptadas a condiciones industriales específicas (Benítez et al., 1996; Rachidi et al., 1999;). Estas variaciones pueden tener lugar como consecuencia de la hostilidad del medio en el que se encuentran (Infante et al., 2003).

En el caso de las cepas de flor se ha comprobado que no sólo presentan una enorme variabilidad en el número de cromosomas nucleares, sino también en el tamaño de los mismos, y por tanto en el contenido total de ADN, oscilando éste desde 1.3 hasta casi 3.0 n (Martínez, 1995; Ibeas, 1996). Las levaduras de flor mantienen un patrón cromosómico similar entre las distintas razas, que a su vez difiere del patrón que presentan otras levaduras industriales como las panaderas o cerveceras (Martínez et al., 1995; Benítez et al., 1996).

Además del ADN cromosómico, *S. cerevisiae* posee varios elementos genéticos extracromosómicos como un plásmido de ADN de 2 μ m localizado en el núcleo,

partículas de ARN parecidas a virus (VLP, *Virus Like Particles*) y elementos semejantes a priones en el citoplasma y en la mitocondria (Pretorius, 2000). Su ADN mitocondrial es una molécula circular de 75 kb, rica en A+T, que presenta grandes regiones intergénicas e intrones autocatalíticos. En el ADN mitocondrial de las levaduras de flor se observa una enorme variabilidad, más incluso que la observada a partir de los patrones cromosómicos (Martínez et al., 1995; Ibeas et al., 1997b). Esta alta variabilidad parece ser el resultado de la mutagenicidad provocada por las altas concentraciones de etanol, así como de acetaldehído, en las que se encuentran estas levaduras (Ibeas and Jiménez, 1997; Castrejon et al., 2002). Pero dada la necesidad de conservar mitocondrias funcionales, para llevar a cabo el metabolismo oxidativo, en estas levaduras existe una presión por la cual cualquier cambio que dé lugar a genomios mitocondriales no funcionales es eliminado. Ibeas y Jiménez (1997) han descrito que el mecanismo de esta mutagenicidad del etanol es la pérdida del ADN mitocondrial, basándose en que el etanol es un solvente de membranas que facilitaría dicha lesión.

Las VLP codifican para proteínas que confieren a las levaduras que las poseen la capacidad de producir una toxina, denominada killer, y un factor autoinmune frente a la misma. La actividad killer es típica de levaduras que realizan la fermentación espontánea de los mostos, constituyendo uno de los mecanismos clave del desplazamiento de levaduras en dicho proceso (Pérez et al., 2001). En función de esta propiedad las levaduras pueden clasificarse en tres fenotipos distintos: killer, sensibles y neutras. Las levaduras de fenotipo killer sintetizan y excretan al medio una toxina (factor killer) que es letal para las células sensibles. Las levaduras con fenotipo neutro no la sintetizan pero son resistentes a su acción, mientras que las levaduras de fenotipo sensible no sintetizan la toxina ni son resistentes a la misma, por lo que son destruidas por las cepas killer. Este factor podría ser responsable de los desplazamientos poblacionales ocurridos en el velo de flor dentro de las distintas bodegas analizadas, puesto que la presencia de cepas killer podría desplazar a cepas sensibles (Mesa et al, 1999).

Las condiciones ambientales que soportan las levaduras industriales favorecen la selección de genomios estables, al menos, mitóticamente (Querol and Bond, 2009). Del mismo modo, estas condiciones ambientales también han fijado una serie de características fisiológicas particulares en las cepas, resultado de la presión selectiva a la que ha sido sometido su material genético.

El empleo de microarrays ha permitido comparar el genomio de células de levaduras de velo de flor y de laboratorio, detectando diferencias gen a gen. De esta forma se han podido identificar aneuploidías, amplificaciones o deleciones, en parte responsables de la variabilidad genética encontrada y de las propiedades enológicas que presenta este tipo de levaduras (Infante et al., 2003; Hu et al., 2007). En otros trabajos se ha empleado por ejemplo esta técnica para analizar genes implicados en síntesis de aromas de distintas especies vnicas (Gamero et al., 2014). También recientemente se ha publicado un trabajo de análisis proteómico y metabolómico que relaciona los compuestos propios de estos vinos con proteínas producidas únicamente en estas

condiciones, comparando el crecimiento de una levadura de flor en mosto sintético frente a la misma levadura formando flor en un vino joven (Moreno-García et al., 2014).

3.- Características metabólicas de las levaduras de flor.

Después del proceso de fermentación, las levaduras se encuentran en un medio rico en alcohol, con un pH bajo, una cantidad escasa de oxígeno disuelto y una concentración mínima de azúcar. Las levaduras de flor presentes en el vino deben adaptarse a esta nueva situación, por lo que pasan a obtener energía a través de fuentes de carbono alternativas presentes en el vino. Estas fuentes de carbono alternativas son exclusivamente respirables, y es esta necesidad de oxígeno la que hace que las levaduras se adapten a las nuevas exigencias nutricionales, manteniéndose en la superficie del vino, donde el oxígeno está disponible, y formando el denominado velo de flor (Jiménez y Benítez, 1988).

Las levaduras de flor presentan por tanto un patrón de crecimiento diauxico ya que realizan una primera fase de respiración anaeróbica, durante la cual hay un incremento de la expresión del gen *FLO11* y de la hidrofobicidad celular (Zara et al., 2005), y luego las células se agregan, atrapan las burbujas de CO₂ y alcanzan la superficie del vino donde el oxígeno está disponible, cambiando entonces a un metabolismo oxidativo (Martínez et al., 1997a). En este metabolismo oxidativo, las levaduras utilizan fuentes de carbono respirables como el etanol, el glicerol o el acetato de etilo, y para ello es esencial la presencia de la mitocondria (Martínez et al., 1997b; Fidalgo et al., 2006). La expresión de los genes mitocondriales que llevan a cabo la respiración depende de la presencia de oxígeno (Schuller, 2003), de ahí la importancia de que la levadura se mantenga en la superficie del vino, en contacto con el oxígeno presente en la atmósfera de la bota, y de que esta no se encuentre completamente llena de vino.

En estas circunstancias, la principal fuente de energía para la célula es el etanol, que es transformado en acetaldehído a través de la enzima alcohol deshidrogenasa (Del Carmen Plata et al., 1998). Este último resulta tóxico para la célula por lo que parte se expulsa al medio y otra parte es oxidado a acetato, y seguidamente transformado a acetyl-CoA, que entra en el ciclo del glioxilato para formar ácido succínico, o es incorporado a la mitocondria e introducido en el ciclo de Krebs. En función de la fuente de carbono no fermentable disponible, se activará la transcripción de genes específicos para la incorporación y transformación de dichos compuestos, así como enzimas implicadas en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria. A partir de las nuevas fuentes de carbono alternativas se produce por tanto ATP en la mitocondria y se regeneran los azúcares fosfato mediante la gluconeogénesis, reduciendo la concentración de etanol, ácido acético, etil acetato, glicerol, aminoácidos y ácidos orgánicos y paralelamente incrementando la concentración de acetaldehído, alcoholes superiores, acetoina y 2,3-butanodiol (Mauricio and Ortega, 1993; Blandino et al., 1997; Charpentier et al., 2000; Peinado and Mauricio, 2009).

Una vez formado el velo de flor, este evita el contacto del vino con el oxígeno de la atmósfera de la bota y esto, junto con el consumo por parte de la levadura de flor del oxígeno disuelto, hace que el vino se mantenga en estado reducido. La combinación de ambas acciones provoca además la transformación de sustancias presentes en el vino, originando la aparición del aroma y el sabor característico de estos vinos (Mauricio et al., 1997).

Aunque todas las cepas de flor se consideren iguales, se ha demostrado que existen diferencias metabólicas entre las diferentes levaduras de flor. La tradicionalmente llamada *S. montuliensis* (reclasificada como *T. delbrueckii*) y *S. rouxii* (reclasificada como *Z. rouxii*) consumen más etanol y además producen mayor cantidad de acetaldehído (Martínez et al., 1995,1997c; Ibeas, 1996). Incluso dentro de una misma raza, algunas cepas son mucho más eficientes que otras. También se han atribuido a diferencias metabólicas, como la sensibilidad a diferentes compuestos, entre ellos el acetaldehído, las diferencias fisiológicas encontradas en las razas que dominan en distintas bodegas en el velo de flor (Estévez-Zarzoso et al., 2004).

Vamos a analizar ahora algunas de las propiedades de las levaduras identificadas en la D.O. Montilla-Moriles.

Resultados

Con el objetivo de conocer las propiedades de las distintas levaduras aisladas en este trabajo, procedimos a realizar un estudio que comprende el análisis de las características microbiológicas, enológicas, celulares y genéticas de las mismas.

1.- Caracterización microbiológica.

1.1.- Tiempo de generación.

Una característica importante a la hora de seleccionar una levadura para su empleo en una bodega es su capacidad de crecimiento. Para comenzar este estudio, se determinó el crecimiento que presentan las distintas cepas de flor aisladas en la D.O. Montilla-Moriles en medio rico de laboratorio (YPD), a tres temperaturas diferentes, 20, 25 y 28°C. A partir de estas medidas se calculó el tiempo de generación para cada cepa en cada temperatura. En la Figura 2.2. se observan las curvas de crecimiento, para las distintas cepas a una temperatura de 28°C y en la Tabla 2.2 el tiempo de generación calculado en las mismas condiciones. Los tiempos de generación obtenidos para las temperaturas de 20 y 25°C se pueden consultar en la Tabla AI.15 y AI.16 del Anexo I, respectivamente.

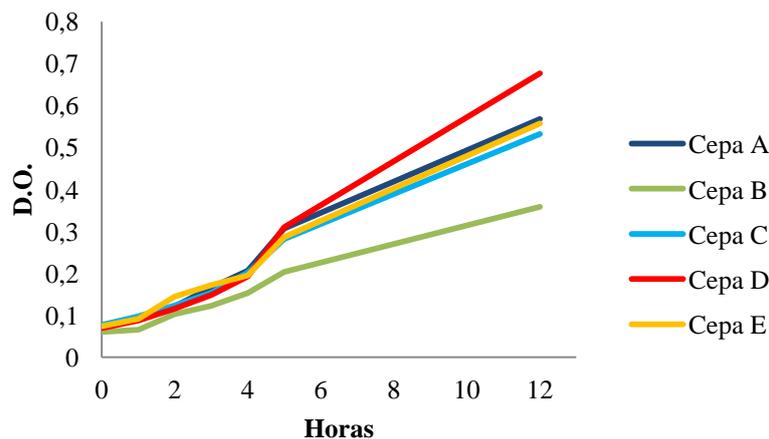


Figura 2.2.- Curvas de crecimiento de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en medio YPD a 28°C.

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	2:24:00	0:10:49
Cepa B	2:44:24	0:06:22
Cepa C	2:31:48	0:05:59
Cepa D	2:10:12	0:05:39
Cepa E	2:25:12	0:19:11

Tabla 2.2.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPD a 28°C.

De los datos obtenidos para las cepas creciendo en YPD a 28°C, podemos destacar que la cepa B es la más lenta creciendo con un tiempo de generación cercano a 3 h, seguida de las cepas A, C y E que rondan las 2,5 h de tiempo de generación y la cepa D que sería la más rápida con un tiempo de generación de tan solo 2 h, aproximadamente. Los resultados obtenidos a 20 y 25°C son similares a lo que ocurre a 28°C, por tanto concluimos que la cepa B es la más lenta creciendo y la cepa D mantiene un tiempo de generación reducido y constante, independientemente de las temperaturas ensayadas.

Posteriormente, decidimos analizar el comportamiento de estas levaduras en medio conteniendo alcohol. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento en medio rico conteniendo 5 o 10% v/v de etanol como única fuente de carbono. En este caso, las curvas se realizaron a una única temperatura de 28°C. Los resultados obtenidos muestran que a 5% v/v de etanol la cepa E es la que mejor crece, mientras que la más lenta es la cepa B, existiendo entre ellas una diferencia de cuatro veces en la DO final (Figura 2.3). Analizando los tiempos de generación de estas levaduras, comprobamos que existe una coincidencia entre la velocidad de crecimiento y la DO final alcanzada por cada una de ellas (Tabla 2.3).

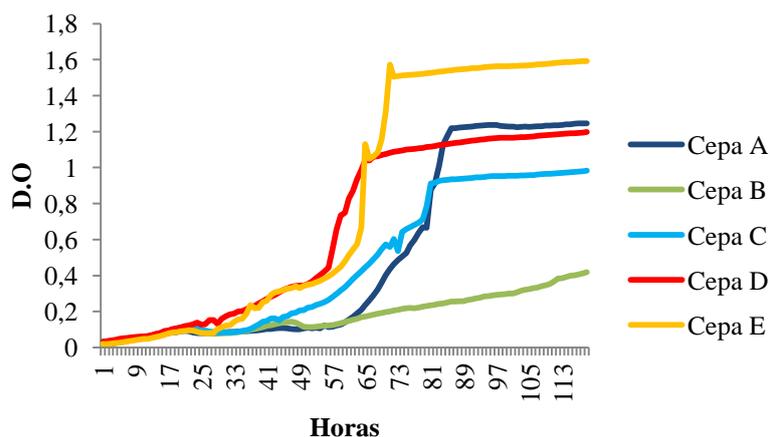


Figura 2.3.- Curvas de crecimiento de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPE5% a 28°C.

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	12:11:31	1:53:02
Cepa B	66:22:19	1:57:21
Cepa C	21:35:24	2:43:37
Cepa D	8:34:26	1:02:52
Cepa E	8:26:42	0:31:51

Tabla 2.3.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPD5% v/v de etanol a 28°C.

Con respecto a los resultados obtenidos para las cepas aisladas creciendo en medio rico conteniendo 10% v/v de etanol como única fuente de carbono (Figura 2.4), observamos como las cepas A y E presentan el mejor crecimiento, mientras que el peor crecimiento en este caso lo muestra la cepa D. Observando los tiempos de generación hallados en estas condiciones (Tabla 2.4), vemos como las cepas más rápidas, la cepa A y E, rondan tiempos de generación de 8 h, mientras que la cepa más lenta en este caso, la cepa D, presenta un tiempo de generación cercano a las 48 h.

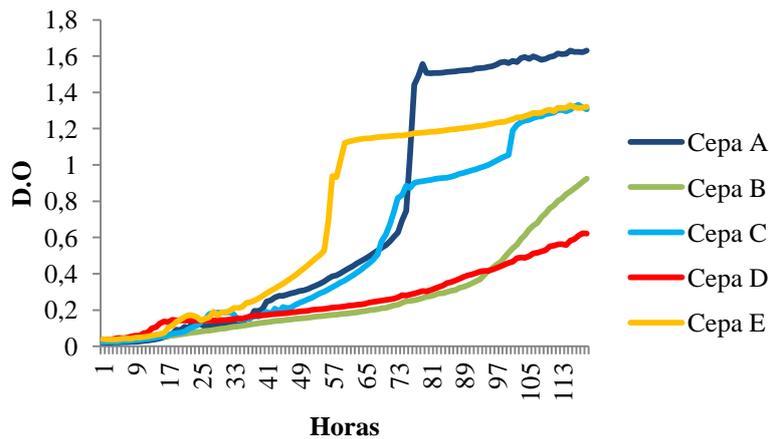


Figura 2.4.- Curvas de crecimiento de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPE 10% a 28°C.

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	8:11:52	0:05:45
Cepa B	26:25:33	2:13:33
Cepa C	9:57:14	0:12:10
Cepa D	47:49:48	0:43:40
Cepa E	8:26:24	0:58:51

Tabla 2.4.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPD10% v/v de etanol a 28°C.

Se asume que el origen de las levaduras de flor está, junto con el de las cepas fermentadoras, en la uva. De hecho, una vez completada la fermentación de los mostos, tanto antes como después del encabezado, se observa la formación de un velo sobre los vinos que permanecen almacenados en depósitos, probablemente constituidos por levaduras de flor, cuya resistencia al alcohol es mucho mayor que la de las cepas responsables de la fermentación. Con el objetivo de determinar la capacidad de proliferar durante la fermentación en un mosto de uva, se analizó el crecimiento de las diferentes levaduras de flor aisladas en mosto sintético a 28°C. Los resultados obtenidos muestran que la cepa A es la que crece más rápido en mosto sintético, seguida de la

cepa C y E. Las cepas de más lento crecimiento en este medio serían la cepa B y D, por lo que serían las menos competitivas en la fase fermentación (Figura 2.5). Si observamos los tiempos de generación hallados para estas condiciones de crecimiento (Tabla 2.5), vemos como las cepas A, C y E rondan las 4,5 h mientras que las cepas B y D presentan tiempos de generación mayores, de hasta el doble en el caso de la cepa B.

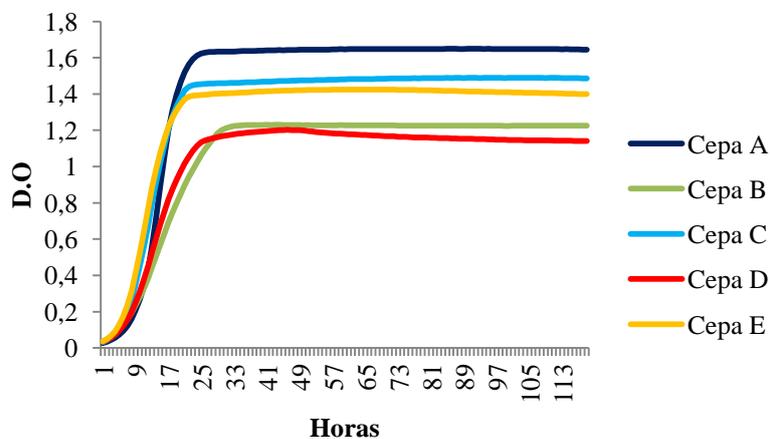


Figura 2.5.- Cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en mosto sintético a 28°C y tabla con los tiempos de generación hallados en estas condiciones.

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	5:06:10	0:05:42
Cepa B	9:07:15	0:09:32
Cepa C	4:30:07	0:17:56
Cepa D	6:43:22	0:12:10
Cepa E	4:28:44	0:11:31

Tabla 2.5.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en mosto sintético a 28°C.

1.2.- Velocidad de formación de flor.

Una vez conocida la capacidad de crecimiento en diferentes condiciones, procedimos a analizar otro parámetro, quizás de los más importantes para estas levaduras, que es la capacidad de formación de flor. Con el objetivo de abarcar las diferentes condiciones que se producen en la bodega a lo largo del año y durante el proceso de envejecimiento, como consecuencia de las variaciones en la temperatura así como en las concentraciones de alcohol, se analizó la velocidad de formación de flor en vino a tres temperaturas diferentes, 20, 22.5 y 25°C, y en cada una de ellas a 14, 14.5, 15 y 15.5% v/v de alcohol.

En la Tabla 2.6 se pueden observar los datos recogidos para la formación de flor de las cinco cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles a la temperatura de 22.5°C. En ella vemos como la cepa D siempre es la más rápida formando flor y la cepa C es la más lenta, quedando las cepas A, B y E en una situación intermedia. El incremento en la concentración de alcohol provoca en tres de ellas, las cepas B, C y D, un retraso en la formación de flor de entorno a tres días, mientras que las cepas A y E mantienen la misma velocidad de formación de flor, independientemente de la concentración de alcohol. Los datos obtenidos para las temperaturas de 20 y 25°C pueden consultarse en las Tabla AI.17 y AI.18 del Anexo I, respectivamente.

		Día 0	Día 3	Día 4	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11	Día 13	Día 14	Día 17	
Grado alcohólico (v/v)	14%	Cepa A	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
		Cepa B	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
		Cepa C	0	3	3	3	3	3	3	4	5	5
		Cepa D	0	3	3	4	5	5	5	5	5	5
		Cepa E	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	14.5%	Cepa A	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
		Cepa B	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
		Cepa C	0	3	3	3	3	3	3	4	4	5
		Cepa D	0	3	3	4	5	5	5	5	5	5
		Cepa E	0	3	3	4	4	4	4	5	5	5
	15%	Cepa A	0	2	3	4	4	4	5	5	5	5
		Cepa B	0	2	2	4	4	4	4	5	5	5
		Cepa C	0	2	2	3	3	3	3	4	4	5
		Cepa D	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
		Cepa E	0	2	2	4	3	4	5	5	5	5
	15.5%	Cepa A	0	2	2	4	4	5	5	5	5	5
		Cepa B	0	2	2	4	4	4	4	5	5	5
		Cepa C	0	0	1	3	3	3	3	4	4	5
		Cepa D	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
		Cepa E	0	2	2	4	3	4	5	5	5	5

Tabla 2.6.- Velocidad de formación de flor obtenida por las cepas aisladas en D.O. Montilla-Moriles a 22.5°C a 14, 14.5, 15 y 15.5% v/v de alcohol (A, B, C y D, respectivamente). (0 vino sin flor, 1 islotes pequeños, 2 islotes/casi cubierto, 3 velo fino, 4 velo bueno y 5 velo muy bueno/rugoso).

La Tabla 2.6. resume los datos de los tres experimentos, y nos permite comparar, no sólo las distintas cepas en las mismas condiciones, sino también cada cepa en distintas condiciones. Podemos ver en ella que la cepa más lenta en formar el velo de flor es la cepa C, mientras que la más rápida es la cepa D, independientemente de la concentración de alcohol empleada.

			Temperatura		
			20°C	22.5°C	25°C
Grado alcohólico (v/v)	14%	Cepa A	13	10	7
		Cepa B	17	11	10
		Cepa C	17	14	14
		Cepa D	11	7	11
		Cepa E	13	10	11
	14.5%	Cepa A	13	10	7
		Cepa B	17	11	10
		Cepa C	14	17	14
		Cepa D	11	7	10
		Cepa E	13	13	11
	15%	Cepa A	13	11	10
		Cepa B	17	16	10
		Cepa C	14	17	14
		Cepa D	11	10	11
		Cepa E	14	11	10
	15.5%	Cepa A	13	10	10
		Cepa B	17	13	13
		Cepa C	17	17	14
		Cepa D	11	10	10
		Cepa E	14	11	10

Tabla 2.7.- Días a los que el velo de las diferentes cepas ensayadas adquiere el carácter de bueno/rugoso, considerando todas las temperaturas y grados alcohólicos ensayados.

Analizando los datos de formación de flor en su conjunto observamos que a medida que aumenta la temperatura todas las cepas alcanzan antes el estado de velo óptimo, mientras que el incremento en la concentración de alcohol suele provocar un retraso. Observamos también que la cepa más lenta a 20°C, es la cepa B, mientras que a temperaturas superiores es la cepa C. Las cepas más rápidas son por lo general la cepa D a baja temperatura y la cepa A a las temperaturas más altas.

1.3.- Análisis de producción y resistencia/sensibilidad de factor killer.

Como se ha comentado anteriormente, el factor killer puede afectar la relación entre levaduras coexistentes en un medio. Por este motivo estudiamos el comportamiento de las levaduras aisladas durante la fase de crianza biológica respecto a este carácter, con el objetivo de determinar su posible papel en la distribución de las mismas en las bodegas analizadas. Para ello analizamos su capacidad de producción, así como su resistencia o sensibilidad a los dos factores killer más estudiados en levaduras

vínicas, K_1 y K_2 . Los resultados obtenidos para la producción, y resistencia/sensibilidad a este carácter se muestran en la Tabla 2.8 y en la Figura 2.6

	K_1		K_2	
	PRODUCCIÓN	RES/SEN	PRODUCCIÓN	RES/SEN
Cepa A	NP	S	NP	R
Cepa B	NP	R	NP	S
Cepa C	NP	S	NP	R
Cepa D	NP	S	NP	R
Cepa E	NP	S	NP	R

Tabla 2.8.- Análisis de producción y resistencia/sensibilidad de factores killer realizado a las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. NP: No productora. S: sensible. R: resistente.

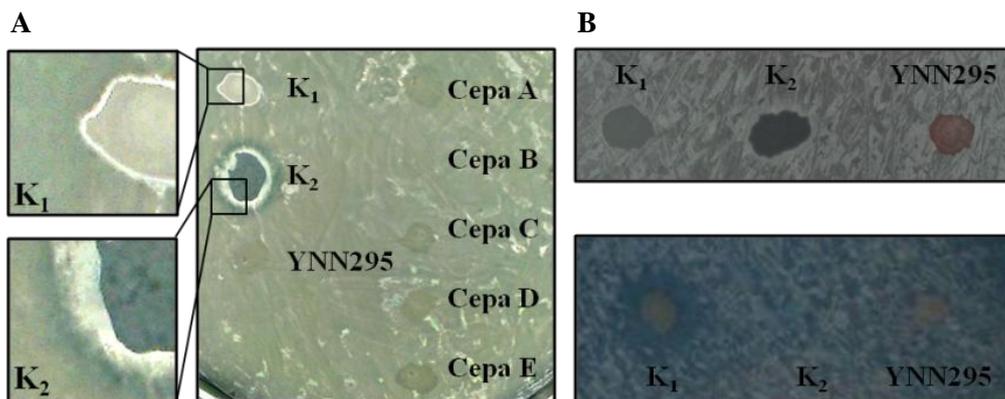


Figura 2.6.- Análisis de producción y resistencia/sensibilidad al factor killer. **A.** Producción de factores killer por parte de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles. **B.** Análisis de resistencia/sensibilidad de las mismas cepas a los factores K_1 y K_2 . Como ejemplo se muestra el césped de la cepa B sensible a la toxina K_2 (arriba) y el césped de la cepa A sensible a la toxina K_1 (abajo).

Como se puede observar tanto en la Figura 2.6 como en la Tabla 2.8, ninguna de las cepas analizadas es productora de toxina killer. En cuanto a la sensibilidad/resistencia, todas las cepas son sensibles a la toxina K_1 a excepción de la cepa B que sería neutra por ser resistente aunque no la produce. Sin embargo, para el factor K_2 todas de las cepas son neutras a excepción de la cepa B que en este caso es sensible.

1.4.- Ensayos de competencia entre levaduras de flor.

Con el objetivo de tratar de determinar las razones por las que en la mayoría de las bodegas se impone la cepa A, excepto en la bodega Alvear, en la que la cepa predominante es la cepa B, diseñamos experimentos de competencia entre las levaduras identificadas en dichas bodegas. Para ello, se prepararon vinos con diferentes concentraciones de alcohol que se inocularon con proporciones diferentes de las levaduras a competir, y se incubaron a diferentes temperaturas. Posteriormente se tomaron muestras a tiempo 0, 40, 80 y 130 días, aproximadamente, que se analizaron mediante RFLPmit y microsatélite para determinar la levadura presente en los mismos. La Tabla 2.9 muestra las condiciones analizadas, las cepas inoculadas y los resultados finales del experimento. En las Tablas AI.19, AI.20 y AI.21 del Anexo I se pueden observar los resultados obtenidos en cada ensayo de competencia realizado.

El primer experimento de competencia con las cepas presentes en la bodega Alvear, cepas A y B, se llevó a cabo en condiciones de baja concentración de alcohol (14% v/v) y baja temperatura (20°C). Los resultados obtenidos muestran una imposición de la cepa B en todas las muestras analizadas, independientemente de la proporción de inóculo inicial de cada cepa. A continuación se repitió el experimento aumentando la concentración de alcohol a 15 y 15.5% v/v, con temperaturas de 20 y 22.5°C respectivamente, manteniendo las proporciones de los inóculos empleados. En ambos casos se observó una imposición de la cepa A en todas las muestras analizadas.

En el caso de las cepas presentes en la bodega Robles, las competencias se realizaron con las cepas A, C y D, enfrentándolas por pares, de forma similar al experimento realizado con las cepas presentes en la bodega Alvear. En este caso las condiciones empleadas fueron 15 y 15.5% v/v de alcohol, con temperaturas de 20 y 22.5°C respectivamente. Estas competencias mostraron que en todos los casos en los que se encontraba la cepa D en el inóculo, esta se imponía, independientemente de su concentración inicial, de la concentración de alcohol y de la temperatura empleada. En el caso de la competencia entre A y C sólo se formó flor, y pudo ser analizada en el experimento con 15% v/v de alcohol y 20°C, en el que fue la cepa C la que se impuso en todas las muestras. Podemos concluir que en este experimento la levadura D es la más competitiva, aunque sólo aparece en una bota en un muestreo.

BODEGA	PORCENTAJES DE LAS CEPAS A COMPETIR		14% de alcohol 20°C	15% de alcohol 20°C	15,5% de alcohol 22.5°C
ALVEAR	A/B	75%/25%	N.F.	Cepa A	Cepa A
		50%/50%	Cepa B	Cepa A	Cepa A
		25%/75%	Cepa B	Cepa A	Cepa A
ROBLES	A/C	75%/25%		Cepa C	N.F.
		50%/50%		Cepa C	N.F.
		25%/75%		Cepa C	N.F.
	A/D	75%/25%		Cepa D	Cepa D
		50%/50%		Cepa D	Cepa D
		25%/75%		Cepa D	Cepa D
C/D	75%/25%		Cepa D	Cepa D	
	50%/50%		Cepa D	Cepa D	
	25%/75%		Cepa D	Cepa D	

Tabla 2.9.- Resultado de los ensayos de competencias realizados entre las cepas aisladas en la bodega Alvear (A/B) y en la bodega Robles (A/C, A/D y D/C). N.F.: No formaron flor (Color gris indica competencia no realizada en esas condiciones).

2.- Caracterización enológica. Crianza biológica.

Una vez identificadas las diferentes cepas de levaduras de flor en las bodegas estudiadas, y sabiendo que en trabajos previos realizados con levaduras de flor aisladas en la D.O. Jerez, la evolución de los vinos durante el envejecimiento varía en función de la cepa empleada (Martínez et al., 1998; Ibeas et al., 1997b), realizamos experimentos de crianza biológica empleando cultivos puros de tres de las cepas aisladas. Para ello se inocularon cultivos puros de la cepa A, B y D, cada uno en garrafas de 16 litros. Estas garrafas se mantuvieron en una habitación a una temperatura constante de 20°C y se fue observando la formación del velo de flor. Las garrafas que contenían la cepa A no habían formado velo a los 79 días por lo que este se le trasplantó desde matraces con velo ya formado. Dos de las garrafas que contenían las cepas B también tuvieron que ser trasplantadas con velo formado por la misma cepa en otra garrafa. A los 120 días se tomó la primera muestra, y tras ella una muestra cada mes durante seis meses, aproximadamente. En estas muestras se analizaron varios parámetros de interés enológicos cuyos resultados se muestran en las Tablas AI.23, AI.24 y AI.25 del Anexo I. A continuación se muestra el análisis de los dos parámetros más importantes, la concentración de alcohol y de acetaldehído (Figura 2.13).

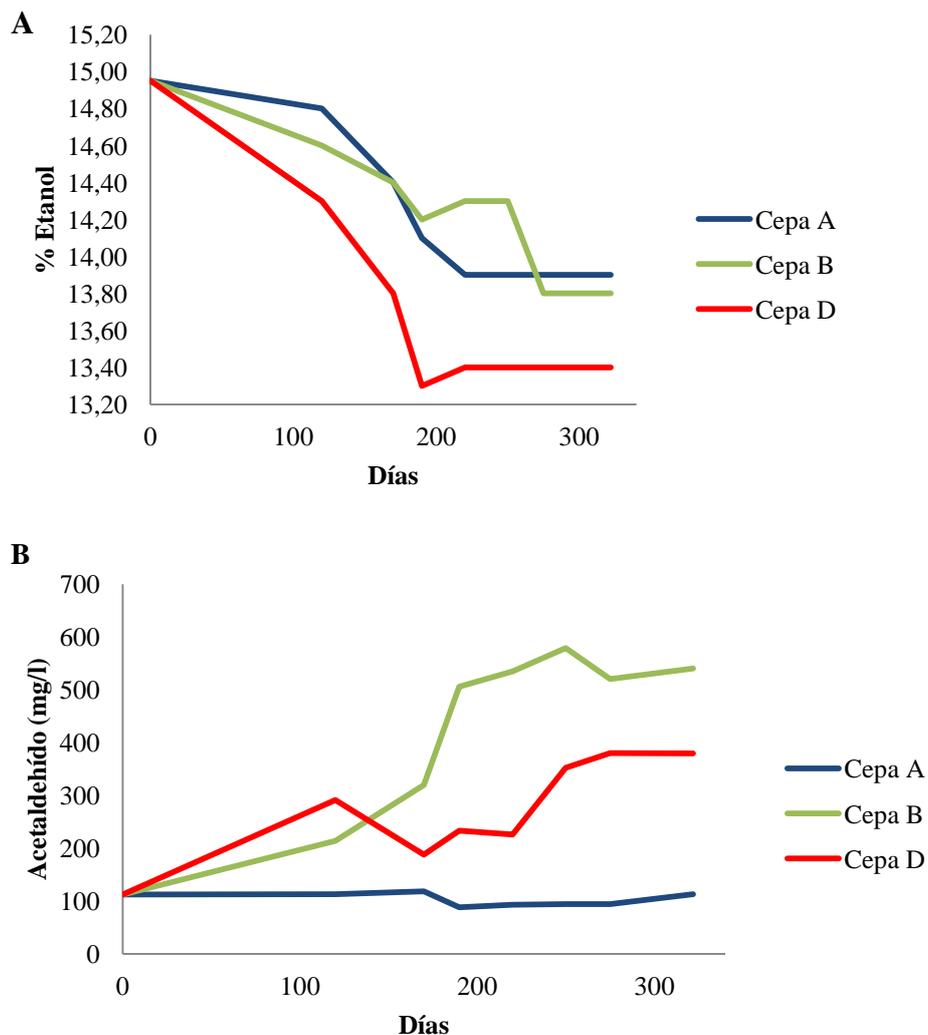


Figura 2.13.- Análisis de las garrafas mantenidas en el laboratorio a lo largo del tiempo para las cepas A, B y D. **A.** Porcentaje de alcohol medio (v/v). **B.** Cantidad de acetaldehído en mg/l.

En términos generales, se observa que las tres cepas tienen un consumo de alcohol similar, mientras que muestran grandes diferencias en la producción de acetaldehído. Concretamente, la cepa B que corresponde a la tradicionalmente denominada *S. montuliensis* llega a producir hasta seis veces más que la cepa A, que se corresponde con *S. beticus*, de acuerdo con lo observado en trabajos anteriores con cepas de flor (Martínez et al., 1998; Ibeas et al., 1997b).

De forma paralela se realizó el mismo experimento en bodega, donde las condiciones son menos controladas, mas reales, y de nuevo con de las cepas A, B y D. En este caso la primera muestra se tomo a los 40 días, ya que en ese momento el velo de flor estaba completamente desarrollado en los tres casos. A partir de ahí, se tomaron cinco muestras durante 200 días, tiempo en el que se analizaron de nuevo parámetros de interés enológico cuyos resultados se muestran en las Tablas AI.25, AI.26 y AI.27 del Anexo I. Los resultados obtenidos para el alcohol y el acetaldehído se muestran en la Figura 2.14.

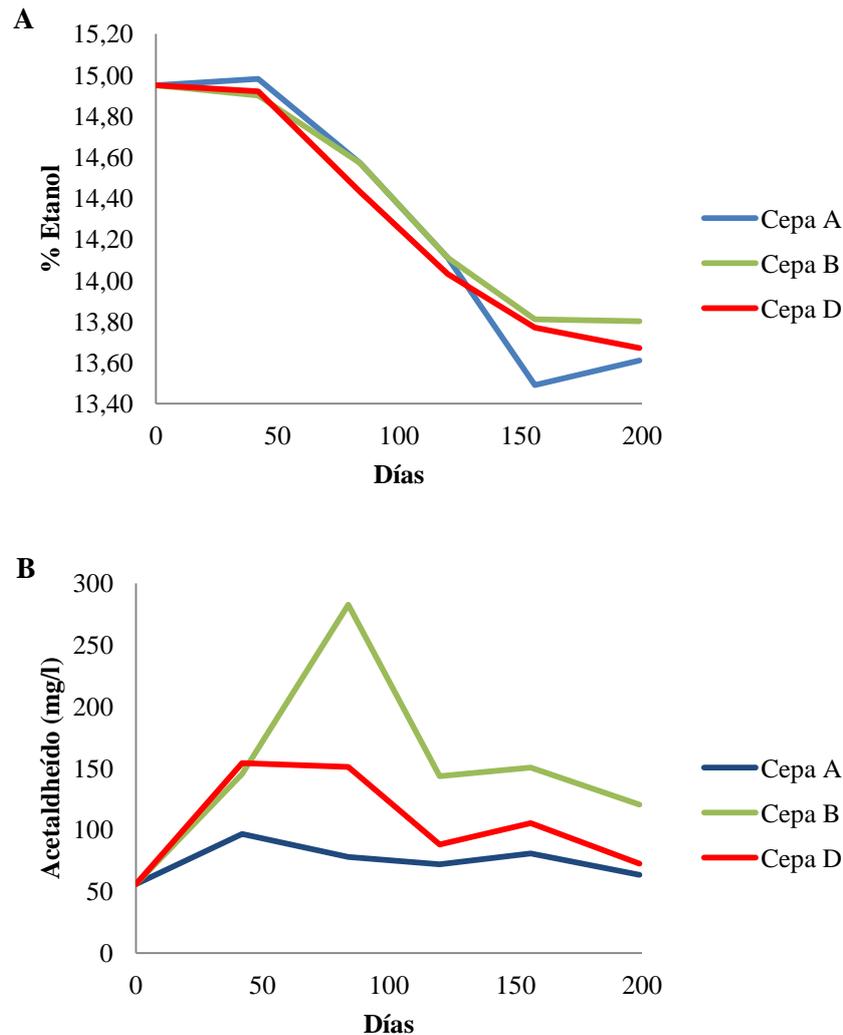


Figura 2.14.- Análisis de las garrafas mantenidas en bodega a lo largo del tiempo para las cepas A, B y D. **A.** Porcentaje de alcohol medio (v/v). **B.** Cantidad de acetaldehído en mg/l.

En este experimento, obtenemos resultados similares, aunque las concentraciones de acetaldehído no han llegado a ser tan elevadas, y han sufrido una caída a partir de los cien días del inicio del experimento. En términos generales, de nuevo la cepa B es la mayor productora de acetaldehído y la cepa A, la menor. El análisis del consumo de glicerina generó resultados similares a los obtenidos para el etanol.

3.- Caracterización celular.

3.1.- Contenido de ADN.

Para determinar el contenido de ADN por célula de cada una de las cinco cepas aisladas, se llevó a cabo un estudio mediante citometría de flujo de cultivos puros de cada una de ellas, tomando como referencia una cepa haploide de laboratorio. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 2.7 y la Tabla 2.10.

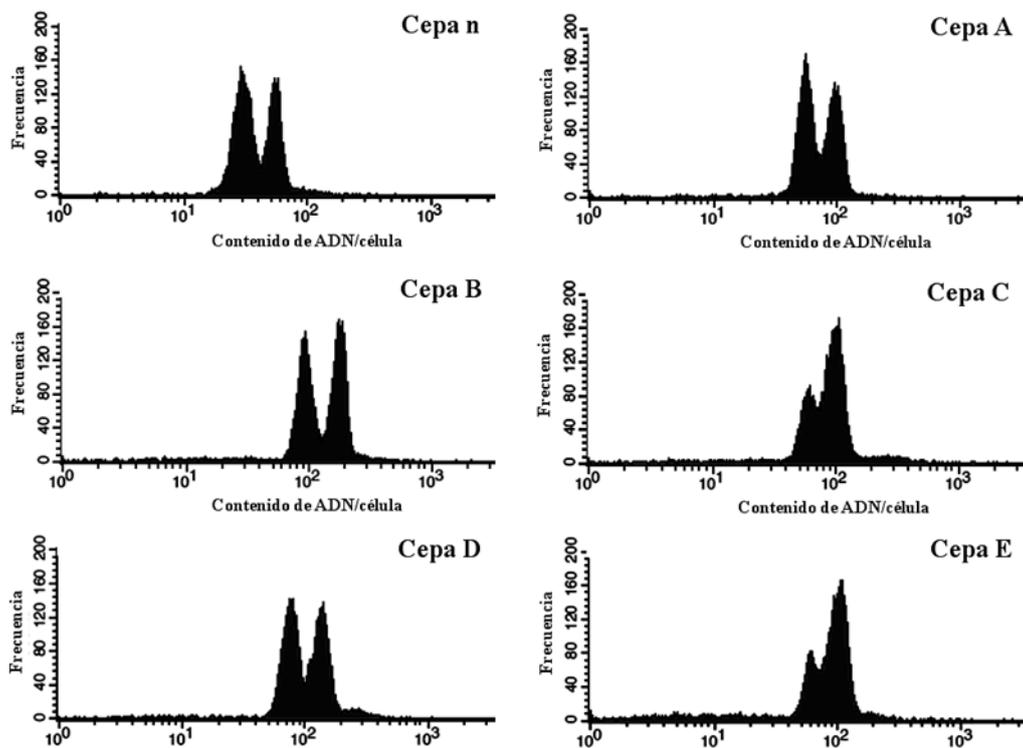


Figura 2.7.- Citometría de flujo que refleja el contenido de ADN de las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a la cepa control haploide.

CEPA	PLOIDÍA
KA-5A	1
A	1,8
B	3
C	2
D	2,5
E	2

Tabla 2.10.- Contenido de ADN de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles respecto a la cepa haploide control KA-5A.

Puede observarse cómo todas las cepas presentan un contenido de ADN cercano al diploide a excepción de la cepa B que presenta un contenido de ADN de 3n.

3.2.-Hidrofobicidad celular.

La elevada expresión del gen *FLO11* detectada en las levaduras de flor provoca que éstas sean altamente hidrofóbicas, hecho que les proporciona un beneficio a la hora de agregarse para formar el biofilm (Zara et al., 2005; Barrales et al., 2008). El análisis de las cinco cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles, muestra que todas ellas son bastantes hidrofóbicas en comparación con una cepa de laboratorio no formadora de flor, en este caso la cepa YNN295 (Figura 2.8). Como control positivo, y referencia a

datos anteriores obtenidos en nuestro laboratorio, se empleó la cepa 133d, cepa haploide, formadora de flor, derivada del cruce de una cepa de flor con una de laboratorio (Ibeas, 1996; Fidalgo et al., 2006; Barrales et al., 2008). Entre ellas, podemos destacar que aunque todas presentan alta hidrofobicidad, las cepas D y E son ligeramente menos hidrofóbicas que el resto.

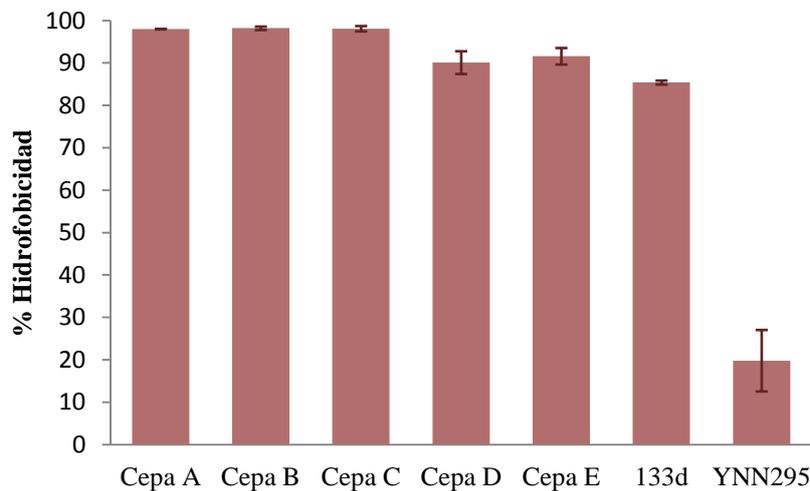


Figura 2.8.- Porcentaje de hidrofobicidad que presentan las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a dos cepas de laboratorio, 133d formadora de flor y YNN295 no formadora de flor.

4.- Caracterización genética.

Una vez determinados los parámetros microbiológicos y celulares de las cinco cepas aisladas, procedemos ahora a una caracterización genética cuyo objetivo es, por un lado, determinar algunas propiedades de interés de estas cepas como la susceptibilidad de formación de mutantes petite, o el nivel de expresión del gen *FLO11*, y por otro, diseñar las estrategias para la generación de nuevas cepas de flor que se desarrollan en el capítulo siguiente, para lo que es interesante conocer aspectos como su capacidad de conjugarse y esporular.

4.1.- Inducción de mutantes petite (rho-).

El efecto conjunto del alcohol y la temperatura provocan en las levaduras de la especie *S. cerevisiae* la aparición de mutantes petite o rho-, que pierden parte o todo su ADN mitocondrial (Ibeas and Jiménez, 1997; Castrejon et al, 2002). Dado que estos mutantes son incapaces de respirar, no forman flor, y el incremento de su proporción en un velo parece ser una de las causas del deterioro y desaparición del velo en los meses de verano (Ibeas et al., 1997a; Ibeas and Jiménez, 1997). No todas las cepas de levaduras de flor son igualmente susceptibles de sufrir estas mutaciones, es por ello que, como parte de la caracterización de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles,

quisimos comprobar la resistencia que mostraban a la inducción de mutantes rho-, puesto que este carácter puede ser de interés a la hora de seleccionar una cepa frente a otras. Los porcentajes de mutantes rho- que se obtuvieron se muestran en la Tabla 2.11.

	Formación de rho-	
	Frecuencia espontánea	Frecuencia inducida
Cepa A	13,9	27,2
Cepa B	8,8	15
Cepa C	3,5	2,6
Cepa D	2	1,4

Tabla 2.11.- Porcentaje de mutantes rho- espontáneos e inducidos por etanol en las cepas A, B, C y D aisladas en la D.O. Montilla-Moriles.

Los porcentajes de mutantes rho- espontáneos observados muestran valores muy elevados para las cepas A y B, respecto a las otras dos cepas. Como era de esperar, estos porcentajes se incrementan tras la incubación de las levaduras en presencia de etanol, aunque no en todas las cepas, ya que las cepas C y D, que presentan los valores menores, mantienen unos porcentajes bajos tras la inducción.

4.2.-Análisis del gen *FLO11*.

El gen *FLO11* codifica para una adhesina que se ha descrito como una proteína esencial en procesos de adhesión celular, como la formación de biofilm sobre la superficie sólida entre otros (Reynolds and Fink, 2001). Posteriormente se ha identificado como el único gen responsable de la formación del velo de flor, ya que su delección provoca una pérdida en la capacidad de formar flor, y la transformación de una cepa de laboratorio incapaz de formar flor con el alelo de *FLO11* de cepas de flor permite la formación del biofilm sobre la superficie líquida (Zara et al., 2005; Fidalgo et al., 2006). Las cepas no formadoras de flor también poseen una copia del *FLO11*, sin embargo el nivel de expresión es mucho mayor en las cepas formadoras de flor que en las no formadoras (Fidalgo et al., 2006). El análisis del nivel de expresión de este gen en las cinco levaduras aisladas (Figura 2.10) mostró que las cepas B y D presentan una mayor expresión, triplicando y duplicando respectivamente los valores observados en las cepas C y E, mientras que la cepa A presenta valores próximos a la cepa D.

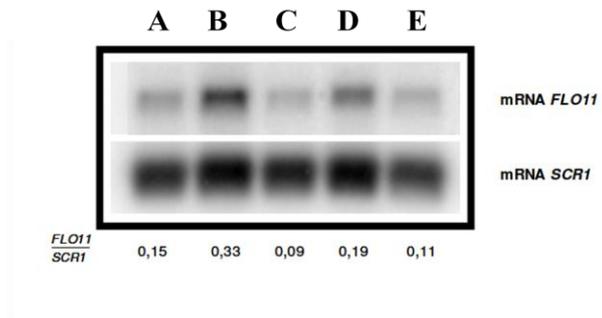


Figura 2.10.- Análisis de expresión del gen *FLO11* en las distintas cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles mediante *Northern blot*. Los valores indican el nivel de expresión de *FLO11* relativo al del gen *SCR1* empleado como control.

Fidalgo y colaboradores (2006) describieron que el promotor del gen *FLO11* de una cepa de flor presentaba, además de diferencias puntuales a lo largo de toda la secuencia, una delección de 111 pb relacionada con los niveles de expresión de dicho gen. Posteriormente Barrales y colaboradores (2012) relacionan dicha región con la zona de actividad de complejos reguladores de la expresión de *FLO11*. Para comprobar si las levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles presentaban también dicha delección, amplificamos la región del promotor donde localiza la delección de 111pb en las levaduras de flor, empleando los oligonucleótidos FLO11 p13 y FLO11 p12 (Tabla AII.6). En la Figura 2.12 se observa como todas las cepas analizadas también presentan dicha delección.

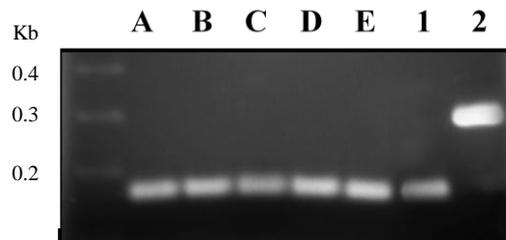


Figura 2.12.- Amplificación por PCR de un fragmento del promotor del gen *FLO11* que contiene la delección de 111pb en las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a una levadura de flor (1) (133d) y una levadura de laboratorio (2) (L5684).

El análisis de la longitud del marco abierto de lectura (ORF) del gen *FLO11* de las levaduras de flor revela un mayor tamaño del mismo con respecto a las levaduras de laboratorio incapaces de formar biofilm (Fidalgo et al., 2006). Otros estudios han relacionado la longitud del ORF del gen *FLO11* con la capacidad de formar flor (Zara et al., 2009). Para determinar la longitud del ORF de las cinco cepas aisladas en este

trabajo amplificamos por PCR el ORF del gen *FLO11* con los oligonucleótidos FLO11 p1 y FLO11 p2 (Tabla AII.7) de 40 cepas que representaban los cinco patrones identificados, observando que todas ellas poseen un ORF de mayor longitud que el que presenta la cepa de laboratorio L5684, siendo la cepa D la que presenta el alelo de menor tamaño y B la que presenta el de mayor tamaño (Figura 2.11).

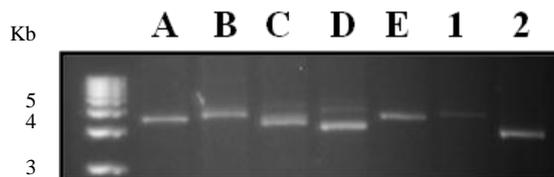


Figura 2.11.- Amplificación por PCR del ORF de *FLO11* en las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles junto a una levadura de flor (1) (133d) y una levadura de laboratorio (2) (L5684).

4.3.- Esporulación y conjugación.

Para comprobar la capacidad de producir esporas por parte de las cepas aisladas, realizamos ensayos de esporulación empleando dos medios de preesporulación diferentes y dos medios de esporulación también diferentes, así como sus combinaciones (Codón et al., 1995).

Transcurridos los tiempos indicados para cada una de las combinaciones de medios, se observaron las muestras al microscopio, comprobando que ninguna de las cinco cepas analizadas formó ascas. Para verificar el resultado, las preparaciones se tiñeron con verde malaquita (tiñe las ascas) y rojo congo (tiñe la célula). En la Figura 2.9 se muestra la tinción de esporas de las cepas control y a modo de ejemplo lo observado en la cepa D, que es representativo de lo que se observó en el resto de cepas.

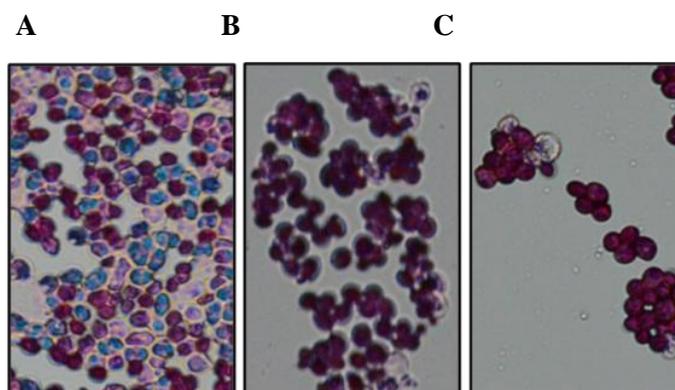


Figura 2.9.- Observación microscópica de las esporas producidas por **A.** la cepa diploide MMY3, **B.** la cepa haploide YNN295, **C.** la cepa D aislada en la bodega Robles. En verde-azulado se observan las ascas y en rojo las células no esporuladas.

Las mismas cepas fueron también sometidas a pruebas para determinar su capacidad de conjugarse con las cepas control de sexo conocido MMY1 y MMY2, obteniendo resultados negativos en todos los casos.

5.- Caracterización de las cepas A identificadas en las diferentes bodegas.

Puesto que las cepas A constituyen el 79% de las cepas aisladas en esta Denominación de Origen, y es la mayoritaria en cuatro de las cinco bodegas estudiadas, decidimos caracterizar un aislamiento de la cepa A de cada una de las bodegas que integran este estudio. Para ello se analizaron parámetros como la velocidad de crecimiento, la velocidad de formación de flor, el análisis del contenido en ADN, la longitud del promotor y el ORF de *FLO11*, y concluimos que las cinco cepas se comportaron de forma idéntica. Los datos obtenidos no se muestran por ser similares a los ya descritos para la cepa A para la caracterización desarrollada en este capítulo.

Discusión

El objetivo principal de este capítulo ha sido el de caracterizar las levaduras identificadas en las diferentes bodegas de la D.O. Montilla-Moriles. Con esa caracterización pretendemos conocer sus capacidades para elaborar los vinos Finos, así como las condiciones que puedan determinar su presencia en las bodegas y su uso potencial para la mejora genética. En primer lugar nos interesamos por la capacidad de crecimiento que presentaban las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles en diferentes medios de cultivos. Para ello las distintas cepas se crecieron tanto en medio rico YPD, medio con etanol como única fuente de carbono (YPE5 y 10% v/v de etanol) y mosto sintético. También se ensayaron diferentes temperaturas con el fin de poder determinar las condiciones óptimas de crecimiento de las mismas, ante la necesidad por ejemplo de producir cultivos para la inoculación dirigida de botas en determinadas épocas del año. En la mayoría de las condiciones ensayadas, la cepa B es la que presenta un crecimiento más lento, independientemente de la temperatura ensayada. A priori podríamos pensar que la cepa B no sería la apropiada para la inoculación de botas de forma dirigida, aunque como vimos en el capítulo 1, la cepa B es la mayoritaria en la bodega Alvear, por lo que debe presentar algunas características que la hagan competente, más allá de su velocidad de crecimiento. En el medio con la mayor concentración de etanol, YPE10% v/v, es la cepa A la que presenta un mayor crecimiento, lo que explicaría en cierto modo que sea la cepa mayoritaria en todo el muestreo realizado en esta Denominación de Origen. Por otro lado, la cepa A es también la que crece mejor en mosto sintético. Esto junto con su mayor crecimiento en los medios con etanol puede favorecer su proliferación durante la etapa de fermentación, ampliando así las posibilidades de alcanzar e imponerse luego en la fase de crianza biológica. Por otro lado, como hemos podido observar, la cepa A es resistente a la toxina killer K_2 , mientras que la cepa B es sensible. Podría ser que la presencia de algunas levaduras productoras de la toxina K_2 durante la fase fermentativa, provocasen la imposición de la cepa A en la mayoría de las bodegas. Aunque la levadura B es la única resistente a la toxina K_1 , el hecho de que el pH óptimo para la actividad de esta proteína quede por encima del pH del vino (Woods and Bevan, 1968), hace que no podamos pensar en este factor como responsable de la imposición de esta levadura en la bodega Alvear.

El resto de cepas aisladas mantienen un crecimiento discreto, entre el mínimo presentado por la cepa B y el máximo por la cepa A. Algunas de estas cepas se han impuesto al resto, en casos puntuales, pero sin guardar ninguna correlación aparente con las condiciones establecidas, como la cepa E creciendo en YPE5% v/v de etanol o la cepa D creciendo en YPD a 20°C. Concretamente esta última cepa, la cepa D, es la que mejor crecimiento presenta en medio rico a cualquiera de las temperaturas ensayadas, pero parece ser la más sensible al crecimiento en etanol, puesto que presenta un buen desarrollo en medio YPE5% v/v de etanol pero cuando el porcentaje de etanol aumenta al 10% su crecimiento disminuye notablemente, pudiendo ser esta quizá la causa de su escasa presencia en las bodegas, una sola bota en un solo muestreo. Sin embargo, en el análisis de producción de mutantes rho-, que se inducen por alcohol, y además le impide a la levadura emplearlo como fuente de carbono, es precisamente la cepa D la que

menor porcentaje de estos mutantes presenta, tanto en ausencia como en presencia de alcohol, y la cepa mayoritaria en la D.O., la cepa A, es la que más mutantes rho-muestra en ambas condiciones.

Las levaduras de flor, además de crecer en vino deben formar flor de forma estable, y a la mayor velocidad posible. Por ello era interesante conocer la velocidad de formación de flor a diferentes temperaturas y concentraciones de alcohol, observándose que a la menor temperatura ensayada (20°C) la cepa que forma flor más rápido es la cepa D, mientras que a la temperatura más alta (25°C), es la cepa A. A la temperatura intermedia, ambas cepas tienen un comportamiento similar. Sin embargo, la cepa D sólo se ha detectado en el muestreo realizado en Junio, cuando las temperaturas son más altas y por otra parte la cepa mayoritaria aislada en este trabajo, la cepa A, lo es independientemente de la fecha de muestreo, y por ende de la oscilación de las temperaturas que se den en las bodegas. Pensamos por tanto que deben existir otros factores que influyan en el establecimiento de una cepa, en una bota o bodega, aparte de la velocidad de formación de flor. Basándonos en datos previos, podemos pensar en aspectos como la longitud de la región codificante del gen *FLO11* (Zara et al., 2009), el nivel de expresión de este gen (Fidalgo et al., 2006) o la hidrofobicidad celular (Zara et al., 2005). Es por ello que se analizaron estas características en las cinco cepas aisladas. En cuanto a la expresión del gen *FLO11*, se ha descrito que las cepas formadoras de biofilm presentan una delección de 111 pb en el promotor de este gen que incrementa su nivel de expresión (Fidalgo et al., 2006). Las cinco cepas analizadas presentan dicha delección, aunque el análisis de expresión de *FLO11* genera resultados diferentes para ellas, siendo la cepa B, la que mayor nivel de expresión presenta, y la cepa A una de las que menos. Por su parte, la región codificante, cuya longitud parece ser proporcional a la capacidad de formación de flor, también presenta resultados variables entre las cepas, siendo B la cepa con el fragmento de mayor tamaño y D con el menor. Estos datos apoyarían la hipótesis de que la cepa B sería la mejor cepa para la formación de flor, ya que presenta el mayor nivel de expresión y la región codificante de mayor tamaño, los dos factores propuestos como ideales para favorecer la formación de biofilm, sin embargo su comportamiento en este sentido es intermedio. Otro parámetro que podría influir en la velocidad de formación de flor es la hidrofobicidad celular (Zara et al., 2005), pero tras el análisis realizado a las cepas aisladas observamos que todas presentan valores superiores al 90% y, curiosamente, las dos cepas con mayor velocidad de formación de flor, A y D, son las que presentan mayor y menor hidrofobicidad respectivamente. Por tanto, aunque existen algunos indicios, está claro que pueden ser muchas las razones que determinan la velocidad de formación de flor de una cepa.

Los datos poblacionales descritos en el capítulo 1 muestran que la cepa A es la predominante en todas las bodegas excepto en Alvear, en la que se impone la cepa B. Para determinar las causas que conducen a estas dominancias se llevaron a cabo ensayos de competencias entre ellas en diferentes condiciones de temperatura, grado alcohólico y porcentaje inicial de células de cada cepa. Por su buena capacidad de formación de flor, se incluyó también a la cepa D en estos estudios. En la competencia de las cepas A

y B identificadas en la bodega de Alvear observamos como a 20°C es determinante el porcentaje de alcohol en el vino, puesto que a 14% v/v se impone la cepa B, mientras que al 15% v/v lo hace la cepa A, independientemente del porcentaje inicial de cada cepa en el inóculo. Estos resultados concuerdan con lo observado en los muestreos realizados, ya que la concentración de alcohol del vino suele rondar los 15-15.5% v/v y, como vemos, es la condición más favorable para el establecimiento de la cepa A, incluso cuando se inocula en menor proporción que la cepa B. Sin embargo, en una de las bodegas, la bodega Alvear, es la cepa B la mayoritaria, aun existiendo A en dicha bodega. La cepa B debe por tanto poseer alguna característica que la haga imponerse en la bodega, incluso a altas temperaturas y grado de alcohol, o las condiciones de la bodega favorecen su proliferación. El análisis del vino contenido en esas botas, así como la temperatura de la bodega a lo largo del año, podría ayudar a revelar esta cuestión, sin embargo, lamentablemente no se ha podido alcanzar un acuerdo con la empresa para llevar a cabo estos análisis.

En los ensayos de competencia entre las cepas A, C y D identificadas en la bodega Robles, encontramos una clara imposición de la cepa D, cuando se enfrentó tanto con la cepa A como con C, independientemente de la temperatura, el porcentaje de etanol y la cantidad inicial de inóculo. Como ya hemos mencionado la cepa D fue hallada en esta bodega únicamente en una bota durante el segundo muestreo, constituyendo sólo el 2.9% de las levaduras encontradas en esa bodega. Sin embargo, es una cepa competitiva, rápida en la formación de velo de flor y resistente a la formación de mutantes rho-. De nuevo, sería interesante conocer las razones que hacen que esta cepa no se imponga al resto de cepas.

La competencia entre las cepas A y C identificadas en la bodega Robles se realizó a 15.5% v/v de alcohol y 22.5°C donde ninguna de ellas fue capaz de formar flor, a pesar que de forma individual si son capaces de hacerlo, y a 15% v/v de alcohol y 20°C donde se impuso la cepa C. Cabría pensar que las cepas A aisladas en la bodega Robles fuesen diferentes de la cepa A aislada en la bodega Alvear, que se imponía en estas condiciones de temperatura y porcentaje de alcohol. Para comprobar que las cepas A aisladas en ambas bodegas eran la misma, se realizaron experimentos de caracterización para ambas cepas, y se incluyeron también cepas A aisladas en las otras tres bodegas, y se observó que el comportamiento era el mismo independientemente de su origen. Por tanto esperaríamos que la cepa C se impusiera en ensayos de competencia realizados a 15% v/v de alcohol y 20°C sobre la cepa B, no realizados en este trabajo.

Finalmente, con las cepas que presentaban mayor velocidad de formación de flor A y D, así como con la cepa B, por ser mayoritaria en una de las bodegas dentro del estudio, se realizaron ensayos de vinificación tanto en laboratorio como en bodega. El objetivo de estas vinificaciones era conocer las características y el comportamiento concreto en bodega de las cepas seleccionadas. Destacamos, de los parámetros estudiados, el consumo de etanol y la producción de acetaldehído, ambos sustrato y producto, respectivamente, del metabolismo oxidativo que sufren las levaduras de flor en las botas (Ibeas et al., 1997b; Martínez et al., 1997c; Mauricio et al., 1997). Los

resultados muestran que la cepa B es la que produce más acetaldehído, lo que concuerda con lo descrito para su clasificación, que ya determinamos en el capítulo 1 esta cepa como perteneciente a *S. cerevisiae* raza *montuliensis*, ahora reclasificada como *Torulaspora delbrueckii*. Este aumento en la producción de acetaldehído podría ser a su vez la causa de la imposición de esta cepa en ciertas condiciones, al ser posiblemente más resistente a este compuesto que el resto de las cepas identificadas. Entre las cepas A y D, ambas pertenecientes a *S. cerevisiae* raza *beticus*, hoy día consideradas como sinónimos de *S. cerevisiae*, la cepa D es la que produce más acetaldehído en ambos casos, con un consumo de etanol igual entre ambas.

Capítulo III:

Mejora de las levaduras de
flor aisladas en la D.O.

Montilla-Moriles

Introducción

1.- Mejora genética de las levaduras vínicas.

La industria vinícola está en constante evolución con el propósito de mejorar los sistemas de producción, desarrollar nuevos vinos, explorar nuevos mercados, etc. Entre las estrategias que se siguen, y en relación con el trabajo que nos ocupa, uno de los objetivos a alcanzar es el conseguir nuevas cepas de levaduras que se ajusten a los actuales requerimientos de la producción y de los consumidores. Los primeros trabajos de mejora, en cuanto a las cepas vínicas, consistían en el aislamiento de cepas silvestres en diferentes condiciones, y la posterior selección de las mejores para uso industrial mediante evaluación enológica, aspecto que está de nuevo en auge en nuestros días, con el objetivo de seleccionar cepas autóctonas de diferentes regiones. El incremento de la demanda de los consumidores, que conlleva un aumento de producción y de calidad, a menor coste, llevó al sector a incorporar estrategias de mejora genética clásica para la obtención de nuevas cepas industriales. Hoy en día, no sólo son esas las razones, sino también un interés por la diversificación en las características de los vinos producidos, lo que aumenta la demanda de nuevas cepas, y con los conocimientos actuales es la ingeniería genética la que se consolida como el método más rápido y dirigido para llevarlas a cabo, con la contrapartida de las restricciones de uso y comercialización que presentan los organismos genéticamente modificados (OGM), que comentaremos mas adelante.

1.1.- Selección natural de cepas de levaduras vínicas con características de interés.

La mejora genética en la industria vitivinícola comenzó realmente con la domesticación de la vid hace unos 5000 años. Esta fue llevada a cabo por los agricultores que, de forma empírica, aplicaron la selección natural de mutaciones al azar, junto con cruzamientos sexuales forzados, con la intención de conseguir una mayor producción, mejor calidad, y resistencia de estas plantas al ataque de plagas o a estreses abióticos.

Las levaduras vínicas también han sido objeto de mejora genética a lo largo de la historia de este producto, y también de forma empírica, habiéndose seleccionado aquellas variantes naturales que realizaban mejor la fermentación, o que tenían determinadas características ventajosas, como mayor producción de aromas, mejor crecimiento sobre determinados sustratos o bajo ciertas condiciones de elaboración, etc. Al actuar así, aunque de forma inconsciente, el hombre ha realizado mejora genética de las levaduras utilizadas para la elaboración de los productos fermentados y, hoy en día, es evidente que el genoma de dichas levaduras es el resultado de una fuerte presión de selección ejercitada durante millones de generaciones (Querol et al., 2003). Actualmente existen centenares de cepas dentro de la especie *S. cerevisiae* precisamente como resultado de procesos de cruzamiento, mutación y selección de la microbiota indígena sufridos a los largo de siglos, que han ido adaptándolas a los diferentes nichos ecológicos de cada mosto, y cada zona de vinificación.

1.2.- Mejora genética clásica.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido objeto de estudio en los laboratorios para el conocimiento de su biología, y por su uso como organismo modelo, estudiando en ella procesos que son difíciles de analizar en otros organismos más complejos. Estos estudios han dado lugar a numerosas técnicas que posteriormente se han podido aplicar para la mejora de las levaduras industriales. Entre ellas vamos a destacar aquellas que han permitido reproducir en el laboratorio, y con estos organismos, los experimentos de mejora genética clásica que el hombre viene aplicando a los animales y las plantas desde hace varios miles de años.

Las técnicas de mejora clásica que se detallan a continuación son lentas, inespecíficas, y no siempre aplicables a las cepas de levaduras industriales. Durante años se han intentado llevar a cabo modificaciones dirigidas del genoma de cepas vínicas mediante el empleo de estas técnicas, pero en la mayoría de los casos los resultados no han sido satisfactorios desde el punto de vista industrial, aunque han aportado conocimientos sobre los genomas de estas levaduras industriales.

1.1.1.- Generación de híbridos.

La idea de generar híbridos surge con el objetivo de conseguir cepas naturales que presenten una combinación ideal de características industriales deseables, situación poco probable en la naturaleza, acorde a las exigencias actuales en la industria enológica, como alto poder fermentativo, producción y tolerancia a etanol, producción de acidez volátil así como adaptabilidad a distintas temperaturas entre otras. Estas propiedades dependen de una multitud de loci distribuidos a lo largo del genoma, y de sus interacciones impredecibles (Giudici et al., 2005; Marullo et al., 2004). Sumado a esto último, la presencia de un gran número de variantes alélicas, el alto grado de heterocigosis y la presencia de aneuploidias o poliploidías en las cepas vínicas (Barre et al., 1993; Codón and Benítez, 1995; Naumov et al., 2000), avalan a la hibridación como el mecanismo más indicado para generar cepas industriales mediante la fusión de ambos genomas completos (Giudici et al., 2005). Esta hibridación puede ser tanto intraespecífica como interespecífica, ya que también la hibridación de especies estrechamente relacionadas con *Saccharomyces* se ha mostrado como un mecanismo natural implicado en la adaptación de estas levaduras a procesos industriales (Barrio et al., 2006; Querol and Bond, 2009). Mejoras genéticas llevadas a cabo por hibridación intraespecífica han permitido el desarrollo por ejemplo de cepas capaces de flocular y no producir H₂S a partir de cepas parentales de *S. cerevisiae* que presentaban estos caracteres por separado (Romano et al., 1985) así como cepas con un notable aumento de la producción de bioetanol o mayor termotolerancia (Marullo et al., 2009).

Como regla general, los híbridos suelen estar mejor adaptados al medio o a situaciones de fluctuación debido a la adquisición de propiedades de ambas cepas parentales (Belloch et al., 2008; González et al., 2006), lo que los hace interesantes para el empleo en diferentes procesos industriales, o para estudios básicos. Los métodos de hibridación clásicos consisten en lograr un cruzamiento entre dos levaduras haploides

de sexo opuesto, e incluyen la conjugación entre esporas o bien entre esporas y células haploides, así como la conjugación realizada por *rare mating*. Los híbridos generados por estas técnicas, basadas en eventos de conjugación raros pero naturales, no son considerados OGM, lo que los hace apto para su uso en la industria alimentaria.

1.1.1.1.- Conjugación directa.

La conjugación directa es la manera más intuitiva de generar nuevos organismos. De forma similar a la selección que ocurre en la agricultura, esta técnica consiste en el cruce de dos cepas parentales poseedoras de características ventajosas de interés, y la posterior selección de la descendencia con el fenotipo buscado. Este cruce se ha realizado mediante la conjugación entre células vegetativas, entre esporas o entre esporas y células vegetativas. Es un método muy sencillo, y puede llevarse a cabo mediante micromanipulación (Cummings and Fogel, 1978), donde las esporas o células haploides a conjugar son colocadas próximas sobre una superficie de agar, observándose posteriormente los eventos de conjugación por microscopía, o en masa, cuando se dispone de marcadores genéticos complementarios que permiten seleccionar los híbridos formados (Hawthorne and Philippsen, 1994). En ese caso, el híbrido se identifica por el crecimiento de colonias producidas bajo condiciones de cultivo restrictivas para ambos parentales. La conjugación de esporas produce alta diversidad genética y puede ser utilizada para combinar genotipos y características deseables en una sola cepa (Attfield and Bell, 2003). Los principales problemas de esta técnica son (i) la incapacidad de la mayoría de levaduras industriales de conjugar y/o esporular, (ii) la falta de marcadores que permitan seleccionar a los híbridos formados, y (iii) la posible pérdida de algunos de los rasgos importantes desde el punto de vista industrial presentes en los parentales, por la segregación que ocurre durante la meiosis o la generación de esporas previa a la hibridación, así como tras la fusión. A pesar de esto, y de que es una técnica costosa en el tiempo, el cruce directo entre dos cepas ha demostrado ser una forma efectiva de generar híbridos (Sipicki, 2008). Concretamente, el cruce entre esporas o entre esporas y células vegetativas se ha utilizado para generar nuevos híbridos, generalmente interespecíficos, para mejorar cepas dedicadas a las fermentaciones industriales, aumentando su capacidad de floculación (Coloretti et al., 2006), haciéndolas termotolerantes (Marullo et al., 2009) y criotolerantes o capaces de soportar múltiples estreses (Benjaphokee et al., 2012; Pérez-Través et al., 2012).

1.1.1.2.- Hibridación por *rare mating*.

El apareamiento raro o *rare mating* es una adaptación de las técnicas de conjugación clásica en levaduras (Spencer and Spencer, 1996). En un primer momento su uso estuvo dirigido al estudio del cambio en el tipo de apareamiento en *S. cerevisiae* (Gunge and Nakatomi, 1972), pero más tarde fue adaptado a la investigación de levaduras industriales que presentan bajas frecuencias de conjugación y baja viabilidad de esporas, o que no se aparean ni esporulan, por ser diploides, poliploides o aneuploides (Mortimer et al., 1994; Codón et al., 1995). El método se basa en el cambio esporádico que ocurre en el locus sexual en algunas levaduras industriales, en las que

una célula diploide heterocigota para el locus MAT (a/α) cambia para ser homocigota (a/a o α/α), pudiendo hibridar con una célula haploide de sexo opuesto. Esta técnica requiere el uso de poblaciones de gran tamaño ya que se trata de un evento de muy baja frecuencia (Gunge and Nakatomi, 1972; Hammond, 2003). Pese a esto último, esta técnica ha sido usada para estudiar eventos de hibridación interespecíficos entre especies dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (de Barros Lopes et al., 2002) así como la mejora de múltiples características en levaduras. Algunos ejemplos recientes a destacar del empleo de esta técnica son la construcción de levaduras vínicas criotolerantes (Pérez-Través et al., 2012) o la generación de híbridos interespecíficos triploides entre cepas de *S. cerevisiae* y otras especies pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto* (como *S. mikatae*), para diversificar el perfil de sabor de los vinos (Bellon et al., 2011, 2013).

1.1.1.3- Fusión de protoplastos.

Esta técnica, al igual que el rare mating, es empleada también para la hibridación de cepas incapaces de conjugar o cepas del mismo sexo, y es el mejor sistema para realizar hibridaciones interespecíficas (Nakazawa and Iwano, 2004). Es un método de hibridación artificial basado en la fusión de levaduras, en el que éstas son previamente tratadas enzimáticamente para degradar su pared, y se fuerza la unión en presencia de un agente como el polietilenglicol. Al igual que en el caso anterior, al realizarse en masa es siempre necesaria la existencia de marcadores complementarios que permitan la selección del híbrido. La frecuencia con la que se producen estas hibridaciones es mayor que en el *rare mating* pero sigue siendo muy baja. Existen varios ejemplos de uso con éxito para la mejora de cepas industriales de *Saccharomyces* mediante el empleo de esta técnica (Spencer et al., 1983; Carrau et al., 1994; Choi et al., 2010), sin embargo, los híbridos obtenidos por fusión de protoplastos son considerados como OGM acorde a la legislación vigente en la Unión Europea (Steensels et al., 2014) y, por esta razón su uso ha sido generalmente limitado a estudios básicos o procesos industriales no implicados en la alimentación. También se han fusionado protoplastos de cepas de *Saccharomyces* con otras levaduras no convencionales que manifiestan una característica específica, como utilización de la lactosa (Krishnamoorthy et al., 2010), osmotolerancia (Lucca et al., 2002), actividad Killer (Gunge and Sakaguchi, 1981) o degradación de ácido málico (Carrau et al., 1994), entre otras.

1.1.1.4.- Citoducción.

La citoducción permite fusionar células haploides sin que se produzca la unión de sus núcleos, utilizando para ello mutantes de cariogamia denominados Kar (Conde and Fink, 1976; Georgieva and Rothstein, 2002). Se puede de esta forma transferir elementos citoplasmáticos de interés como las mitocondrias o factores killer entre otros, sin alteración del genoma nuclear. La citoducción se ha empleado para transferir características como la floculación (Barre et al., 1993), factores que influyen en la utilización de fuentes de carbono (Spencer et al., 1992) o cromosomas artificiales de levaduras (YACs; Spencer et al., 1994). Para llevar a cabo la citoducción se emplearán

cualquiera de las técnicas descritas anteriormente, en función de las características de las cepas a hibridar.

1.1.2.- Mutagénesis al azar.

La mutagénesis al azar es una herramienta comúnmente aplicada en la mejora genética de cepas de levaduras vínicas (Cebollero et al., 2007). Se lleva a cabo sobre un cultivo de levaduras, empleando agentes mutagénicos que pueden ser tanto químicos como físicos, y cuyo efecto es el de aumentar la tasa de mutaciones que, de forma espontánea ocurre en las levaduras, para luego seleccionar los caracteres de interés. La principal limitación de la mutagénesis al azar es la de requerir un sistema de selección que permita identificar los mutantes de interés. Algunos ejemplos recientes de aplicación de mutagénesis son el trabajo de González (2010), para generar levaduras vínicas superproductoras de manoproteínas, seleccionando mediante el empleo de toxinas como la toxina Killer 9; el de Cordente y colaboradores (2009), en el que aislaron mutantes de una cepa vínica que produce menores cantidades de H₂S con respecto a la cepa parental; el de Coloretto y colaboradores (2006), en el que se obtuvieron nuevos híbridos con características deseables para la producción de vinos espumosos, mediante cruce de cepas floculantes de *S. cerevisiae* con cepas no floculantes de *S. uvarum*, o el de Kutyna y colaboradores (2012), en el que seleccionaron cepas de levaduras vínicas en presencia de sulfito y a pH alcalino, consiguiendo aislar un mutante con alta producción de glicerol y mayor resistencia a sulfito.

1.3.- Mejora por ingeniería genética.

La principal ventaja con la que cuenta la ingeniería genética frente a las técnicas expuestas anteriormente, es que se puede modificar con precisión una característica concreta, sin afectar a propiedades deseables. Pese al gran progreso en el conocimiento de la biología molecular de la levadura, todavía no ha salido al mercado ningún alimento ni bebida elaborado empleando una levadura generada por ingeniería genética, por ser considerados OGM. Se define como OGM aquel organismo cuyo material genético ha sido alterado de forma artificial mediante el empleo de la ingeniería genética. En la industria alimentaria, el empleo de OGM está limitado por la legislación vigente en diferentes países, así como detractado por la opinión pública (Pérez-Través et al., 2012). Aún así, en los últimos años han sido muchos los estudios que se han llevado a cabo desarrollando, mediante ingeniería genética, cepas con nuevas características fenotípicas de gran utilidad y valor para la industria vinícola. Aunque el empleo de estas últimas es poco probable en el presente, proporcionan una idea del potencial futuro de los OGM.

En el presente trabajo parte del objetivo de mejora genética consiste en generar híbridos intraespecíficos, bien empleando *rare mating* o en la mayoría de los casos fusionando protoplastos, de tres de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas en la D.O. Montilla-Moriles, con características enológicas de interés y complementarias. La selección de los híbridos, basada en la complementación de auxotrofías presentes en los

parentales es imposible puesto que las cepas industriales son prototrofas (Akada, 2002; Nakazawa and Iwano, 2004). Debido a que la generación de cepas auxótrofas en levaduras industriales de *S. cerevisiae* es compleja, por su naturaleza generalmente poliploide o aneuploide, en nuestro trabajo la selección se ha realizado empleando genes marcadores de resistencia a antibióticos introducidos en algunas copias del locus de la leucina. Objeto de estudio ha sido también el intercambio de mitocondrias entre algunas de las cepas aisladas en la D.O. Montilla-Moriles empleando la técnica de citoducción, utilizando el mutante Kar como intermediario del intercambio. Para la selección de estos híbridos hemos empleado las auxotrofías y resistencias que presentaba el mutante Kar, así como la presencia de una fuente de carbono no fermentable para seleccionar los mutantes petite de nuestros aislados, en los casos en los que estos últimos han sido empleados.

2.- El biofilm en las levaduras de flor.

La principal característica de las levaduras de flor, y que las diferencia de otras de su misma especie, es su capacidad de flotar sobre la superficie del vino, soportando además unas concentraciones de alcohol tóxicas para la mayoría de sus congéneres. Para conseguirlo, las levaduras de flor se agregan formando una estructura multicelular que parece ser la responsable de estas características. El análisis de este tipo de estructura y su mejora han sido objeto de estudio por parte de nuestro grupo de investigación y de otros muchos en los últimos años, y no solo en *S. cerevisiae* sino también en la levadura patógena *Candida albicans*.

2.1.- Agregación celular.

En un ambiente natural, muchos hongos unicelulares tienen la capacidad de unir sus células y formar agregados con funciones tan diversas, y a veces esenciales para su supervivencia, como la reproducción sexual, el desarrollo de estructuras multicelulares, la colonización de superficies o la patogénesis (Herker et al., 2004). En todas ellas, la adhesión célula-célula o célula-sustrato es esencial para su desarrollo (Gimeno et al., 1992; Verstrepen and Klis, 2006). Estas agregaciones surgen generalmente como respuesta a cambios fisiológicos, o a cambios en el ambiente que los rodea, e implican modificaciones en la composición química de la pared celular de los mismos.

En *S. cerevisiae* se han descrito varias formas de agregados celulares entre los que destacan los formados durante la reproducción sexual, la pseudofilamentación, la floculación, o la formación de biofilm. Con ellas, una única célula incapaz de moverse puede, por ejemplo, penetrar o desplazarse sobre una superficie cuando detecta la falta de nutrientes, formando hifas o pseudohifas. Estas no son más que células que se dividen de forma continuada sin llegar a separarse unas de otras, con lo que forman largas cadenas que a veces incluso se pueden ramificar (Gimeno et al., 1992).

Otro fenómeno bastante estudiado, por sus aplicaciones industriales, es la floculación, que consiste en una unión celular dependiente de calcio y reversible, que permite a las células resistir ante condiciones adversas, y que por el tamaño que puede

alcanzar, provoca una rápida sedimentación del flóculo cuando se forma en un medio líquido (Bony et al., 1997; Stratford, 1989). La formación de flóculos permite a las levaduras que los constituyen sobrevivir en condiciones adversas, puesto que evita o reduce el contacto con sustancias tóxicas, y en caso de falta de nutrientes, la lisis de las células de la zona interior del flóculo sirve de alimento para el resto (Herker et al., 2004). Desde que se conoce este fenotipo en algunas levaduras, su estudio y sus posibles aplicaciones han dado como resultado por ejemplo el uso de cepas naturales y el diseño de levaduras cerveceras o vónicas con capacidad de flocular al final de la fermentación, lo que facilita la retirada de las mismas del producto final, reduciendo los costes y mejorando la calidad del mismo (Govender et al., 2011; Vidgren and Londesborough, 2011). En otros campos como el de la producción de bioetanol, el uso de levaduras floculantes permite el empleo de hidrolizados lignocelulósicos como materia vegetal que, aunque contienen sustancias tóxicas para las levaduras no floculantes, la protección que proporciona la floculación permite el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol (Purwadi et al. 2007).

2.2.- Formación del biofilm.

Las levaduras de flor, objeto principal de este estudio, tienen la capacidad de formar un tipo especial de estructura multicelular conocida como biofilm (Fidalgo et al., 2006). El biofilm se define como una estructura compuesta por células, adheridas entre sí o a una superficie sólida, y cubiertas por una matriz extracelular, que la diferencia del resto (Bojsen et al., 2012).

2.2.1.- Biofilm en *Candida albicans*.

La formación de biofilm sobre una superficie sólida por parte de *C. albicans* lleva siendo analizada desde hace más de 20 años. En ella se pueden distinguir cuatro etapas, similares a las desarrolladas por otros microorganismos formadores de biofilm (Figura 3.1). La primera etapa consiste en la adhesión de células individuales a una superficie sólida y entre ellas, posteriormente se agregan más células y comienza la producción de la matriz extracelular, a continuación el biofilm madura aumentando el número de células que comienzan a filamentar y la cantidad de matriz, con lo que aumenta la superficie colonizada, y finalmente se produce la dispersión de células individuales para colonizar nuevas zonas libres de biofilm (Blankenship and Mitchell., 2006; Finkel and Mitchell, 2011).

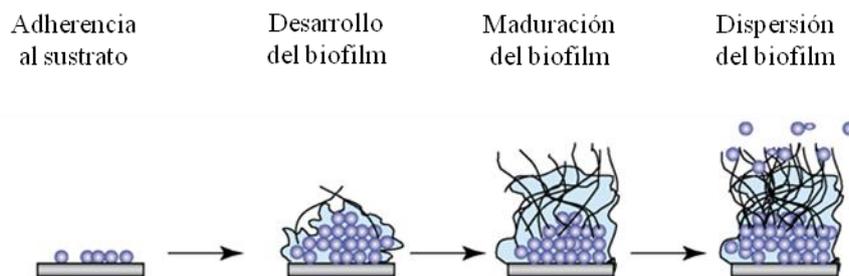


Figura 3.1.- Representación de las distintas fases por las que pasa un biofilm de *C. albicans* durante su formación. Adaptado de Blakeship and Mitchell, 2006.

El estudio de esta estructura ha permitido identificar muchos elementos implicados en cada una de estas fases, y se están diseñando productos que, dirigidos contra ellos o contra sus reguladores, eviten la formación y progresión de esta estructura en el interior de un organismo (Li et al., 2012).

A nivel transcripcional, uno de los principales elementos implicados en la formación del biofilm es Efg1p, un factor de transcripción que controla la expresión de genes implicados en la filamentación, así como en la producción de proteínas localizadas en la superficie celular. Ace2p, otro factor de transcripción, responsable de la regulación transcripcional de genes que codifican para quitinasas y proteínas de pared celular, es también esencial para la formación del biofilm (Kunamoto and Vines, 2005).

En cuanto a las proteínas identificadas durante la formación de biofilm, uno de los grupos principales lo forman un conjunto de proteínas hidrofóbicas de superficie, que reciben el nombre de adhesinas (Huang et al, 2009). El papel de las mismas, como su nombre indica, es el de favorecer la adhesión entre células, o a superficies bióticas o abióticas. Las adhesinas más estudiadas en levaduras son la familia de Als en *C. albicans*, y las familias de las aglutininas y floculinas en *S. cerevisiae*. La familia Als está compuesta por nueve glicoproteínas denominadas Als1-9p que comparten una estructura común entre ellas y con las proteínas de la familia Flo de *S. cerevisiae*.

2.2.2.- Biofilm en *Saccharomyces cerevisiae*.

El biofilm desarrollado por las levaduras de la especie *S. cerevisiae* sobre la superficie del vino en el periodo de maduración de éste, denominado velo de flor, se considera un mecanismo de adaptación consistente en cambios de forma, tamaño e hidrofobicidad en las células como consecuencia de la alta graduación alcohólica, alta concentración de acetaldehído y elevados niveles de estrés oxidativo (Zara et al., 2005).

El cruce de la cepa 133d, una cepa de laboratorio con la capacidad de formar el biofilm sobre una superficie líquida (Fidalgo et al. 2006), con una cepa de laboratorio, y el posterior análisis fenotípico de las esporas, mostró una segregación monogénica del carácter de formación de flor. Mediante mapeo genético clásico, se ha descrito que el

carácter de formación de flor viene determinado por un alelo del gen *FLO11* diferente al que presentan las cepas de laboratorio (Zara et al. 2005; Fidalgo et al., 2006).

El gen *FLO11* codifica para una adhesina perteneciente a la familia de las floculinas de *S. cerevisiae* llamada Flo, que está constituida por Flo11p y otras cuatro proteínas más: Flo1p, Flo5p, Flo9p y Flo10p (Teunissen and Steensma, 1995). De las proteínas de familia Flo, sólo Flo8p, Flo10p y como ya hemos mencionado especialmente Flo11p, están implicadas en la formación de biofilm (Lambrechts et al., 1996, b; Guo et al., 2000; Govender et al. 2008; VanMulders et al., 2009), mientras que Flo1p, Flo5p y Flo9p están implicadas en floculación, otro de los tipos de estructura multicelular descrito anteriormente. Flo11p también está implicada en la formación de otras estructuras multicelulares como las hifas y las pseudohifas, y el biofilm en superficie líquida. Esta adhesina juega un papel central en las múltiples respuestas que la célula emplea para enfrentarse a los cambios ambientales. No es de extrañar por tanto que el promotor del gen *FLO11* sea el de mayor tamaño descrito en *S. cerevisiae* con 3 Kb, siendo numerosos los elementos que interaccionan con el controlando su expresión (Barrales et al., 2008).

A pesar de que todas las cepas de *S. cerevisiae* posee el gen *FLO11*, no todas son capaces de formar biofilm, y menos aún, de formarlo sobre una superficie líquida. Es necesaria la presencia de un alelo activo de *FLO8*, no presente en todas las cepas de esta levadura, y una elevada expresión del gen *FLO11* (Fidalgo et al., 2006), para que la levadura tenga la capacidad de flotar en la superficie de un líquido, y formar en ella un biofilm. Las levaduras de flor presentan una delección de 111 pares de bases en la región promotora de *FLO11* que incrementa considerablemente su expresión (Fidalgo et al., 2006). El incremento en la longitud de una región de repeticiones presente en la proteína Flo11p, parece favorecer aún más esta capacidad. Trabajos recientes, y otros no publicados, muestran además que una correcta glicosilación de la proteína Flo11p es necesaria para que los fenotipos en los que participa se pongan de manifiesto (Fidalgo et al., 2006; Meem and Cullen, 2012; Barrales, 2010).

Dado que en *S. cerevisiae* se ha comprobado que la formación del biofilm sigue una cinética similar a la de *C. albicans*, aunque los estudios son más recientes y menos numerosos, se ha postulado como modelo para el estudio de esta estructura en levaduras, por su facilidad de manejo en el laboratorio (Mosch, 2000; Reynolds and Fink, 2001).

2.3.- Implicación en patogénesis

La posibilidad de formar un biofilm confiere a las células la capacidad de colonizar nuevos nichos, así como resistencia a compuestos antifúngicos y otros tipos de estreses (Vallejo et al., 2013), que hacen que la formación de biofilm sea un mecanismo esencial, por ejemplo en la etapa patogénica de *C. albicans*, para la colonización de tejidos o catéteres, así como en otros elementos empleados en implantes.

Existen otros hongos formadores de biofilms aunque menos estudiados (Vallejo et al., 2013) entre los que podemos destacar las levaduras patógenas *Histoplasma capsulatum* o *Cryptococcus neoformans*, cuyos biofilms comienzan a ser objeto de análisis, y que también parecen tener un papel importante en la virulencia (Pitanguí et al., 2012; Robertson et al., 2012).

3.- *Ustilago maydis* modelo para el estudio del biofilm en superficie líquida.

El hongo biotrófico *U. maydis* pertenece al orden de los *Ustilaginales* conocidos por causar la enfermedad del carbón de los cereales. Este hongo posee dos fases en su ciclo de vida bien diferenciadas: una asexual, en la que crece de forma levaduriforme sin capacidad infectiva, y otra sexual, creciendo de forma filamentosa y patogénica, en la que requiere a la planta de maíz para esporular (Kahmann et al., 2000) (Figura 3.3). Su ciclo de vida comienza con la fusión de dos células de sexo opuesto tras el reconocimiento a través de un sistema de feromonas y receptores. Tras la fusión, se genera un filamento dicarionte que, cuando detecta la presencia de señales específicas de la planta, se diferencia para formar un apresorio. Los apresorios son estructuras morfogenéticas cuya función es la de facilitar la entrada del hongo en el interior de la planta. Para ello, éste tiene que conseguir atravesar la cutícula vegetal, que actúa como una auténtica barrera física entre la planta y el ambiente (Deising et al., 2000; Tucker and Talbot, 2001; Gohre and Robatzek, 2008). Una vez dentro, el hongo se expande por los tejidos de la planta en forma de micelio induciendo la formación de tumores, dentro de los cuales se generan las esporas tras la fusión de los dos núcleos y la diferenciación de la hifa. Las esporas son liberadas al medio y cuando las condiciones ambientales sean las apropiadas se producirá su germinación y la meiosis, completándose así el ciclo de vida con el crecimiento levaduriforme de nuevo (Banuett and Herskowitz, 1996).

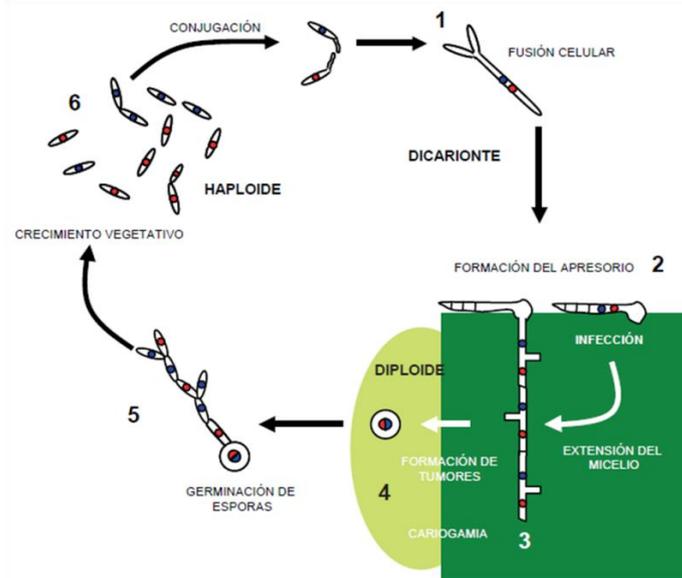


Figura 3.3.- Ciclo de vida del hongo *U. maydis*. Se pueden distinguir seis pasos diferentes: 1, fusión celular entre células de sexo opuesto; 2, formación del apresorio; 3, extensión del micelio en el interior de la célula vegetal; 4, formación de tumores y cariogamia; 5, germinación de esporas y 6, crecimiento vegetativo (Fernández-Alvarez et al., 2009).

El proceso de infección genera diferentes síntomas en la planta que van desde la formación de clorosis y de antocianina, un pigmento rosáceo que produce la planta como consecuencia del estrés biótico, hasta la formación de prominentes tumores en todas las partes aéreas de la planta (Brefort et al., 2009).

En *U. maydis*, como en tantos otros patógenos, también es importante una buena adhesión a una superficie sólida, que se considera como un prerrequisito para la diferenciación de la hifa a apresorio. En nuestro laboratorio hemos descrito que la O-manosiltransferasa PMT4 juega un papel clave en esta adhesión celular. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas PMT, ubicadas en el retículo endoplasmático, y encargadas de adicionar a la proteína diana el primer residuo de manosa en el proceso de O-glicosilación. La adición de esta manosa dará lugar al transporte de la proteína diana al aparato de Golgi donde concluirá el proceso de O-glicosilación con la colocación del resto de manosas (Fernández-Álvarez et al., 2010). Se ha descrito también a PMT4 como una proteína esencial para la virulencia de *U. maydis*, ya que los mutantes $\Delta pmt4$ son incapaces de formar tumores en las plantas de maíz, como consecuencia de una reducción en el número de apresorios formados, y la incapacidad de penetrar de los mismos. Estos mutantes son también incapaces de adherirse eficientemente sobre una superficie sólida (Fernández-Alvarez et al., 2009).

Estudios sobre el dimorfismo y la virulencia de este hongo realizados también en nuestro laboratorio, nos han permitido comprobar su elevada capacidad de formación de biofilm en superficie líquida, aspecto no descrito anteriormente, y por tanto no estudiado. Las etapas de formación de este biofilm son similares a las descritas para *C. albicans*, pero su principal atractivo es la velocidad a la que se forma, y que lo hacen en condiciones en las que *Candida* o *S. cerevisiae* son incapaces de hacerlo. Por ello, nos planteamos en este capítulo el iniciar el estudio del biofilm en este hongo, con el objetivo de identificar elementos que puedan aportar información, o incluso ser transferidos a *S. cerevisiae* para mejorar la formación del biofilm. Para ello nos apoyaremos en el uso tanto de la proteína PMT4, clave en el proceso de adhesión, como en el factor transcripcional BIZ1, implicado en el proceso de filamentación en *U. maydis* (Flor-Parra et al., 2006).

Resultados

1.- Obtención de nuevas cepas a partir de las levaduras aisladas.

Una vez caracterizadas las cinco cepas de levaduras presentes en las bodegas analizadas de la D.O. Montilla-Moriles, hemos seleccionado las cepas A, B y D para realizar una mejora genética de las mismas. El objetivo de esta parte del trabajo es el de generar una levadura que agrupe algunas de las propiedades individuales de cada cepa parental en la maduración del vino Fino.

Tras comprobar que las cepas analizadas son incapaces de conjugarse con cepas de sexo contrario, y a la vez incapaces de esporular, diseñamos dos estrategias genéticas, basadas ambas en la fusión de protoplastos y el *rare mating*. La primera de ellas pretende generar híbridos combinando los genomas completos de dos de las cepas seleccionadas, y la otra intercambiar sus mitocondrias, tratando de esta forma de atribuir propiedades a uno u otro genoma, y combinarlos con el objetivo de generar nuevas levaduras.

1.1.- Obtención de híbridos por fusión de cepas de flor.

Puesto que las cepas de flor carecen de marcadores genéticos que permitan seleccionar los híbridos formados por la unión de dos cepas diferentes, la primera tarea consistió en generar cepas con dichos marcadores. Para ello, se transformaron las cepas A, B y D mediante la técnica de acetato de litio y polietilenglicol, integrando en ellas resistencias a distintos antibióticos en el locus de la leucina.

Para el marcaje de las cepas se emplearon los plásmidos pUG6, pAG25 y pAG32 descritos por Goldstein and McCusker (1999) (Figura 3.4), que portan los genes que confieren resistencia a geneticina, higromicina y nourseotricina (ClonNat), respectivamente. Todos ellos contienen el marcador de selección AmpR que permite seleccionar las bacterias transformadas en medio con ampicilina. El plásmido pUG6 posee el gen *KANMX4* proveniente del transposón Tn903 de *E. coli*, el cual codifica una proteína con actividad aminoglicósido fosfotransferasa que confiere resistencia a kanamicina en *E.coli* y a geneticina (G-418) en levaduras (Jiménez and Davies, 1980). El plásmido pAG25 contiene el gen *HPH* de *Klebsiella pneumoniae* que codifica para la higromicina B fosfotransferasa que confiere resistencia a la higromicina y pAG32 porta el gen *NAT1* de *Streptomyces noursei* que codifica para una N-acetil transferasa que confiere a la levadura resistencia a nourseotricina (Goldstein and McCusker, 1999). Todos los genes de resistencia portados por estos plásmidos están fusionados a una secuencia promotora y terminadora del gen *TEF* del hongo filamentoso *Ashbya gossypii*, que permite la expresión del mismo en levaduras.

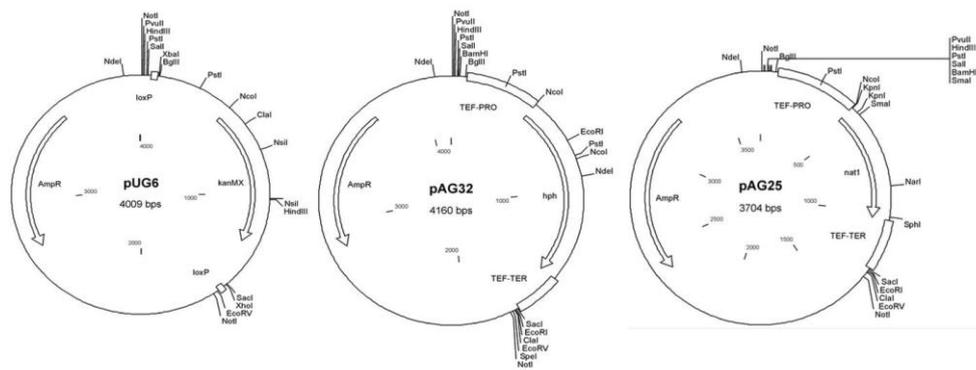


Figura 3.4.- Plásmidos pUG6, pAG25 y pAG32, que contienen resistencias a geneticina, higromicina y nourseotricina, respectivamente.

Para la transformación de las levaduras se emplearon únicamente los fragmentos conteniendo el marcador de resistencia. Para ello, dichos fragmentos se amplificaron empleando oligonucleótidos específicos, LEU2KO5 y LEU2KO3 (Tabla AII.1), que contienen la secuencia homóloga al vector en cuestión, y en su extremo 5' una secuencia de 40 pb idénticas a los extremos del gen al que se pretenden dirigir, en nuestro caso, la leucina. Los productos de estas PCR son por tanto fragmentos que contienen el gen que confiere la resistencia, flanqueado por la región promotora y terminadora del gen *TEF* y, estas a su vez, por una región homóloga al gen de la leucina (RHL) (Figura 3.5). La transformación de estos fragmentos, llevada a cabo por acetato de litio, provoca el reemplazo del gen de la leucina por el casete empleado mediante recombinación homóloga.

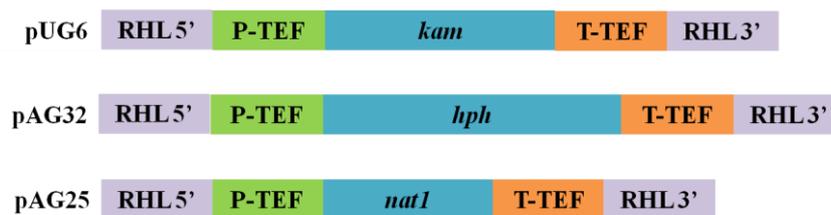


Figura 3.5.- Fragmentos generados tras la amplificación por PCR de los plásmidos indicados, empleados para transformar las distintas cepas de *S. cerevisiae*. Cada uno de ellos porta la resistencia indicada, flanqueada por región promotora y terminadora del gen *TEF*, así como una región de homología con el gen de la leucina (RHL).

Los transformantes se seleccionaron en los medios apropiados y, tras aislar colonias de nuevo en medio selectivo, se comprobó por PCR la integración del fragmento en el locus de la leucina. A modo de ejemplo se muestra el resultado de la comprobación de los transformantes de la cepa A con el fragmento que confiere resistencia a geneticina (Figura 3.6). La banda de 1.6 pb se corresponde al fragmento

integrado, y la banda de 1.1 pb a la copia silvestre del gen leucina que localiza en otra copia del cromosoma, o en otro cromosoma, permitiendo que los transformantes sean aún protótrofos para la leucina, aspecto que se comprobó para todas las cepas obtenidas. De esta forma pudimos seleccionar varios clones de las siguientes cepas A_{hyg}^R , A_{gen}^R , A_{nat}^R , B_{gen}^R , D_{hyr}^R , D_{gen}^R y D_{nat}^R .

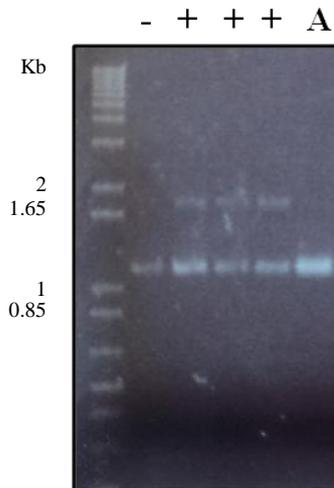


Figura 3.6.- Comprobación de varios clones transformantes de A_{gen}^R junto a la cepa A empleada como control. (+) Clones positivos. (-) Clones negativos.

A continuación se llevaron a cabo los experimentos para la formación de híbridos entre estas cepas realizando las tres combinaciones posibles A/B, A/D y B/D, todas mediante fusión de protoplastos y *rare mating*. La selección de estas colonias se llevó a cabo con los dos antibióticos a los que eran resistentes las cepas parentales. Para ello las placas de medio selectivo se elaboraron con una primera capa de YPD sorbitol con los dos antibióticos doblemente concentrados, y una segunda capa formada por YPD sorbitol que se añade en el momento previo a la siembra, sobre las que se vertieron los protoplastos inmersos en agar de cobertera. De todos los intentos de hibridación llevados a cabo, sólo en uno de los casos obtuvimos colonias en el medio selectivo, concretamente entre una cepa A_{hyg}^R y la cepa B_{gen}^R . En ambos casos la frecuencia de cepas fusionadas fue muy baja. Se obtuvieron un total de 16 colonias, cuatro de ellas procedentes de *rare mating* a las que denominamos R1-4, y doce procedentes de la fusión de protoplastos, a las que denominamos F1-12.

A todas las cepas aisladas se les realizaron distintas pruebas para determinar que realmente eran híbridos entre las dos cepas parentales. En primer lugar se realizó un análisis de RFLPmit con la enzima HinfI a los aislados obtenidos junto con los parentales A y B para determinar cuál de las mitocondrias habían mantenido. Como podemos ver en la Figura 3.7 todos los aislados presentaban la mitocondria de la cepa B.

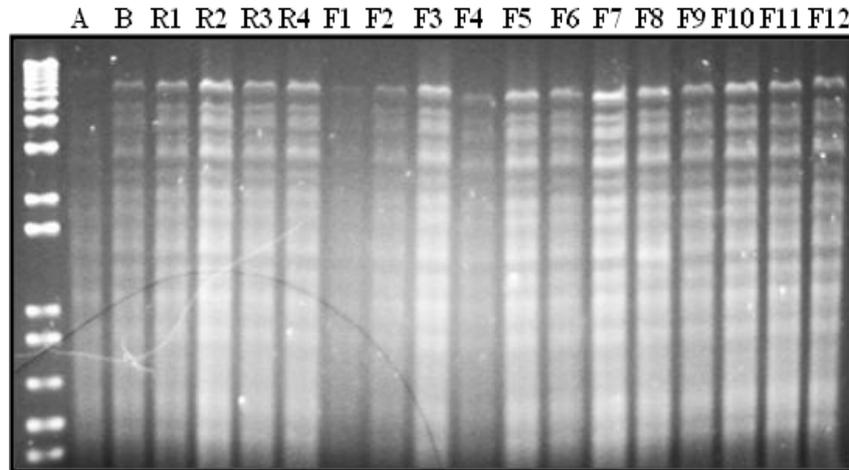


Figura 3.7.- Patrón de bandas obtenido del análisis por RFLPmit con la enzima *HinfI* a las cepas seleccionadas junto con los parentales A y B. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Todos los aislados fueron también sometidos a un análisis de microsatélites junto con las cepas parentales A y B, observándose que todos ellos presentaban el mismo patrón de microsatélite que presenta la cepa B (Figura 3.8).

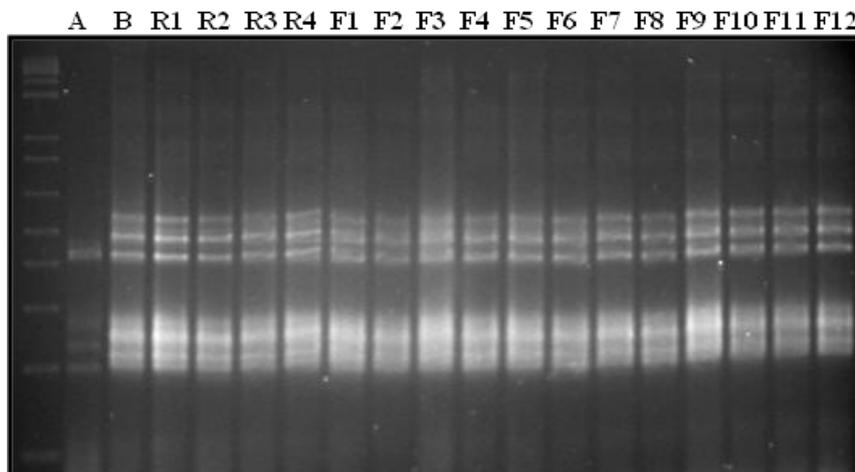


Figura 3.8.- Patrón de bandas obtenido del análisis de microsatélites a las cepas seleccionadas junto con los parentales A y B. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Finalmente se realizó un análisis del cariotipo de algunos de estos posibles híbridos y todos ellos presentaban un patrón similar al de la cepa B (Figura 3.9).

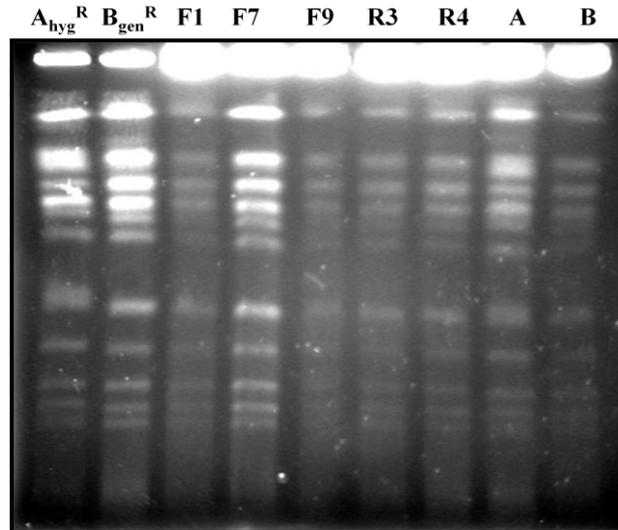


Figura 3.9.- Patrón de bandas obtenido del análisis del cariotipo mediante CHEF a las cepas obtenidas junto con los parentales A y B.

Los datos recopilados hasta el momento acerca de las colonias aisladas con la doble selección por ambas técnicas, fusión de protoplastos y *rare mating*, nos hacían pensar que realmente no se trataba de híbridos entre las cepas A y B sino que estas colonias crecidas en los medios con doble selección eran del tipo B_{gen}^R . Para comprobarlo se diseñaron oligonucleótidos específicos que amplificaban parte del gen de la higromicina, concretamente un fragmento interno de 777 pb (Tabla AII.5). Como control positivo se emplearon dos clones de la cepa parental A_{hyg}^R y como control negativo la cepa de flor A. En ninguna de las colonias analizadas se obtuvo amplificación del fragmento, mientras que en los controles positivos se obtuvo la banda esperada (Figura 3.10). Esto nos indica que todas las colonias que crecieron en las placas con doble selección eran del tipo B_{gen}^R , probablemente con mutaciones espontáneas que le conferían resistencia a la higromicina.



Figura 3.10.- Amplificación de un fragmento de 777 pb perteneciente al gen de la higromicina en algunas cepas obtenidas en la hibridación A/B. Como control positivo se emplearon dos clones de la cepa A_{hyg}^R y como control negativo la cepa A.

Se realizaron más intentos, hibridando en estos casos combinaciones de cepas parentales con distintas resistencias por si el problema estuviese en la doble selección empleada con los antibióticos geneticina e higromicina. Se hibridaron las cepas $A_{nat}^R \times D_{hyg}^R$ y $B_{gen}^R \times D_{nat}^R$, y en ningún caso obtuvimos colonias positivas, ni por fusión de protoplastos ni por *rare mating*.

Planteándonos que la doble selección de antibiótico pudiese ser muy agresiva, diseñamos una nueva estrategia que consistía en emplear mutantes rho- de las cepas parentales con las distintas resistencias, e hibridar así una cepa parental rho- portadora de una resistencia con una cepa parental silvestre. De esta forma la selección se realizó en medio conteniendo un solo antibiótico, al que aportaba resistencia uno de los parentales, y etanol como fuente de carbono, para evitar el crecimiento del otro parental. Para ello se generaron las cepas rho- (ρ^-) mediante la inducción con bromuro de etidio, y se seleccionaron en los medios correspondientes. Las combinaciones utilizadas para las hibridaciones fueron $A_{hyg}^{R\rho^-} \times B$, $A_{hyg}^{R\rho^-} \times D$, $D_{hyg}^{R\rho^-} \times A$, $D_{hyg}^{R\rho^-} \times B$ y $B_{gen}^{R\rho^-} \times D$. En ninguna de ellas se obtuvieron colonias aisladas. Se realizaron más fusiones de protoplastos entre las combinaciones $D_{hyg}^{R\rho^-} \times A$, $D_{hyg}^{R\rho^-} \times B$, $B_{gen}^{R\rho^-} \times D$ y $B_{gen}^{R\rho^-} \times A$, añadiendo en estos casos un periodo de regeneración de 6.5 h a los protoplastos antes de que estos fueran sembrados en las placas de selección. Tampoco de estos últimos se obtuvieron colonias aisladas.

De forma paralela se realizaron por *rare mating* las hibridaciones entre las cepas $A_{hyg}^{R\rho^-} \times B$ y $A_{hyg}^{R\rho^-} \times D$, de las que tampoco se obtuvieron colonias en los medios selectivos.

1.2.- Intercambios de mitocondrias entre cepas de flor.

El objetivo de esta estrategia es el de analizar la posible influencia ejercida por el ADN mitocondrial de las levaduras de flor analizadas, respecto a sus características de mayor interés. Esta aproximación genética se realizó en dos pasos, en primer lugar se transfirieron las mitocondrias de una cepa de flor a una cepa de laboratorio, mediante el empleo de un mutante Kar (K; deficientes en cariogamia) empleando la cepa K5-5A (Conde y Fink, 1976), a la que previamente se le había inducido la mutación rho-, y en segundo lugar la mitocondria fue transferida de esta a otra cepa de flor rho- distinta a la de procedencia.

1.2.1.- Transferencia mitocondrial desde una cepa de flor a una cepa de laboratorio.

La cepa de laboratorio empleada K5-5A ρ^- , a la que a partir de ahora denominaremos mutante K ρ^- , fue fusionada con las cepas de flor aisladas A, B y D como se indica en la Figura 3.11, siguiendo el protocolo ya descrito de fusión de protoplastos.

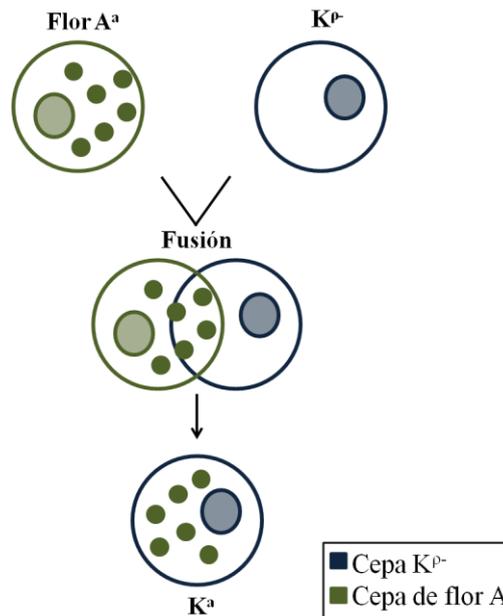


Figura 3.11.- Transferencia de mitocondrias desde una cepa de flor a la cepa de laboratorio K^P.

La selección fue realizada en medio mínimo suplementado con adenina, histidina y canavanina (80µg/ml), para seleccionar el núcleo de la cepa K^P, y con etanol como única fuente de carbono, para seleccionar la presencia de la mitocondria de la cepa de flor. Alternativamente a esta doble selección, y con el objetivo de relajar las condiciones exigidas para el crecimiento de los intercambios, también se hicieron selecciones individuales de cada una de las cepas. Por un lado para la selección de las cepas de flor, empleando sólo medio rico con etanol, y para la selección de las cepas K^P, medio mínimo con canavanina. Se sembraron las fusiones también en placas con medios no selectivos.

En las placas de doble selección nunca aparecieron colonias aisladas, no así en las placas con selección única o en las placas de no selección, como era de esperar. En estas últimas se observó un césped de crecimiento que fue recogido con medio líquido de doble selección e incubado en agitación durante 60 min para que se disgregaran del agar el mayor número de células posibles. Tras la agitación, el agar fue decantado y las células que habían quedado en suspensión, recogidas y sembradas en placas de medio con doble selección. En estas placas si se observó el crecimiento de colonias aisladas que fueron sometidas a crecimiento en medio mínimo y medio mínimo suplementado con adenina o histidina o ambos, para seleccionar aquellas que mantenían las auxotrofías de la cepa Kar.

De varios intentos de fusión entre las cepas A, B y D con la cepa de laboratorio K^P conseguimos aislar y caracterizar dos candidatos potenciales en cada una de las fusiones a los que denominamos como K^a, K^b y K^d, según si provenían de cruzar la cepa K^P con las cepas A, B o D, como donador de la mitocondria, respectivamente.

A las cepas obtenidas se les realizó un análisis de RFLPmit en el que pudo comprobarse que el patrón obtenido coincidía con el patrón de RFLPmit que presentaban cada una de las cepas de flor donadora (Figura 3.12).

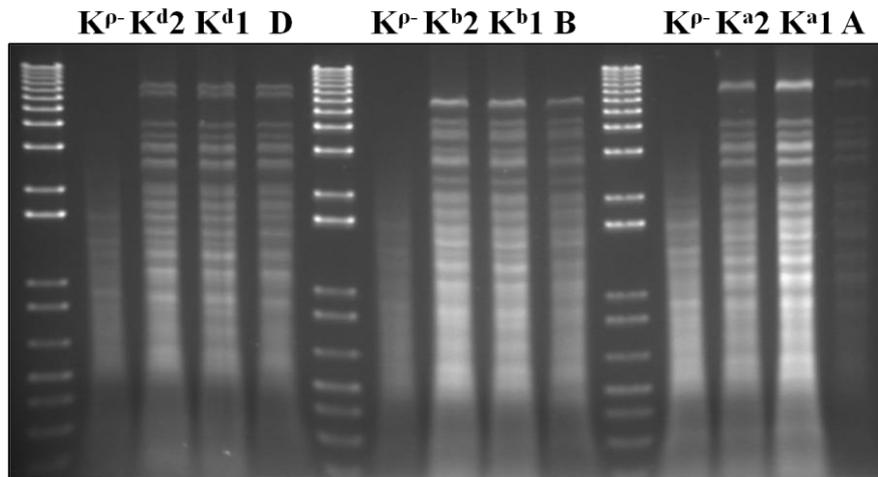


Figura 3.12.- Patrones de bandas obtenidos del análisis de RFLPmit de las cepas K^a, K^b y K^d, junto con la cepas control K^ρ, D, B y A. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Para analizar el núcleo de las cepas obtenidas, de forma complementaria a las pruebas de auxotrofías que le habíamos realizado previamente, realizamos un análisis de microsateélites con el que verificamos que compartían el núcleo con la cepa receptora K^ρ (Figura 3.13).

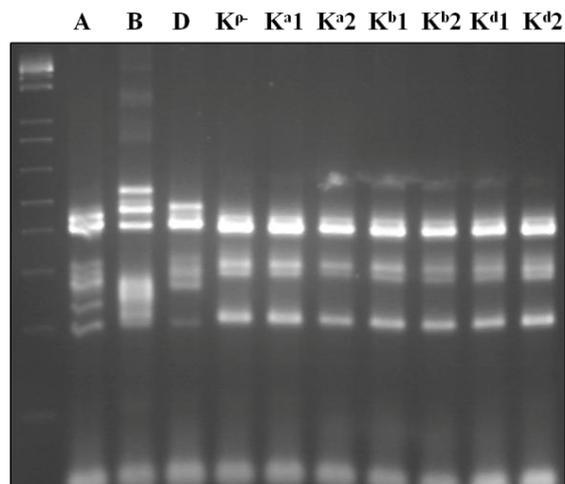


Figura 3.13.- Patrones de bandas obtenidos del análisis de microsateélites de las cepas K^a, K^b y K^d, junto con la cepas control A, B, D y K^ρ. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Finalmente también se les realizó un cariotipado por CHEF en el que observamos que el patrón de cromosomas obtenido era idéntico al que presenta la cepa $K^{\rho-}$ (Figura 3.14).

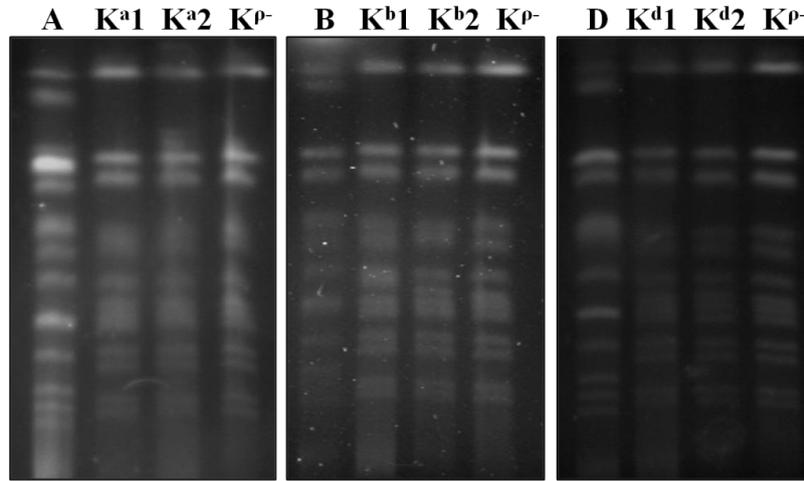


Figura 3.14.- Patrones de bandas obtenidos del análisis del cariotipo mediante CHEF de las cepas K^a , K^b y K^d , junto con la cepas control $K^{\rho-}$, D, B y A.

Con todos estos datos llegamos a la conclusión de que la fusión entre las cepas de flor y la cepa de laboratorio, con el protocolo seguido, había sido satisfactoria, y habíamos conseguido tres cepas diferentes que presentaban el genoma nuclear de la cepa Kar, y la mitocondria de una cepa de flor.

Se determinó la capacidad de crecimiento de las cepas obtenidas K^a , K^b y K^d , en medio rico así como con etanol al 5 y al 10% v/v. Como se puede observar en la Figura 3.15, la cepa Kar con su propia mitocondria es incapaz de crecer en los medios con etanol como única fuente de carbono. Sin embargo, cuando la cepa Kar adquiere la mitocondria donada por cualquiera de las cepas de flor, ésta adquiere la capacidad de crecer en medios con etanol, tanto al 5 como al 10% v/v. En todos los casos las cepas obtenidas tras los intercambios han necesitado un periodo de adaptación al medio de unas 50 horas aproximadamente, hasta iniciar su crecimiento exponencial. Ninguna de las cepas obtenidas en los intercambios presenta problemas de crecimiento en medio rico YPD, de hecho mejoran su crecimiento respecto a la cepa parental.

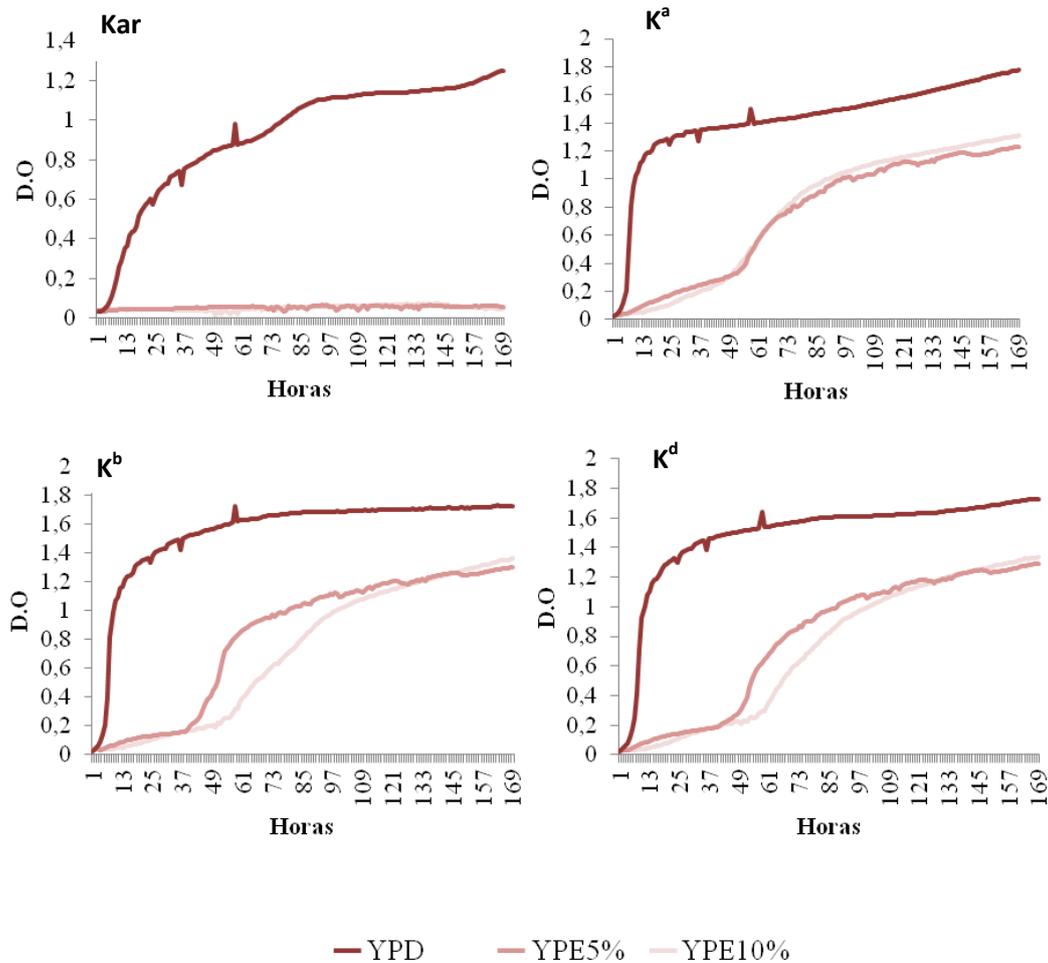


Figura 3.15.- Curvas de crecimiento de la cepa Kar y las cepas K^a, K^b y K^d provenientes de los intercambios, creciendo en medio rico y en medios con etanol al 5 y al 10% v/v.

1.2.2.- Transferencia mitocondrial desde las cepas K^a, K^b y K^d a las cepas de flor ρ-.

El segundo paso en el intercambio de mitocondrias entre dos cepas de flor fue el de transferir la mitocondria de una cepa de flor desde la cepa Kar portadora, a otra cepa de flor distinta a la de procedencia. Este intercambio se produjo mediante la fusión de protoplastos de ambas cepas, donadora y receptora como se muestra en el esquema de la Figura 3.16.

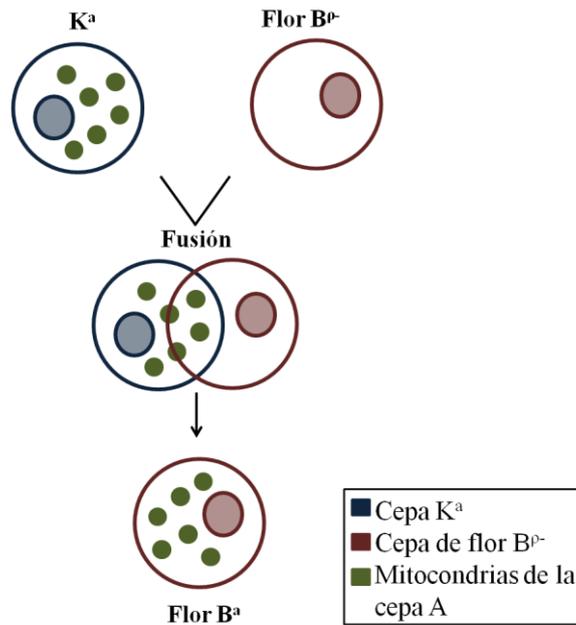


Figura 3.16.- Transferencia de mitocondrias desde una cepa Kara portadora a una cepa de flor ρ^- .

Para llevar a cabo este intercambio generamos, con bromuro de etidio, mutantes ρ^- en las cepas A, B y D aisladas. Una vez obtenidas las cepas, a las que denominamos A^{ρ^-} , B^{ρ^-} y D^{ρ^-} , se comprobó mediante análisis de RFLPmit la ausencia de ADN mitocondrial. A continuación se realizaron fusiones de protoplastos con las diferentes combinaciones entre estas cepas y las cepas K^a , K^b y K^d originadas en la primera parte del intercambio mitocondrial.

En esta fusión de protoplastos la selección se hizo de nuevo en medio mínimo con etanol como única fuente de carbono para seleccionar directamente las cepas fusionadas, e individualmente, por un lado en medio mínimo con el que seleccionaríamos exclusivamente a los mutantes ρ^- , y por otro lado medio rico con etanol como única fuente de carbono, para seleccionar a las cepas con núcleo Kar. También se sembraron las fusiones en placas de medio rico, sin selección alguna.

Como resultado de estos intercambios no se observó ninguna colonia aislada en las placas de doble selección. Sin embargo, de nuevo si crecieron colonias en las placas con una sola selección o sin selección. Al igual que en la primera parte del intercambio mitocondrial, la biomasa crecida en las placas de no selección fue recogida con medio líquido de doble selección, que en este caso era medio mínimo con etanol como única fuente de carbono, y se incubó en agitación durante 60 min para que se disgregaran del agar el mayor número de células posibles. Tras la agitación, el agar fue decantado y las células que habían quedado en suspensión, recogidas y sembradas en placas de medio mínimo con etanol como única fuente de carbono. En estas placas observamos el crecimiento de colonias aisladas que fueron seleccionadas para su análisis.

1.2.2.1.- Análisis molecular de las cepas KA^b, KA^d, KB^a, KB^{*d}, KD^{*a} y D^b.

A diez colonias aisladas de cada una de las combinaciones obtenidas se les realizó un análisis de RFLPmit con la enzima HinfI, un análisis de microsatélites y un cariotipo (CHEF). El intercambio entre todas las combinaciones posibles dio como resultado dos tipos de colonias, aquellas formadas por células que realmente habían aceptado la mitocondria que portaba la cepa intermediaria Kar, y cepas que eran híbridos entre las dos cepas parentales. En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las combinaciones analizadas, representando para cada una de las pruebas moleculares realizadas como + (positivas) aquellas que mostraron el patrón esperado, y como – (negativa), las que mostraron un patrón diferente al esperado, indicando en este último caso que no se había producido el intercambio deseado, sino que había ocurrido una hibridación entre las cepas empleadas.

	KA ^b	KA ^d	KB ^a	KB ^{*d}	KD ^{*a}	D ^b
RFLPmit	+	+	+	-	-	+
Microsatélites	-	-	+	-	-	+
CHEF	-	-	-	-	-	+

Tabla 3.1.- Resultados de los análisis de RFLPmit, microsatélites y cariotipado mediante CHEF de las cepas obtenidas tras los intercambios de mitocondrias. Los signos + indican un patrón de bandas esperado y los – un patrón diferente al esperado.

Como se observa en la Tabla 3.1, como resultado final del intercambio de mitocondrias entre las cepas de flor A, B y D hemos obtenido únicamente la cepa D^b. El resto de cepas obtenidas, que hemos nombrado KA^b, KA^d, KB^a, KB^{*d} y KD^{*a}, son realmente híbridos entre las cepas K^a, K^b, K^d y las cepas A^{p-}, B^{p-}, D^{p-}, parentales de la fusión, como indica el análisis de microsatélites y CHEF realizados. De estas cepas, las marcadas con un asterisco, KB^{*d} y KD^{*a}, presentan además un patrón de RFLPmit diferente al del parental correspondiente.

En la Figura 3.17 puede observarse un ejemplo de los resultados obtenidos en el análisis de RFLPmit con la enzima HinfI, el análisis de microsatélites y el cariotipo de una cepa híbrida, que este caso se trata de la cepa KD^{*a}. Con estas pruebas pudo determinarse que esta cepa tiene un patrón de microsatélite muy parecido al de la cepa Kar, aunque el patrón de cromosomas presenta mayor parecido a la cepa D, y la mitocondria ha sufrido algún tipo de reorganización, ya que no comparte el mismo patrón de la mitocondria presente en la cepa donadora.

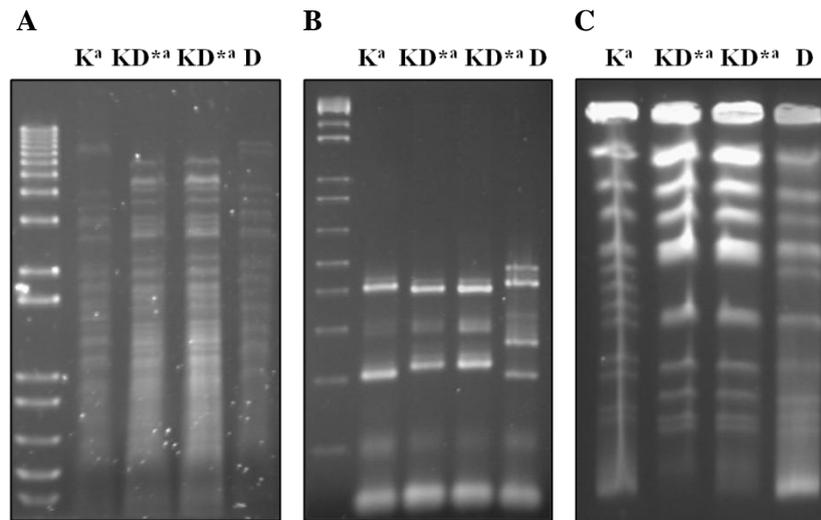


Figura 3.17.- Patrones obtenidos para la cepa resultante del intercambio entre las cepas K^a y D^b . **A.** RFLPmit. **B.** Microsatélites. **C.** CHEF. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

Los resultados obtenidos para la cepa D^b se muestran en la Figura 3.18. En este caso se puede observar que los patrones generados coinciden con los de las cepas parentales, por lo que podemos concluir que el intercambio se ha producido de forma correcta.

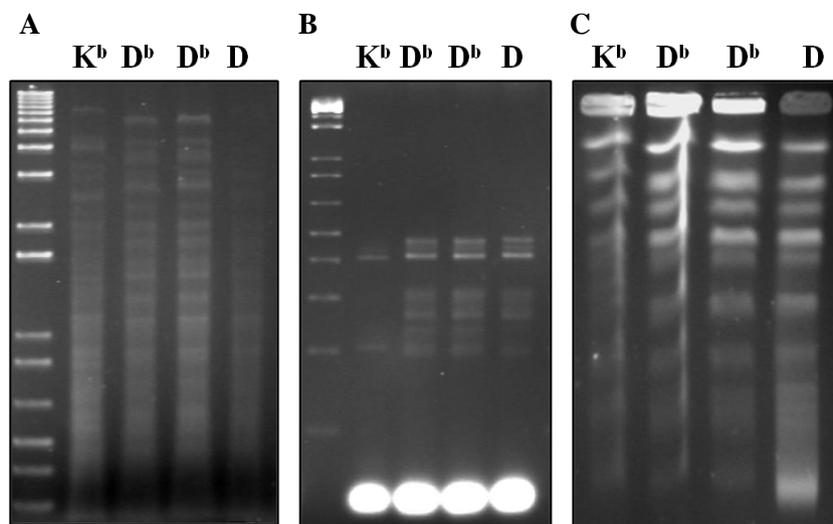


Figura 3.18.- Patrones obtenidos para la cepa resultante del intercambio entre las cepas K^b y D^b . **A.** RFLPmit. **B.** Microsatélites. **C.** CHEF. El marcador de peso molecular utilizado es el *1Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

1.2.2.2.- Caracterización de la cepa D^b.

Con el objetivo de determinar las características de la cepa D^b, se analizó su capacidad para crecer en medios que contienen etanol al 5 y 10% v/v como única fuente de carbono, así como en mosto sintético. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.19, en la que se observa que la cepa D^b crece de forma similar a como lo hacen las cepas parentales D y B tanto en mosto sintético como en medio con 10 % v/v de etanol. En el medio conteniendo 5% v/v de etanol se puede observar como la mitocondria aportada por la cepa B, marca el comportamiento de la cepa D^b en cuanto al perfil de crecimiento. También se realizó el experimento creciendo las cepas en medio rico YPD, observándose en este caso el mismo comportamiento que en el mosto sintético.

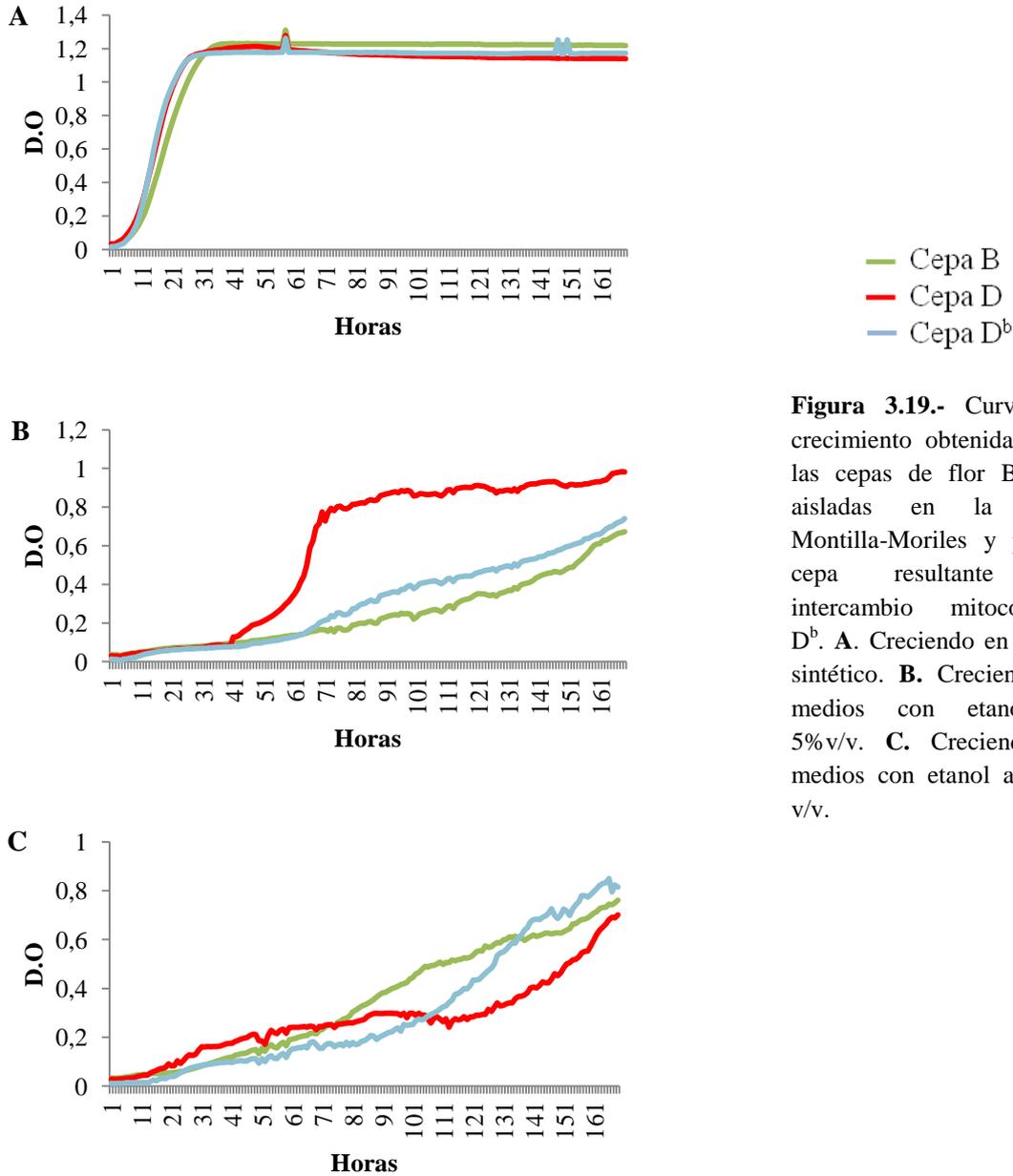


Figura 3.19.- Curvas de crecimiento obtenidas para las cepas de flor B y D aisladas en la D.O. Montilla-Moriles y por la cepa resultante del intercambio mitocondrial D^b. **A.** Creciendo en mosto sintético. **B.** Creciendo en medios con etanol al 5% v/v. **C.** Creciendo en medios con etanol al 10% v/v.

1.2.2.3.- Caracterización de las cepas KA^b y KB^a.

En el resto de los intercambios realizados el resultado obtenido no ha sido el esperado, sino la generación de un híbrido entre las cepas parentales, incorporando la mitocondria del donador en la mayoría de los casos. Se han obtenido de este modo las cepas: KA^b, KA^d, KB^a, KB^{*d} y KD^{*a}. Entre estas, algunas son positivas sólo en el análisis de RFLPmit, otras lo han sido para este y para el análisis de microsatélites y otras no han sido positivas para ninguna de las pruebas moleculares realizadas (ver Tabla 3.1). Para conocer el efecto de estas hibridaciones analizamos el crecimiento en diferentes medios de dos de las cepas obtenidas en estos intercambios, la cepa KB^a que es positiva para RFLPmit y para el análisis de microsatélites, y la cepa KA^b que es positiva sólo para el análisis de RFLPmit.

En la Figura 3.20 se muestra el comportamiento de dichas cepas junto con sus parentales creciendo en los diferentes medios. En mosto sintético, las cepas que mejor crecen son las que poseen el genoma de la cepa A, independientemente de la mitocondria que posean. En cuanto a los medios conteniendo 5 y 10% v/v de etanol como única fuente de carbono, la cepa de flor A y la cepa KB^a presentan un comportamiento parecido, lo cual puede atribuirse a las mitocondrias presentes en estas cepas, la mitocondria de la cepa A. En el caso de la cepa KA^b, ésta ha mejorado el crecimiento en estos medios con respecto a la cepa B, alcanzando valores finales similares a los de la cepa A. El crecimiento en medio rico es similar en todas las cepas (datos no mostrados).

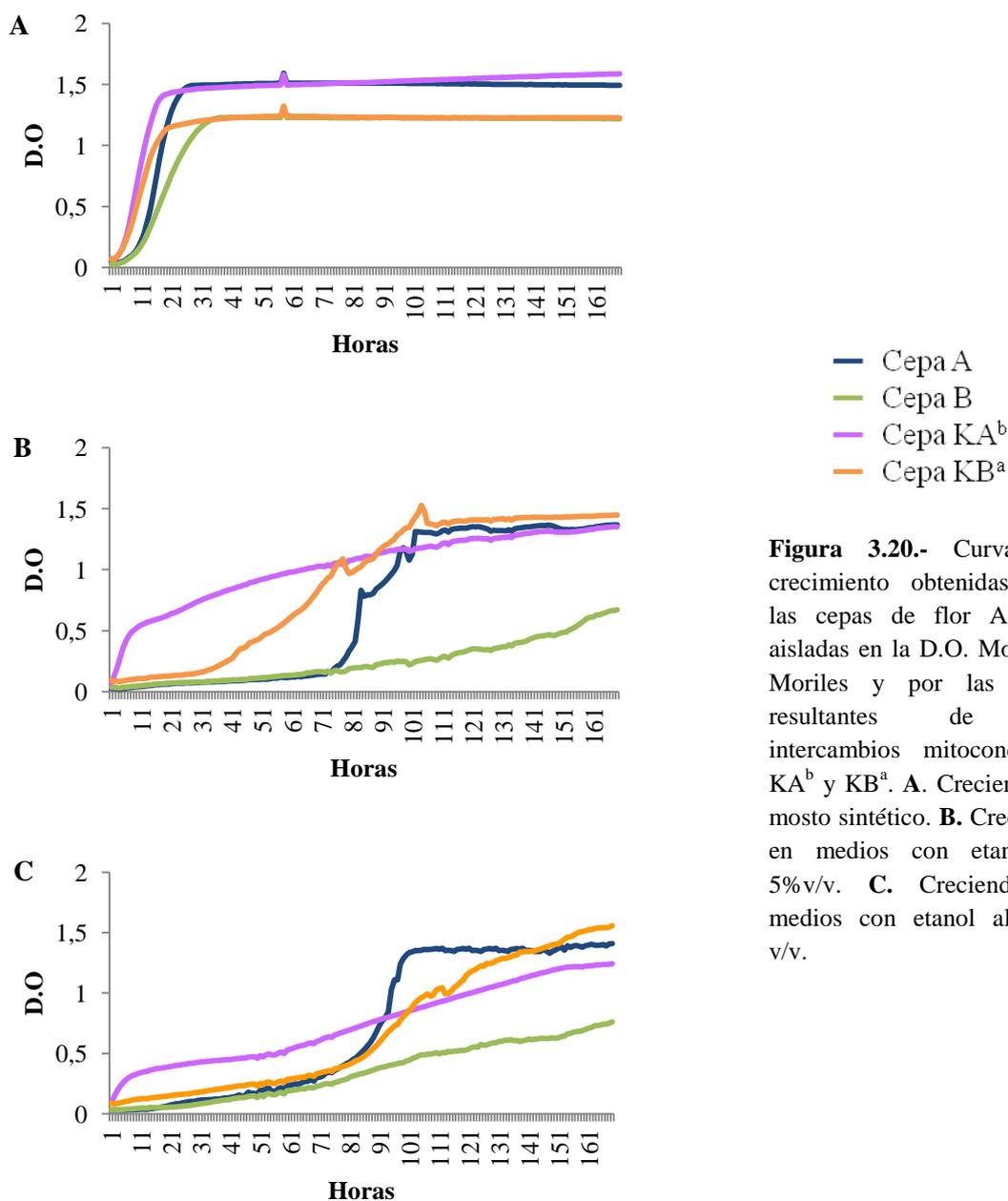


Figura 3.20.- Curvas de crecimiento obtenidas para las cepas de flor A y B aisladas en la D.O. Montilla-Moriles y por las cepas resultantes de los intercambios mitocondriales KA^b y KB^a. **A.** Creciendo en mosto sintético. **B.** Creciendo en medios con etanol al 5%v/v. **C.** Creciendo en medios con etanol al 10% v/v.

2. Aproximación proteómica para la identificación de proteínas implicadas en la formación de biofilm de *Ustilago maydis*.

2.1.- Búsqueda *in silico* de adhesinas en el genoma de *U. maydis*.

Con el objetivo de identificar en *U. maydis* proteínas implicadas en la formación de biofilm, se realizó una búsqueda en el transcriptoma de este organismo de proteínas homólogas a Flo11p, glicoproteína responsable de este fenotipo en *S. cerevisiae*. Para ello se realizó un BLASTP en la base de datos de NCBI empleando como sonda la proteína completa, así como los diferentes dominios que la componen. No se obtuvo de esta forma ninguna proteína de *U. maydis* con homología a Flo11p. Para afinar la búsqueda se aplicó una rutina de exploración diseñada por el grupo del Dr. Perez-Pulido (cuyo objetivo es incluir en la búsqueda proteínas de otros hongos con cierta homología a Flo11p). Este análisis tampoco reportó ningún resultado positivo.

Finalmente se realizó el mismo proceso pero empleando en este caso como sonda la proteína Als1p de *C. Albicans*, glicoproteína responsable de la formación de biofilm en este organismo, sin obtener tampoco ningún resultado positivo, ni siquiera de homología con Flo11p. Podemos concluir por tanto que, es caso de existir, las posibles adhesinas de *U. maydis* son tan diferentes a Flo11p y Als1p como lo son ellas entre sí, y con ello, imposibles de detectar mediante esta estrategia.

2.2.- Estudio comparativo de proteínas secretadas entre células formando biofilm y células en cultivo.

Como se ha descrito anteriormente, ante diversos tipos de estrés, algunas levaduras son capaces de agruparse formando estructuras multicelulares como el biofilm, que le protegen frente a condiciones adversas del medio. El cambio de crecimiento como célula individual a crecimiento en biofilm conlleva que las proteínas que en el primer caso son secretadas al medio, se sitúen en el biofilm en la matriz extracelular que las rodea. Otras proteínas secretadas permanecen adheridas, aunque no integradas, a la pared celular de las levaduras. El conocimiento de las proteínas diferencialmente localizadas en una u otra forma de crecimiento puede aportar indicios de los mecanismos empleados por este hongo para formar el biofilm, como ya se ha hecho en *C. albicans* (Thomas et al., 2006). Para comparar las proteínas secretadas por las células creciendo en cultivo y las que aparecen en la matriz extracelular de las células que forman el biofilm, así como aquellas adheridas a la pared celular en las mismas condiciones, pusimos a punto en el hongo *U. maydis* el protocolo descrito para *Candida albicans* por Thomas et al. (2006). Para ello se inoculó un cultivo de *U. maydis* en matraces con medio YPDU que se incubó a 28°C en agitación hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente se dejó el cultivo en reposo a 25°C y tras un día, comenzó a formarse un biofilm en la superficie del medio (Figura 3.21). Por otro lado, y como control, se emplearon cultivos de *U. maydis* crecidos en medio YPDU a 28°C hasta fase exponencial.

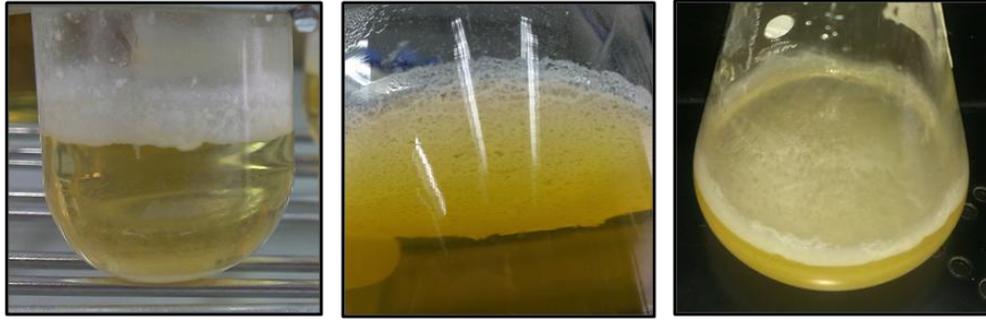


Figura 3.21.- Imágenes tomadas del biofilm formado por una cepa silvestre de *U. maydis* mostrando distintos planos del mismo.

En primer lugar se compararon las proteínas que se encuentran adheridas a la pared celular de *U. maydis* cuando forma biofilm, con aquellas presentes tras el crecimiento en medio YPDU en agitación. Para ello, el biofilm formado por *U. maydis* fue recogido y se separaron las células de la matriz extracelular que las rodea. Para la purificación de las proteínas adheridas a su pared celular las células se incubaron en tampón con β -mercaptoetanol con agitación suave, como se indica en el apartado correspondiente en Materiales y Métodos. En cuanto a las células crecidas en cultivo con agitación, cuando estas alcanzaron la fase estacionaria se recolectaron por centrifugación y se trataron de la misma forma. La Figura 3.22 muestra la separación electroforética de estas proteínas en la que se observa una gran diferencia entre las dos situaciones analizadas.

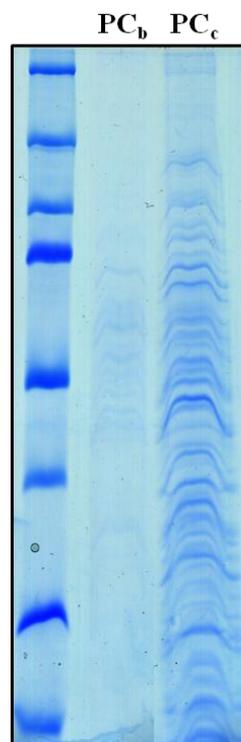


Figura 3.22.- Electroforesis de proteínas adheridas a la pared celular de células formando biofilm (PCb) y células en cultivo (PCc). El marcador de peso molecular utilizado es el *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad).

Posteriormente se compararon las proteínas presentes en la matriz extracelular del biofilm, con las secretadas al medio por las células crecidas en agitación hasta fase exponencial. Para ello, se trató la matriz extracelular previamente separada de las células, y en el caso del cultivo en agitación, una vez retiradas las células por centrifugación, se recolectaron las proteínas secretadas al medio por precipitación. La Figura 3.23 muestra la separación electroforética de ambas muestras. En este caso, es la fracción de la matriz extracelular, correspondiente a las células que forman el biofilm, la más rica en proteínas.

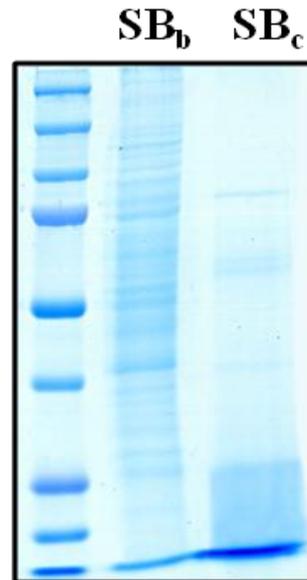


Figura 3.23.- Electroforesis de proteínas presentes en la matriz extracelular de células formando biofilm (SB_b) y proteínas secretadas al medio en un cultivo en agitación (SB_c). El marcador de peso molecular utilizado es el *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (BioRad).

Debido al gran número de proteínas diferentes en ambas situaciones, que haría muy compleja la identificación de factores concretos implicados en la formación de biofilm, decidimos aplicar un abordaje más específico que se detalla en el apartado 2.3.

2.3.- 2D-DIGE para la identificación de proteínas implicadas en adhesión y filamentación.

Como se ha mencionado en la introducción, tanto la adhesión como la filamentación de las células son dos factores esenciales en la formación de biofilm en levaduras. Las proteínas implicadas en la formación de biofilm en *S. cerevisiae* y en *C. albicans* dependen de la activación de un programa que conlleva la filamentación de las células (Kunamoto and Vincens, 2005; Younes and Khalaf, 2013), y en ambos sistemas se sabe que la glicosilación es esencial para que el biofilm se produzca de forma correcta (Mora-Montes et al., 2010; Barrales, 2010). Es por ello que para identificar proteínas del hongo *U. maydis* implicadas en la formación de biofilm diseñamos una aproximación en la que se traten de forma específica estos aspectos. Por un lado empleamos una cepa en la que de forma artificial se activa el programa de filamentación, para que se sinteticen las proteínas que dependen de dicho programa, y por otro lado, trabajamos con un mutante de glicosilación cuyo fenotipo incluye la

ausencia de adhesión celular, que afecta a la formación de biofilm. Concretamente, las cepas con las que realizamos el estudio fueron una cepa que sobreexpresa el factor transcripcional BIZ1 que activa el programa de filamentación (Flor-Parra et al., 2006), con y sin la delección de la O-manosiltransferasa *pmt4* cuya delección impide la adhesión de las células al sustrato (Fernández-Álvarez et al., 2009), y afecta a la formación de biofilm, FB1*biz1*^{erg} Δ *pmt4* y FB1*biz1*^{erg}, junto con los controles pertinentes de células que no sobreexpresan el gen *biz1* (FB1 y FB1 Δ *pmt4*).

En primer lugar se realizó la puesta a punto de la técnica de proteómica en geles bidimensionales, no desarrollada hasta el momento por nuestro grupo de investigación. Para ello, realizamos extracciones de proteínas citosólicas de las cepas control FB1 y FB1 Δ *pmt4*. Para la separación de la primera dimensión se usaron *strips* con un amplio rango de pH, 3-11 NL con el objetivo de cubrir el mayor número de proteínas posibles de las presentes en la muestra. La segunda dimensión se realizó en geles de 24 x 24 cm (Figura 3.24).

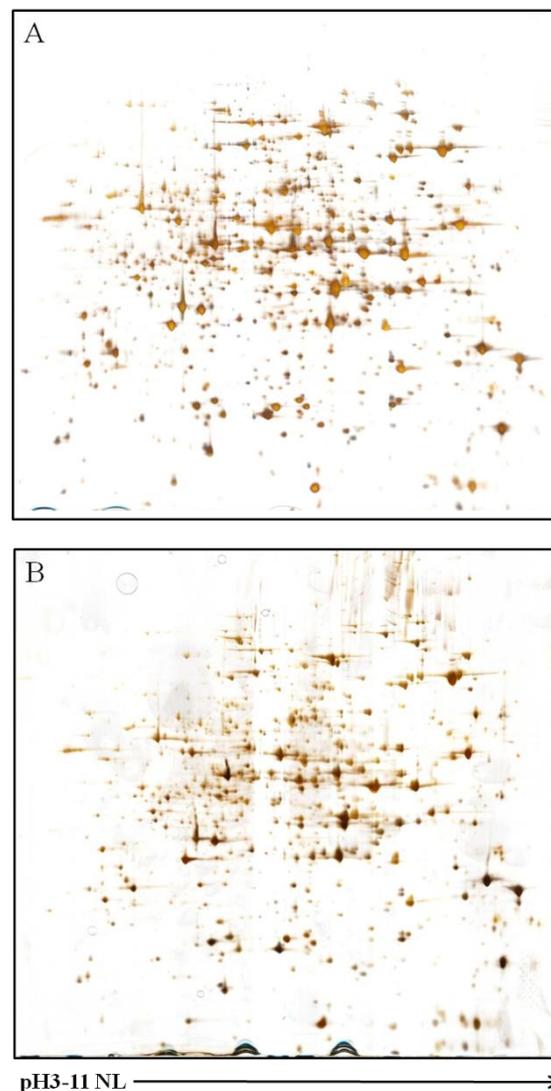


Figura 3.24.- Geles bidimensionales de muestras de proteínas citosólicas utilizando *strips* de rango de pH 3-11NL. **A.** Cepa FB1. **B.** Cepa FB1 Δ *pmt4*. El revelado se ha realizado empleando nitrato de plata.

Tras analizar los primeros geles bidimensionales, observamos una gran cantidad de proteínas en los mismos, lo que podría conllevar al posible enmascaramiento de algunas de interés por parte de otras demasiado abundantes y de poca relevancia para nuestro estudio. Para acotar más la búsqueda, procedimos a enriquecer las muestras en proteínas glicosiladas purificando los extractos citosólicos con columnas de afinidad a concanavalina A (Con A). La Con A es una lectina de origen vegetal con afinidad por los grupos α -monosilo, α -glucosilo y α -N-acetilglucoaminilo, siendo la manosa, el monosacárido con mayor afinidad al sitio de unión de azúcares de la Con A (Goldstein and Poretz, 1986). Realizamos por tanto una cromatografía de afinidad por columnas de Con A con la ayuda de un FPLC, la cual nos permitió disminuir el número de proteínas presentes en los geles, enriqueciendo los mismos en proteínas manosiladas. La electroforesis realizada en las mismas condiciones que en el caso anterior generó el resultado que se muestra en la Figura 3.25.

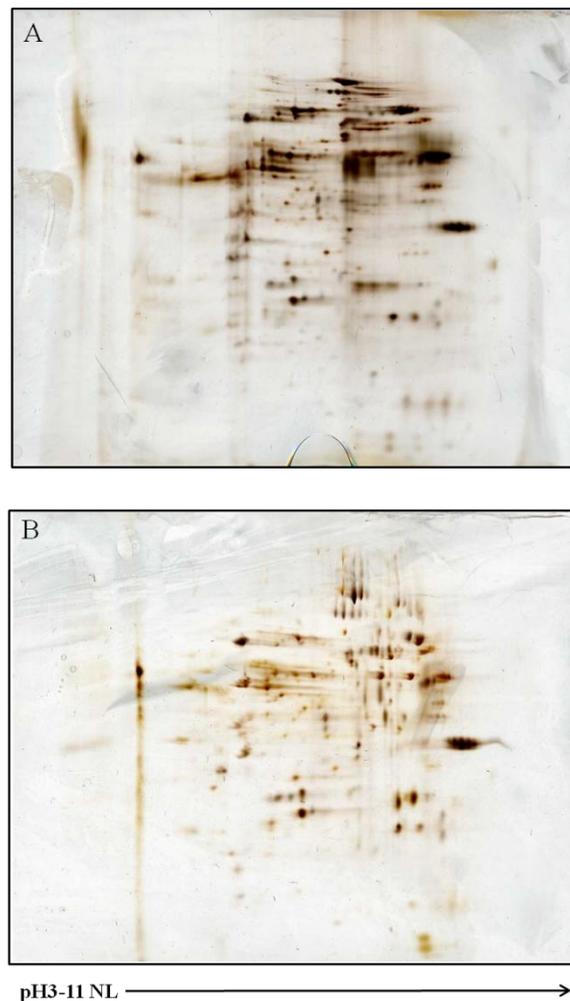


Figura 3.25.- Geles bidimensionales de extractos proteicos enriquecidos en glicoproteínas citosólicas utilizando *strips* de rango de pH 3-11NL. **A.** Ceba FB1biz1^{crg}. **B.** Ceba FB1biz1^{crg}Δpmt. El revelado se ha realizado con nitrato de plata.

Puesto que en todas las muestras analizadas, la mayor parte de glicoproteínas purificadas se agrupaban en el centro del gel, decidimos disminuir el rango de pH de los *strips* a 4-7NL para que de esta forma se acotara y definiera la región central en la que se localizaban las mismas. Realizamos una primera comparativa entre las cuatro condiciones del estudio empleando cuatro réplicas biológicas en las que pudimos observar, a simple vista, que algunas proteínas variaban su localización o intensidad entre las condiciones de sobreexpresión de *biz1*/no sobreexpresión de *biz1* y silvestre/ Δ *pmt4* (Figura 3.26). Pero el combinar las cuatro situaciones, tratando de identificar proteínas que estaban presentes sólo cuando se sobreexpresaba *biz1*, y que presentaran un cambio en su movilidad electroforética o intensidad entre las cepas FB1*biz1*^{crg} y FB1*biz1*^{crg} Δ *pmt4*, era demasiado complejo. Además, el alto número de réplicas con las que trabajábamos, 16 geles totales, junto con la variabilidad en las intensidades aportadas por la tinción con nitrato de plata, dificultaba aun más el análisis.

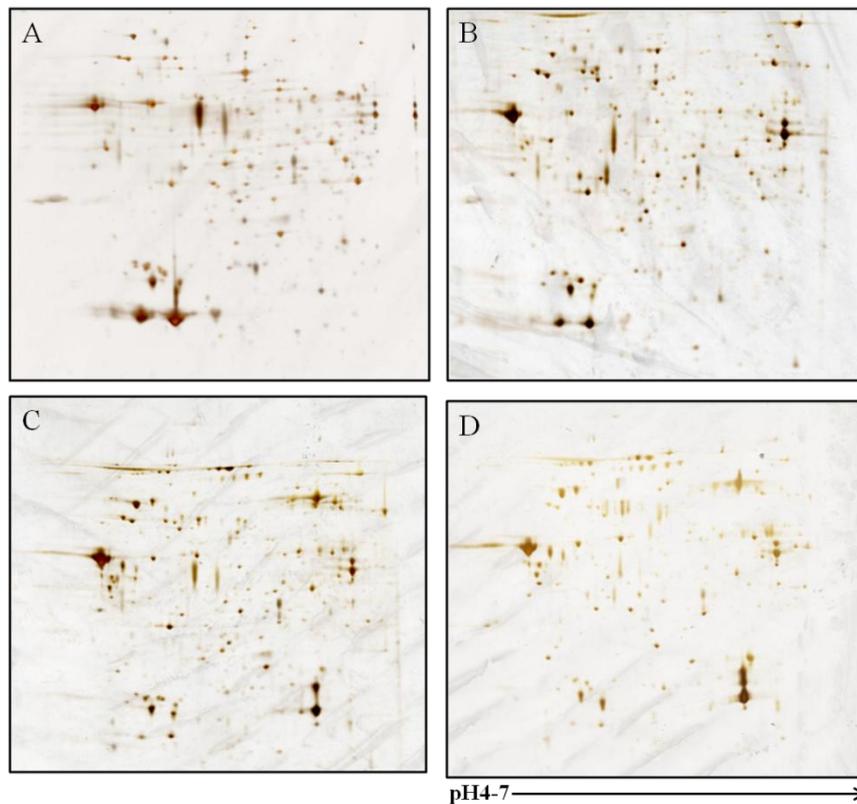


Figura 3.26.- Geles bidimensionales de extractos proteicos enriquecidos en glicoproteínas citosólicas utilizando *strips* de rango de pH 4-7NL. **A.** Cepa FB1. **B.** Cepa FB1 Δ *pmt4*. **C.** Cepa FB1*biz1*^{crg1}. **D.** FB1*biz1*^{crg1} Δ *pmt4*. El revelado se ha realizado no nitrato de plata.

Decidimos entonces aplicar un método más sensible que nos permitiera detectar diferencias en intensidades de una forma más sencilla. Para ello, se llevó a cabo un análisis proteómico mediante 2D-DIGE de la fracción glicosilada de las células en cada condición, para el que se realizaron tres réplicas biológicas de cada una de ellas. Las muestras proteicas fueron marcadas cada una con dos fluoróforos diferentes Cy3-Dye y

Cy5-Dye, y un estándar, producto de la mezcla de todas las muestras, se marcó con el fluoróforo Cy2-Dye. En cada uno de los geles se combinaron aleatoriamente dos de las condiciones en estudio y el estándar. En la Figura 3.27 podemos observar la distribución de cada una de las muestras empleadas en un análisis de componentes principales, así como un gel donde aparecen marcadas las proteínas que fueron seleccionadas por presentar un cambio estadísticamente significativo (t student ≤ 0.05 y al menos 1.5 veces de cambio) entre las distintas condiciones del estudio. Estas proteínas se identificaron como la disulfito isomerasa PDI1, la invertasa SUC2, una corismato mutasa denominada CMU1 y una L- α -arabinofuranosidasa, ABF1.

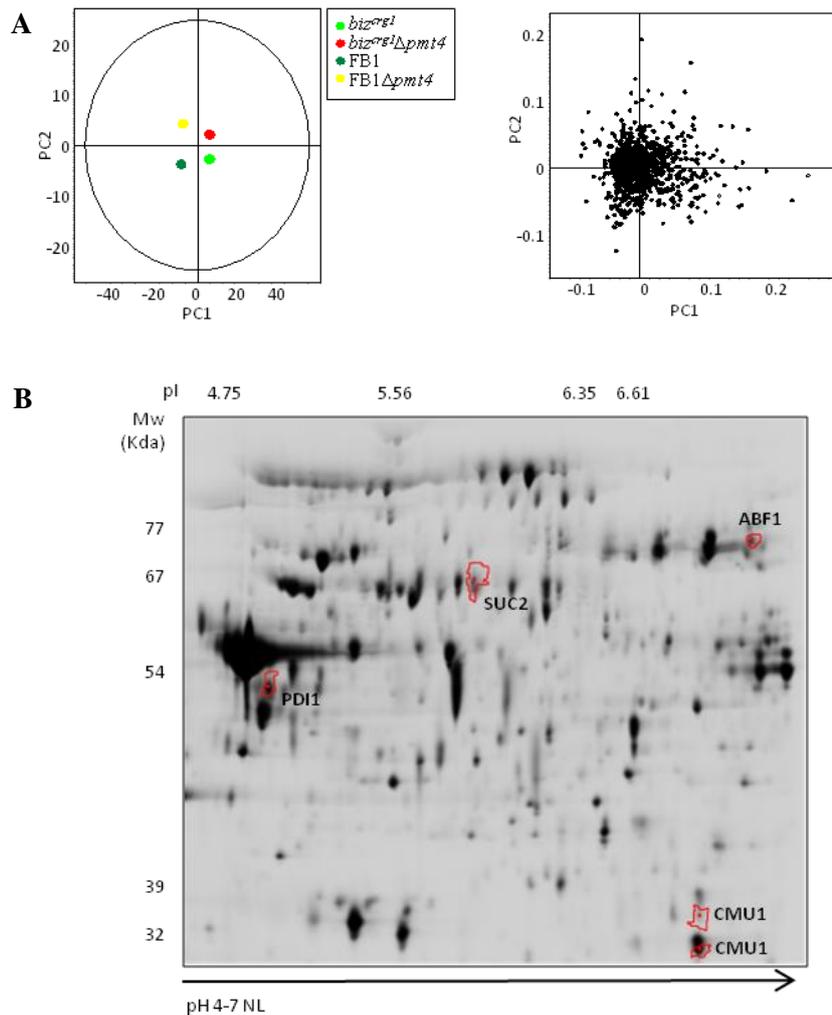


Figura 3.27.- **A.** Distribución de cada una de las cepas empleadas así como de cada uno de los *spot* detectados en un análisis de componentes principales. **B.** Electroforesis bidimensional de proteínas donde aparecen marcadas las proteínas que fueron seleccionadas por presentar un cambio estadísticamente significativo entre las distintas condiciones del estudio.

En la Figura 3.28 podemos observar la abundancia relativa de cada una de las proteínas halladas en el análisis en cada una de las cepas analizadas, así como una imagen con más detalle que muestra el cambio electroforético que sufre cada una de ellas.

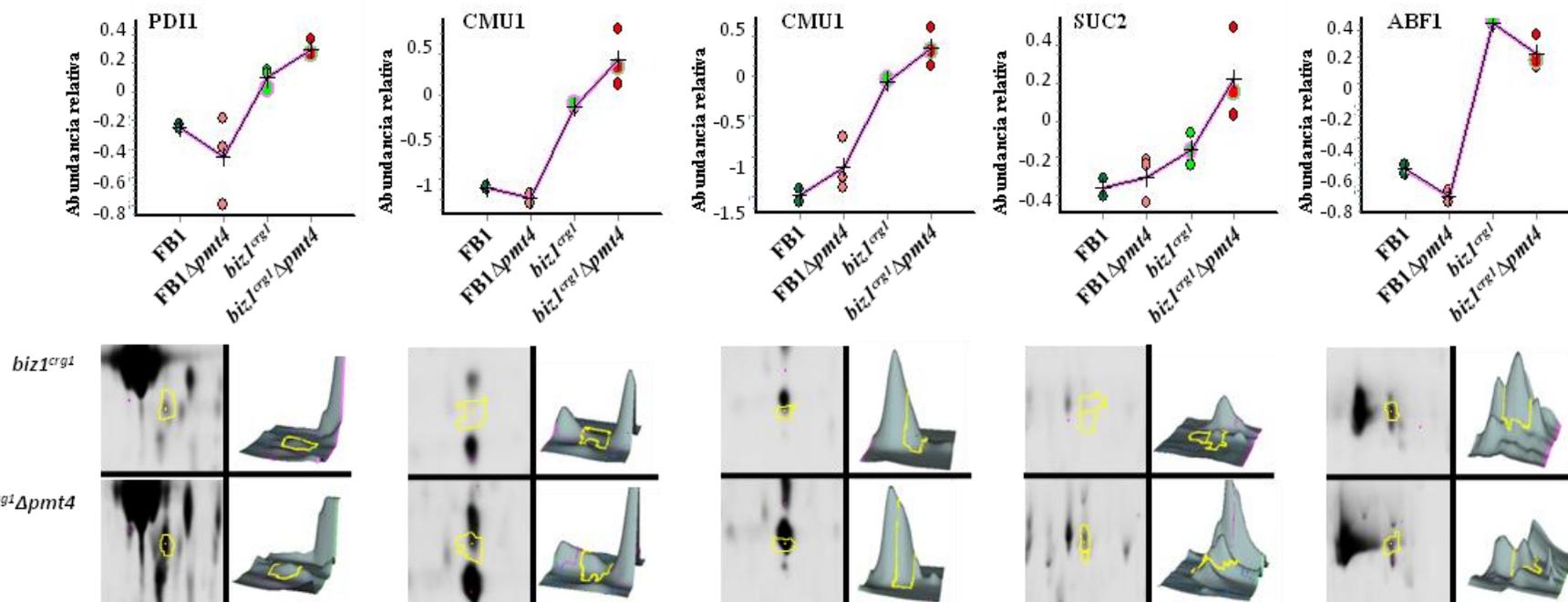


Figura 3.28.- Análisis de las cuatro proteínas PDI1, CMU1, SUC2 y ABF1, detectadas por el software por presentar un cambio estadísticamente significativo. En la parte superior se puede observar la abundancia relativa de cada una de estas proteínas en las cepas de estudio y en la parte inferior una ampliación de la región del gel 2D donde se localizaban estas proteínas en las cepas de estudio *biz1^{crg1}* y *biz1^{crg1}Δpmt4*, junto con un perfil del gel en tres dimensiones donde puede apreciarse el cambio sufrido por estas proteínas entre ambas situaciones.

2.4.- Caracterización de los mutantes $\Delta pdi1$, $\Delta suc2$ y $\Delta abf1$.

Con el objetivo de determinar el papel de las proteínas identificadas en la formación de biofilm, los genes que codifican para las mismas fueron deletados en una cepa silvestre del hongo *U. maydis*. En estos mutantes se ensayó tanto la velocidad de formación de biofilm respecto al silvestre como el efecto que tenían estas proteínas en el proceso infeccioso de dicho hongo. Debido a que ya se ha demostrado el papel de CMU1 en la interacción hongo-planta como un efector que altera el metabolismo de la planta para favorecer su crecimiento (Djamei et al., 2011), hemos decidido continuar el trabajo con las otras tres proteínas identificadas.

2.4.1.- Formación de biofilm.

Con respecto a la formación de biofilm, tres de los cuatro mutantes deletados para cada una de las proteínas halladas fueron ensayados para ver la capacidad de formar biofilm que presentaban. Para ello se inocularon tubos con 5 ml de medio YPDU con 5×10^{-3} células procedentes de un cultivo exponencial. Los tubos se incubaron en estático a 25°C y se observó el desarrollo del biofilm formado por ellos hasta que éste envejeció o se cayó, siguiendo una escala arbitraria de 0 a 6, siendo 0 sin biofilm y 6 biofilm viejo o caído. Como puede observarse en la Figura 3.29. todos los mutantes muestran un crecimiento inferior al mostrado por la cepa silvestre. Es interesante destacar que el mutante $\Delta suc2$ forma sólo pequeños islotes hasta el día 4 y a partir de ese momento se deteriora completamente, no llegando a formar un biofilm bueno en ningún momento.

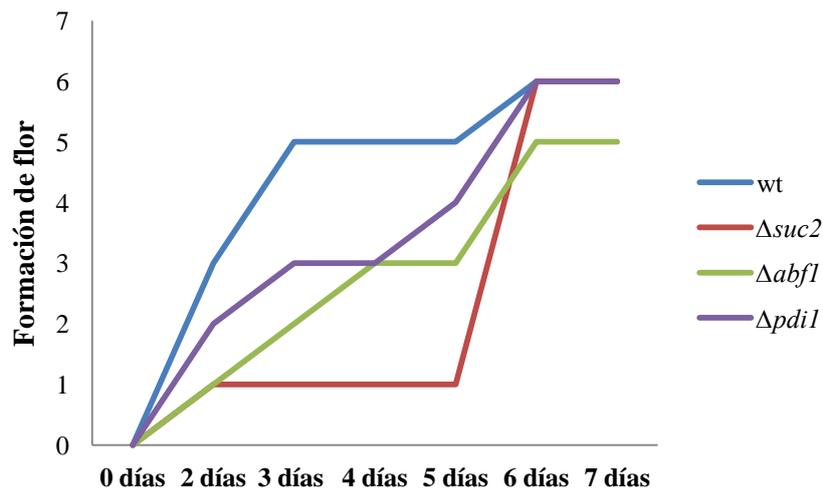


Figura 3.29.- Velocidad de formación de flor presentada por las cepas silvestre, $\Delta suc2$, $\Delta abf1$ y $\Delta pdi1$ partiendo de cultivos exponenciales expuestos a crecimiento en estático una vez alcanzada la fase exponencial. (0, sin biofilm; 1, islas pequeñas-muy poco en los bordes; 2, islas grandes-borde cubierto; 3, casi toda la superficie cubierta por el biofilm; 4, toda la superficie cubierta por el biofilm; 5, biofilm empieza a caerse y 6, viejo-caído).

En la Figura 3.30 podemos observar el biofilm formado por cada uno de los mutantes estudiados respecto a la cepa silvestre a los cuatro días de crecimiento sin agitación.

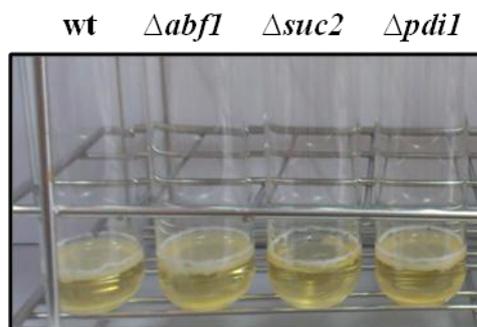


Figura 3.30.- Biofilm formado por las cepas CL13 (wt), $\Delta suc2$, $\Delta abf1$ y $\Delta pdi1$.

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que las tres proteínas ensayadas están, de alguna forma, implicadas en la formación de biofilm.

2.4.2.- Efecto en fitopatogénesis.

Puesto que la filamentación, adhesión y, posiblemente, la formación de biofilm están implicados en la infección de la planta de maíz por parte de este hongo, ensayamos el efecto que la ausencia de estas proteínas puede tener en la virulencia del mismo. Para ello, inoculamos cultivos de los diferentes mutantes y la cepa silvestre correspondiente en hojas de maíz, una semana después de plantar las semillas y observamos los síntomas de la infección a los 14 días, diferenciando entre plantas sin tumores, plantas con tumores menores de 1mm y plantas con tumores mayores o iguales a 1 mm. En la Figura 3.31 se muestran los síntomas observados en las hojas de las plantas infectadas con cada una de las cepas mencionadas, y en la gráfica se representan los resultados totales de la inoculación con las mismas cepas. Como se puede observar, los tres mutantes presentan defectos graves durante la infección, ya que aunque en la gráfica los mutantes para SUC2 y ABF1 muestran tumores mayores de 1 mm, el número de plantas con dichos tumores es menor que los presentados por la cepa silvestre, y además, como se observa en las imágenes de las hojas, en todos los casos el número de tumores presentes en las mismas es muy reducido.

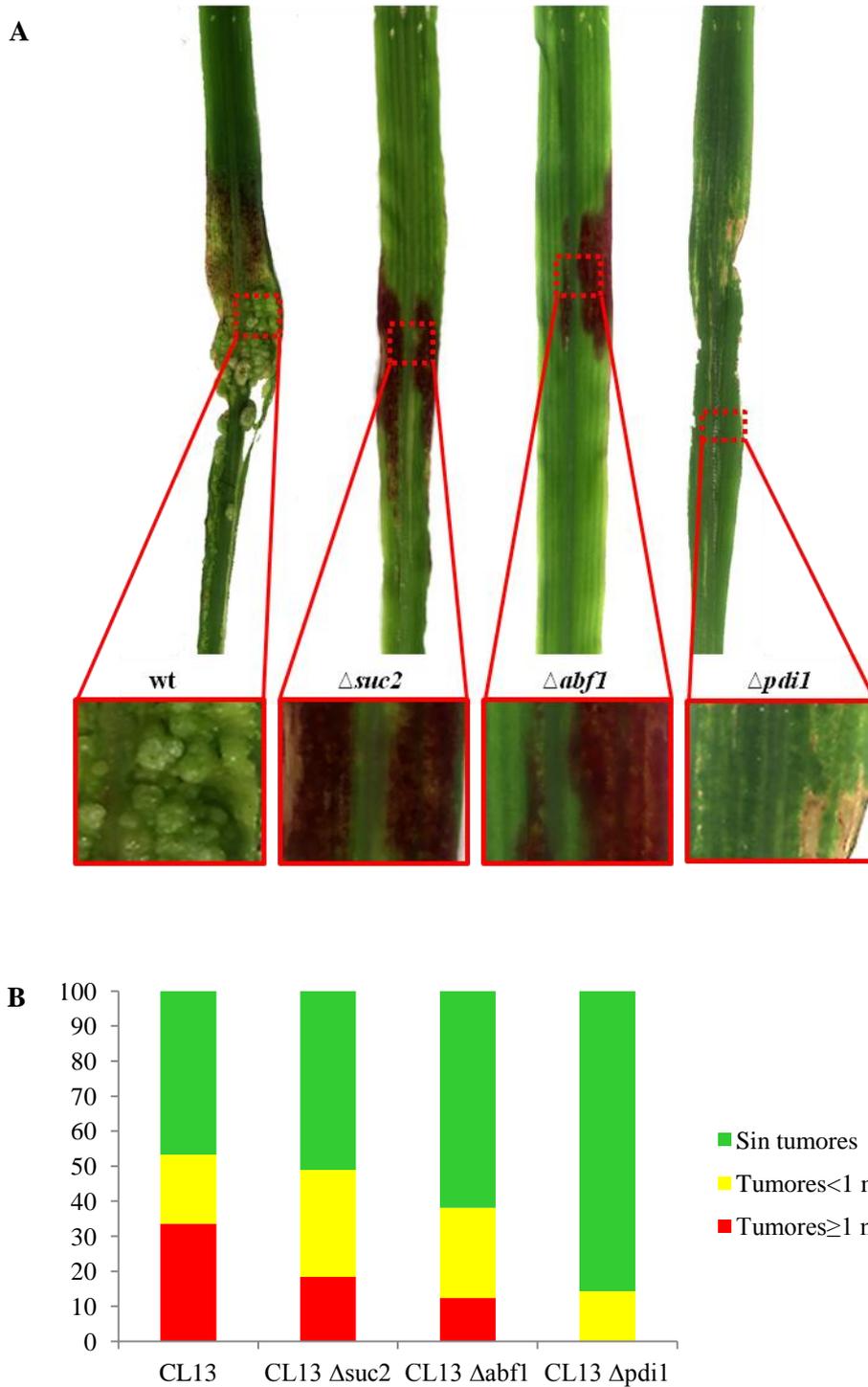


Figura 3.31.- Ensayo de infección de los distintos mutantes en plantas de maíz. **A.** Imágenes de las plantas infectadas a los 14 dpi, con ampliación de la zona donde se localizan los tumores. **B.** Número de tumores formados por cada cepa, observándose en todas ellas una disminución de tumores formados respecto al control.

Discusión

Como ya se ha comentado a lo largo del trabajo, el objetivo fundamental de este capítulo ha sido el de generar una levadura que agrupara algunas propiedades ventajosas de las que presentan las levaduras aisladas en la primera parte del proyecto, y que están directamente relacionadas con la maduración del vino Fino. El análisis de la ploidía presentada por estas levaduras muestra que todas ellas poseen un contenido de ADN superior al haploide, que en uno de los casos llega a triplicarlo. Estas variaciones en el contenido de ADN, provocadas generalmente por aneuploidias en los distintos cromosomas, lleva apareada una incapacidad para desarrollar la esporulación y conjugación, limitando las posibilidades de plantear su mejora genética empleando los sistemas naturales de cruzamiento y segregación. Dentro de las técnicas disponibles y comentadas anteriormente para la mejora clásica de levaduras, hemos seleccionado la generación de híbridos, puesto que el empleo de la mutagénesis al azar implicaría una alta probabilidad de alterar otras características industriales de interés, además de la dificultad que implicaría la selección de las características a mejorar.

Las cepas seleccionadas para llevar a cabo la mejora han sido las dos cepas mayoritarias halladas en la D.O. Montilla-Moriles, la cepa A y la cepa B, y una tercera, la cepa D por mostrar ciertas propiedades de interés. El hecho que la cepa A se localice en porcentajes superiores al 80% en cuatro de las cinco bodegas analizadas en este estudio, además de ser, aparentemente la misma levadura aisladas mayoritariamente en bodegas de la D.O. Jerez hace 20 años (Ibeas, 1996), y una de las mayoritarias en un análisis que nuestro grupo está realizando actualmente en la misma Denominación de Origen, indica que su grado de adaptación a las condiciones en las que se produce este vino es excelente. En cuanto a la cepa B, su presencia mayoritaria en una bodega, en la que desplaza a la gran destacada, la cepa A, la hacen también interesante para la mejora. Además, estas tres cepas presentan características particulares, interesantes desde el punto de vista de la industria productora del vino Fino, como un rápido crecimiento, alta velocidad de formación de flor y capacidad de imponerse en determinados porcentajes de etanol y temperatura, en el caso de las cepas A y D y una gran producción de acetaldehído, componente importante en las características organolépticas de este vino, para la cepa B.

Para llevar a cabo la hibridación entre las levaduras seleccionadas hemos empleado la fusión de protoplastos y el rare mating. En todas las combinaciones ensayadas, con diferentes y numerosas estrategias para la selección de los posibles híbridos, la frecuencia de hibridación ha sido muy baja, algo que era de esperar por la complejidad presentada por estas levaduras silvestres, y tan sólo en una fusión se obtuvieron colonias, de las que posteriormente se comprobó que correspondían a mutantes espontáneos resistentes a higromicina. Estos resultados guardan concordancia con trabajos previos, en los que la frecuencia de eventos de hibridación tras la fusión de protoplastos o el rare mating era también muy baja (Gunge and Nakatomi, 1972; Bell et al., 1998; Pérez-Través et al., 2012).

Dada la incapacidad de obtener híbridos con estas técnicas decidimos cambiar de estrategia hacía el intercambio mitocondrial entre estas levaduras, de forma que a través

de éste se pudieran generar nuevas cepas con una combinación núcleo-mitocondria que presentara nuevas propiedades o modificaciones de las ya existentes en la cepa parental. Se ha descrito que el ADN mitocondrial es responsable, al menos en parte, de características como la frecuencia de mutantes rho-, la viabilidad en alcohol y temperatura, la esporulación, etc. (Jiménez and Benítez, 1988; Codón et al., 1995). Su papel respecto a la tolerancia a etanol se pudo comprobar con las cepas K^a, K^b y K^d, procedentes del intercambio entre K^p, y las diferentes cepas de flor, que poseen el núcleo de la cepa Kar y las mitocondrias de las cepas correspondientes, y en las que éstas aportaron la capacidad de crecer en etanol en concentraciones de hasta un 10%.

La primera parte del intercambio de mitocondrias, el paso de la mitocondria de una cepa de flor a la cepa K, aunque costosa, resultó fructífera, y se obtuvieron las cepas K^a, K^b y K^d antes mencionadas. Sin embargo, en la segunda parte, la transferencia de la mitocondria desde estas cepas a una cepa de flor diferente, la frecuencia de éxito fue bastante baja, y la mayor parte de los intentos acabaron por originar híbridos entre las cepas K^a, K^b y K^d y la cepa de flor petite con la que se había fusionado. Podemos pensar que eso se debiera a problemas técnicos cuando interviene en ellos una cepa de flor rho-, o que se trate de una incompatibilidad núcleo-mitocondria, ya descrita por otros autores (Lee et al., 2008), aunque resulta sorprendente que la cepa Kar pueda crecer con la mitocondria de una cepa de flor, pero una cepa de flor no sea capaz de crecer con la mitocondria de otra cepa de flor diferente.

De las técnicas empleadas para detectar si la cepa resultante del intercambio mitocondrial era la esperada o se trata de un híbrido entre ambos parentales, fue el análisis de su cariotipo mediante CHEF el que determinó de forma irrefutable el genoma resultante. El genoma nuclear de las cepas obtenidas fue estudiado en primer lugar por análisis de microsatélites, mostrando menos resolución a la hora de diferenciar las cepas obtenidas en los intercambios, que el CHEF. Los híbridos obtenidos mostraban alta variabilidad en sus genomas nucleares con respecto a las cepas parentales, probablemente debido a diferentes procesos de pérdida y reorganización del material genético de ambos parentales que ocurren durante los estados tempranos de la fusión.

Con respecto al análisis del RFLPmit, éste puso de manifiesto que en la mayor parte de los casos la transferencia mitocondrial ocurría satisfactoriamente, como era de esperar, puesto que sólo una de las cepas aporta mitocondria. Sin embargo, en dos de los casos, los de las KB*^d y KD*^a, observamos variabilidad en el patrón de RFLPmit con respecto a lo esperado, posiblemente como fruto de reorganizaciones sufridas también por el genoma mitocondrial.

La única cepa obtenida, en la que el intercambio mitocondrial fue llevado a cabo con éxito, fue la cepa D^b. Esta cepa posee la mitocondria de una cepa de flor agrupada dentro del grupo taxonómico montuliensis (cepa B) y el núcleo de una cepa de flor perteneciente al grupo taxonómico beticus (cepa D). Puesto que una de las características de la cepa B es la alta producción de acetaldehído, y esto parece tener

una vinculación directa con la mitocondria, ya que es un producto derivado de la respiración, cabría esperar que la cepa D^b produjese mayor cantidad de acetaldehído. En esta cepa la mitocondria también ha marcado la capacidad de crecer en medios con etanol como única fuente de carbono, comportándose en ellos al igual que el parental B. Con respecto a la cepa híbrida KB^a, su crecimiento en los medios YPE 5 y 10% v/v de etanol, se ha visto notablemente mejorado con respecto a la cepa parental B que crece muy lentamente, posiblemente debido a las características aportadas por la mitocondria de A, aunque por tratarse de un híbrido nunca podríamos descartar un efecto del genoma de la cepa Kar. El análisis del crecimiento del híbrido KA^b en los medios YPE5 y 10% v/v de etanol, muestra que si bien el resultado final es similar al de la cepa A y al híbrido KB^a, la fase inicial de crecimiento se ve notablemente mejorada, pudiendo atribuir esta mejora, de nuevo, al resultado de la fusión de los dos genomas. Cuando se comparó el crecimiento en mosto sintético de los híbridos KB^a y KA^b, con respecto a sus parentales se observó su comportamiento viene determinado por su genoma, con resultado similar para las cepas A y KA^b, y B y KB^a. En este caso la unión de los genomas no afecta al crecimiento, por lo que podemos pensar que la hibridación estaría favoreciendo el crecimiento de estas cepas exclusivamente en medio con etanol como única fuente de carbono. Resulta sorprendente, en cualquier caso, que la unión de una cepa de flor con una cepa de laboratorio genere un híbrido con mejor capacidad de crecimiento en medios en el que esta última es incapaz de crecer.

Otra estrategia seguida para la mejora de las levaduras de flor ha sido la búsqueda de proteínas implicadas en la formación de biofilm, característica principal de estas levaduras (Fidalgo et al., 2006). Para ello hemos trabajado con el hongo fitopatógeno *U. maydis*, por presentar éste una capacidad de formación de biofilm en superficie líquida similar a la encontrada en las cepas de flor, pero de forma más rápida. En primer lugar se realizaron búsquedas de homólogos a la adhesina Flo11p de *S. cerevisiae* y Als1p en el genoma del hongo *U. maydis*, no encontrándose ningún homólogo tras las diferentes estrategias empleadas.

En hongos patógenos como *C. albicans* su patogenicidad va a menudo asociada con la formación de biofilm en superficies tanto biológicas como inertes (Thomas et al., 2006). La superficie celular tiene un papel importante en ambos aspectos, ya que es la encargada de mediar entre el hongo y el medio, y en última instancia son las proteínas presentes en ellas, principalmente manoproteínas, las que juegan un importante papel estructural y fisiológico, incluyendo en él virulencia, morfogénesis, adherencia y presentación de antígenos (Chaffin et al., 1998). Por esto consideramos importante analizar las proteínas asociadas con la superficie celular del hongo durante el biofilm, y compararlo con sus equivalentes en la superficie celular de células creciendo en cultivo. Sin embargo, mientras en estudios similares llevados a cabo en *C. albicans*, las muestras proteicas procedentes de la superficie celular, tanto de células creciendo en biofilm como de células creciendo en condiciones de cultivo, presentaron un alto grado de similaridad (Thomas et al., 2006), este abordaje llevado a cabo en *U. maydis* pone de manifiesto una gran diferencia entre ambos extractos proteicos, presentando muchas

más proteínas el extracto procedente de células de cultivo que el de células formando biofilm.

Del mismo modo, creímos interesante analizar las proteínas que se encontraban formando parte de la matriz extracelular que engloba a las células que forman el biofilm, presentando una función estructural y de protección hacia estas células. Baillie y Douglas en el 2000 analizaron la matriz del biofilm de *C. albicans* encontrando que en su composición sólo un 5% eran proteínas, y el resto integrado por carbohidratos, fósforos y hexosaminas. La naturaleza de estas proteínas era desconocida hasta que Thomas y colaboradores en 2006 llevaron a cabo un estudio proteómico de la matriz del biofilm de *C. albicans*, comparando un extracto proteico procedente de la misma con las proteínas secretadas al medio por células creciendo en cultivo, donde hallaron una gran similitud entre ambos extractos. Esto indicaría que parte de las proteínas que las células secretan en estado de cultivo pasarían a formar parte de la matriz extracelular en el caso del biofilm. Estas proteínas secretadas abarcaban un amplio rango de masas moleculares, existiendo una gran representación de proteínas con alto peso molecular lo que se corresponde probablemente con altos niveles de glicosilación. En nuestro estudio en *U. maydis*, del mismo modo que para las proteínas integrantes de la pared celular, el análisis de las proteínas pertenecientes a la matriz extracelular del biofilm, reveló la presencia de un reducido número de proteínas y con ello una diferencia entre ellas y las proteínas secretadas al medio en células creciendo en cultivo. Pensamos que durante la separación de las células de la matriz, gran parte de las proteínas adheridas a la pared celular son retiradas de la misma, lo que puede alterar los resultados.

Por los resultados obtenidos en el análisis de las proteínas de pared celular y matriz extracelular en este estudio y puesto que para el correcto desarrollo del biofilm es fundamental la adhesión de las células y la filamentación previa a la formación de esta estructura, como se ha descrito en el organismo modelo por excelencia del estudio del biofilm, *C. albicans* (Blankenship and Mitchell., 2006; Finkel and Mitchell, 2011), planteamos un abordaje proteómico con el hongo *U. maydis* teniendo como pilares del mismo una proteína implicada en adhesión y glicosilación, PMT4, y un factor transcripcional implicado en filamentación, BIZ1. Puesto que muchas de las proteínas halladas en la matriz fueron manoproteínas con afinidad a Con A, y dado que PMT4 es una O-manosiltransferasa implicada en el proceso de manosilación de proteínas, los extractos proteicos para este abordaje fueron purificados por cromatografía de afinidad a esta lectina. Para disminuir los problemas técnicos que entrañaba el experimento, sobre todo por volumen de cultivo y contaminación con componentes de la matriz extracelular, al tratarse de proteínas que iban a formar parte de la superficie celular o ser secretadas, decidimos trabajar con los extractos de proteínas citosólicas altamente glicosiladas, ya que la glicosilación es un requisito imprescindible para que estas alcancen sus destinos finales.

Los extractos proteicos correspondían a cepas que sobreexpresaban el factor transcripcional BIZ1, con y sin la delección de *pmt4*, frente a los controles pertinentes sin la sobreexpresión de *biz1*. De esta forma identificamos cuatro proteínas

dependientes de BIZ1 cuya movilidad electroforética o intensidad se veía afectada por PMT4, la mayoría de ellas secretadas y con funciones relevantes en la patogénesis del hongo, de lo que hablaremos más adelante. Las proteínas identificadas correspondían a una disulfito isomerasa PDI1, con homología a Pdi1p de *S. cerevisiae*, la invertasa SUC2, también presente en *S. cerevisiae*, una corismato mutasa CMU1 y una L- α -arabinofuranosidasa ABF1, estas últimas sin homología en *S. cerevisiae*.

Se generaron los mutantes con la delección de los genes que codificaban para las proteínas PDI1, SUC2 y ABF1 en *U. maydis*. Con ellos se hicieron ensayos de formación de biofilm, comparando con la cepa silvestre y observamos que todas estas proteínas tienen una implicación en la formación de biofilm, al menos en este organismo, puesto que los mutantes ralentizan el proceso, o incluso son incapaces de formar el biofilm adecuadamente, respecto a la cepa silvestre. Se abre en este punto del estudio el camino para profundizar en la implicación que podrían tener estas proteínas en el biofilm formado por *S. cerevisiae*, ofreciendo una vía para la mejora del mismo. Aunque *Saccharomyces*, un ascomiceto y *Ustilago*, un basidiomiceto, son bastantes distantes en la escala filogenética, comparten por ejemplo ciertas similitudes como el control genético que se ejerce sobre una levadura a la hora de convertirse a su forma filamentosa, ya que ambos organismos haploides levaduriformes son incapaces de desarrollar la forma filamentosa hasta que pasan a ser diploides, o dicariontes en el caso de *Ustilago*, heterocigotos para el locus MAT (Gimeno et al., 1992). Puede que en el caso de la formación de biofilm ambos organismos tampoco sean tan diferentes y del mismo modo que estas proteínas afectan al desarrollo del biofilm en *Ustilago* lo hagan en el caso de *S. cerevisiae* al desarrollar el velo de flor.

Puesto que se ha descrito en otros hongos patógenos, principalmente en *C. albicans*, una relación directa entre el biofilm y la patogénesis, decidimos analizar el efecto que la delección de estos genes tendría en la patogénesis sobre la planta de maíz. El resultado obtenido fue que los tres mutantes ensayados habían disminuido su capacidad virulenta con respecto a la cepa silvestre, que se manifestaba como una reducción del número de tumores formados en todos los casos, y del tamaño de los mismos. De todos ellos fue el mutante *Apdi1* el que presentaba una mayor disminución en el número de tumores, no llegando a formar ninguno mayor o igual a 1mm. Podemos pensar que la agrupación de células durante la infección, y/o la producción de matriz extracelular que las rodea, puede favorecer la adhesión de estas a la superficie de la planta, además de actuar como barrera a los sistemas de defensa de la misma, que se activan tras la detección de la presencia de un patógeno sobre ella. La matriz extracelular puede camuflar los elementos de la superficie del hongo que activan estas defensas, así como evitar el paso de los compuestos antifúngicos producidos y secretados por las células de la planta.

En cuanto al papel que estas proteínas puedan tener durante la formación de biofilm, así como durante la patogénesis, en el caso de PDI1, una proteína implicada en el plegamiento de proteínas glicosiladas, pensamos que, de forma general, su ausencia provoca defectos en la glicosilación de proteínas, entre las que se pueden encontrar

adhesinas implicadas en la adhesión a células y sustratos, glicoproteínas de pared celular que bloquean el paso de compuestos antigúngicos producidos por las plantas, así como efectores, como ocurre con CMU1, secretados por el hongo y necesarios durante el proceso de infección. En el caso de la invertasa SUC2 y la arabinofuranosidasa ABF1, ambas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, se puede pensar que su ausencia provoque una alteración de la composición en azúcares en la matriz extracelular, así como en las proteínas glicosiladas de la pared celular, que modifique su actividad tanto durante la formación del biofilm como durante la patogénesis.

Los datos obtenidos sobre el biofilm de *U. maydis* abren un campo muy interesante sobre el que seguir profundizando en las implicaciones individuales que estas proteínas puedan tener en el proceso patogénico, y establecer una relación entre la formación del biofilm y la virulencia de este hongo, como ocurre en el caso de *C. albicans* y algunos otros hongos.

Conclusiones

1. En la D.O. Montilla-Moriles se han aislado cinco cepas de levaduras responsables de la crianza biológica de sus vinos, en función de las pruebas moleculares realizadas, a las que hemos denominado cepas A, B, C, D y E. De ellas la cepa A es la mayoritaria en cuatro de las cinco bodegas estudiadas.
2. Las cepas aisladas se clasifican dentro del grupo de 'levaduras de flor' en la especie *S. cerevisiae*, y según los análisis tradicionales de fermentación y asimilación de diferentes azúcares, dentro de los grupos taxonómicos clásicamente denominados como *beticus*, las cepas A, C, D y E, y *montuliensis*, la cepa B.
3. En la mayoría de las condiciones ensayadas, la cepa B es la que presenta un crecimiento más lento. La cepa mayoritaria A, es la que mejor crece en medios con alta concentración de etanol, así como en mosto sintético, lo que puede favorecer su proliferación durante la etapa de fermentación, ampliando las posibilidades de alcanzar e imponerse luego en la fase de crianza biológica.
4. La cepa D es la más rápida en formar la flor a 20°C y la cepa A a 25°C. Sin embargo, la cepa D sólo representa el 1% de las muestras analizadas, aun presentando mayor velocidad a temperaturas más frecuentes dentro de las bodegas. No se establecen relaciones entre la capacidad de formación de flor y los resultados obtenidos en el análisis de la longitud de la región codificante del gen *FLO11*, el nivel de expresión de este gen o la hidrofobicidad celular.
5. En los ensayos de competencia realizados entre las distintas cepas aisladas, hemos observado como la cepa D es la más competente, independientemente del porcentaje de alcohol, de la temperatura y de la cantidad inicial del inóculo. La segunda cepa más competitiva es la cepa A.
6. En todas las combinaciones ensayadas, con diferentes y numerosas estrategias para la selección de híbridos, la frecuencia de hibridación tras la fusión de protoplastos o el *rare mating* ha sido muy baja.
7. En las cepas K^a, K^b y K^d, con núcleo de la cepa Kar y mitocondrias de las cepas de flor correspondientes, se ha visto que la mitocondria aporta la capacidad de crecer en etanol como única fuente de carbono.
8. La cepa D^b ha sido la única obtenida como resultado de transferir la mitocondria desde la cepa B a la cepa D. En esta cepa la mitocondria también ha marcado la capacidad de crecer en medios con etanol como única fuente de carbono, comportándose en ellos al igual que el parental B.
9. El hongo *U. maydis* es capaz de formar un biofilm, similar al que forman las levaduras de flor, en aproximadamente 48 h. Las proteínas de la pared celular de este organismo formando biofilm difieren de las presentes creciendo en cultivo, presentando muchas más proteínas en este último caso. También el análisis de las proteínas pertenecientes a la matriz extracelular del biofilm, reveló la

presencia de un reducido número de proteínas, frente a las secretadas al medio en células creciendo en cultivo.

10. Se han identificado cuatro proteínas dependientes del factor transcripcional BIZ1 cuya movilidad electroforética o intensidad se ve afectada por la O-manosiltransferasa PMT4, en el hongo *U. maydis*. Estas son PDI1, SUC2, CMU1 y ABF1.
11. Las proteínas PDI1, SUC2 y ABF1 están implicadas en la formación de biofilm del hongo *U. maydis* ya que todos los mutantes en estos genes ralentizan este proceso o incluso son incapaces de formar el biofilm adecuadamente, respecto a la cepa silvestre.
12. Con respecto a la patogénesis del hongo *U. maydis*, los mutantes $\Delta pdi1$, $\Delta suc2$ y $\Delta abf1$ se encuentran afectados, presentando una reducción del número de tumores formados y en su tamaño en todos los casos.

ANEXO I.

Tablas

A continuación se exponen las tablas que recogen datos complementarios detallados de este estudio.

ROBLES	Estado de la flor			
	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	Bueno	Regular	Bueno	Bueno
Bota 2	Bueno	Regular	Malo	Malo
Bota 3	Bueno	Bueno	Malo	Malo
Bota 4	Regular	Regular	Bueno	Bueno
Bota 5	Buena	N.M	Bueno	Malo
Bota 6	Regular	N.M	Muy bueno	Regular
Bota 7	Bueno	Bueno	Bueno	Regular
Bota 8	Regular	Regular	Bueno	Regular
Bota 9	Malo	Regular	Sin flor	Malo

Tabla AI.1.- Estado de la flor en las muestras tomadas de la bodega Robles en los cuatro muestreos realizados. (N.M.: no muestreada)

COOPERTRATIVA LA UNIÓN	Estado de la flor			
	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	Regular	Bueno	Bueno	Malo
Bota 2	Bueno	Malo	Bueno	Muy bueno
Bota 3	Bueno	Regular	Malo	Regular
Bota 4	Bueno	Regular	Bueno	Regular
Bota 5	Bueno	Regular	Bueno	Muy bueno
Bota 6	Bueno	Regular	Malo	Regular
Bota 7	N.M	Regular	Muy bueno	Bueno
Bota 8	N.M	N.M	N.M	N.M
Bota 9	N.M	N.M	N.M	N.M

Tabla AI.2.- Estado de la flor en las muestras tomadas de la bodega Cooperativa La Unión en los cuatro muestreos realizados. (N.M.: no muestreada)

PÉREZ BARQUERO	Estado de la flor		
	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	Malo	Malo	Malo
Bota 2	Malo	Bueno	Malo
Bota 3	Malo	Bueno	Malo
Bota 4	Malo	Bueno	Bueno

Bota 5	Regular	Malo	Malo
Bota 6	Regular	Malo	Regular
Bota 7	Malo	Regular	Regular
Bota 8	Regular	Bueno	Bueno
Bota 9	Regular	N.M	N.M

Tabla AI.3.- Estado de la flor en las muestras tomadas de la bodega Pérez Barquero en los cuatro muestreos realizados. (N.M.: no muestreada)

TORO ALVALÁ	Estado de la flor		
	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	Malo	Bueno	Bueno
Bota 2	Malo	Malo	Bueno
Bota 3	Malo	Malo	Malo
Bota 4	Malo	Muy bueno	Bueno
Bota 5	Malo	Bueno	Malo
Bota 6	Malo	Bueno	Bueno
Bota 7	Malo	Bueno	Regular
Bota 8	Malo	Regular	Malo
Bota 9	Regular	Bueno	N.M

Tabla AI.4.- Estado de la flor en las muestras tomadas de la bodega Toro Alvalá en los cuatro muestreos realizados. (N.M.: no muestreada)

ALVEAR	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	50	5	40	50
Bota 2	28	3	5	5
Bota 3	28	4	0	0
Bota 4	3	7	10	15
Bota 5	36	10	0,5	20
Bota 6	5	5	0,5	0,5
Bota 7	16	10	0,5	10
Bota 8	10	3	30	5
Bota 9	18	3	0,5	20

Tabla AI.5.- Porcentaje de viabilidad hallado en la bodega Alvear en cada bota analizada para cada muestreo.

ROBLES	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	38	2	40	30

Bota 2	39	3	1	0,5
Bota 3	31	5	1	3
Bota 4	16	4	45	25
Bota 5	34	8	60	0,5
Bota 6	18	5	60	10
Bota 7	24	14	45	10
Bota 8	9	18	35	30
Bota 9	3	1	0,5	6

Tabla AI.6.- Porcentaje de viabilidad hallado en la bodega Robles en cada bota analizada para cada muestreo.

COOPERATIVA LA UNIÓN	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	15	5	30	0,5
Bota 2	30	1	5	40
Bota 3	21	1	1	8
Bota 4	30	1	45	13
Bota 5	26	2	40	35
Bota 6	33	2	1	3
Bota 7	N.M.	1	60	70
Bota 8	N.M.	2	N.M.	N.M.
Bota 9	N.M.	1	N.M.	N.M.

Tabla AI.7.- Porcentaje de viabilidad hallado en la bodega Cooperativa La Unión en cada bota analizada para cada muestreo. (N.M.: no muestreada)

PÉREZ BARQUERO	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	N.M.	2	4	3
Bota 2	N.M.	0,5	40	1
Bota 3	N.M.	1	40	3
Bota 4	N.M.	2	40	8
Bota 5	N.M.	2	1	2
Bota 6	N.M.	1	2	5
Bota 7	N.M.	1	30	20
Bota 8	N.M.	3	35	50
Bota 9	N.M.	2	N.M.	N.M.

Tabla AI.8.- Porcentaje de viabilidad hallado en la bodega Pérez Barquero en cada bota analizada para cada muestreo. (N.M.: no muestreada)

TORO ALVALÁ	Abril-2010	Junio-2010	Noviembre-2010	Marzo-2011
Bota 1	N.M.	2	30	45
Bota 2	N.M.	1	1	8
Bota 3	N.M.	2	3	8
Bota 4	N.M.	4	55	12
Bota 5	N.M.	1	25	8
Bota 6	N.M.	2	35	45
Bota 7	N.M.	1	40	8
Bota 8	N.M.	3	5	3
Bota 9	N.M.	6	35	N.M.

Tabla AI.9.- Porcentaje de viabilidad hallado en la bodega Toro Alvalá en cada bota analizada para cada muestreo. (N.M.: no muestreada)

Muestras	Abril 2010 (M1)		Junio 2010 (M2)				Noviembre 2010 (M3)					Febrero 2011 (M4)			
	MIT	SAT	MIT		SAT		MIT			SAT		MIT		SAT	
	1	a	1	4	a	c	1	2	3	a	c	1	3	a	c
Bota 1	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%
Bota 2	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%
Bota 3	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%
Bota 4	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%
Bota 5	100%	100%	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	100%				100%		90%	10%	100%
Bota 6	100%	100%	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	50%		50%		100%		100%		100%
Bota 7	100%	100%		100%		100%	100%				100%		100%		100%
Bota 8	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%
Bota 9	100%	100%	100%		100%		100%				100%		100%		100%

Tabla AI.10.- Distribución de las cepas aisladas en la bodega Robles por botas según los patrones obtenidos de cada una de ellas en su estudio de RFLPmit y el análisis de microsátelites. (N.M.: no muestreada).

Muestras	Abril 2010 (M1)				Junio 2010 (M2)				Noviembre 2010 (M3)				Febrero 2011 (M4)				
	MIT		SAT		MIT		SAT		MIT		SAT		MIT		SAT		
	1	2	a	b	1	2	a	b	1	2	a	b	1	2	a	b	d
Bota 1	100%		100%		N.M.	N.M.	N.M.	N.M.		100%		100%		100%		100%	
Bota 2		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 3		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 4		100%		100%	30%	70%	30%	70%	100%		100%		100%		100%		
Bota 5		100%		100%		100%		100%	10%	90%	10%	90%	100%		100%		
Bota 6		100%		100%	40%	60%	40%	60%		100%		100%	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.
Bota 7		100%		100%	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	90%	10%	90%	10%	80%	20%	60%	20%	20%
Bota 8	100%		100%		100%		100%		70%	30%	70%	30%	100%		100%		
Bota 9		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%		100%	

Tabla AI.11.- Distribución de las cepas aisladas en la bodega Alvear por botas según los patrones obtenidos de cada una de ellas en su estudio de RFLPmit y el análisis de microsátélites. (N.M.: no muestreada).

Muestras	Abril 2010 (M1)				Junio 2010 (M2)			Noviembre 2010 (M3)				Febrero 2011 (M4)			
	MIT		SAT		MIT	SAT		MIT		SAT		MIT		SAT	
	1	3	a	d	1	a	d	1	3	a	d	1	3	a	d
Bota 1	100%		100%		100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 2	100%		100%		100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 3	100%		100%		100%	70%	30%	100%		100%		100%		100%	
Bota 4	100%		60%	40%	100%		100%	100%		70%	30%	100%		60%	40%
Bota 5		100%	100%		100%	80%	20%		100%	100%		20%	80%	100%	
Bota 6		100%	100%		100%	70%	30%	50%	50%	100%		100%		100%	
Bota 7	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	100%		100%	100%		100%		100%		100%	
Bota 8	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.
Bota 9	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.

Tabla AI.12.- Distribución de las cepas aisladas en la bodega Cooperativa La Unión por botas según los patrones obtenidos de cada una de ellas en su estudio de RFLPmit y el análisis de microsatélites. (N.M.: no muestreada).

Muestras	Abril 2010 (M1)		Junio 2010 (M2)			Noviembre 2010 (M3)				Febrero 2011 (M4)			
	MIT	SAT	MIT	SAT		MIT		SAT		MIT		SAT	
			1	a	d	1	3	a	d	1	d	a	d
Bota 1	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 2	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 3	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		90%	10%	100%		100%	
Bota 4	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 5	N.M.	N.M.	100%	100%		80%	20%	80%	20%	100%		100%	
Bota 6	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 7	N.M.	N.M.	100%	30%	70%	100%		100%		100%		100%	
Bota 8	N.M.	N.M.	100%	100%		100%		100%		100%		100%	
Bota 9	N.M.	N.M.	100%	100%		N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.	N.M.

Tabla AI.13.- Distribución de las cepas aisladas en la bodega Pérez Barquero por botas según los patrones obtenidos de cada una de ellas en su estudio de RFLPmit y el análisis de microsátélites. (N.M.: no muestreada).

Muestras	Abril 2010 (M1)		Junio 2010 (M2)			Noviembre 2010 (M3)					Febrero 2011 (M4)		
	MIT	SAT	MIT	SAT		MIT			SAT		MIT		SAT
			1	a	d	1	2	3	a	b	1	3	a
Bota 1	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 2	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 3	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 4	N.M.	N.M.	100%	100%		90%	10%		90%	10%	100%		100%
Bota 5	N.M.	N.M.	100%	70%	30%	70%		30%	100%		80%	20%	100%
Bota 6	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 7	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 8	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		100%		100%
Bota 9	N.M.	N.M.	100%	100%		100%			100%		N.M.	N.M.	N.M.

Tabla AI.14.- Distribución de las cepas aisladas en la bodega Toro Alvalá por botas según los patrones obtenidos de cada una de ellas en su estudio de RFLPmit y el análisis de microsátelites. (N.M.: no muestreada)

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	3:19:48	0:33:37
Cepa B	4:25:12	0:12:54
Cepa C	3:54:00	0:26:08
Cepa D	3:49:48	0:28:08
Cepa E	3:47:24	0:12:52

Tabla AI. 15.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPD a 20°C.

	TIEMPO DE GENERACIÓN	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
Cepa A	2:40:48	0:07:19
Cepa B	3:45:00	0:18:49
Cepa C	2:52:48	0:03:27
Cepa D	2:40:48	0:03:07
Cepa E	2:46:12	0:03:16

Tabla AI. 16.- Tiempo de generación de levaduras aisladas en la D.O. Montilla-Moriles creciendo en YPD a 25°C.

		Día 0	Día 3	Día 4	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11	Día 13	Día 14	Día 17
14% alcohol	Cepa A	0	3	3	3	4	4	4	5	5	5
	Cepa B	0	3	3	3	3	3	3	4	4	5
	Cepa C	0	3	3	3	3	3	3	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	3	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	2	2	3	3	3	3	5	5	5
14,5% alcohol	Cepa A	0	3	3	3	4	4	4	5	5	5
	Cepa B	0	3	3	3	3	3	3	4	4	5
	Cepa C	0	3	3	3	3	3	3	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	3	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	2	2	3	3	3	3	5	5	5
15% alcohol	Cepa A	0	2	2	3	4	4	4	5	5	5
	Cepa B	0	2	2	3	3	3	3	4	4	5
	Cepa C	0	2	2	3	3	3	3	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	3	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	2	2	2	3	3	3	4	5	5
15,5% alcohol	Cepa A	0	2	2	3	4	4	4	5	5	5
	Cepa B	0	2	2	3	3	3	3	4	4	5
	Cepa C	0	2	2	3	3	3	3	4	4	5
	Cepa D	0	3	3	3	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	2	2	2	3	3	3	4	5	5

Tabla AI.17.- Velocidad de formación de flor obtenida por las cepas aisladas en D.O. Montilla-Moriles a 20°C y en los porcentajes de alcohol indicados. (0 vino sin flor, 1 islotes pequeños, 2 islotes/casi cubierto, 3 velo fino, 4 velo bueno y 5 velo muy bueno/rugoso).

		Día 0	Día 3	Día 4	Día 6	Día 7	Día 10	Día 11	Día 13	Día 14	Día 17
14% alcohol	Cepa A	0	3	3	4	5	5	5	5	5	5
	Cepa B	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa C	0	3	3	3	3	3	4	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
14,5% alcohol	Cepa A	0	3	3	4	5	5	5	5	5	5
	Cepa B	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa C	0	2	2	3	3	3	4	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa E	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
15% alcohol	Cepa A	0	2	3	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa B	0	2	2	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa C	0	2	2	3	3	3	4	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	4	4	4	5	5	5	5
	Cepa E	0	3	2	4	4	5	5	5	5	5
15,5% alcohol	Cepa A	0	2	2	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa B	0	2	2	3	3	4	4	5	5	5
	Cepa C	0	2	2	2	3	3	4	4	5	5
	Cepa D	0	3	3	4	4	5	5	5	5	5
	Cepa E	0	2	2	4	4	5	5	5	5	5

Tabla AI.18.- Velocidad de formación de flor obtenida por las cepas aisladas en D.O. Montilla-Moriles a 25°C y en los porcentajes de alcohol indicados. (0 vino sin flor, 1 islotes pequeños, 2 islotes/casi cubierto, 3 velo fino, 4 velo bueno y 5 velo muy bueno/rugoso).

BODEGA	PORCENTAJES DE LAS CEPAS A COMPETIR	T0		T1		T2		T3	
		A	B	A	B	A	B	A	B
ALVEAR	A/B	75%/25%	90	10	100		100		100
		75%/25%	50	50	100		100		100
		75%/25%	90	10	100		100		100
		50%/50%	60	40	100		100		100
		50%/50%	30	70	100		100		100
		50%/50%	50	50	100		100		100
		25%/75%	40	60	100		100		100
		25%/75%	40	60	10	90	100		100
		25%/75%	40	60	50	50	100		100

			A	C	A	C	A	C	A	C	
ROBLES	A/C	75%/25%	60	40		100		100		100	
		75%/25%	40	60		100		100		100	
		75%/25%	40	60		100		100		100	
		50%/50%	50	50		100		100		100	
		50%/50%	60	40		100		100		100	
		50%/50%	50	50		100		100		100	
		25%/75%	30	70		100		100		100	
		25%/75%	10	90		100		100		100	
		25%/75%	20	80		100		100		100	
				A	D	A	D	A	D	A	D
	A/D	75%/25%	50	40		100		100		100	
		75%/25%	50	50		100		100		100	
		75%/25%	70	30		100		100		100	
		50%/50%	20	80		100		100		100	
		50%/50%	60	40		100		100		100	
		50%/50%	30	70		100		100		100	
		25%/75%	30	70		100		100		100	
		25%/75%	20	80		100		100		100	
		25%/75%	30	70		100		100		100	
				C	D	C	D	C	D	C	D
	C/D	75%/25%	60	40	20	80	20	80		100	
		75%/25%	60	40	50	50	30	70		100	
		75%/25%	90	10	20	80		100		100	
		50%/50%	80	20		100		100		100	
		50%/50%	80	20		100		100		100	
		50%/50%	80	20		100		100		100	
		25%/75%	30	70		100		100		100	
		25%/75%	30	70		100		100		100	
		25%/75%	50	50	10	90		100		100	

Tabla AI.19.- Porcentaje de colonias halladas en los experimentos de competencia realizados a 15% v/v de etanol y 20°C a T0, T1 (66 días), T2 (104 días) y T3 (165 días).

BODEGA	PORCENTAJES DE LAS CEPAS A COMPETIR	T0		T1		T2		T3	
		A	B	A	B	A	B	A	B
ALVEAR	A/B	75%/25%	85	15	100		100		100
		75%/25%	65	35	100		100		100
		75%/25%	65	35	95	5	100		100
		50%/50%	35	65	100		100		100

		50%/50%	60	40	100		100		100	
		50%/50%	80	20	100		100		100	
		25%/75%	30	70	100		100		100	
		25%/75%	20	80	100		100		100	
		25%/75%	30	70	95	5	100		100	
			A	C	A	C	A	C	A	
ROBLES	A/C	75%/25%	100							
		75%/25%	70	30						
		75%/25%	70	30						
		50%/50%	50	50						
		50%/50%	50	50						
		50%/50%	70	30						
		25%/75%	40	60						
		25%/75%	60	40						
		25%/75%	40	60						
				A	D	A	D	A	D	A
	A/D	75%/25%	40	60		100		100		100
		75%/25%	70	30		100		100		100
		75%/25%	60	40		100		100		100
		50%/50%	30	70		100		100		100
		50%/50%	30	70		100		100		100
		50%/50%	20	80		100		100		100
		25%/75%		100		100		100		100
		25%/75%	30	70		100		100		100
		25%/75%	10	90		100		100		100
				C	D	C	D	C	D	C
	C/D	75%/25%	60	40		100		100		100
		75%/25%	70	30		100		100		100
		75%/25%	70	30		100		100		100
		50%/50%	40	60		100		100		100
		50%/50%	50	50		100		100		100
		50%/50%	50	50		100		100		100
		25%/75%		100		100		100		100
		25%/75%	20	80		100		100		100
		25%/75%	20	80		100		100		100

Tabla AI.20.- Porcentaje de colonias halladas en los experimentos de competencia realizados a 15.5% v/v de etanol y 22.5°C a T0, T1 (22-37 días), T2 (80 días) y T3 (106). (Color gris indica que no se formó flor en esas condiciones).

BODEGA	PORCENTAJES DE LAS CEPAS A COMPETIR		T0		T1		T2		T3	
			A	B	A	B	A	B	A	B
ALVEAR	A/B	75%/25%	70	30						
		75%/25%	80	20						
		75%/25%	60	40						
		50%/50%	20	80		100		100	20	80
		50%/50%	50	50		100		100		100
		50%/50%	40	60		100	10	90		100
		25%/75%	30	70		100		100		100
		25%/75%	40	60		100	20	80		100
		25%/75%	20	80		100	10	90	30	70

Tabla AI.21.- Porcentaje de colonias halladas en los experimentos de competencia realizados a 14% v/v de etanol y 20°C a T0, T1 (42 días), T2 (80 días) y T3 (136). (Color gris indica que no se formó flor en esas condiciones).

Cepa A	Día	PH	T ^a	SO ₂ T	AC.VOLATIL	OH	ACETALDEHIDO	FE
Garrafa 1	1	3,37	28	51,2	0,22	14,8	117	4
	51	3,41	24	60,8	0,23	14,3	122	4
	70	3,4	23	60,7	0,03	14,1	88	4
	98	3,42	22	65	0,06	14	95	4
	131	3,41	20	60,4	0,1	14,1	93	4
	153	3,24	15	60	0,1	14,1	89	4
	173	3,22	16	60	0,09	14,1	101	4
Garrafa 2	1	3,36	28	57,6	0,19	14,8	101	4
	51	3,38	24	51,2	0,15	14,4	108	4
	70	3,4	22	54,4	0,09	14,1	87	4
	98	3,4	21	55	0,05	14	89	4
	131	3,41	21	65	0,06	14	91	4
	153	3,2	15	64	0,05	14	74	4
	173	3,22	16	65	0,05	14	99	4
Garrafa 3	1	3,37	28	57,6	0,16	14,9	120	4
	51	3,42	24	54,4	0,17	14,4	124	4
	70	3,37	23	60,8	0,08	14,1	90	4
	98	3,4	20	62	0,07	13,6	95	4
	131	3,41	20	66	0,08	13,7	98	4
	153	3,21	15	66	0,09	13,7	120	4
	173	3,22	16	66	0,01	13,7	139	4

Tabla AI.22.- Resultados del análisis de vinificación en laboratorio para las tres réplicas en garrafas de la Cepa A.

Cepa B	Día	PH	Tª	SO ₂ T	AC.VOLATIL	OH	ACETALDEHIDO	FE
Garrafa 1	1	3,38	28	51,2	0,19	14,6	192	4
	51	3,42	24	60,8	0,19	14,2	318	4
	70	3,4	22	54,5	0,11	13,5	341	4
	98	3,42	21	58	0,24	13,8	405	4
	131	3,42	21	67	0,31	13,8	536	4
	153	3,21	15	66	0,33	13,8	520	4
	173	3,21	16	65	0,34	13,8	540	4
Garrafa 2	70	3,38	23	44,8	0,23	14,5	218	4
	98	3,4	23	48,2	0,43	14,4	340	4
	131	3,4	20	59	0,52	14,4	600	4
	153	3,2	15	58	0,55	14,4	600	4
	173	3,21	16	60	0,56	14,4	600	4
Garrafa 3	70	3,4	23	44,8	0,2	14,6	231	4
	98	3,4	22	59,5	0,3	14,7	300	4
	131	3,41	20	55	0,34	14,6	576	4
	153	3,19	15	56	0,33	14,6	600	4
	173	3,21	16	57	0,35	14,7	600	4

Tabla AI.23.- Resultados del análisis de vinificación en laboratorio para las tres réplicas en garrafas de la Cepa B.

Cepa D	Día	PH	Tª	SO ₂ T	AC.VOLATIL	OH	ACETALDEHIDO	FE
Garrafa 1	1	3,42	28	60,8	0,11	14,2	221	4
	51	3,45	24	67,2	0,12	13,6	232	4
	70	3,44	23	67,2	0,23	13,1	320	4
	98	3,4	22	60,2	0,3	13,3	278	4
	131	3,44	20	86	0,34	13,3	537	4
	153	3,24	15	86	0,34	13,3	600	4
	173	3,24	16	82	0,34	13,3	600	4
Garrafa 2	1	3,39	28	48	0,11	14,4	398	4
	51	3,43	24	60,8	0,12	13,9	215	4
	70	3,43	22	56,8	0,2	13,4	166	4
	98	3,41	21	76	0,37	13,4	199	4
	131	3,44	20	88	0,49	13,5	288	4
	153	3,22	15	88	0,49	13,5	285	4
	173	3,25	16	87	0,49	13,5	278	4
Garrafa 3	1	3,39	28	70,4	0,18	14,2	254	4
	51	3,44	24	67,2	0,12	13,9	116	4
	70	3,43	23	63,6	0,36	13,3	213	4
	98	3,4	21	80	0,25	13,5	200	4
	131	3,45	20	95	0,18	13,4	232	4
	153	3,26	16	97	0,2	13,4	255	4

	173	3,25	16	95	0,21	13,5	260	4
--	-----	------	----	----	------	------	-----	---

Tabla AI.24.- Resultados del análisis de vinificación en laboratorio para las tres réplicas en garrafas de la Cepa D.

Cepa A	Día	Alcohol	Ac. Volátil	Acetaldehido	Ac. Etilo	Glicerina
Réplica 1	43	15,00	0,27	117	32	5,57
	84	14,56	0,14	79	28	3,69
	120	14,06	0,02	84	25	1,88
	156	13,61	0,05	65	12	0,95
	199	13,55	0,04	69	11	0,50
Réplica 2	43	14,97	0,22	93	31	5,97
	84	14,57	0,12	78	27	3,69
	120	14,13	0,02	75	23	1,90
	156	13,37	0,04	92	12	1,89
	199	13,61	0,04	61	14	0,57
Réplica 3	43	14,96	0,26	80	32	5,86
	84	14,59	0,13	77	27	3,68
	120	14,14	0,02	57	22	1,52
	156	13,49	0,03	85	12	1,78
	199	13,67	0,03	60	15	0,63

Tabla AI.25.- Resultados del análisis de vinificación en bodega para las tres réplicas en garrafas de la Cepa A.

Cepa B	Día	Alcohol	Ac. Volátil	Acetaldehido	Ac. Etilo	Glicerina
Réplica 1	51	14,94	0,22	140	30	5,89
	84	14,54	0,13	265	29	3,89
	120	14,16	0,02	141	27	2,09
	156	13,66	0,01	154	13	3,08
	199	13,86	0,01	145	20	1,36
Réplica 2	51	14,91	0,23	158	29	6,15
	84	14,58	0,14	331	39	3,73
	120	14,03	0,02	151	24	1,90
	156	13,85	0,01	151	15	2,41
	199	13,75	0,02	124	20	1,14
Réplica 3	51	14,85	0,21	138	32	5,05
	84	14,59	0,15	252	40	3,54
	120	14,13	0,02	138	26	1,96
	156	13,91	0,02	146	18	2,37
	199	13,79	0,06	92	20	1,20

Tabla AI.26.- Resultados del análisis de vinificación en bodega para las tres réplicas en garrafas de la Cepa B.

Cepa D	Día	Alcohol	Ac. Volátil	Acetaldehido	Ac. Etilo	Glicerina
Réplica 1	43	14,90	0,22	167	30	5,66
	84	14,34	0,10	164	33	2,75
	120	13,74	0,02	145	20	1,40
	156	13,45	0,03	134	16	2,00
	199	13,45	0,07	88	18	0,86
Réplica 2	43	14,93	0,18	148	31	6,21
	84	14,47	0,12	163	33	2,74
	120	14,14	0,02	56	21	2,41
	156	13,92	0,02	90	15	3,64
	199	13,77	0,03	63	13	1,54
Réplica 3	43	14,92	0,22	147	30	6,61
	84	14,47	0,12	126	32	3,25
	120	14,20	0,02	63	20	2,59
	156	13,95	0,01	92	14	3,82
	199	13,78	0,02	66	16	1,66

Tabla AI.27.- Resultados del análisis de vinificación en bodega para las tres réplicas en garrafas de la Cepa D.

ANEXO II.
Oligonucleótidos

A continuación se exponen los principales oligonucleótidos utilizados durante la realización de este trabajo.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
LEU2K05	CCAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCACAGCCGAA
LEU2K03	TCGGCGACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTG
LEU2-1	AAGGATCCACCATTC TAATGTCTGC
LEU2-2	AAGGATCCAATCTTTTAAAGCAAGG

Tabla AII.1.- Oligonucleótidos empleados para la delección de genes en *S. cerevisiae*, mostrados en su orientación 5'->3'.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
ABF1K05-1	GATCGTTGAGAACCTGTGTGTCG
ABF1K05-2	CACGGCCTGAGTGGCCTGTTGCAGAGGGTAGATACAGC
ABF1K03-1	GTGGCCATCTAGGCCATTGCATCGACCCTCAACAGC
ABF1K03-2	GCCTTACTCCGCAACTTCAGC
SUC2K05-1	CTGTAACGCTGAGTTGTTTCG
SUC2K05-2	CACGGCCTGAGTGGCCGGATCTGTGACAAGCAAGACG
SUC2K03-1	GTGGCCATCTAGGCCCTGACTTCATGCTCCGTCTCG
SUC2K03-2	TGCGATGAACGAATGCTTGG
PDI1K05-1	CCAATCGGAAGCAAGTCTCG
PDI1K05-2	CACGGCCTGAGTGGCCAGACAAGGTGGAAGAGCAAGG
PDI1K03-1	GTGGCCATCTAGGCCGATGTCGTCCCGATACATGC
PDI1K03-2	AAGGCTGGGATCTTCCGTAGG

Tabla AII.2.- Oligonucleótidos empleados para la delección de genes en *U. maydis*, mostrados en su orientación 5'->3'.

LOCUS	OLIGONUCLEÓTIDOS
SC8132X	FW:CTGCTCAACTTGTGATGGGTTTTGG RV:CCTCGTTACTATCGTCTTCATCTTGC
SCYOR267C	FW:GGTGA CTCTAACGGCAGAGTGG RV:GGATCTACTTGCAGTATACGGG
SCPTSY7	FW:AAAAGCGTAAGCAATGGTGTAGAT RV:AAATGATGCCAATATTGAAAAGGT

Tabla AII.3.- Oligonucleótidos empleados para el análisis de las regiones de microsatélites localizadas en los locus indicados. Orientación 5'->3'.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Tabla AII.4.- Oligonucleótidos empleados para la secuenciación del fragmento 5.8S-ITS. Orientación 5'->3'.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
HYG1	GTAAATAGCTGCGCCGATGG
HYG2	TTGTGTACGCCCGACAGTCC

Tabla AII.5.- Oligonucleótidos empleados para amplificar parte del gen de la hygromicina, empleados en la comprobación de los híbridos obtenidos por fusión de las cepas de flor. Orientación 5'->3'.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
FLO11 p13	CCAGAGTATGTTCTCACAGC
FLO11 p12	AAAGGACCCACTTCGATAGG

Tabla AII.6.- Oligonucleótidos empleados para amplificar la región de 111 pb del promotor del gen FLO11. Orientación 5'->3'.

OLIGONUCLEÓTIDOS	
FLO11 p1	ATATCGATTTGTAGCCCTCAAAAATCCATATACG
FLO11 p1	TGATCGATTAGAATACAACTGGAAGAGCGAGTAGC

Tabla AII.7.- Oligonucleótidos empleados para amplificar el ORF del gen FLO11. Orientación 5'->3'.

ANEXO III.

Abreviaturas y siglas

µg: microgramo

AcLi: acetato de litio

ADNr: ADN ribosómico

ARNr: ARN ribosómico

°C: grado centígrado

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

Con A: lectina concanavina A

DNAss: ADN de esperma de salmón

D.O. : denominación de origen

DO: densidad óptica

dpi: días post-infección

etc.: etcétera

gen: genética

h: horas

hyg: hygromicina

kb: kilobase

l: litro

M: molar

mb: megabases

mM: milimolar

mg: miligramos

min: minutos

ml: mililitro

mm: milímetro

n: haploide

ng: nanogrammo

NL: no lineal

nm: nanómetro

OGM: organismos genéticamente modificados

ORF: pauta abierta de lectura

pb: pares de bases

ppm: partes por millón

rho-: mutantes incapaces de respirar

rpm: revoluciones por minuto

seg: segundos

U: unidad de enzima

v/v: volumen/volumen

Bibliografía

Akada, R., 2002. Genetically modified industrial yeast ready for application. *Journal of bioscience and bioengineering* 94, 536-544.

Alexandre, H., 2013. Flor yeasts of *Saccharomyces cerevisiae* their ecology, genetics and metabolism. *Int J Food Microbiol* 167, 269-275.

Álvarez, M., Moreno, I.M., Jos, A.M., Cameán, A.M., González, A.G., 2007. Study of mineral profile of Montilla-Moriles “fino” wines using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 391-395.

Aranda, A., Querol, A., del Olmo, M., 2002. Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Archives of microbiology* 177, 304-312.

Attfield, P.V., Bell, P. J.L., 2003. Genetic Improvement of Baker's Yeasts, In: Dilip, K.A., George, G.K. (Eds.), *Applied Mycology and Biotechnology*. Elsevier, pp. 213-240.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., 1997. *Current protocols in molecular biology*. Ed. Wiley, NY.

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

Baleiras Couto, M.M., Eijnsma, B., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H., van der Vossen, J.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied and environmental microbiology* 62, 41-46.

Banuett, F., Herskowitz, I., 1989. Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5878-5882.

Banuett, F., Herskowitz, I., 1996. Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development (Cambridge, England)* 122, 2965-2976.

Barnett, J.A., 1992. The taxonomy of the genus *S. meyen ex rees*: a short review for nontaxonomists. *Yeast* 8, 1-23.

Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, I.J. 1990. *Yeast: Characterization and Identification*, 2nd ed. Cambridge University Press. London.

Barrales, R.R., 2010. Estudio de la regulación de FLO11, gen esencial en el dimorfismo y formación de biofilm en *Saccharomyces cerevisiae*. Universidad Pablo de Olavide.

Barrales, R.R., Jimenez, J., Ibeas, J.I., 2008. Identification of novel activation mechanisms for FLO11 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 178, 145-156.

Barrales, R.R., Korber, P., Jimenez, J., Ibeas, J.I., 2012. Chromatin modulation at the FLO11 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* by HDAC and Swi/Snf complexes. *Genetics* 191, 791-803.

Barre, P., Vézinhét, F., Dequin, S., Blondin, B., 1993. Genetic improvement of wine yeast. In: Fleet, G.H. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology* (Fleet GH, ed), pp. 265–287. Taylor & Francis, New York, NY.

Barrio, E., González, S., Arias, A., Belloch, C., Querol, A., 2006. Molecular Mechanisms Involved in the Adaptive Evolution of Industrial Yeasts, In: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 153-174.

Bell, P.J., Deere, D., Shen, J., Chapman, B., Bissinger, P.H., Attfield, P.V., Veal, D.A., 1998. A flow cytometric method for rapid selection of novel industrial yeast hybrids. *Applied and environmental microbiology* 64, 1669-1672.

Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., García, M.D., Querol, A., 1997. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial analysis. *System Appl Microbiol* 20, 397-408.

Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E., Querol, A., 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int J Food Microbiol* 122, 188-195.

Bellon, J.R., Eglinton, J.M., Siebert, T.E., Pollnitz, A.P., Rose, L., de Barros Lopes, M., Chambers, P.J., 2011. Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 603-612.

Bellon, J.R., Schmid, F., Capone, D.L., Dunn, B.L., Chambers, P.J., 2013. Introducing a New Breed of Wine Yeast: Interspecific Hybridisation between a Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS ONE* 8, e62053.

Beltrán, G., Torrija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Rozes, N., Mas, A., 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287-293.

Benítez, T., Martínez, P., Codón, A.C., 1996. Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiologia (Madrid, Spain)* 12, 371-384.

Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C., Harashima, S., 2012. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. *New biotechnology* 29, 379-386.

- Berlanga, T.M., Atanasio, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M.,** 2001. Influence of aeration on the physiological activity of flor yeasts. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 3378-3384.
- Berlanga, T.M., Peinado, R., Millan, C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M.,** 2004. Influence of blending on the content of different compounds in the biological aging of sherry dry wines. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 2577-2581.
- Birren, B., Lai, E.,** 1993. Pulsed field electrophoresis: A practical guide. Academic Press, San Diego.
- Blandino, A., Caro, I., Cantero, D.,** 1997. Comparative study of alcohol dehydrogenase activity in flor yeast extracts. *Biotechnol Lett* 19, 651-654.
- Blankenship, J.R., Mitchell, A.P.,** 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology* 9, 588-594.
- Boekhout T, Kutzman C.,** 1996. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berling, Germany,: 1-81.
- Bojsen, R.K., Andersen, K.S., Regenber, B.,** 2012. *Saccharomyces cerevisiae*--a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. *FEMS immunology and medical microbiology* 65, 169-182.
- Bolker, M., Bohnert, H.U., Braun, K.H., Gori, J., Kahmann, R.,** 1995. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular & general genetics* : MGG 248, 547-552.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., Blondin, B.,** 1997. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *Journal of bacteriology* 179, 4929-4936.
- Bottin, A., Kamper, J., Kahmann, R.,** 1996. Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics* : MGG 253, 342-352.
- Bravo-Abad, F.,** 1986. Crianza Biológica de Vino: Procedimiento Tradicional de Vinos Finos de D.O. Jerez y D.O. Montilla-Moriles. . *Enología y Enotecnia*, 15-19.
- Brefort, T., Doehlemann, G., Mendoza-Mendoza, A., Reissmann, S., Djamei, A., Kahmann, R.,** 2009. *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual review of phytopathology* 47, 423-445.
- Budroni, M., Zara, S., Zara, G., Pirino, G., Mannazzu, I.,** 2005. Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Res* 5, 951-958.
- Carrascosa, A.V., González García, R., Muñoz, R.,** 2011. *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier.

Carrau, J.L., Dillon, A.J.P., Serafini, L.A., Pazqual, M.S., 1994. L-malic acid degrading yeast for wine making. United States Patent 5, 774.

Casaregola, S., Nguyen, H.V., Lepingle, A., Brignon, P., Gendre, F., Gaillardin, C., 1998. A family of laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* carry rearrangements involving chromosomes I and III. *Yeast* 14, 551-564.

Castrejón, F., Codón, A.C., Cubero, B., Benítez, T., 2002. Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Systematic and applied microbiology* 25, 462-467.

Cebollero, E., González-Ramos, D., Tabera, L., González, R., 2007. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnol Lett* 29, 191-200.

Chaffin, W.L., Lopez-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., Martínez, J.P., 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 62, 130-180.

Charpentier, C., Colin, A., Alais, A., Legras, J.L., 2009. French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie van Leeuwenhoek* 95, 263-273.

Charpentier, C., Etiévant, P., Guichard, E., 2000. Vinificación de los vinos de velo: vino Jaune, Jerez y Otros. *Enología, Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, C. Flanzy, Ed., pp. 531-539.

Choi, G.-W., Um, H.-J., Kang, H.-W., Kim, Y., Kim, M., Kim, Y.-H., 2010. Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Biomass and Bioenergy* 34, 1232-1242.

Chu, G., Volrath, D., Davis, R.W., 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 234, 1582-1685.

Codón, A.C., Benítez, T., 1995. Variability of the Physiological Features and of the Nuclear and Mitochondrial Genomes of Bakers' Yeasts. *Systematic and applied microbiology* 18, 343-352.

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

Codón, A.C., Gasent-Ramírez, J.M., Benítez, T., 1995. Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Applied and environmental microbiology* 61, 630-638.

Coloretti, F., Zambonelli, C., Tini, V., 2006. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food microbiology* 23, 672-676.

Conde, J., Fink, G.R., 1976. A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73, 3651-3655.

Constantí, M., Reguant, C., Poblet, M., Zamora, F., Mas, A., Guillamón, J.M., 1998. Molecular analysis of yeast population dynamics: effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 169-175.

Cordente, A.G., Heinrich, A., Pretorius, I.S., Swiegers, J.H., 2009. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res* 9, 446-459.

Cummings, J., Fogel, S., 1978. Genetic Homology of wine yeasts with *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing* 84, 267-270.

Curtin, C.D., Bellon, J.R., Henschke, P.A., Godden, P.W., De Barros Lopes, M.A., 2007. Genetic diversity of *Dekkera bruxellensis* yeasts isolated from Australian wineries. *FEMS Yeast Research* 7, 471-481.

de Barros Lopes, M., Bellon, J.R., Shirley, N.J., Ganter, P.F., 2002. Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* 1, 323-331.

Deising, H.B., Werner, S., Wernitz, M., 2000. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1631-1641.

Del Carmen Palta, M., Mauricio, J.C., Millán, C., Ortega, J., 1998. In vitro specific activity of alcohol acetyltransferase and esterase in two flor yeast strains during biological aging of sherry wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 369-374.

Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M., Kahmann, R., 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* 478, 395-398.

Duarte, F.L., Pais, C., Spencer-Martins, I., Leao, C., 1999. Distinctive electrophoretic isoenzyme profiles in *Saccharomyces sensu stricto*. *International journal of systematic bacteriology* 49 Pt 4, 1907-1913.

Estéve-Zarzoso, B., Fernández-Espinar, M.T., Querol, A., 2004. Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 151-158.

Estéve-Zarzoso, B., Peris-Toran, M.J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A., 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied and environmental microbiology* 67, 2056-2061.

Fernández-Espinar, M.T., Estéve-Zarzoso, B., Querol, A., Barrio, E., 2000. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of

the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 87-97.

Fernández-Álvarez, A., Elias-Villalobos, A., Ibeas, J.I., 2009. The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*. *The Plant cell* 21, 3397-3412.

Fernández-Álvarez, A., Elias-Villalobos, A., Ibeas, J.I., 2010. Protein glycosylation in the phytopathogen *Ustilago maydis*: From core oligosaccharide synthesis to the ER glycoprotein quality control system, a genomic analysis. *Fungal genetics and biology : FG & B* 47, 727-735.

Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E., Querol, A., 2001. Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int J Food Microbiol* 70, 1-10.

Fidalgo, M., Barrales, R.R., Ibeas, J.I., Jiménez, J., 2006. Adaptive evolution by mutations in the FLO11 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11228-11233.

Fierro-Risco, J., Rincón, A.M., Benítez, T., Codón, A.C., 2013. Overexpression of stress-related genes enhances cell viability and velum formation in Sherry wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 6867-6881.

Finkel, J.S., Mitchell, A.P., 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature reviews. Microbiology* 9, 109-118.

Fleet, G., 1993. The microorganisms of winemaking. Isolation, enumeration and identification, p. 1-27. En: G. Fleet ed. *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Fleet, G., 2007. Wine. In M. Doyle, & L. Beuchat (Eds.), *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (pp. 863-890). Washington, DC: ASM Press.

Fleet, G., Heard, G., 1993. Yeast growth during fermentation, p. 27-57. En: G. Fleet ed. *Wine microbiology and biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Switzerland.

Flor-Parra, I., Vranes, M., Kamper, J., Perez-Martín, J., 2006. Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *The Plant cell* 18, 2369-2387.

Gallego, F.J., Pérez, M.A., Martínez, I., Hidalgo, P., 1998. Microsatellites Obtained From Database Sequences Are Useful to Characterize *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 350-351.

Gamero, A., Belloch, C., Ibanez, C., Querol, A., 2014. Molecular Analysis of the Genes Involved in Aroma Synthesis in the Species *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and *S. bayanus* var. *uvarum* in Winemaking Conditions. *PLoS One* 9, e97626.

Georgieva, B., Rothstein, R., 2002. Kar-mediated plasmid transfer between yeast strains: alternative to traditional transformation methods. *Methods in enzymology* 350, 278-289.

Jimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., Fink, G.R., 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68, 1077-1090.

Giudici, P., Solieri, L., Pulvirenti, A.M., Cassanelli, S., 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 622-628.

Gohre, V., Robatzek, S., 2008. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology* 46, 189-215.

Golden, D.A., Beuchat, L.R., Hitchcock, H.L., 1994. Changes in fatty acid composition of various lipid components of *Zygosaccharomyces rouxii* as influenced by solutes, potassium sorbate and incubation temperature. *Int J Food Microbiol* 21, 293-303.

Goldstein, A.L., McCusker, J.H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.

Goldstein, I.J., Poretz, R.D., 1986. Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins. In Goldstein IJ, Liener IE, Sharon N. *The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. San Diego: Academic. pp. 233-247.

González, G.R., González, R.D., Tabera, M.L., Quiros, A.M., Barcenilla, M.J.M., 2010. Procedimiento para la obtención de levaduras vínicas superproductoras de manoproteínas mediante tecnologías no recombinantes. Google Patents.

González, S.S., Barrio, E., Gafner, J., Querol, A., 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res* 6, 1221-1234.

González-Techera, A., Jubany, S., Carrau, F.M., Gaggero, C., 2001. Differentiation of industrial wine yeast strains using microsatellite markers. *Lett Appl Microbiol* 33, 71-75.

Govender, P., Domingo, J.L., Bester, M.C., Pretorius, I.S., Bauer, F.F., 2008. Controlled expression of the dominant flocculation genes FLO1, FLO5, and FLO11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 74, 6041-6052.

Govender, P., Kroppenstedt, S., Bauer, F.F., 2011. Novel wine-mediated FLO11 flocculation phenotype of commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with modified FLO gene expression. *FEMS microbiology letters* 317, 117-126.

- Graves, L.M., Swaminathan, B.**, 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* 65, 55-62.
- Gray, M.W.**, 1989. Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annual review of cell biology* 5, 25-50.
- Guijo, S., Mauricio, J.C., Salmón, J.M., Ortega, J.M.**, 1997. Determination of the Relative Ploidy in Different *Saccharomyces cerevisiae* Strains used for Fermentation and 'Flor' Film Ageing of Dry Sherry-type Wines. *Yeast* 13, 101-117.
- Guijo, S., Millán, C., Ortega, J.M.**, 1986. Fermentative features of vinification and maturation yeasts isolated in the Montilla-Moriles region of Southern Spain. *Food microbiology* 3, 133-142.
- Guillamón, J.M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A.**, 1994. Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International journal of systematic bacteriology* 44, 708-714.
- Guo, B., Styles, C.A., Feng, Q., Fink, G.R.**, 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12158-12163.
- Gunge, N., Nakatomi, Y.**, 1972. Genetic Mechanisms of Rare Matings of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Heterozygous for Mating Type. *Genetics* 70, 41-58.
- Gunge, N., Sakaguchi, K.**, 1981. Intergeneric transfer of deoxyribonucleic acid killer plasmids, pGK11 and pGK12, from *Kluyveromyces lactis* into *Saccharomyces cerevisiae* by cell fusion. *Journal of bacteriology* 147, 155-160.
- Hammond, J.R.M.**, 2003. Yeast Genetics. *Brewing Microbiology*, Vol. 3 (Priest FG & Campbell I, eds), pp. 67-112. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.
- Hawthorne, D., Philippsen, P.**, 1994. Genetic and molecular analysis of hybrids in the genus *Saccharomyces* involving *S. cerevisiae*, *S. uvarum* and a new species, *S. douglasii*. *Yeast* 10, 1285-1296.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M.**, 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research* 6, 986-994.
- Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K.A., Maldener, C., Frohlich, K.U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., Madeo, F.**, 2004. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *The Journal of cell biology* 164, 501-507.
- Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M., Luo, Z.W.**, 2007. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 175, 1479-1487.

- Huang, G., Dougherty, S.D., Erdman, S.E.,** 2009. Conserved WCPL and CX4C domains mediate several mating adhesin interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 182, 173-189.
- Ibeas, J.I.,** 1996. Análisis y mejora genética de la levadura de flor en las bodegas de Osborne. Universidad de Málaga.
- Ibeas, J.I., Jiménez, J.,** 1996. Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. *Current genetics* 30, 410-416.
- Ibeas, J.I., Jiménez, J.,** 1997. Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces flor* yeasts. *Applied and environmental microbiology* 63, 7-12.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdigonés, F., Jiménez, J.,** 1997a. Effects of Ethanol and Temperature on the Biological Aging of Sherry Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 71-74.
- Ibeas, J.I., Lozano, I., Perdigonés, F., Jiménez, J.,** 1997b. Dynamics of Flor Yeast Populations During the Biological Aging of Sherry Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 75-79.
- Infante, J.J., Dombek, K.M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M., Young, E.T.,** 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* 165, 1745-1759.
- Iñigo, B., Vázquez, D.,** 1964. *Rev. Ciencia Aplicada*. 93, 296.
- Ishigami, M., Nakagawa, Y., Hayakawa, M., Iimura, Y.,** 2006. FLO11 is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 70, 660-666.
- James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N., Collins, M.D.,** 1997. Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: Description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov., and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. . *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 453-460.
- Jiménez, A., Davies, J.,** 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*. *Nature* 287, 869-871.
- Jiménez, J., Benítez, T.,** 1988. Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Current genetics* 13, 461-469.
- Joppa, B., Li, S., Cole, S., Gallagher, A.,** 1992. Pulsed field electrophoresis for separation of large DNA. *Probe* 2.
- Kahmann, R., Steinberg, G., Basse, C., Feldbrügge, M., Kämper, J.,** 2000. *Ustilago maydis*, the Causative Agent of Corn Smut Disease, In: Kronstad, J.W. (Ed.), *Fungal Pathology*. Springer Netherlands, pp. 347-371.

Keogh, R.S., Seoighe, C., Wolfe, K.H., 1998. Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14, 443-457.

Kovacs, M., Stuparevic, I., Mrsa, V., Maraz, A., 2008. Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains: relevance for flor formation. *FEMS Yeast Res* 8, 1115-1126.

Kreger-Van Rij, N.J.W., 1984. *The yeast, a taxonomic study.* Elsevier Science Publisher B.V, Amsterdam.

Krishnamoorthy, Narayanan, R., Vijila, K., Kumutha, K., 2010. Intergeneric protoplast fusion of yeast for high ethanol production from cheese industry waste – Whey. *J Yeast Fungal Res* 1, 81-87.

Kumamoto, C.A., Vinces, M.D., 2005. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annual review of microbiology* 59, 113-133.

Kurtzman, C., Fell, J.W., 1998. *Zygosaccharomyces.* Barker. pp: 424-432. En: Kurtzman, C., *The yeasts, a taxonomic study.* 4th edn, Elsevier, Amsterdam.

Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study.* Elsevier Science. 5th edn.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit 26S ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw.* 73, 331-371.

Kutyna, D.R., Varela, C., Stanley, G.A., Borneman, A.R., Henschke, P.A., Chambers, P.J., 2012. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 1175-1184.

Lai, E., barren, B.W., Clark, S.M., Hood, L., 1989. Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *J. Inst. Brew.* 91, 169-173.

Lambrechts, M.G., Bauer, F.F., Marmur, J., Pretorius, I.S., 1996. Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8419-8424.

Lee, H.Y., Chou, J.Y., Cheong, L., Chang, N.H., Yang, S.Y., Leu, J.Y., 2008. Incompatibility of nuclear and mitochondrial genomes causes hybrid sterility between two yeast species. *Cell* 135, 1065-1073.

Li, M., Chen, M., Pan, W., 2013. Approaches on genetic polymorphism of *Cryptococcus* species complex. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 18, 1227-1236.

- Li, W. H.**, 1997. Molecular evolution. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Li, Y., Ma, Y., Zhang, L., Guo, F., Ren, L., Yang, R., Li, Y., Lou, H.**, 2012. In vivo inhibitory effect on the biofilm formation of *Candida albicans* by liverwort derived riccardin D. *PLoS One* 7, e35543.
- Lodder, J.**, 1970. General Classification of the yeasts. In: *The Yeasts, A Taxonomic Study*, 2nd edn. (Ed.): J. Lodder, pp. 1-33. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Lopandic, K., Tiefenbrunner, W., Gangl, H., Mandl, K., Berger, S., Leitner, G., Abd-Ellah, G.A., Querol, A., Gardner, R.C., Sterflinger, K., Prillinger, H.**, 2008. Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. *FEMS Yeast Research* 8, 1063-1075.
- Loureiro, V., Querol, A.**, 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol* 10, 1-10.
- Lucca, M.E., Spencer, J.F., de Figueroa, L.I.**, 2002. Glycerol and arabitol production by an intergeneric hybrid, PB2, obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 472-476.
- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A.**, 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292-1305.
- Martínez, P.**, 1995. Evolución y Caracterización de las Poblaciones de Levaduras Responsables de la Crianza Bilógica del Vino de Jerez. Universidad de Sevilla.
- Martínez, P., Codón, A.C., Pérez, L., Benítez, T.**, 1995. Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* 11, 1399-1411.
- Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., Benítez, T.**, 1997a. Evolution of Flor Yeast Population During the Biological Aging of Fino Sherry Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 160-168.
- Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., Benítez, T.**, 1997b. Factors which Affect Velum Formation by Flor Yeasts Isolated from Sherry Wine. *Systematic and applied microbiology* 20, 154-157.
- Martínez, P., Pérez Rodríguez, L., Benítez, T.**, 1997c. Velum Formation by Flor Yeasts Isolated From Sherry Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 48, 55-62.
- Martínez, P., Valcárcel, M.J., Piérez, L., Benítez, T.**, 1998. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* Flor Yeasts During Fermentation and Biological Aging of Fino Sherry: By-products and Aroma Compounds. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 240-250.

- Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., Dubourdieu, D.,** 2004. Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res* 4, 711-719.
- Marullo, P., Mansour, C., Dufour, M., Albertin, W., Sicard, D., Bely, M., Dubourdieu, D.,** 2009. Genetic improvement of thermo-tolerance in wine *Saccharomyces cerevisiae* strains by a backcross approach. *FEMS Yeast Res* 9, 1148-1160.
- Massart, S., Luna-Guarda, M., Jijakli, M.H.,** 2004. In situ development and application of cDNA-AFLP to isolate genes of *Candida oleophila* (strain O) potentially involved in antagonistic properties against *Botrytis cinerea*. *Communications in agricultural and applied biological sciences* 69, 595-599.
- Mauricio, J.C., Moreno, J.J., Ortega, J.M.,** 1997. In Vitro Specific Activities of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases from Two Flor Yeasts during Controlled Wine Aging. *Journal of agricultural and food chemistry* 45, 1967-1971.
- Mauricio, J.C., Ortega, J.M.,** 1993. Influence of fermentation conditions on specific activity of the enzymes alcohol and aldehyde dehydrogenase from yeasts. *Microbios* 75, 95-106.
- Mauricio, J.C., Valero, E., Millán, C., Ortega, J.M.,** 2001. Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeasts. *Journal of agricultural and food chemistry* 49, 3310-3315.
- Meem, M.H., Cullen, P.J.,** 2012. The impact of protein glycosylation on Flo11-dependent adherence in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 12, 809-818.
- Mesa, J.J., Infante, J.J., Rebordinos, L., Cantoral, J.M.,** 1999. Characterization of Yeasts Involved in the Biological Ageing of Sherry Wines. *LWT - Food Science and Technology* 32, 114-120.
- Mesa, J.J., Infante, J.J., Rebordinos, L., Sánchez, J.A., Cantoral, J.M.,** 2000. Influence of the Yeast Genotypes on Enological Characteristics of Sherry Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 15-21.
- Metzenberg, R.L., Glass, N.L.,** 1990. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 12, 53-59.
- Mora-Montes, H.M., Bates, S., Netea, M.G., Castillo, L., Brand, A., Buurman, E.T., Diaz-Jimenez, D.F., Jan Kullberg, B., Brown, A.J., Odds, F.C., Gow, N.A.,** 2010. A multifunctional mannosyltransferase family in *Candida albicans* determines cell wall mannan structure and host-fungus interactions. *The Journal of biological chemistry* 285, 12087-12095.

- Moreira da Silva, M. , Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V., St Aubyn, A.,** 1994. Long-chain fatty acid composition as a criterion for yeast distinction in the brewing industry. *Journal of the Institute of Brewing* 100, 17-22.
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J., Millán, M.C., Mauricio, J.C.,** 2014. A proteomic and metabolomic approach for understanding the role of the flor yeast mitochondria in the velum formation. *Int J Food Microbiol* 172, 21-29.
- Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G., Polsinelli, M.,** 1994. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* 10, 1543-1552.
- Mosch, H.U.,** 2000. Pseudohyphal development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Contributions to microbiology* 5, 185-200.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.,** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
- Muñoz, D., Peinado, R., Medina, M., Moreno, J.,** 2006. Higher alcohols concentration and its relation with the biological aging evolution. *Eur Food Res Technol* 222, 629-635.
- Nakazawa, N., Iwano, K.,** 2004. Efficient selection of hybrids by protoplast fusion using drug resistance markers and reporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioscience and bioengineering* 98, 353-358.
- Naumov, G.,** 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 17, 295-302.
- Naumov, G.I., Calero, F., Naumova, E.S., Sancho, E.,** 1994. Genetic characteristics of Spanish sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae* from the Montilla-Moriles region. . *Russian Biotechnology* 8, 12.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Masneuf, I., Aigle, M., Kondratieva, V.I., Dubourdiou, D.,** 2000. Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: auto- and allotetraploidy. *Systematic and applied microbiology* 23, 442-449.
- Naumova, E.S., Ivannikova, Y.V., Naumov, G.I.,** 2005. Genetic Differentiation of the Sherry Yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Microbiol* 41, 578-582.
- Órbera, T.,** 2004. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. . *Rev Iberoam Micol.* 21, 15-19.

- Paneque, P., Álvarez-Sotomayor, M.T., Gómez, I.A.,** 2009. Metal contents in 'oloroso' sherry wines and their classification according to provenance. *Food Chemistry* 117, 302-305.
- Peinado, R., Mauricio, J.,** 2009. Biologically aged wines. *Wine Chemistry and Biochemistry*, M. C. Polo and M. V. Moreno-Arribas, Eds, pp. 81–101. Springer Life Au17 Sciences Publisher.
- Pérez, F., Ramírez, M., Regodón, J.,** 2001. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 79, 393-399.
- Pérez-Través, L., Lopes, C.A., Barrio, E., Querol, A.,** 2012. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *International Journal of Food Microbiology* 156, 102-111.
- Pirino, G., Zara, S., Pinna, G., Farris, G.A., Budroni, M.,** 2004. Diversity of Y region at HML locus in a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from a Sardinian wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 29-36.
- Pitangui, N.S., Sardi, J.C., Silva, J.F., Benaducci, T., Moraes da Silva, R.A., Rodriguez-Arellanes, G., Taylor, M.L., Mendes-Giannini, M.J., Fusco-Almeida, A.M.,** 2012. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling* 28, 711-718.
- Pozo-Bayón, M.A., Moreno-Arribas, M.V.,** 2011. Sherry wines, pp. 17-40.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P., Typas, M.A.,** 2000. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology* 89, 236-248.
- Pretorius, I.S.,** 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E., Perez-Ortin, J.E.,** 2000. Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and environmental microbiology* 66, 2057-2061.
- Purwadi, R., Brandberg, T., Taherzadeh, M.,** 2007. A Possible Industrial Solution to Ferment Lignocellulosic Hydrolyzate to Ethanol: Continuous Cultivation with Flocculating Yeast. *International Journal of Molecular Sciences* 8, 920-932.
- Querol, A., Bond, U.,** 2009. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS microbiology letters* 293, 1-10.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M., Barrio, E.,** 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol* 86, 3-10.

Rachidi, N., Barre, P., Blondin, B., 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. . Molecular & general genetics : MGG 261, 841-850.

Reynolds, T.B., Fink, G.R., 2001. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. Science 291, 878-881.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A., 2000. Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications, vol. I. Wiley, West Sussex, England.

Robinson, J., 1994. The Oxford companion to wine. Oxford University Press: Oxford.

Robertson, E.J., Wolf, J.M., Casadevall, A., 2012. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. Applied and environmental microbiology 78, 7977-7984.

Romano, P., Soli, M.G., Suzzi, G., Grazia, L., Zambonelli, C., 1985. Improvement of a Wine *Saccharomyces cerevisiae* Strain by a Breeding Program. Applied and environmental microbiology 50, 1064-1067.

Saiki, R., Sharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., 1985. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction gene analysis for diagnostic of sickle-cell anaemia. . Science 230, 1350-1354.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Schaf, S.J., Higuchi, R., Hoprn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. . Science 239, 487-491.

Sancho, E.D., Hernández, E., Rodríguez-Navarro, A., 1986. Presumed Sexual Isolation in Yeast Populations during Production of Sherrylike Wine. Applied and environmental microbiology 51, 395-397.

Santa Maria, J., Vidal, D., 1973. Genetic control of 'flor' formation by *Saccharomyces*. Journal of bacteriology 113, 1078-1080.

Schuller, H.J., 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Current genetics 43, 139-160.

Schwartz, D.C., Cantor, C.R., 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 37, 67-75.

Sipiczki, M., 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. FEMS Yeast Research 8, 996-1007.

Sipiczki, M., 2002. Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts (CianiM, ed), pp. 53-69. Research Signpost, Kerala.

Spencer, F., Hugerat, Y., Simchen, G., Hurko, O., Connelly, C., Hieter, P., 1994. Yeast kar1 mutants provide an effective method for YAC transfer to new hosts. *Genomics* 22, 118-126.

Spencer, J.F., Spencer, D.M., 1996. Rare-mating and cytoduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 53, 39-44.

Spencer, J.F., Spencer, D.M., de Figueroa, L., Nougues, J.M., Heluane, H., 1992. Transfer of genes for utilization of starch (*sta2*) and melibiose (*mel*) to industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* by single-chromosome transfer, using a *kar1* mutant as vector. *Appl Microbiol Biotechnol* 37, 230-234.

Spencer, J.F.T., Spencer, D.M., Whittington-Vaughan, P., Miller, R., 1983. Use of mitochondrial mutants in the isolation of hybrids involving industrial yeast strains. *Current genetics* 7, 159-164.

Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J., 2014. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS microbiology reviews*.

Stratford, M., 1989. Evidence for two mechanisms of flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 5 Spec No, S441-445.

Suárez-Lepe, J.A., 1997. *Levaduras vónicas, funcionalidad y uso en bodega.*, 1ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

Sudhadham, M., Gerrits van den Ende, A.H., Sihanonth, P., Sivichai, S., Chaiyarat, R., Menken, S.B., van Belkum, A., de Hoog, G.S., 2011. Elucidation of distribution patterns and possible infection routes of the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using AFLP. *Fungal biology* 115, 1051-1065.

Teunissen, A.W., Steensma, H.Y., 1995. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast* 11, 1001-1013.

Thomas, D.P., Bachmann, S.P., Lopez-Ribot, J.L., 2006. Proteomics for the analysis of the *Candida albicans* biofilm lifestyle. *Proteomics* 6, 5795-5804.

Thornton, R.J., Eschenbruch, R., 1976. Homothalism in wine yeasts. *Anton. Leeuw.*, 42, 503-509.

Tucker, S.L., Talbot, N.J., 2001. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology* 39, 385-417.

Turcotte, B., Liang, X.B., Robert, F., Soontorngun, N., 2010. Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* 10, 2-13.

- Vacanneyt, B.P., Hennebert, G., Kersters, K.**, 1991. Differentiation of yeast species based on electrophoretic whole-cell protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 14, 23-32.
- Vallejo, J.A., Sánchez-Pérez, A., Martínez, J., Villa, T.G.**, 2013. Cell aggregations in yeasts and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 2305-2318.
- van der Walt, J.P.**, 1970. *Saccharomyces*. Meyen emend. Reess, pp. 555-718. In J. Lodder (ed.), *The yeasts: a taxonomic study*. ElsevierNorth-Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S.M., Daenen, L., Verbelen, P.J., Willaert, R., Verstrepen, K.J., Delvaux, F.R.**, 2009. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 9, 178-190.
- Van Vuuren, H.J., Van Der Meer, L.**, 1987. Fingerprinting of yeast by protein electrophoresis. *Am. J. Enol. Vitic.* 38, 49-53.
- Vaudano, E., García-Moruno, E.**, 2008. Discrimination of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains using microsatellite multiplex PCR and band pattern analysis. *Food microbiology* 25, 56-64.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A.**, 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In *The yeasts: a taxonomic study*. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds). Amsterdam: Elsevier, 358-371.
- Verstrepen, K.J., Klis, F.M.**, 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology* 60, 5-15.
- Vidgren, V., Londesborough, J.**, 2011. 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing* 117, 475-487.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M.**, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23, 4407-4414.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, E., Taylor, J.**, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315-322). San Diego, CA: Academic Press.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.**, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18, 6531-6535.
- Wolfe, K.H., Shields, D.C.**, 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708-713.

Woods, D.R., Bevan, A., 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. gen. Microbiol.* 51, 115-126.

Younes, S.S., Khalaf, R.A., 2013. The *Candida albicans* Hwp2p can complement the lack of filamentation of a *Saccharomyces cerevisiae* flo11 null strain. *Microbiology* 159, 1160-1164.

Zara, G., Zara, S., Pinna, C., Marceddu, S., Budroni, M., 2009. FLO11 gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 155, 3838-3846.

Zara, S., Bakalinsky, A.T., Zara, G., Pirino, G., Demontis, M.A., Budroni, M., 2005. FLO11-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* 71, 2934-2939.