

DEPARTAMENT GENÈTICA

DIVERSIDAD GENÉTICA EN LAS ESPECIES DEL
COMPLEJO SACCHAROMYCES SENSU STRICTO DE
FERMENTACIONES TRADICIONALES

JOSÉ ARMANDO ARIAS GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 d'octubre de 2008 davant un tribunal format per:

- D^a. Carmen Tahía Benítez Fernández
- D. Ramón González García
- D. Bruno Blondin
- D^a. Emilia Matallana Redondo
- D. David Martínez Torres

Va ser dirigida per:

D. Eladio Barrio Esparducer

D^a. Amparo Querol Simón

©Copyright: Servei de Publicacions
José Armando Arias García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7302-6

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

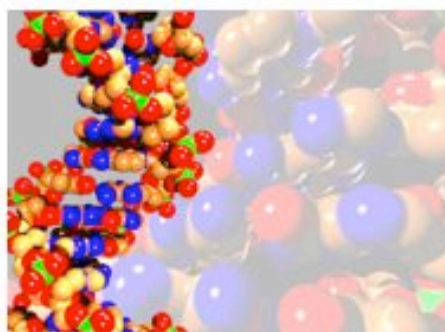
Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT (U) VALÈNCIA Facultat de Ciències Biològiques



**Diversidad genética en las especies del complejo
Saccharomyces sensu stricto de fermentaciones
tradicionales**



Tesis Doctoral
José Armando Arias García
Valencia, 2008

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Genética

Institut Cavanilles de Biodiversitat i Biologia Evolutiva



**Diversidad genética en las especies del complejo
Saccharomyces sensu stricto de fermentaciones tradicionales**

Trabajo presentado por Dn. JOSÉ ARMANDO ARIAS GARCÍA para optar al grado de doctor por parte de la Universitat de València.

Valencia, 2008



El Dr. Eladio Barrio Esparducer, Profesor Titular del Departamento de Genética de la Universitat de València y la Dra. Amparo Querol Simón, Profesor de Investigación del CSIC, en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, hacen constar que:

José Armando Arias García, licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación recogido en esta memoria, que lleva por título: “Diversidad genética en las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* de fermentaciones tradicionales”, para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas.

Burjassot, Septiembre 2008

Fdo. Eladio Barrio Esparducer

Fdo. Amparo Querol Simón

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias al apoyo otorgado por parte del Gobierno de México, a través de una beca dentro del Programa de Mejoramiento del Profesorado, PROMEP, UDG-482 (2003-2007).

El trabajo aquí descrito se enmarca dentro de los proyectos que llevan por título: “Caracterización fisiológica y biotecnológica de híbridos de especies del género *Saccharomyces* presentes en procesos fermentativos” (ref. AGL2006-12703-CO2-01/ALI) y “Caracterización genética y genómica comparada de híbridos de especies del género *Saccharomyces* de interés biotecnológico” (ref. AGL2006-12703-CO2-02/ALI).

A mis padres

A mis hermanos

A Ana

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis Eladio y Amparo, por la confianza que me dieron y que han hecho posible este “pedazo” de tesis doctoral. Ha sido una decisión acertada y muy satisfactoria el haber dejado México durante un momento (inicialmente 3 años que se hicieron 4, y finalmente 5) y venir a sus laboratorios para continuar con mi incursión en el mundo de las levaduras y, además, el haberme permitido iniciarme en la investigación en evolución molecular de levaduras (vínicas y no vínicas).

A los profesores que enviaron cepas de *Saccharomyces*, muchas gracias por su apoyo y que ayudaron a que fuera posible este trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio del Instituto Cavanilles de la Universidad de Valencia y del 307 del IATA con los que he coincidido en mayor o menor medida. Gracias por proporcionarme sabiduría, buenas ideas, y muy buenas diversiones: Ma. José, Sara, Laura Pérez, Silvia Llopis, Amparo Gamero, Patri, Rosa, Peris (chico estrés), Sandi, Jordi, David, Juanan, Oscar, Luisa, Paloma, Ajo, Noe, Christian, Carmela, Roberto, Vicky, Alma, Silvia, Peris, Laura, Fernanda, Conchi, Chuy y demás compañeros y profesores del Instituto Cavanilles y del IATA, gracias. LAURA cuida tus “monstruitos” no los dejes salir, por que se reproducirán como los Gremlins y no te ayudaran a escribir la tesis; PERIS sigue chipeando pero con escuatro no estrés pues la vida no son círculos rojos y verdes, ni batallas ni ciudades (si tienes tele....) (Yo no fui!!!); SILVIA creo que tu eres la próxima en leer, ánimo, ya falta poco; a JORDI, y a mi compañera enzimática AMPARO G. suerte en el DEA y en sus investigaciones. A todos les deseo buena suerte en sus planes a futuro, que sigan disfrutando de esta etapa de tu vida, por que la vida de estudiante se está terminando.

Un agradecimiento muy especial a Maria Luisa (Alejandro), Oly y Miguel, amigos y colegas que compartieron las andanzas en tierras andaluzas, manchegas y valencianas. A Ely, Silvia, Ofe, Martha, Luis, Pedro y Carmen, Libe, Lily, Mario, Chuy, Carlos, y otros amigos y compañeros del CUCBA, a todos ustedes muchas gracias.

A los chicos de la resi que compartieron su amistad. En especial a Lucia, la próxima bióloga de Segovia, a Mouna, Gemma, Cristina, Susana, Virgi, Vicky, Patri, Pedro el Teru. A Lluís, el veterinario y ahora bombero, gracias por compartir muchos momentos agradables, te deseo mucha suerte y se feliz.

A MURAD, por compartir muchos momentos agradables y no tan agradables, gracias por tu apoyo en todo momento y más cuando se encuentra uno solo y lejos de la familia y seres queridos. Nunca olvidare esos gestos de amistad y todos los ratos que compartimos aquí en España. Te deseo mucha suerte en tu regreso a Jordania o algun otro sitio donde y se que se te cumplirán tus sueños para ti y tu padre y hermanos.

A todos ustedes y a los que he olvidado mencionar, (sin querer) gracias por compartir, desayunos, comidas, meriendas, cenas, pubs, Ferias del vino, Fallas, mascletá, tardes de piscinas, cumpleaños, seminarios, congreso, paellas, patatas bravas, tapas, chivitos, estrés (que a veces se hacia de cuatro), charlas, viajes bueno bueno!!!, son muchos recuerdos.

Finalmente, quiero agradecer de forma especial el apoyo incondicional de mis padres, mis hermanos y cuñados y mis sobrinos que me han dado fuerza a lo largo de estos años para continuar hacia delante. Gracias de todo corazón. A Ana, por tu amor y cariño, paciencia, comprensión, y por estar siempre a mi lado animándome para terminar con este sueño, ya te pagare con la misma moneda

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS	xxi
RESUMEN	xxiii
INTRODUCCIÓN	1
1. LAS LEVADURAS DEL GÉNERO <i>SACCHAROMYCES</i>	1
1.1. Clasificación y taxonomía.	1
1.2. El concepto de especie.	2
1.3. Identificación de especies de levaduras.	4
2. CICLO DE VIDA DE <i>SACCHAROMYCES</i>	5
3. CONSTITUCIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS.	7
4. GENERACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.	9
4.1. Mutación.	10
4.2. Recombinación.	10
4.3. Conversión génica.	11
4.4. Deriva genética.	11
4.5. Migración.	12
4.6. Selección.	13
5. IMPORTANCIA DE <i>SACCHAROMYCES</i> EN FERMENTACIONES.	15
6. BEBIDAS TRADICIONALES.	17
7. DIVERSIDAD GENÉTICA EN <i>SACCHAROMYCES</i>	22
7.1. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética.	23
8. ADAPTACIÓN DE LAS LEVADURAS A LOS AMBIENTES FERMENTATIVOS.	25
8.1. Características fisiológicas de las cepas de <i>Saccharomyces</i> aisladas de fermentaciones.	25
8.2. Origen de <i>S. cerevisiae</i> de ambientes fermentativos asociadas a fermentaciones industriales y tradicionales.	26
8.3. Renovación genómica.	28
8.4. Duplicación génica.	28
8.4.1. Poliploidía.	29
8.4.2. Duplicación cromosómica y aneuploidías.	30
8.4.3. Duplicaciones de un gen o de segmentos génicos.	31
8.5. Formación de híbridos.	32
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. CEPAS DE LEVADURAS.	37
1.1. Cepas de levaduras aisladas de bebidas de Perú.	46
1.2. Cepas de levaduras aisladas de bebidas de México.	47
2. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE LEVADURAS.	47
2.1. YPD.	47
2.2. GPYA.	47
2.3. Medio de cultivo para evaluar la fermentación de azúcares.	47
2.4. Medio para la producción de enzimas glicosidasas.	48
2.5. Medios para evaluar actividades enzimáticas.	48
2.6. Medios para evaluar la tolerancia a estrés.	49

2.7.	Medio LB.....	49
2.8.	Medio LB con Amp/IPTG/X-Gal.	49
3.	PREPARACIÓN DEL INÓCULO Y CONDICIONES DE CULTIVO.	49
4.	AISLAMIENTO DE LEVADURAS.	50
5.	CARACTERIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LEVADURAS AISLADAS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	50
5.1.	Fermentación de azúcares: glucosa, fructosa y maltosa.	50
5.2.	Producción de enzimas glicosidasas.	50
5.3.	Determinación de actividad α -amilasa.	51
5.4.	Tolerancia a distintos estreses.....	51
6.	TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	52
6.1.	Aislamiento de DNA total de levadura.....	52
6.2.	Oligonucleótidos para amplificar las regiones génicas por PCR.....	52
6.3.	Amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico por PCR.	53
6.4.	Amplificación de los dominios D1 y D2 del gen ribosómico 26S.	54
6.5.	Amplificación de los genes para evaluar la diversidad genética.	54
6.6.	PCR-RFLPs de las cepas híbridas.....	55
6.7.	Análisis de restricción de los amplificadores de la región 5,8S-ITS.	55
6.8.	Análisis de restricción del DNA mitocondrial.....	56
6.9.	Electroforesis en campo pulsante.	56
6.10.	Clonación de los productos de PCR.....	57
6.11.	PCR de colonia.....	57
6.12.	Secuenciación del DNA.....	58
7.	OBTENCIÓN DE GENOTIPOS.	58
7.1.	Detección de heterocigotos.....	58
7.2.	Identificación y análisis de los alelos de <i>S. cerevisiae</i>	59
8.	ANÁLISIS GENÉTICO POBLACIONAL.....	60
8.1.	Identificación de recombinación en secuencias de DNA.....	60
8.2.	Identificación de conversión génica en secuencias de DNA.	61
8.3.	Estimas de diversidad genética y pruebas de neutralidad.	61
8.4.	Equilibrio Hardy-Weinberg.	63
8.5.	Desequilibrio de ligamiento entre los alelos.	63
8.6.	Análisis de estructura poblacional.....	63
9.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>S. CEREVISIAE</i>	63
10.	ORIGEN DE LOS HÍBRIDOS <i>S. CEREVISIAE</i> X <i>S. KUDRIAVZEVII</i>	64
11.	COMPARACIÓN GENÉTICA DE <i>S. CEREVISIAE</i> Y <i>S. PARADOXUS</i>	65
CAPÍTULO 1. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE BEBIDAS TRADICIONALES DE PERÚ Y MÉXICO.		67
1.1.	Identificación de los aislados de masato.....	69
1.2.	Identificación de los aislados de chicha de jora.	72
1.3.	Análisis de polimorfismos del DNA mitocondrial de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de masato y chicha de jora.	74
1.4.	Análisis del patrón de bandas de cromosomas de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de masato y chicha de jora.....	78
1.5.	Bebidas fermentadas tradicionales de México.....	80
1.5.1.	Identificación de los aislados de agave.	81
1.5.2.	Identificación de los aislados de tejuino.	84
1.5.3.	Identificación de los aislados de tepache.	86
1.5.4.	Identificación de los aislados de tuba.....	86

1.5.5.	Identificación de los aislados de <i>Drosophila</i>	87
1.6.	Distribución de cepas aisladas en México.	88
1.7.	Análisis del patrón de restricción del mtDNA	91
1.8.	Análisis del patrón de bandas de cromosomas.....	92
1.9.	Propiedades fisiológicas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de bebidas tradicionales de Perú.	93
1.9.1.	Capacidad de fermentar diferentes azúcares.....	94
1.9.2.	Actividad α -amilasa.	96
1.9.3.	Crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés.	98
1.9.4.	Producción de glicosidasas.....	102
1.10.	Propiedades fisiológicas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas de bebidas tradicionales de México.	105
1.10.1.	Capacidad de fermentar diferentes azúcares.....	105
1.10.2.	Actividad α -amilasa.	106
1.10.3.	Crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés.	108
1.10.4.	Producción de glicosidasas.....	112
1.11.	Discusión.....	114
CAPÍTULO 2. VARIABILIDAD GENÉTICA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DE FERMENTACIONES TRADICIONALES DE LATINOAMÉRICA.....		119
2.1	RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA DE <i>S. CEREVISIAE</i>	120
2.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>EGT2</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i>	124
2.3	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>CAT8</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i>	143
2.4	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>BRE5</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i>	163
2.5	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>GAL4</i> EN <i>S. CEREVISIAE</i>	185
2.6	ANÁLISIS DE LOS GENOTIPOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS.....	206
2.7	ANÁLISIS DE LA RECOMBINACIÓN EN LAS POBLACIONES VÍNICAS Y NO VÍNICAS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	217
2.8	ANÁLISIS DE DIVERGENCIA ENTRE POBLACIONES VÍNICAS Y NO VÍNICAS DE <i>S.</i> <i>CEREVISIAE</i>	220
2.9	PRUEBAS DE SELECCIÓN.....	222
2.9.1	Estimas de neutralidad basada en el polimorfismo intraespecífico.....	223
2.9.2	Estimas de neutralidad con polimorfismos intraespecíficos y divergencia. Prueba de neutralidad de McDonald-Kreitman (McDK).....	225
2.9.3	Prueba de neutralidad de Hudson, Kreitman y Aguadé (HKA).....	228
2.10	DISCUSIÓN.....	231
CAPITULO 3. ESTUDIO GENÉTICO DE <i>S. PARADOXUS</i>.....		243
3.1	POLIMORFISMO Y DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA DE <i>S. PARADOXUS</i>	245
3.2	ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE <i>S. PARADOXUS</i>	249
3.3	ORIGEN DE LOS ALELOS VÍNICOS DE <i>S. CEREVISIAE</i>	253
3.4	DIVERGENCIA NUCLEOTÍDICA ENTRE <i>S. CEREVISIAE</i> Y <i>S. PARADOXUS</i>	253
3.5	INTROGRESION DE <i>S. CEREVISIAE</i> Y <i>S. PARADOXUS</i>	257
3.6	ESTUDIO DEL GEN MITOCONDRIAL <i>COX2</i> EN <i>SACCHAROMYCES</i> SPP.....	260
3.7	DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA EN LA REGIÓN GÉNICA <i>COX2</i>	270
3.8	DISCUSIÓN.....	271
CAPITULO 4. ORIGEN DE LOS HÍBRIDOS <i>S. CEREVISIAE</i> X <i>S.</i> <i>KUDRIAVZEVII</i>.....		281

4.1	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>EGT2</i>	282
4.2	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>BRE5</i>	286
4.3	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>CAT8</i>	290
4.4	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>GAL4</i>	293
4.5	ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE <i>COX2</i>	297
4.6	DISCUSIÓN.....	306
	DISCUSION GENERAL.....	311
	CONCLUSIONES.....	323
	ANEXOS.....	327
	BIBLIOGRAFÍA.....	361

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I1. Productos fermentados a partir de cereales, jugos de frutas y la savia de plantas que se consumen en Latinoamérica.	19
Tabla M1. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo, así como el origen geográfico y fuente de aislamiento.	38
Tabla M2. Cepas de <i>S. paradoxus</i> utilizadas en el trabajo, así como el origen geográfico y fuente de aislamiento.	44
Tabla M3. Cepas híbridas de <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> utilizadas en el trabajo, así como el origen y fuente de aislamiento.	45
Tabla M4. Oligonucleotidos utilizados en el trabajo.	53
Tabla 1.1 Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de masato y chicha de jora de Perú.	71
Tabla 1.2 Distribución de especies de levaduras identificadas en los cuatro tipos de masato.	73
Tabla 1.3. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidos de diferentes muestras de masato. ...	76
Tabla 1.4. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de las diferentes muestras de chicha de jora.	78
Tabla 1.5. Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de bebidas elaboradas con <i>Agave</i> spp.	83
Tabla 1.6. Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tejuino.	85
Tabla 1.7. Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tepache.	86
Tabla 1.8. Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tuba.	87

Tabla 1.9. Peso molecular del producto de PCR amplificado y de los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de <i>Drosophila</i>	88
Tabla 1.10. Distribución de las especies de levaduras identificadas en bebidas fermentadas tradicionales de México.	90
Tabla 1.11. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA (%) de <i>S. cerevisiae</i> detectados en muestras de bebidas tradicionales de México.	92
Tabla 1.12. Fermentación de glucosa, fructosa y maltosa de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de Perú.	95
Tabla 1.13. Actividad α -amilasa de los aislados identificados como <i>S. cerevisiae</i> de las bebidas fermentadas tradicionales de Latinoamérica en comparación con cepas control de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bayanus</i>	97
Tabla 1. 14. Tolerancia a pH, glucosa, temperatura y etanol, como factor de estrés de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de Perú....	101
Tabla 1.15. Producción de glucosidasa y xilosidasa de las cepas de las bebidas tradicionales de Perú.....	104
Tabla 1.16. Fermentación de glucosa, fructosa y maltosa de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de México.	106
Tabla 1.17. Producción de amilasa de los aislados identificados como <i>S. cerevisiae</i> de las bebidas fermentadas tradicionales de México en comparación con cepas vínicas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bayanus</i>	107
Tabla 1.18 Tolerancia a pH, glucosa, temperatura y etanol, como factor de estrés de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de México.....	110
Tabla 1.19. Producción de glucosidasas y xilosidasas de las cepas de las bebidas tradicionales de México.....	113
Tabla 2.1. Diversidad nucleotídica de diferentes regiones génicas del genoma de <i>Saccharomyces</i>	121
Tabla 2.2. Diversidad genética de las cuatro regiones nucleares y una mitocondrial de <i>S. cerevisiae</i>	123
Tabla 2.3. Diversidad genética de cepas vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i> para la región génica <i>EGT2</i>	134
Tabla 2.4. Diversidad genética de cepas vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i> para la región génica <i>CAT8</i>	152

Tabla 2.5. Diversidad genética de las cepas vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i> para la región génica <i>BRE5</i>	172
Tabla 2.6. Diversidad genética de cepas vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i> para la región génica <i>GAL4</i>	193
Figura 2.7. Genotipos compartidos entre las cepas de <i>S. cerevisiae</i>	208
Tabla 2.8. Distribución de genotipos de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> en relación a las cuatro regiones génicas estudiadas.....	211
Tabla 2.9. Diversidad alélica en poblaciones vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	214
Tabla 2.10. Significación de la prueba de desequilibrio de ligamiento en las poblaciones vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	216
Tabla 2.11. Tasa de recombinación y el número mínimo de sucesos de recombinación para cada una de las población vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	219
Tabla 2.12. Divergencia genética (F_{ST}) entre poblaciones vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	221
Tabla 2.13. D de Tajima, D^* y F^* de Fu y Li para las cuatro regiones nucleares y el gen mitocondrial <i>COX2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	224
Tabla 2.14. Relación dNS/dS (ω) de sustituciones polimórficas y fijadas en alelos vínicos y no vínicos de cuatro regiones nucleares de <i>S. cerevisiae</i> respecto a <i>S. paradoxus</i> y entre la población vínica y no vínica.....	228
Tabla 2.15. Prueba de HKA con las sustituciones totales de las cuatro regiones nucleares de <i>S. cerevisiae</i> respecto a las tres subpoblaciones de <i>S. paradoxus</i>	229
Tabla 2.16. Prueba de HKA con las cuatro regiones nucleares de los alelos vínicos de <i>S. cerevisiae</i> respecto a los no vínicos.....	231
Tabla 3.1. Estimaciones de diversidad nucleotídica en las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial en <i>S. paradoxus</i>	248
Tabla 3.2. Divergencia nucleotídica de las cinco regiones génicas entre <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. paradoxus</i>	255
Tabla 3.3. Divergencia nucleotídica entre <i>S. cerevisiae</i> y las poblaciones de <i>S. paradoxus</i> y entre las poblaciones de <i>S. paradoxus</i> en las cinco regiones génicas, expresada en sustituciones nucleotídicas por sitio.....	256

Tabla 3.4. Estimaciones de diversidad nucleotídica para la región génica <i>COX2</i> de <i>S. paradoxus</i> y cepas vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	270
Tabla 4.1. Posiciones nucleotídicas variables en <i>EGT2</i> de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i>	286
Tabla 4.2. Posiciones nucleotídicas variables en <i>BRE5</i> de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i>	289
Tabla 4.3. Posiciones nucleotídicas variables en la región génica <i>CAT8</i> de los alelos de cepas híbridas <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	293
Tabla 4.4. Posiciones nucleotídicas variables en la región génica <i>GAL4</i> de los alelos de cepas híbridas <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	296
Tabla 4.5. Posiciones nucleotídicas variables en la región mitocondrial <i>COX2</i> de las cepas tipo de <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> y <i>S. kudriavzevii</i> , diversas cepas de <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> y las cepas híbridas <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i>	302
Tabla 4.6. Genotipo de las cepas híbridas <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. kudriavzevii</i> en base a cuatro regiones nucleares y una mitocondrial.....	305

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I1. Ciclo de vida de <i>Saccharomyces</i>	6
Figura I2. Diferentes tipos de apareamiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con relevancia genética en la población: anfigimixis, haplo-selfing y automixis.....	7
Figura M1. Secuencia de DNA en donde se muestran dos sitios heterocigotos marcados con una flecha y el programa asigna C y C.	60
Figura 1.1. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa <i>Hinfl</i> de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de masato.	75
Figura 1.2. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa <i>Hinfl</i> de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de chicha de jora.....	77
Figura 1.3. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de masato.....	79
Figura 1.4. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de chicha de jora.	80
Figura 1.5. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa <i>Hinfl</i> de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas de México.....	91
Figura 1.6. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas de México.....	93
Figura 2.1. Red filogenética de la región nuclear <i>EGT2</i> con los alelos detectados entre los alelos de cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de <i>S. cerevisiae</i>	125
Figura 2.1c. Red filogenética de la región nuclear <i>EGT2</i> con los alelos detectados en las poblaciones vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	126
Figura 2.1d. Red filogenética de la región nuclear <i>EGT2</i> con los alelos detectados en las poblaciones no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	130
Figura 2.2. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de <i>EGT2</i> de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de <i>S. cerevisiae</i>	135
Figura 2.3. Árbol obtenido con parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica <i>EGT2</i>	137

Figura 2.4. Posiciones nucleotídicas polimórficas en los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>EGT2</i> ..	139
Figura 2.5. Posiciones nucleotídicas polimórficas en alelos recombinantes o con conversión génica de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>EGT2</i>	140
Figura 2.6. Ejemplos de combinaciones alélicas en cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica <i>EGT2</i>	142
Figura 2.7. Red filogenética de la región nuclear <i>CAT8</i> con los alelos detectados entre las cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de <i>S. cerevisiae</i>	144
Figura 2.7c. Red filogenética de la región nuclear <i>CAT8</i> con los alelos detectados en las poblaciones vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	145
Figura 2.7d. Red filogenética de la región nuclear <i>CAT8</i> con los alelos detectados en las poblaciones no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	148
Figura 2.8. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de <i>CAT8</i> de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de <i>S. cerevisiae</i>	153
Figura 2.9. Árbol obtenido con máxima parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica <i>CAT8</i>	155
Figura 2.10. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>CAT8</i>	157
Figura 2.11. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>CAT8</i>	159
Figura 2.12 Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos de <i>S. cerevisiae</i> con recombinación en la región génica <i>CAT8</i>	160
Figura 2.13. Ejemplos de combinaciones alélicas de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica <i>CAT8</i>	162
Figura 2.14. Red filogenética de la región nuclear <i>BRE5</i> con los alelos detectados entre los alelos de cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de <i>S. cerevisiae</i>	164
Figura 2.14c. Red filogenética de la región nuclear <i>BRE5</i> con los alelos detectados en las poblaciones vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	166
Figura 2.14d. Red filogenética de la región nuclear <i>BRE5</i> con los alelos detectados en las poblaciones no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	169

Figura 2.15. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de <i>BRE5</i> de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de <i>S. cerevisiae</i>	173
Figura 2.16. Árbol obtenido con parsimonia estadística, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica <i>BRE5</i>	176
Figura 2.17. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>BRE5</i>	177
Figura 2.18. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>BRE5</i>	179
Figura 2.19. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos de <i>S. cerevisiae</i> con recombinación en la región génica <i>BRE5</i>	180
Figura 2.20. Combinaciones alélicas de <i>S. cerevisiae</i> de vino y de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica <i>BRE5</i>	183
Figura 2.21. Red filogenética de la región nuclear <i>GAL4</i> con los alelos detectados entre los alelos de cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de <i>S. cerevisiae</i>	186
Figura 2.21.c. Red filogenética de la región nuclear <i>GAL4</i> con los alelos detectados en las poblaciones vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	187
Figura 2.21d. Red filogenética de la región nuclear <i>GAL4</i> con los alelos detectados en las poblaciones no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	190
Figura 2.22. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de <i>GAL4</i> de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de <i>S. cerevisiae</i>	195
Figura 2.23. Árbol obtenido con máxima parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica <i>GAL4</i>	197
Figura 2.24. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>GAL4</i>	200
Figura 2.25. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos de <i>S. cerevisiae</i> con recombinación en la región génica <i>GAL4</i>	200
Figura 2.26. Combinaciones alélicas de <i>S. cerevisiae</i> de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica <i>GAL4</i>	204

Figura 2.27. Cladograma UPGMA con los valores de F_{ST} de las poblaciones vínicas y no vínicas de <i>S. cerevisiae</i>	222
Figura 3.1. Posiciones nucleotídicas polimórficas de las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i> en las cuatro regiones nucleares <i>CAT8</i> , <i>BRE5</i> , <i>GAL4</i> y <i>EGT2</i> y la mitocondrial <i>COX2</i>	246
Figura 3.2. Árboles filogenéticos de <i>Saccharomyces. paradoxus</i> y <i>S. cerevisiae</i> de las regiones génicas nucleares <i>BRE5</i> , <i>CAT8</i> , <i>GAL4</i> y <i>EGT2</i> con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.	251
Figura 3.3 Árbol filogenético de <i>S. paradoxus</i> y <i>S. cerevisiae</i> de la región génica mitocondrial <i>COX2</i> con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.	252
Figura 3.4. Árbol filogenético de las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i> y los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> de la región génica <i>EGT2</i> con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.	259
Figura 3.5. Posiciones nucleotídicas polimórficas de las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i> y algunos alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i> en la región génica <i>EGT2</i>	260
Figura 3.6. Red filogenética de la región mitocondrial <i>COX2</i> de los alelos de cepas vínicas (a) y de los alelos de cepas no vínicas (b) de <i>S. cerevisiae</i> y las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i>	262
Figura 3.7. Posiciones nucleotídicas de los polimorfismos en los haplotipos detectados en el gen mitocondrial <i>COX2</i> para las cepas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. paradoxus</i>	267
Figura 3.8. Árbol filogenético de <i>S. paradoxus</i> y <i>S. cerevisiae</i> de la posición 1 a la 525 (a) y de la 526 a la 585 (b) de la región mitocondrial <i>COX2</i> con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.	269
Figura 4.1. Árbol filogenético de <i>EGT2</i> con los alelos de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i>	285
Figura 4.2. Árbol filogenético de <i>BRE5</i> de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de <i>S. cerevisiae</i>	288

Figura 4.3. Árbol filogenético de *CAT8* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*.....**292**

Figura 4.4. Árbol filogenético de *GAL4* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*.....**295**

Figura 4.5. Árbol filogenético del gen mitocondrial *COX2* de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y las cepas referencia de especies del género *Saccharomyces*.....**299**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Similitud de las secuencias de la región del 26S rRNA de los patrones de restricción no identificados de los aislados de bebidas tradicionales de Latinoamérica, mediante un Blast como método de comparación.....	327
Anexo 2. Genotipo de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> considerando las cuatro regiones nucleares y una mitocondrial.....	328
Anexo 3. Desequilibrio de ligamiento entre las cuatro regiones génicas estudiadas en las poblaciones vínicas (a) y no vínicas (b) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	334
Anexo 4. Estimaciones de neutralidad con la prueba de McDK para las cuatro regiones génicas de <i>S. cerevisiae</i> en comparación con las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i>	336
Anexo 5. Tablas de pruebas de neutralidad mediante el método de HKA para las cuatro regiones génicas de <i>S. cerevisiae</i> considerando sustituciones sinónimas, no sinónimas y totales y las tres poblaciones de <i>Saccharomyces paradoxus</i>	339
Anexo 6. Diversidad nucleotídica de las tres poblaciones de <i>S. paradoxus</i> en las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial.....	360

Abstract

Traditional fermented beverages and foods from Latin America are poorly studied. The yeast microbiota involved in these ancient processes has been isolated from “Old World” yeast populations until the introduction of winemaking and distillation. The aim of this work was to study the genetic variation of *Saccharomyces* strains from traditional and industrial fermentations and to deduce the origin and evolution of *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* were isolated from traditional Latin American fermentations. Some of the investigated *S. cerevisiae* strains showed good physiological properties that are important in the wine production. A genetic analysis was performed based on sequencing of four nuclear and one mitochondrial gene of strains isolated from Latin-American traditional and industrial (mainly European) fermentative processes. Genetic variability from *S. cerevisiae* strains shows two populations, one from wine and the second from non-wine fermentations. Wine population represent a very homogeneous group, with low recombination rate, high frequency of homozygous strains, low genotypic diversity and low nucleotide divergence. These finding indicate a recent domestication event by clonal reproduction and some events of haplo-selfing. Non-wine populations represent a heterogeneous group, with clonal reproduction and rare sexual reproduction by anfimixis. Wine and non-wine alleles detected in Latin-American populations indicated genetic flow. Phylogenetic analysis shows that wine alleles of *S. cerevisiae* are originated from non-wine alleles of *S. cerevisiae*, but not from *S. paradoxus*. Two theories are proposed for the origin of wine *S. cerevisiae* strains: 1) wine yeast represent a population with low genetic diversity because “wine” alleles were fixed and emerged after domestication event from an ancestral and heterogeneous population of non-wine yeast; 2) wine and non-wine strains represent populations with different alleles, but genetic flow is frequent from wine to non-wine, and rare in opposite direction. Recombination and introgression events detected in *Saccharomyces* species indicated that hybridizations occur more frequently then expected. According to the phylogenetic results wine hybrids *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* were originated from three hybridizations events, and brewery hybrids from one.

RESUMEN

El género *Saccharomyces* incluye tanto especies naturales como especies de levaduras que se utilizan en fermentaciones industriales y tradicionales. Algunas bebidas fermentadas, como son el Pulque y la Chicha, se obtienen mediante un proceso tradicional desarrollado durante el Neolítico americano en las civilizaciones precolombinas mesoamericanas y andinas. Por ello, las levaduras que participan en estos procesos de fermentación han estado aisladas de las poblaciones vínicas del resto del mundo, hasta la llegada de los europeos en 1942, con la introducción de nuevos procesos fermentativos, como son la producción de vino y los destilados. El objetivo del presente estudio fue determinar la variación genética de las cepas del género *Saccharomyces*, tanto presentes en fermentaciones tradicionales como las de procesos fermentativos industriales, para deducir el origen y la historia evolutiva de *Saccharomyces cerevisiae*. Con técnicas moleculares se detectó a *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* en bebidas tradicionales de Latinoamérica, y mediante estudios fisiológicos se demostró que *S. cerevisiae* presenta propiedades tecnológicas adecuadas para una fermentación vínica. Con el análisis filogenético de cuatro regiones nucleares y una mitocondrial se detectó que *S. cerevisiae* esta compuesta por dos poblaciones, una de ambientes vínicos y la otra de ambientes no vínicos, muy diferentes entre ellas. Las poblaciones vínicas se caracterizan por ser un grupo muy homogéneo, con baja tasa de recombinación, alta frecuencia de homocigosis, con menos diversidad genotípica y menos divergencia nucleotídica. Esto indica una reciente domesticación, con reproducción clonal y sucesos de autodiploidización. En cambio, las poblaciones no vínicas están formadas por un grupo muy heterogéneo, con reproducción clonal pero la reproducción sexual más frecuente por anfimixis. La detección de alelos vínicos y no vínicos entre las cepas de las poblaciones latinoamericanas indica que existe flujo genético entre ambas poblaciones. Por otro lado, se detectó que los alelos vínicos de *S. cerevisiae* no provienen de *S. paradoxus* sino de los alelos no vínicos de *S. cerevisiae*. En base a los resultados obtenidos se proponen dos

posibles escenarios no incompatibles para el origen de *S. cerevisiae*. En un primer escenario, las cepas no vínicas forman una población muy heterogénea con alelos muy diversos, lo que dio lugar a la aparición de las cepas vínicas por domesticación, y se vio reducida la diversidad genética cuando se fijaron los alelos vínicos. En el segundo caso, las cepas vínicas y no vínicas, son poblaciones con alelos muy diferentes, pero con flujo genético se intercambiaron alelos vínicos en no vínicos, pero muy raro en el otro sentido. Finalmente se proponen que al menos tres eventos de hibridación dieron origen a las cepas híbridas aisladas de vinos, y probablemente a partir de uno solo para las cepas híbridas cerveceras. Sin embargo, los fenómenos de recombinación y de introgresión detectados entre diferentes especies de *Saccharomyces* permiten suponer que la hibridación puede ocurrir con mayor frecuencia.

INTRODUCCIÓN

1. Las levaduras del género *Saccharomyces*.

1.1. Clasificación y taxonomía.

Las levaduras son hongos unicelulares con forma redonda, ovoide o cilíndrica que se reproducen asexualmente por gemación o bipartición, y si existe reproducción sexual, las esporas denominadas ascosporas o basidiosporas, no se forman dentro de un cuerpo fructífero. Son organismos saprofitos que crecen sobre una gran variedad de sustratos de origen vegetal o animal, o bien son parásitos de plantas y animales. De acuerdo a la estructura de reproducción sexual que se forme, las levaduras se agrupan en tres órdenes: Endomycetales cuando las esporas están incluidas en una bolsa denominada asca, y Tremellales y Ustilaginales, cuando se desarrollan sobre una estructura que las soporta (esterigma). Cuando no se ha encontrado alguna estructura de reproducción sexual, las especies se denominan levaduras imperfectas o anamórficas y se agrupan en la clase Blastomycetes (Kurtzman, 1998).

Las levaduras con capacidad de llevar a cabo la fermentación de azúcares se agrupan, dentro del orden Endomycetales, en la familia Saccharomycetaceae. Recientemente, a partir del análisis filogenético de varias regiones nucleares y mitocondriales, se ha propuesto la clasificación de la familia Saccharomycetaceae en 11 clados bien definidos (Kurtzman and Robnett, 2003). En el género *Saccharomyces* se incluyen las especies con una gran capacidad fermentativa, en presencia o ausencia de oxígeno, para la producción de etanol y que, previamente, se les había denominado como "*Saccharomyces sensu stricto*" (Vaughan-Martini and Martini, 1998).

El género *Saccharomyces* se caracteriza por presentar una fase vegetativa con gemación multipolar como reproducción asexual. Las células son esféricas, ovoides o elongadas que, en ocasiones, pueden formar un pseudomicelio, pero

nunca un micelio verdadero. Las ascas son persistentes con una a cuatro ascosporas esféricas a ovoides (Kurtzman and Robnett, 2003).

La identificación y clasificación de especies dentro del género *Saccharomyces* siempre ha sido difícil, ya que comparten muchas características y no se ve una clara separación entre ellas. Convencionalmente, la taxonomía de levaduras se realiza con pruebas morfológicas y fisiológicas, pero no ha sido muy concluyente para diferenciar especies de *Saccharomyces*. Las posibles causas de esta limitación son: en primer lugar, que la morfología de levaduras es muy variable dentro de la misma especie; otra posible causa es que la diferenciación entre dos taxones se lleva a cabo en base a un reducido número de pruebas fisiológicas, con el riesgo de que la mayoría de las características fisiológicas sean producto de una mutación en un solo gen (Rainieri et al., 2003).

Tradicionalmente, la delimitación de especies en organismos que presentan reproducción sexual se realiza mediante la obtención e identificación de híbridos entre dos especies diferentes para determinar si estos producen progenies viables y fértiles. Las especies de *Saccharomyces* pueden presentar reproducción sexual, sin embargo, y sobre todo en aislados procedentes de procesos fermentativos, se han encontrado cepas que no producen esporas por defectos en la meiosis, lo que ocasiona errores en la aplicación del concepto de especie basada en este criterio.

1.2. El concepto de especie.

El concepto de especie es fundamental para las ciencias biológicas (Coyne and Orr, 1998; Mallet, 1995), pero su definición siempre ha sido muy complicada. El concepto biológico de especie (CBE) es el más aceptado desde que Ernest Mayr lo propuso en 1942, y se aplica en organismos con reproducción sexual. Así, se considera que una especie se compone de organismos que son capaces de producir una progenie híbrida viable y fértil, y que muestran aislamiento reproductivo con individuos de otras especies, a través de diversos mecanismos, tanto prezigóticos como postzigóticos.

Los problemas al aplicar el concepto biológico de especie ocurren en organismos con reproducción asexual, incluyendo algunos hongos (Taylor et al., 2000), plantas (Rieseberg, 1997), así como por la transferencia horizontal de genes entre bacterias (Gogarten and Townsend, 2005). Debido a los problemas en aplicar el concepto biológico de especie, se han propuesto 24 conceptos de especie (Hey, 2001), pero solo mencionaremos algunos que se pueden aplicar a las levaduras.

Varias alternativas al concepto de especie biológica comprenden conceptos de especies basados en una cohesión genética o fenotípica. El concepto de especie como agrupamientos genotípicos (CEAG) (Mallet, 1995) considera una especie como un grupo de individuos morfológica o genéticamente diferentes de otros grupos, y cuando están en contacto, hay pocos o ningún grupo intermedio entre ellos. El concepto de especie por reconocimiento (CER) (Paterson, 1985) comprende una población incluyente de individuos biparentales que comparten un sistema común de fertilización. El concepto de especie por cohesión (CEC) (Templeton, 1989) considera a la población más incluyente de individuos con un potencial de cohesión fenotípica, la cual se mantiene mediante diversos mecanismos intrínsecos de cohesión. Estos mecanismos están clasificados en reproductivos, que limitan el intercambio genético, y en demográficos que definen los límites de la dispersión de nuevas variantes a través de la deriva genética y/o la selección natural.

Otra alternativa al concepto de especie biológica son los conceptos de especie basados en una cohesión evolutiva. Entre ellos, esta el concepto ecológico de especie (CEE) (Van Valen, 1976), el cual define una especie como un linaje o conjunto de linajes afines que evolucionan separadamente de otros, y que ocupan una zona adaptativa o nicho ecológico. El concepto evolutivo de especie (CEvE) (Wiley, 1978), define una especie como un linaje de organismos o poblaciones descendientes de un ancestro común que mantienen su identidad en relación a otros linajes, que evoluciona independientemente y que tiene su propio destino evolutivo.

Por otro lado, están los conceptos de especie basados en la historia evolutiva de los individuos que la componen. El concepto filogenético de especie (CFE) (Cracraft, 1989) define a la especie como un grupo monofilético diferenciable al considerar su historia evolutiva y su distribución geográfica. El problema de éste concepto de especie es el conocimiento incompleto de la historia evolutiva puede llevar a una delimitación arbitraria de las especies (Hudson, 2002).

1.3. Identificación de especies de levaduras.

La identificación de especies de levaduras a través de la taxonomía convencional se realiza teniendo en cuenta diversas características morfológicas y pruebas bioquímicas (Barnett, 1990); sin embargo, en ocasiones resulta una clasificación incorrecta de la especie o bien una identificación incorrecta de las cepas. Las levaduras del genero *Saccharomyces* no son la excepción y en ocasiones se obtienen errores en la diferenciación de especies dentro del género (Rainieri et al., 2003).

Con el progreso de la biología molecular, se han desarrollado nuevas técnicas para la identificación y caracterización de levaduras (Esteve-Zarzoso et al., 1999; James et al., 1997; Kurtzman and Robnett, 2003). La taxonomía molecular, es decir, el estudio de la clasificación de especies mediante técnicas de biología molecular, se desarrolló como consecuencia de las limitaciones de la taxonomía convencional y por los problemas derivados al aplicar el concepto de especie biológica (Rainieri et al., 2003), por lo que el uso de estas técnicas se ha incrementado con el fin de evitar los problemas observados en la taxonomía tradicional. Las primeras técnicas moleculares utilizadas para la identificación de especies de levaduras fueron la determinación de la similitud de genomas basada en su composición nucleotídica (% G+C) o en reasociación del DNA, en donde una similitud mayor del 80% indica conespecificidad (Price, 1978; Vaughan-Martini and Kurtzman, 1985).

Entre las técnicas más utilizadas para diferenciar especies y cepas de levaduras cabe destacar: los cariotipos electroforéticos, basados en el

polimorfismo del DNA cromosómico (Johnston, 1986); la secuenciación o restricción del DNA mitocondrial (Belloch et al., 1997; Belloch et al., 1998); los polimorfismos de fragmentos de restricción o RFLP (Guillamón et al., 1994); los métodos de genotipado basados en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Barros Lopes et al., 1998; Ryu et al., 1998), el DNA polimórfico amplificado al azar o RAPDs (Fernández-Espinar et al., 2003), los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados o AFLP (Azumi and Goto-Yamamoto, 2001; de Barros Lopes et al., 1999); la secuenciación de genes nucleares (Valente et al., 1999); los microsatélites, que son secuencias de nucleótidos repetidos en tándem al azar a lo largo del genoma (Bradbury et al., 2006). En el capítulo 1 analizaremos con más detalle la aplicación de algunas de estas técnicas en la identificación y caracterización de las especies del género *Saccharomyces*.

2. Ciclo de vida de *Saccharomyces*.

Las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran en la naturaleza como organismos unicelulares, generalmente diploides, que se dividen asexualmente por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre, posteriormente ocurre la división nuclear, la síntesis de la pared y finalmente la separación de las dos células. Este ciclo asexual se puede dar tanto en cultivos de células diploides como haploides (Figura I1).

En la fase sexual, las células de una levadura diploide generan ascas con 4 esporas haploides producto de la meiosis. Las esporas pueden presentar dos tipos sexuales a ó α . El tipo sexual de una célula haploide esta determinado por su genotipo en el locus *MAT* ("mating-type") situado en el cromosoma III. Las dos formas del locus *MAT*, *MAT a* y *MAT α* , difieren tanto en la secuencia nucleotídica, el tamaño, como los genes que incluyen (Metzenberg and Glass, 1990). Las esporas germinan y pueden tener crecimiento vegetativo y mantenerse así hasta que se forme un cigoto mediante apareamiento con otra célula haploide del tipo opuesto.

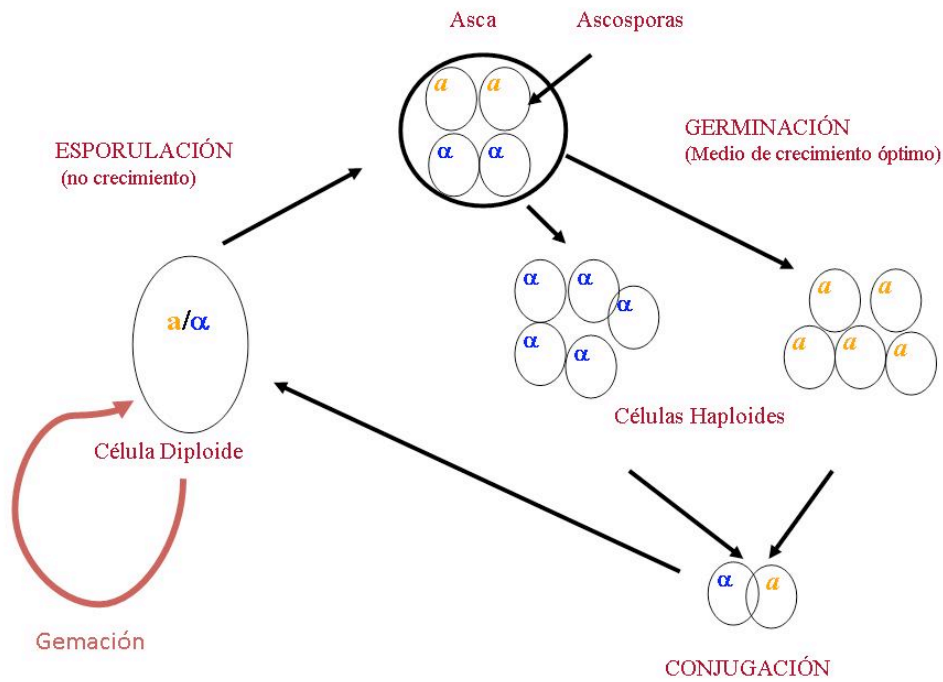


Figura I1. Ciclo de vida de *Saccharomyces*.

La reproducción sexual en *Saccharomyces* es versátil, incluyendo tres tipos diferentes de apareamiento: la anfimixis, la automixis y el “haplo-selfing” (Figura I2) (Knop, 2006). El suceso clásico de apareamiento entre dos células haploides, que provienen de diferentes células diploides no relacionadas, con diferente tipo sexual, se conoce como anfimixis o cruzamiento inter-tétrada y ocurre en cepas heterotálicas. La automixis o cruzamiento intra-tétrada, en la cual dos esporas de tipo opuesto, producto de una misma meiosis, se aparean para la formación del diploide. El apareamiento puede ocurrir en el asca antes de que se rompa la pared del asca, o cuando las esporas son liberadas. Por último, se puede dar “haplo-selfing”, o autodiploidización, que ocurre en cepas homotálicas, es el apareamiento entre una célula y una de sus células hijas después del cambio del tipo sexual de célula hija. Las células poseen copias del locus *MAT* que están silenciadas y por tanto no interfieren en la determinación sexual (*HML* y *HMR*). El proceso de cambio en el tipo sexual es el resultado de una translocación de la información no expresada del locus *HML* o *HMR* al locus *MAT*, mediante una endonucleasa (producto del locus *HO*) que reconoce un sitio de corte en el locus *MAT* y ataca los extremos libres

generados. Los sistemas de reparación del DNA son activados y reemplazan el locus *MAT* por una de las copias adicionales *HMR* o *HML* (Herskowitz, 1988).

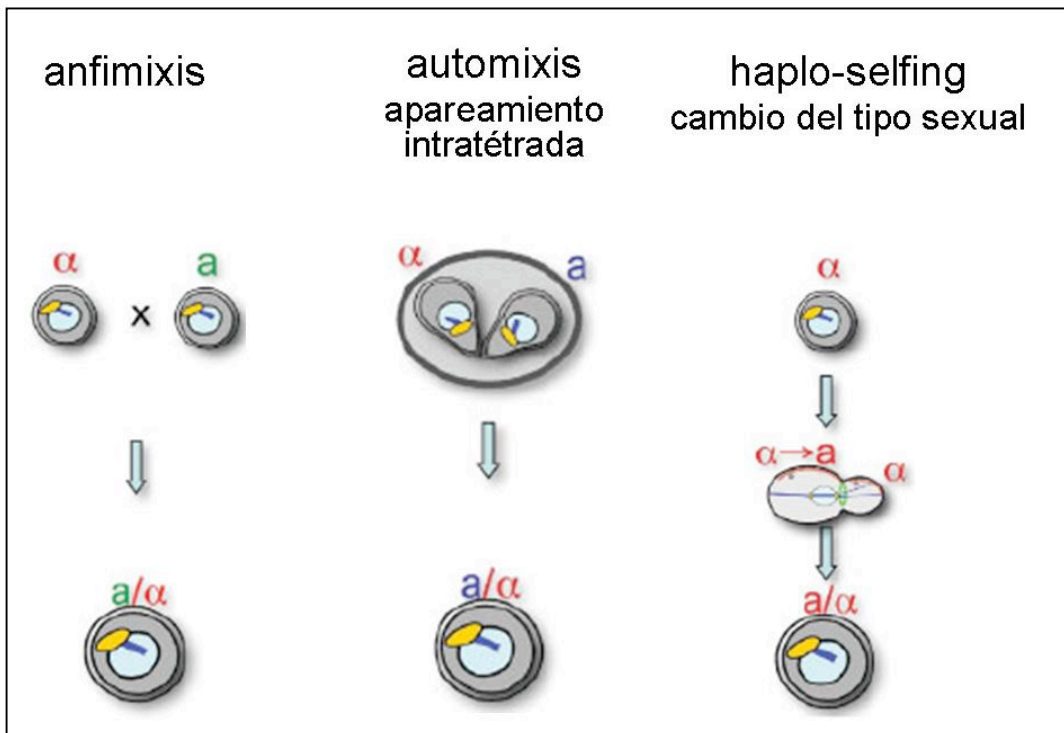


Figura I2. Diferentes tipos de apareamiento de *Saccharomyces cerevisiae* con relevancia genética en la población: anfimixis, automixis y haplo-selfing.

3. Constitución genética de levaduras.

Desde que el hombre observó que los jugos de frutas se fermentan de forma espontánea produciendo una bebida alcohólica, *S. cerevisiae* y especies relacionadas se han convertido en componentes importantes de muchas actividades humanas, entre ellas, la panificación, la producción de cerveza, los destilados y la vinificación (Mortimer et al., 1994). En general las cepas de *Saccharomyces*, que se utilizan industrialmente, son organismos muy especializados, que se han adaptado a diferentes ambientes o nichos ecológicos proporcionados por las diferentes actividades humanas. Este proceso, descrito como “domesticación”, es responsable de las características genéticas particulares de las levaduras industriales. La mayoría de las cepas que se utilizan en estos procesos industriales (que consideramos como no silvestres) son organismos homotáticos a diferencia de las cepas silvestres y de laboratorio, que son heterotáticas.

Introducción

El genoma de *S. cerevisiae* es relativamente pequeño, con un gran número de cromosomas, poco DNA repetitivo y genes mayoritariamente sin intrones. Una cepa haploide contiene aproximadamente 12–13 megabases de DNA nuclear, distribuidos en 16 cromosomas, y estos varían en tamaños desde 250 a 2000 kb (Barre et al., 1992; Pretorius, 2000). Sin embargo, el número de bandas observadas en los cariotipos electroforéticos por campo pulsante, varía de 14 para cepas de laboratorio a más de 20 en las cepas industriales (Codón et al., 1998), debido tanto a diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos como a la presencia de reordenaciones y aneuploidias.

Aunque la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* de laboratorio son haploides o diploides y tienen la longitud de los cromosomas bien definidas, las cepas industriales son principalmente diploides, aneuploides o poliploides (Codón and Benítez, 1995). La presencia de aneuploidias o poliploidias 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).

Las cepas vínicas suelen presentar un elevado grado de polimorfismo en la longitud de sus cromosomas, el cual es generado por recombinación heteróloga mediada por los transposones Ty o por las secuencias repetidas subteloméricas (Bidenne et al., 1992; Rachidi et al., 1999). Esto ocasiona una gran variabilidad en la capacidad de esporulación (entre 0 y 75%) y en la viabilidad de las esporas (de 0 hasta 98%) (Codón and Benítez, 1995; Mortimer et al., 1994). Sin embargo, también ha permitido una diferenciación de cepas a nivel de cariotipos (Guillamón et al., 1996).

La heterocigosidad ha sido observada tanto en cepas homotáticas como heterotáticas (Barre et al., 1992; Codón and Benítez, 1995). Sin embargo, la mayoría de las cepas industriales son homotáticas, de manera que tras la esporulación se produce una división mitótica en la que la célula hija cambia de sexo y conjuga con la célula madre de tipo contrario, por lo que el cigoto diploide formado será homocigoto para todos los loci (autodiploidización).

Además del DNA cromosómico, existen varios elementos genéticos extracromosómicos en el núcleo, el citoplasma y la mitocondria de *S. cerevisiae*. Entre ellos están algunas partículas de RNA parecidas a virus y elementos semejantes a priones en el citoplasma, el plásmido de DNA de 2 μ en el núcleo y por último, el DNA mitocondrial.

El genoma de *S. cerevisiae* contiene aproximadamente de 35 a 55 copias de retrotransposones (elementos Ty), los cuales se mueven de una posición a otra en el genoma mediante el uso de un intermediario de RNA y la transcriptasa inversa. El único plásmido nuclear y circular con DNA que se encuentra de forma natural en *S. cerevisiae* se mantiene estable y presenta una longitud de 2 μ m. Este elemento extracromosómico de 6.3 kb está presente entre 50-100 copias por célula; sin embargo, su función biológica se desconoce. *S. cerevisiae* contiene el DNA mitocondrial mas grande entre las levaduras siendo una molécula circular de 75 kb, rica en A+T, que presenta grandes regiones intergénicas e intrones autocatalíticos.

4. Generación y modificación de la diversidad genética.

La teoría neutralista de la evolución molecular propuesta por Kimura (1983; 1968), plantea que la mayoría de la variabilidad genética o cambios moleculares en la evolución se deben a mutaciones neutras, sin efecto en la eficacia del individuo portador, gobernadas por deriva genética (azar). Es decir, el destino final de estos cambios neutros, el que se fijen o se pierdan, está determinado por la deriva genética. Los defensores de la teoría postulan que las mutaciones no neutras son principalmente deletéreas y rápidamente son eliminadas por la selección natural negativa (selección purificadora). Así, los polimorfismos de DNA representarían una situación transitoria, en la cual un alelo elegido al azar, por fenómenos de deriva, va camino a su fijación o su pérdida.

Sin embargo, frecuentemente la mutación y la deriva genética no son las únicas fuerzas que actúan para modelar los niveles de diversidad de un locus, y la consideración de otros factores puede llevar a otros modelos mas cercanos

a la realidad. La interacción entre mecanismos moleculares como son la mutación, la recombinación y la conversión génica a nivel genómico, y la deriva genética, la migración y selección a nivel poblacional, determinarán en gran manera la evolución de una secuencia de DNA.

4.1. Mutación.

Las mutaciones, o cambios en la molécula de DNA, suponen la fuente primaria de diversidad en el DNA y el origen de nuevos alelos en las poblaciones. Las mutaciones puntuales son sustituciones de pares de bases en la secuencia de DNA, las cuales se clasifican en transiciones y transversiones. Las transiciones son la sustitución de un nucleótido de una pirimidina por otra o de una purina por otra. En cambio, las transversiones son sustituciones nucleotídicas de una pirimidina a una purina y viceversa. Las deleciones e inserciones hacen referencia a la eliminación o inserción de uno o más nucleótidos en el DNA. Los cambios en la secuencias de DNA codificante que no dan lugar a cambios en los aminoácidos se denominan sustituciones sinónimas, y cambios en la secuencia que resulten en cambios en los aminoácidos se denominan sustituciones no sinónimas.

Las mutaciones, en cuanto al efecto sobre el individuo portador se pueden clasificar en deletéreas, las que reducen la eficacia (probabilidad de reproducción y supervivencia) del individuo; beneficiosas las que la incrementan y neutras, las que no tienen efecto.

4.2. Recombinación.

La formación de nuevas combinaciones de mutaciones (alelos) durante la reproducción sexual se denomina recombinación genética meiótica. También se da durante la mitosis, recombinación mitótica, pero su frecuencia es varios ordenes de magnitud menor. Debido a que la recombinación genética tiende a aleatorizar los genotipos de un locus respecto de los genotipos de otro locus, tiende a reducir las frecuencias de los alelos cromosómicos representados en exceso y a aumentar la frecuencia de los alelos representados en defecto. Es

decir, la recombinación genética reduce el desequilibrio de ligamiento. El desequilibrio de ligamiento es una medida de la asociación de dos alelos de dos genes diferentes. Si estos dos alelos se encuentran juntos en los organismos con mayor frecuencia de lo que se podría esperar, se dice que los alelos están en desequilibrio de ligamiento.

4.3. Conversión génica.

La conversión génica es un subproducto del mecanismo de recombinación que supone la modificación de un alelo (aceptor de información) debido a los mecanismos de reparación cromosómica, determinada por otro que no resulta alterado (donador de secuencia o información). La conversión puede abarcar fragmentos desde pocos a varios centenares de pares de bases y puede ser interalélica, entre los alelos de un mismo locus, o bien interlocus, entre alelos de loci distintos entre los que existe homología (Ohta, 1983). La conversión puede tener una dirección preferente hacia la conversión de una de las secuencias homólogas en particular, lo que se denomina conversión genética sesgada (Li, 1997).

4.4. Deriva genética.

La deriva genética es una consecuencia de la transmisión aleatoria de alelos de una generación a la siguiente, con lo que las frecuencias de los alelos pueden modificarse simplemente por un proceso estocástico. Las fluctuaciones aleatorias en generaciones sucesivas pueden hacer que a lo largo del tiempo las frecuencias alélicas se alejen cada vez más del estado inicial. Debido a que se trata sólo del efecto acumulativo de sucesos aleatorios, la deriva genética no puede dar lugar a adaptación, pero puede dar lugar a que las frecuencias alélicas cambien. La deriva tiene una gran influencia sobre poblaciones pequeñas, ya que el azar en la transmisión de alelos hará variar su composición genética más fácilmente que en poblaciones de gran tamaño. Cuando menor sea la población, mayores serán los cambios en las frecuencias alélicas producidas por deriva.

El efecto de la deriva génica se observa durante la reducción drástica del tamaño de una población, denominada “cuello de botella” poblacional, o durante un proceso de colonización de un nuevo hábitat por unos pocos individuos o gametos, llamado “efecto fundador”.

4.5. Migración.

La migración, en un sentido evolutivo, es el movimiento de alelos entre poblaciones. Si dos poblaciones diferentes intercambian individuos o gametos a lo largo del tiempo, las características genéticas de la población que migra se difundirán con ellos en la nueva población. Como resultado, las diferencias genéticas entre ambas poblaciones disminuirán. El efecto de la migración dependerá de la diferencia genética inicial que mantenían las poblaciones, y de la proporción de individuos o gametos que se desplace. En algunas especies muy emparentadas, pueden aparecer híbridos fértiles de apareamientos interespecíficos. Estos híbridos pueden servir de vectores para transferir genes de una especie a otra, fenómeno denominado “introgresión genética”.

La migración puede estar ocasionada por cualquier causa que desplace alelos lo bastante lejos como para ir de una población a otra. Los mecanismos de flujo genético varían desde una dispersión ocasional de animales juveniles a gran distancia hasta el transporte de polen, semillas, o esporas por el viento, el agua, o los animales. La dispersión de levaduras esta asociada a insectos y como respuesta a ello se incrementa el entrecruzamiento. Las tasas de entrecruzamiento, y con ello la formación de heterocigotos, de *S. cerevisiae* se incrementan mas de 10 veces cuando las ascas con las esporas son digeridas por la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, un insecto vector de dispersión de *S. cerevisiae* (Reuter et al., 2007). La dispersión a grandes distancias se ha propuesto también para *S. paradoxus* (Reuter et al., 2007), ya que se ha observado una diversidad genética muy baja entre poblaciones separadas por 8 Km (Johnson et al., 2004).

Por otro lado, el hombre ha contribuido a una gran dispersión de levaduras. Existen referencias de la elaboración del vino en la región de Cáucaso y en

Mesopotamia desde 6000 a. C. En Egipto y Fenicia se producía vino desde 5000 a. C. y, por el año 2000 a. C., ya se producía en Grecia y Creta. Los romanos colonizaron y difundieron la elaboración del vino por todo el Mediterráneo. Para el año 500 a. C., ya se producía vino en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y el Norte de África. Posteriormente el cultivo de la uva se difundió por otras partes de Europa, entre ellas los Balcanes y Alemania a través del Danubio y el Rin. En siglo XVI, los exploradores europeos introdujeron el vino en el Nuevo Mundo, ya en 1530 los españoles habían introducido *Vitis vinifera* en México, Argentina, Perú y Chile (Pretorius, 2000). La dispersión de levaduras ocurrió con las cepas y el material de elaboración introducido en Latinoamérica. Recientemente, se ha comparado la diversidad genética de levaduras procedentes del Líbano (Legras et al., 2007) y las presentes en distintas regiones de Europa y se observaron indicios de migración de las levaduras por la mano del hombre a través de la producción del vino.

4.6. Selección.

La selección natural puede ejercer diferentes grados de presión sobre la variabilidad genética. La presión selectiva confiere distintas probabilidades de sobrevivir y reproducirse (eficacia biológica), al individuo portador de un determinado alelo, las cuales pueden variar en ambientes distintos. El resultado será un incremento o una disminución de la frecuencia de alelos en la población en generaciones sucesivas en función del efecto sobre la eficacia del individuo portador. A un alelo que no está sometido a ningún tipo de presión selectiva se le denomina neutro.

La selección positiva o direccional, es la selección que se da sobre una variante alélica que incrementa la eficacia de los individuos portadores. Esta variante alélica aumentará su frecuencia en la población hasta fijarse debido a la mayor eficacia biológica de los individuos portadores de ese alelo. Una consecuencia de la selección positiva es la reducción de variabilidad por la fijación de un alelo, llamada barrido selectivo ("*selective sweep*") y el arrastre genético ("*hitchhiking*"), que se produce cuando una mutación es

Introducción

selectivamente favorable, y “arrastra” consigo a las variantes neutras ligadas a ella hasta que se fije en la población. La región sometida a barrido y arrastre dependerá de la tasa de recombinación y del coeficiente (fuerza) de selección.

En cambio la selección purificadora consiste en la eliminación de alelos deletéreos de la población resultado de la menor eficacia biológica que presentan los organismos portadores de esos alelos. Ocurre un efecto semejante al del barrido selectivo debido a la selección purificadora. La eliminación de variantes deletéreas en un locus concreto de una población, produce una reducción de la variabilidad neutra ligada a dichas variantes, es la llamada selección de fondo (“*background selection*”) (Charlesworth, 1994).

El arrastre selectivo y la selección de fondo representan casos de selección en los que el destino final de una variante nucleotídica depende del entorno genético en el que se encuentra, y no solamente del efecto que esta variante cause en la eficacia biológica del individuo. La influencia de ambos fenómenos depende de la intensidad de la selección en las variantes seleccionadas, y de la tasa de recombinación en la región cromosómica afectada, aumentando su efecto si la recombinación es baja, y viceversa. El barrido selectivo ocasiona una disminución espectacular en los polimorfismos cuando una mutación ventajosa barre rápidamente toda la población, mientras que la selección de fondo da lugar a una disminución del polimorfismo lenta y estable, tales como las mutaciones deletéreas que eliminan individuos en la población.

La selección equilibradora (*balancing selection*) ocurre cuando los heterocigotos son favorecidos sobre ambos homocigotos, dando lugar a un equilibrio estable de frecuencias alélicas. El locus bajo selección equilibradora mantiene durante largos periodos de tiempo polimorfismos que de otro modo serían eliminados de la población por deriva genética. Por ello se retarda el tiempo de fijación de nuevas mutaciones y se incrementa el número de alelos. Como consecuencia, en los loci ligados las nuevas mutaciones tenderán a acumularse, por lo que existirá un exceso de posiciones segregantes mantenidas a frecuencias intermedias.

5. Importancia de *Saccharomyces* en fermentaciones.

Desde el inicio de la civilización humana, existe una relación estrecha entre el hombre y la actividad fermentativa de los microorganismos, la cual se ha utilizado en la producción de diversos productos fermentados. Es por ello, que la fermentación es uno de los métodos más antiguos y económicos para la producción y conservación de alimentos, ya que no es necesario el conocimiento del papel de los microorganismos involucrados (Blandino et al., 2003).

Las bebidas y los alimentos fermentados, se definen como productos que han estado bajo el efecto de microorganismos o enzimas para la obtención de un cambio bioquímico deseable en el sustrato. Los microorganismos responsables de la fermentación son la microbiota indígena que está presente en el sustrato o los cultivos puros si se añaden como iniciadores. Aunque las bacterias y los hongos filamentosos participan en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, en una fermentación alcohólica las levaduras son los microorganismos predominantes.

Las levaduras están agrupadas en aproximadamente 700 especies descritas hasta la última revisión taxonómica (Kurtzman and Fell, 2000), y solo algunas de ellas son utilizadas en procesos industriales para la obtención de metabolitos y productos fermentados. Uno de los géneros más utilizados es *Saccharomyces*, y en especial *S. cerevisiae*, que es también el eucariota más utilizado como organismo modelo en diferentes estudios bioquímicos, genéticos y fisiológicos, entre otros.

El género *Saccharomyces* (Kurtzman and Robnett, 2003), comprende tres especies asociadas a procesos de fermentación industrial: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, y *S. pastorianus*; y cuatro especies aisladas de hábitats naturales: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*. Recientemente se ha descrito una nueva especie de este género aislada de árboles denominada *S. arboricolus* (Wang and Bai, 2008).

Introducción

S. cerevisiae se ha encontrado asociada a diferentes procesos de fermentación industrial, entre ellos, la producción de pan, cerveza, destilados, vino, sidra, tequila, etc. así como en diferentes bebidas y alimentos fermentados de forma tradicional. La especie *S. bayanus*, se encuentra en la naturaleza en zonas frías de Europa, y también asociada a diferentes procesos de fermentación, tales como la producción de vino, de sidra, de cerveza, así como en el mosto de uva. *S. pastorianus* (syn. *S. carlsbergensis*), es la levadura responsable de la producción de cerveza lager, sin embargo, se ha encontrado también en mosto y vinos.

S. paradoxus, es la especie filogenéticamente más relacionada con *S. cerevisiae* (Rokas et al., 2003). Es una especie natural con distribución mundial y esporádicamente también se ha aislado en procesos de fermentación. Recientemente, se ha descrito como la especie predominante en viñedos croatas (Redzepovic et al., 2002). Por último, el género *Saccharomyces* incluye otras cuatro especies naturales, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* y *S. arboricolus* descritas en base a unas pocas cepas aisladas de ambientes naturales de Brasil, la primera, de Japón las otras dos (Naumov et al., 2000a), y la última de China (Wang and Bai, 2008). También, recientemente se ha descrito la presencia de *S. kudriavzevii* en especies de árboles del género *Quercus* de distintas regiones de Portugal (Sampaio and Gonçalves, 2008).

S. cerevisiae es responsable de la fermentación de sustratos azucarados en etanol, por lo que es una de las especies más importantes en biotecnología y la industria de los alimentos y bebidas. Sin embargo, la fermentación natural es un proceso muy complejo en donde están involucradas diferentes especies de bacterias, levaduras y hongos.

Por ejemplo, la fermentación vínica es un proceso complejo en el que está involucrada una sucesión de diferentes especies de levaduras. Las especies de levaduras predominantes en las uvas son *Hanseniaspora uvarum* y su forma anamórfica *Kloeckera apiculata*, así como levaduras oxidativas de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulospora*, *Kluyveromyces* y en ocasiones *Hansenula*. Estas levaduras, comúnmente denominadas “no-*Saccharomyces*”

crecen al inicio de la fermentación pero, cuando se incrementa la concentración de etanol, son reemplazadas por *Saccharomyces* ya que éstas son más tolerantes al etanol (Fleet and Heard, 1993). Aun cuando existe una gran diversidad de géneros y especies de levaduras en el mosto, *S. cerevisiae* es la especie responsable de la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000). Además del etanol y CO₂, el metabolismo de *S. cerevisiae* durante la fermentación alcohólica genera una gran cantidad de productos, entre ellos el glicerol, el ácido acético, el ácido succínico y el ácido láctico. Además, las propiedades aromáticas de los vinos se ven muy afectadas por la producción de alcoholes superiores (alcoholes con más de dos carbonos), por ésteres y otros compuestos volátiles (Antonelli et al., 1999).

El proceso de fermentación natural de la sidra también involucra una sucesión de levaduras muy semejante a la vinica y se puede dividir en tres fases secuenciales según las especies de levaduras encontradas. Al inicio del proceso predominan las levaduras *Kloeckera/Hanseniaspora uvarum*, pero también se encontró *S. cerevisiae*. Cuando se lleva a cabo la fermentación alcohólica *S. cerevisiae* y *S. bayanus* son las especies dominantes y en la última fase de maduración sólo se encuentra *Dekkera* y *Brettanomyces* (Coton et al., 2006; Morrissey et al., 2004).

En ambas fermentaciones, las especies de levaduras no-*Saccharomyces* contribuyen al aroma, la composición química y la calidad del producto final (Gil et al., 2005), ya que producen una gran cantidad de metabolitos responsables del sabor y aroma finales. Algunos autores han mencionado que la producción de enzimas extracelulares pueden ser las responsables de algunas propiedades de las bebidas fermentadas y que son características de cada región (Charoenchai et al., 1997; Pretorius et al., 1999; Rosi, 1994).

6. Bebidas tradicionales.

Las bebidas y los alimentos fermentados tradicionalmente de África, Asia y Latinoamérica son productos que se obtienen al modificar las diferentes materias primas, tanto vegetales como animales utilizadas mediante la acción

Introducción

microbiana o sus enzimas, lo que ocasiona cambios bioquímicos deseables en el sustrato. Estos productos fermentados juegan un papel muy importante en la dieta de países en desarrollo, ya que proporcionan los nutrientes necesarios para una alimentación adecuada.

Las levaduras están involucradas en la producción de diversos tipos de alimentos y bebidas fermentadas tradicionales (Aidoo et al., 2006; Haard et al., 1999; Jespersen, 2003). Sin embargo, el papel que juegan las levaduras en la elaboración de estos productos está poco estudiado. Un posible papel de las levaduras mencionado en bebidas y alimentos tradicionales de África, es la fermentación de carbohidratos para la producción de alcoholes, la producción de compuestos aromáticos, la estimulación de la producción de metabolitos esenciales por bacterias lácticas, la inhibición de hongos productores de micotoxinas, la degradación de micotoxinas, glucósidos cianogénicos, la producción de enzimas degradadoras de polímeros vegetales (celulasas y xilanasas) y las propiedades probióticas (Jespersen, 2003).

Las bebidas tradicionales de Latinoamérica fueron desarrolladas por los nativos americanos de la región mesoamericana (México y América central) y andina (desde Colombia a Chile) en periodos precolombinos. Estos productos se utilizaban como estimulantes, en medicina tradicional, así como en ceremonias religiosas. Sin embargo, el crecimiento urbano y la introducción de bebidas industriales ha reducido el consumo de muchas de estas bebidas (Wacher-Rodarte, 1995). Aún cuando se produce una gran diversidad de bebidas y alimentos entre los indígenas y mestizos de países latinoamericanos, los productos fermentados de África y Asia se han estudiado más que los de Latinoamérica (Aidoo et al., 2006; Jespersen, 2003; Jespersen et al., 2005; Naumova et al., 2003; Nielsen et al., 2005; Nout, 2003; Romano et al., 2006).

En la Tabla I1, se muestran algunos ejemplos de bebidas fermentadas tradicionales que se consumen en Latinoamérica, las cuales son obtenidas de frutas, vegetales y cereales, principalmente maíz. A pesar de que se producen y consumen numerosas bebidas tradicionales, la chicha o cerveza de maíz, es la bebida fermentada más importante y estudiada.

Tabla I1. Productos fermentados a partir de cereales, jugos de frutas y la savia de plantas que se consumen en Latinoamérica.

Nombre	Descripción	País
Abati	Bebida Alcohólica de maíz	Paraguay
Acupe	Bebida fermentada y azucarada de maíz	Argentina
Agua-agria	Bebida no alcohólica de granos de maíz y agua	Venezuela
Aguamiel	Bebida de savia de agave	México
Arroz quemado	Granos de arroz fermentado	México
Cachaça	Bebida alcohólica de caña de azúcar	Ecuador
Cachiri	Bebida fermentada de maíz, yuca o frutas.	Brasil
Champú	Bebida fermentada de maíz o arroz	Brasil
Charagua	Bebida alcohólica fermentada de "pulque", chile y hojas de maíz tostado	Colombia
Chicha	Bebida alcohólica clara amarillenta efervescente de maíz	Perú
Colonche	Bebida alcohólica roja de sabor dulce de jugo de tuna <i>Opuntia streptacantha</i> .	México
Fubá	Fermentación de granos de maíz germinados en agua	Brasil
Masato	Bebida fermentada de raíces de yuca	Perú
Mezcal	Bebida alcohólica de <i>Agave</i> spp.	México
Napú	Bebida fermentada de granos de maíz germinado y molido	Perú
Ostoche	Bebida alcohólica de maíz y "pulque" o azúcar morena	México
Pozol	Bebida ácida no alcohólica de maíz. Bolas de masa de maíz fermentadas cubiertas con hojas de plátano	México
Pulque	Bebida ácida lechosa, poco espumosa y ligeramente viscosa elaborada con aguamiel	México
Sendechó	Bebida alcohólica de maíz germinado y chile rojo (tipo cerveza)	México
Sora	Bebida alcohólica de maíz germinado, molido, cocido y fermentado	Perú
Tepache	Bebida alcohólica de granos de maíz, azúcar moreno y agua	México
Tequila	Bebida alcohólica de <i>Agave tequilana</i>	México
Tesgüino	Bebida alcohólica de maíz germinado tipo cerveza, molido y cocinado con fragmentos de plantas	México
Tocos	Postre de maíz fermentado durante 2 a 3 meses y cocinado	Perú
Tuba	Vino de palma de color blanco de la savia del tallo de la palma de coco	México
Zambumbia	Bebida alcohólica de cebada tostada y agua, fermentada durante 3 a 4 días y después se añade azúcar moreno	México

La chicha es generalmente una bebida alcohólica clara, amarillenta y efervescente, consumida por los indígenas andinos durante siglos, que se prepara con maíz y tiene un sabor parecido a la sidra. El color puede variar del amarillo al rojo o al púrpura según la variedad de maíz que se utilice, y su

Introducción

contenido alcohólico varía de 2 a 12 % (v/v). El proceso de producción tradicional de la chicha es único ya que se utiliza saliva como fuente de amilasa para la conversión de almidón en azúcar fermentable. Una alternativa, es el malteado del grano de maíz que es más utilizado actualmente, aunque frecuentemente se combinan los dos para su producción (Steinkraus, 1996). Los principales microorganismos que participan en la fermentación del maíz para la producción de chicha son bacterias del género *Lactobacillus* y levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, aunque están presentes otras bacterias, levaduras y hongos (Steinkraus, 1996).

El pozol (espumoso del azteca *pozolli*) es una bebida ácida tradicional de México preparada a partir de bolas de masa de maíz fermentado (Wacher et al., 1993). Esta bebida es preparada con las bolas de masa de maíz recién elaborada o después de fermentarse, que se diluyen en agua y se le puede añadir sal, chiles secos molidos, azúcar o miel. En ocasiones, se añaden granos de cacao antes de la fermentación para la producción de otro producto fermentado, el *chorote*. La microbiota predominante son las bacterias ácido lácticas; también, se han encontrado levaduras de los géneros *Hansenula*, *Candida* y *Saccharomyces*.

El tesgüino o tejuino, que viene de la palabra azteca *tecuin*, y significa el latido del corazón. Es una bebida alcohólica de México preparada mediante la fermentación del jugo de maíz germinado o del tallo del maíz o, incluso, del jugo preparado de hojas de *Agave*, según los grupos étnicos donde se consume (Wacher et al., 1993; Wacher-Rodarte, 1995). Del tesgüino se han aislado varias especies de bacterias, de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, de levaduras *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Pichia*, y hongos *Geotrichum* y *Penicillium* (Ulloa et al., 1987). Como no hay una normativa legal para la preparación del tesgüino, la microbiota de ésta y otras bebidas varía según el fabricante y los substratos utilizados en su preparación.

El masato es una bebida muy importante en la dieta de las poblaciones de indígenas de la región amazónica del Perú. Este producto es obtenido con las

raíces de la yuca o mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) las cuales son cocidas y molidas para obtener una masa. El proceso de fermentación es espontáneo, con una duración de 72 a 96 horas a temperatura ambiente. En algunas comunidades de la Amazonía peruana se sigue preparando masato de forma tradicional para diferentes propósitos, tales como ceremonias religiosas, políticas y comerciales. La saliva de los niños y las mujeres mayores es utilizada como fuente de amilasas para la conversión del almidón, en azúcares fermentables. Actualmente en zonas urbanas, el azúcar de caña (“camote”) se utiliza en lugar de la saliva. Una alternativa a la producción del masato es la fermentación espontánea del mesocarpio cocido y molido del pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K.) ya que presenta un alto contenido de almidón. Esta cerveza de pijuayo tiene buenas características organolépticas con sabor y aromas agradables y un contenido de alcohol del 1.5% (Sotero et al., 1996).

El tequila y el mezcal son bebidas alcohólicas mexicanas que se obtienen a partir de la fermentación de los azúcares extraídos de los jugos de varias especies de agave para su posterior destilación. Estas bebidas son incoloras o ligeramente amarillentas cuando son reposadas, envejecidas o añejadas en barricas de madera de roble blanco o encino. Para elaborar el tequila se utilizan los jugos del *Agave tequilana*, mientras que para el mezcal se utilizan las especies *A. angustifolia*, *A. weberi*, *A. patatorum*, *A. salmiana* o *A. duranguensis*.

El tepache es una bebida dulce refrescante de bajo contenido alcohólico elaborado con piña o con granos de maíz, azúcar moreno y agua que se fermenta durante uno o dos días (Wacher-Rodarte, 1995). Después de este tiempo de fermentación se obtiene una bebida alcohólica, de la cual también se puede producir vinagre. Las levaduras asociadas a este producto son *Torulopsis*, *Candida queretana* y *S. cerevisiae*.

Otras bebidas fermentadas tradicionalmente de Latinoamérica en donde las levaduras del género *Saccharomyces* participan en el proceso de transformación del substrato son: la cachaça, que es una bebida alcohólica que se produce de la destilación del jugo de caña de azúcar fermentado en Brasil

(Guerra et al., 2001). El abati es una bebida alcohólica elaborada con maíz que se produce en Paraguay y Argentina. El napú y la sora elaboradas a partir de granos de maíz en Perú. El colonche es una bebida alcohólica roja de sabor dulce obtenida por fermentación espontánea del jugo de tuna (*Opuntia streptacantha*). El colonche recién preparado es una bebida gaseosa de sabor agradable que con el tiempo adquiere sabor agrio. La tuba es un vino de palma de color blanco que se obtiene por la fermentación de la savia del tallo de varias especies de palma, principalmente de la palma de coco. Esta bebida es refrescante, dulce, algo viscosa, de color blanco, muy efervescente y ligeramente alcohólica. En general, la principal levadura asociada a estas fermentaciones tradicionales es *S. cerevisiae*.

7. Diversidad genética en *Saccharomyces*.

La secuenciación completa del genoma del primer eucariota, la levadura *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), fue el inicio de numerosos estudios biológicos para entender, comprender e interpretar la secuencia de este genoma. Asimismo fue importante para el inicio de la secuenciación de otros genomas y, junto con el análisis genómico comparativo, obtener una gran cantidad de información que permitió entender los sucesos evolutivos que moldearon estos genomas tales como la duplicación de todo el genoma para *S. cerevisiae* (Wolfe and Shields, 1997), corregir anotaciones, encontrar pequeñas zonas conservadas, reguladoras y estructurales, que de otra forma estarían ocultas en el genoma (Liti and Louis, 2005).

Otro aspecto importante es la identificación y comprensión de la diversidad existente en el genoma, así como el estudio de la distribución de esta diversidad en una población y su comparación con otras poblaciones. El patrón de variabilidad de una región genómica se ve influenciado por factores genéticos y por factores poblacionales.

El estudio de la variabilidad genética ayuda a la comprensión de los mecanismos implicados en la generación, mantenimiento y eliminación de esa variabilidad genética. El análisis de la diversidad genética contribuye también al

conocimiento de la historia de las poblaciones. La estructura de la variación genética puede mostrar patrones demográficos, tales como expansiones, reducciones drásticas de la población (cuellos de botella), o migraciones (flujo genético). Además estos estudios también permitirán la reconstrucción filogenética de la especie si se cuenta con suficientes muestras a nivel global y si se cuenta con datos de variación en otras especies cercanas.

7.1. Técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética.

La variabilidad genética empezó a estudiarse de manera rigurosa a principios de la década de los años 60, comparando los patrones de movilidad electroforética de proteínas entre individuos de poblaciones y especies distintas. Con el descubrimiento del DNA se desarrollaron diferentes técnicas moleculares para caracterizar la variación genética. Además, la mejora de las técnicas de secuenciación, ahora ya automatizadas, y el desarrollo de programas informáticos capaces de manejar datos de secuenciación, se permitió que el número de estudios sobre patrones de variación genética basados en DNA creciese rápidamente.

Entre las técnicas moleculares utilizadas para determinar la variación genética en *Saccharomyces* que usan la amplificación por PCR están los elementos delta (Ness et al., 1993). Estos son elementos de 0,3 kb que flanquean los retrotransposones Ty1 (Cameron *et al.* 1979) que corresponden a los LTR (long terminal repeats) del retrotransposon. Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masas de harina para la elaboración de pan muestran un polimorfismo alto en las regiones delta (Pulvirenti et al., 2004). Otra técnica es la amplificación de los sitios de maduración (splicing) de intrones, que muestran un gran polimorfismo a nivel intraespecífico (de Barros Lopes et al., 1996). Los RAPDs es otro método basado en PCR, que consisten en la amplificación al azar de segmentos de DNA. Se han utilizado para caracterizar cepas de *Saccharomyces* aisladas de uva, vino, cerveza y de otros ambientes no fermentativos (Fernández-Espinar et al., 2003), así como aislados de cachaça (Guerra et al., 2001). La variación se puede abordar tanto a nivel interespecífico como intraespecífico, dependiendo de los cebadores utilizados.

Introducción

Sin embargo, en ocasiones es difícil obtener los mismos patrones de bandas al intentar reproducir la técnica. Otra técnica basada en PCR son los microsatélites, que son secuencias de DNA de cadena corta, de una a seis bases que se repiten, en un número variable, lo que permite caracterizar cepas de *S. cerevisiae* de diferente origen geográfico y fuente de aislamiento (Legras et al., 2005).

Los AFLPs es una técnica que se basa en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción del DNA genómico y se ha utilizado para identificar la variación genética en cepas vínicas comerciales y aisladas de viñedos, y de cepas híbridas (de Barros Lopes et al., 1999; y 2002; Lopandic et al., 2007), así como para comparar cepas vínicas y no vínicas (Flores Berrios et al., 2005) o para identificar cepas industriales de *Saccharomyces* spp., entre ellas cepas vínicas, de sake, panaderas, de whisky y de laboratorio (Azumi and Goto-Yamamoto, 2001).

El análisis del DNA mitocondrial mediante RFLPs (Querol et al., 1992a; y 1994), y los análisis del perfil de DNA cromosómico o cariotipos, electroforéticos son herramientas que se han utilizado para caracterizar levaduras vínicas (Fernández-Espinar et al., 2001), y para analizar la dinámica de las poblaciones de levaduras durante la fermentación vínica (Querol and Ramon, 1996), así como para diferenciar y caracterizar cepas predominantes de levaduras en fermentaciones de semillas de cacao de África (Jespersen et al., 2005), masa de maíz fermentada (Hayford and Jespersen, 1999), vino de palma (Owuama and Saunders, 1990) cerveza de sorgo (van der Aa Kuhle et al., 2001) y cachaça (Guerra et al., 2001).

Finalmente, con la secuenciación (automática) de los ácidos nucleicos es posible obtener resultados similares a los obtenidos con otras técnicas; sin embargo, estos son más precisos, ya que se cuenta con la secuencia de DNA lo que permite determinar la diversidad genética y las relaciones entre las cepas con parámetros estadísticos más precisos que han permitido la diferenciación entre poblaciones silvestres y domesticadas de *S. cerevisiae* (Aa et al., 2006; Fay and Benavides, 2005a).

8. Adaptación de las levaduras a los ambientes fermentativos.

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sufrido diversos procesos adaptativos a lo largo de su evolución para ajustarse a los diferentes procesos de fermentación. La resistencia a las condiciones estresantes de una fermentación alcohólica hace que las levaduras fueran seleccionadas porque poseen características fisiológicas y genéticas que las distinguen de las cepas de ambientes naturales (Fay and Benavides, 2005a).

La secuenciación de varios genomas de levaduras, incluyendo las del género *Saccharomyces* (Cliften et al., 2003; Dietrich et al., 2004; Dujon et al., 2004; Kellis et al., 2003; y 2004), ha proporcionado datos que ayudaron a descubrir los mecanismos involucrados en la generación de novedades evolutivas en las levaduras, importantes para la adaptación a los ambientes fermentativos.

8.1. Características fisiológicas de las cepas de *Saccharomyces* aisladas de fermentaciones.

El hombre ha seleccionado inconscientemente cepas de *Saccharomyces* para la elaboración de diferentes productos tales como el pan, el vino, la cerveza, entre otros, mediante el proceso de fermentación. Las diversas cepas de levaduras presentes en cada tipo de fermentación se han ido seleccionado de acuerdo con las diferentes características requeridas para una fermentación eficiente. Por ello, la presión selectiva ha favorecido que las cepas de *Saccharomyces* mantengan un elevado metabolismo fermentativo (Pretorius, 2000).

En un ambiente fermentativo como el de la producción de vino y otras bebidas alcohólicas, se dan una serie de factores que producen estrés para las células de levaduras (Attfield, 1997; Bauer and Pretorius, 2000; Querol et al., 2003) que afectan significativamente a la capacidad de supervivencia de las levaduras (Fleet and Heard, 1993). Entre ellos se encuentra el estrés osmótico, que es ocasionado por una alta concentración de azúcares al inicio de la fermentación alcohólica. Así mismo, en esta etapa de la fermentación, también

podemos hablar de otra condición de crecimiento no óptima como es el bajo pH del medio. Por otro lado, al final de la fermentación la producción de etanol y el agotamiento de algunos nutrientes como son la fuente de nitrógeno, de carbono y las vitaminas, son los principales factores que ocasionan estrés a las células. También la temperatura puede ser considerada como otro factor de estrés (Cardona et al., 2007) ya que existen diversos procesos de producción de bebidas y alimentos fermentados de forma tradicional en los que se dan altas temperaturas (superiores a 30°C) al no utilizarse sistemas de control de temperatura.

Como se ha visto, en los diferentes procesos de fermentación tradicional se utiliza una gran diversidad de substratos vegetales con composiciones químicas diferentes, incluyendo los diferentes azúcares fermentables presentes (Tabla I1). En el caso del masato y de la chicha, bebidas tradicionales de Perú, la yuca y el maíz se utilizan como substratos, y en bebidas tradicionales de México el maíz es el subtrato principal. En ambos casos el polisacárido mayoritario es el almidón, por lo que es importante que las cepas de levaduras produzcan enzimas que degraden este compuesto, tales como la amilasa, maltasa, etc. En otras bebidas fermentadas se emplea la savia o jugos de diversas plantas, en cuyo caso las fuentes de carbono más abundantes son la fructosa o la glucosa, como es el caso del mosto. En otros casos, como el jugo de caña de azúcar para la producción de cachaça, el azúcar principal es la sacarosa, por lo que requieren producir invertasa (sacarasa).

8.2. Origen de *S. cerevisiae* de ambientes fermentativos asociadas a fermentaciones industriales y tradicionales.

S. cerevisiae es la principal especie encontrada entre las levaduras. Sin embargo, *S. bayanus* y *S. paradoxus* también han sido aisladas de fermentaciones lo que hace pensar que la adaptación a nuevos hábitats antrópicos por levaduras altamente fermentativas ocurrió varias veces, como lo demuestra la presencia de, al menos, estas tres especies.

El origen de la especie *S. cerevisiae* es controvertido. Por un lado Martini y Vaughan-Martini (1990) mencionan que prácticamente es imposible encontrar a *S. cerevisiae* en la naturaleza, mientras que Mortimer y Polsinelli (1999) proponen que esta especie está presente en forma natural en los frutos de plantas. En cambio, Naumov (1996) propone que se trata de una especie “domesticada” y que solo es posible encontrarla asociada a actividades humanas, ya que ha sido muy raro encontrarla en la naturaleza. Por ello, se ha planteado que el origen de *S. cerevisiae* se diera por adaptaciones a ambientes antrópicos a partir de su especie más cercana, *S. paradoxus*, de amplia distribución en la naturaleza (Sniegowski et al., 2002; Vaughan-Martini and Martini, 1995) y que está asociada a insectos, exudados de árboles y fermentaciones de extractos de plantas (Naumov et al., 1996). De este modo, la rara aparición de *S. cerevisiae* en ambientes naturales se explicaría mediante la acción dispersadora de insectos (Naumov et al., 1996).

El debate es importante para poder entender cómo sería el genoma original de *S. cerevisiae*, ya que durante la adquisición de la capacidad de adaptación de *S. cerevisiae* a ambientes ricos en azúcares y la competencia con otras levaduras no tolerantes a alcohol, el genoma de estas levaduras habría sido moldeado por una fuerte presión selectiva aplicada inconscientemente por el hombre desde el primer uso en un proceso de fermentación controlada para producir alimentos y bebidas fermentadas.

En general, las cepas de *Saccharomyces* con capacidad para llevar a cabo una fermentación son organismos especializados que han evolucionado para utilizar todo su potencial en los diferentes ambientes o nichos ecológicos que han sido habilitados como consecuencia de la actividad humana (Mortimer, 2000). Este proceso de selección puede ser descrito como una “domesticación” y podría ser el responsable de las características genéticas especiales que poseen las levaduras industriales de *S. cerevisiae*.

8.3. Renovación genómica.

Mortimer y colaboradores analizaron poblaciones naturales de *S. cerevisiae* de fermentaciones espontáneas de vinos y encontraron una diversidad genética muy alta. Sin embargo, todas las cepas eran homocigotas para los genes analizados y presentaban una alta fertilidad (Mortimer et al., 1994), ello les llevó a proponer un proceso de evolución para las levaduras vínicas denominado “genome renewal” o renovación genómica.

Para que este fenómeno ocurra, las cepas haploides de *S. cerevisiae* deben ser homotálicas y con capacidad de cambiar de sexo para conjugar las células provenientes de una misma espora (ver ciclo biológico, Figura I1). Así, se produce un diploide homocigoto para todos los genes, a excepción del locus *MAT*. Con una propagación asexual continua en los viñedos o durante la producción de vino, las cepas de *S. cerevisiae* acumulan mutaciones recesivas en heterocigosis, pero pueden cambiar a diploides completamente homocigotos mediante la capacidad de esporulación y el cambio de sexo de las esporas haploides. Esto hace que la selección pueda actuar sobre la fase diploide eliminando genes deletéreos recesivos y fijando los alelos recesivos beneficiosos o ventajosos, promoviendo una adaptación de las levaduras a las condiciones ambientales. Sin embargo, se ha demostrado que la homocigosis también es posible mediante recombinación mitótica o conversión génica durante el crecimiento vegetativo (Puig et al., 2000).

8.4. Duplicación génica.

La duplicación génica es la fuente más importante para la generación de nuevos genes. Esto se puede producir ya sea en un solo gen o grupos de genes adyacentes (Koszul et al., 2006), en cromosomas y con ello la formación de aneuploidias (Hughes et al., 2000), o en todo el genoma, generando poliploidía (Wolfe and Shields, 1997).

Con la secuencia completa de *S. cerevisiae*, y la detección de 55 segmentos cromosómicos de genes duplicados, se propuso que *S. cerevisiae* es un tetraploide degenerado producto de una duplicación completa del

genoma de uno de sus ancestros (Wolfe and Shields, 1997). Sin embargo, otros autores (Llorente et al., 2000) propusieron que esas regiones duplicadas en levaduras se pudieron originar por diversos sucesos de duplicación/delección génica y no por un único evento de duplicación completa del genoma

La redundancia de genes se mantiene si proporciona una ventaja evolutiva, tales como un incremento en la dosis génica, o bien si uno de los genes duplicados mantiene su función y el otro adquiere mutaciones que generan una función ventajosa o benéfica, este fenómeno se denomina neo-funcionalización (Force et al., 1999; Lynch and Force, 2000). Sin embargo, esto es muy poco probable (Wagner, 1998), pues al acumular mutaciones lo más probable es que se de una pérdida de función convirtiéndose en un pseudogen, fenómeno que se designa como pseudogenización o no-funcionalización (Wagner, 2000). Para que los dos miembros de un par complementario de genes se mantengan, se propuso un proceso alternativo, la subfuncionalización (Force et al., 1999). En esta situación, es más probable que los dos miembros de cada uno de los duplicados adquieran mutaciones degenerativas de pérdida de función que sean complementarias. Así, los dos duplicados se deben mantener para la función que presentaba un solo gen ancestral.

8.4.1. Poliploidía.

En el genoma de *S. cerevisiae* se ha observado la presencia de 376 pares de genes distribuidos en 55 regiones duplicadas, por lo que se ha sugerido que un suceso de duplicación genómica o poliploidización tuvo lugar en un ancestro de *S. cerevisiae* (Wolfe and Shields, 1997). Esta duplicación del genoma ocasionó la adquisición rápida de una copia extra de cada gen, pero el 88% de los genes adquiridos se perdieron por el proceso de pseudogenización. Cerca de 460 pares de genes se mantienen en el genoma de *S. cerevisiae*, pero aproximadamente 60 pares de genes presentan signos de conversión génica, poco más de 100 pares de genes muestran neo-funcionalización y el resto, no muestra diferencias significativas en las tasas de evolución por lo que probablemente se mantuvieron por subfuncionalización (Kellis et al., 2004).

Los mecanismos que pueden generar la poliploidización en levaduras son: a) un error durante la meiosis que genere esporas diploides y la conjugación entre células diploides, b) por un error durante la mitosis en organismos unicelulares, c) apareamiento raro (“rare-mating”) entre dos células diploides de la misma especie, que se han convertido en competentes para cruzarse al cambiar el locus *MAT* por conversión génica (de Barros Lopes et al., 2002). En estos casos se trata de autotetraploides, en donde los núcleos contienen cuatro copias de cada cromosoma.

Puede darse la generación de levaduras alotetraploides, en donde los núcleos contienen pares de cromosomas homeólogos, es decir, que provienen de especies diferentes por varias formas: a) por una hibridación interespecífica mediante la conjugación de esporas de diferentes especies y una duplicación genómica por errores de la mitosis o meiosis, y b) por un “rare-mating” entre dos cepas diploides de diferentes especies pero que son competentes para cruzarse (de Barros Lopes et al., 2002).

La poliploidía, y particularmente la aloploidía, pueden ser mecanismos importantes para aumentar la flexibilidad genética y conferir capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. Además, pueden ser una forma de incrementar la dosis de algunos genes importantes para la fermentación (Conant and Wolfe, 2007).

La poliploidización proporcionó las bases evolutivas para que las levaduras obtuvieran genes con nuevas funciones al competir por colonizar los substratos ricos en azúcares proporcionados por las plantas que producen frutos. Un metabolismo fermentativo incluso en presencia de oxígeno (“Crabtree effect”), con un crecimiento rápido y la producción de un compuesto tóxico, el etanol, dio ventajas competitivas al ancestro de *S. cerevisiae* (Piskur et al., 2006).

8.4.2. Duplicación cromosómica y aneuploidías.

Otro mecanismo que puede generar nuevos genes es la duplicación cromosómica, que dan lugar a aneuploidías; y tienen como consecuencia un

incremento de la dosis génica. Las aneuploidías se producen por una segregación cromosómica errónea durante la meiosis o la mitosis y generan un incremento en el número de genes, un desequilibrio en los productos génicos y en las interacciones regulatorias, que pueden ser deletéreas o letales. En general las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son aneuploides, con dos, tres y en menor frecuencia cuatro copias de cromosomas (disomías, trisomías y tetrasomías) (Bakalinsky and Snow, 1990).

8.4.3. Duplicaciones de un gen o de segmentos génicos.

La duplicación génica se puede dar en un gen, o en un grupo de genes adyacentes, lo que se llama una duplicación segmental. En el genoma de *S. cerevisiae* se han identificado 265 familias multigénicas o grupos de genes idénticos o semejantes. Incluso se ha detectado una familia con 108 miembros (Llorente et al., 2000), lo que indica que ha ocurrido una serie de duplicaciones génicas sucesivas.

Existen varios mecanismos propuestos para la generación de este tipo de duplicaciones en tándem de genes o segmentales. El punto más crítico es la generación de la primera duplicación, ya que es necesario la presencia de secuencias nucleotídicas iguales que flanqueen la región duplicada. La recombinación ectópica entre cromosomas homólogos o el intercambio desigual de cromátidas hermanas en unas secuencias flanqueantes dará lugar a la primera duplicación. Las siguientes duplicaciones pueden ocurrir por una recombinación ectópica entre las regiones duplicadas.

Muchos de los genes duplicados mantienen casi idéntica o idéntica la secuencia entre ellos, lo que indica una forma de conservar la función génica, y con ello, un incremento en la dosis génica. La evolución concertada en los miembros de una familia génica se mantiene por una recombinación ectópica y conversión génica (Li, 1997).

La mayoría de las duplicaciones de un gen y las familias multigénicas corresponden a duplicaciones de repeticiones directas en tándem. En general,

las familias multigénicas están localizadas en regiones subteloméricas, pero hay algunas dispersas en el genoma. Como ejemplo de este tipo de familias multigénicas son los genes involucrados en la asimilación y utilización de azúcares: *MEL*, *SUC*, *MGL* y *MAL* (Vega-Palas, 2000). La mayoría de las familias multigénicas están involucradas en el metabolismo secundario, por lo que los genes no son esenciales pero tienen un papel importante en la adaptación a nuevos ambientes (Harrison and Gerstein, 2002).

8.5. Formación de híbridos.

En el caso del género *Saccharomyces*, uno de los mecanismos más interesantes observados en la adaptación de las levaduras a procesos industriales es la formación de híbridos entre especies de este grupo (de Barros Lopes et al., 2002). La obtención de híbridos artificiales entre especies del género *Saccharomyces* indica que estos son viables pero estériles, aunque se pueden mantener por reproducción asexual.

Las especies del género *Saccharomyces* están presentes en el mismo nicho ecológico y pueden verse implicadas en la formación de híbridos, puesto que las células haploides o las esporas de estas especies son capaces de cruzarse entre sí y formar híbridos viables, aunque estériles. Sin embargo, la esterilidad de los híbridos puede ser superada mediante una duplicación del número cromosómico, lo que resulta en un alotetraploide (Naumov et al., 2000b), o al recuperar la euploidia por una diploidización homotética de las pocas esporas viables, lo que resulta en un homoploide (Greig et al., 2002a).

Los híbridos están menos adaptados que sus parentales a condiciones ambientales específicas, pero pueden adaptarse mejor a condiciones fluctuantes intermedias, lo que puede proporcionar a los híbridos una ventaja selectiva (Greig et al., 2002b). Por otro lado, estos híbridos adquieren propiedades fisiológicas de ambos parentales, por ejemplo, la tolerancia al alcohol y a la glucosa de *S. cerevisiae*, la tolerancia a bajas temperaturas de *S. paradoxus* o la mayor producción de compuestos aromáticos de *S. bayanus* (Masneuf et al., 1998).

Los híbridos interespecíficos del género *Saccharomyces* están presentes en diferentes procesos fermentativos. El ejemplo mejor descrito de una levadura híbrida es la levadura productora de cerveza lager *S. pastorianus* (sin. *S. carlsbergensis*). Esta levadura es un híbrido alotetraploide parcial entre una levadura de la especie *S. cerevisiae* y una cepa desconocida relacionada genéticamente con *S. bayanus* (Casaregola et al., 2001; Hansen and Kielland-Brandt, 1994; Nguyen et al., 2000). Prácticamente la totalidad de los cromosomas parentales se han preservado en *S. pastorianus* (Hansen and Kielland-Brandt, 1994), mientras que su genoma mitocondrial (mtDNA) procede del parental no-*S. cerevisiae* (Groth et al., 1999). También se han encontrado aneuploidías en diferentes aislados de *S. pastorianus* (Casaregola et al., 2001; Hansen and Kielland-Brandt, 1994; Nguyen et al., 2000) y muchos de ellos presentan cromosomas quiméricos generados por recombinación entre cromosomas homeólogos de distinto parental (Bond et al., 2004).

Otros híbridos naturales identificados como tales han sido aislados de vino de Italia como la cepa S6U, que presenta genes de *S. cerevisiae* y de *S. bayanus*; y el triple híbrido aislado de sidra artesanal de la Bretaña francesa (cepa CID1), con dos copias del gen nuclear *MET2*, una de *S. cerevisiae* y la otra de *S. bayanus* (Masneuf et al., 1998), y el genoma mitocondrial de una tercera especie *S. kudriavzevii* (Groth et al., 1999). Recientemente se han descrito nuevos híbridos entre las especies *S. kudriavzevii* y *S. cerevisiae*, tanto en vinos de Suiza (González et al., 2006) como entre cepas cerveceras de Bélgica, Inglaterra, Alemania y Nueva Zelanda (González et al., 2008), así como un triple híbrido *S. bayanus* x *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* vínico suizo.

La gran diversidad de híbridos dentro del género *Saccharomyces* encontrados en diversos orígenes y hábitats, indica que es más frecuente de lo esperado (Barrio et al., 2006). Los mecanismos propuestos para explicar la generación de híbridos interespecíficos entre las especies de levaduras del género *Saccharomyces*, son bien la conjugación de esporas de distintas especies en el tracto digestivo de invertebrados (insectos y gasterópodos) que se alimentan de levaduras, ya que producen enzimas que hidrolizan las ascas, lo que permitiría la liberación de las ascosporas y favorecería la hibridación

Introducción

intra- e interespecífica (Pulvirenti et al., 2002); o bien un suceso de “rare mating” entre cepas diploides $\alpha\alpha$ y aa de distintas especies del género *Saccharomyces* (de Barros Lopes et al., 2002).

OBJETIVOS

S. cerevisiae es una de las especies más importantes en biotecnología y la industria de los alimentos y bebidas. Aunque se dispone de una amplia información de esta especie, se conoce muy poco sobre su historia evolutiva. Los pocos estudios sobre diversidad genética se han centrado en levaduras aisladas de vino, cerveza o pan, conociéndose poco de las características de las levaduras aisladas de procesos fermentativos tradicionales, especialmente de bebidas fermentadas elaboradas en Latinoamérica. Al estudiar las relaciones entre las poblaciones de *Saccharomyces* de bebidas tradicionalmente fermentadas de Latinoamérica con las aisladas de procesos fermentativos de distintas regiones geográficas se pretende deducir su origen e historia evolutiva. Los objetivos planteados en el presente trabajo son los siguientes:

- 1 Estudiar la diversidad de especies de levaduras presentes en bebidas tradicionales fermentadas en Latinoamérica para comprobar si *S. cerevisiae* es la levadura predominante en estas fermentaciones. Esto incluye también una caracterización genética y fisiológica de los aislados de *S. cerevisiae*, encontrados en dichas bebidas tradicionales, para entender el papel que tienen estas levaduras en la elaboración de dichos productos.
- 2 Comparar la variabilidad genética en las especies del género *Saccharomyces*, tanto presentes en fermentaciones tradicionales de Latinoamérica como de otros procesos fermentativos industriales y determinar la historia evolutiva de *Saccharomyces*, para contribuir al mejor entendimiento global de su diversidad genética y evolución.

Objetivos

- 3 Conocer el impacto sobre las poblaciones de *Saccharomyces* de bebidas fermentadas tradicionales de Latinoamérica, que se mantuvieron aisladas del resto del mundo, que pudo tener la introducción de nuevas cepas y nuevos procesos de fermentación implantados por los europeos desde el descubrimiento de América.

- 4 Indagar el origen de *Saccharomyces cerevisiae* a través de su relación con la especie más próxima *S. paradoxus*.

- 5 Determinar el origen de la hibridación que generó los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* a partir de la información genético-poblacional obtenida para *S. cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas de levaduras.

En el presente trabajo se han utilizado cepas de diferentes colecciones. En total 288 cepas de levaduras del género *Saccharomyces*. De ellas 250 son *S. cerevisiae* incluyendo cepas vínicas y no vínicas (Tabla M1), 17 cepas de *S. paradoxus* (Tabla M2), y 21 cepas híbridas entre *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* (Tabla M3). La referencia de las cepas, el origen y fuente de aislamiento se muestra en la Tablas M1, M2 y M3.

Las cepas latinoamericanas se obtuvieron de diversas fermentaciones tradicionales como: masato y chicha de jora en Perú; aguamiel, jugo de agave, mezcal, pulque, sotol, tejuino, tepache y tuba de México, así como de destilerías de cachaça de Brasil. También se incluyeron cepas silvestres como es el caso de una cepa aislada en el Parque Nacional Tijuca, en Río de Janeiro, Brasil. Finalmente se incluyeron cepas vínicas argentinas y chilenas para comparar la diversidad con las fermentaciones industriales introducidas por los europeos en Latinoamérica.

Las cepas que se incluyeron de Europa son de diferentes bebidas y ambientes naturales. El sustrato de donde proceden las cepas de Europa son bebidas fermentadas tales como mosto, vino, cerveza, sidra, entre otros; y de fuentes naturales se incluyeron aislados de flores, agua de mar, peces, exudados de árboles, de insectos y frutas fermentadas. Los países de procedencia son: Eslovenia, Austria, Hungría, Holanda, Inglaterra, Italia, Francia, Suecia, España y Rusia. De Asia se incluyeron cepas aisladas en Japón, Indonesia, China y Pakistán de bebidas fermentadas como son el sake, el vino de palma, el brandy de sorgo, y de ambientes naturales tales como frutas fermentadas y de flores. Como representantes de África se incluyeron las cepas aisladas en Sudáfrica, Burkina Faso, Costa de Marfil, Ghana y Nigeria de las siguientes bebidas fermentadas: vino de palma, vino Bili, cerveza de sorgo, y de kéfir. También se incluyeron cepas aisladas de fermentaciones vínicas

Materiales y Métodos

sudafricanas con la misma finalidad, comparar la diversidad con fermentaciones industriales introducidas por los europeos.

Tabla M1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo, así como el origen geográfico y fuente de aislamiento.

Cepa		Origen	Fuente de aislamiento
CECT 11837	CBS 405	África occidental	Vino "bili"
CBS 8857		Burkina Faso	Cerveza de sorgo
CBS 8858		Burkina Faso	Cerveza de sorgo
CBS 8855		Ghana	Cerveza de sorgo
CBS 4454		Sudáfrica	Cerveza kaffir
CBS 4455		Sudáfrica	Cerveza kaffir
CECT 10691	CBS 400	Costa de Marfil	Vino de palma
CBS 7903		Nigeria	Vino de palma
ZA4	A5B 24	Sudáfrica	Vino
ZA8	BV 3-3 9	Sudáfrica	Vino
ZA9	BV 3-3 24	Sudáfrica	Vino
ZA13	BV 3-5 6	Sudáfrica	Vino
ZA14	BV 3-5 23	Sudáfrica	Vino
ZA17	W4B 7	Sudáfrica	Vino
ZA18	W5C 1	Sudáfrica	Vino
ZA19	W5C 18	Sudáfrica	Vino
ZA20	W6C 13	Sudáfrica	Vino
ZA21	W6C 18	Sudáfrica	Vino
ZA23	LR 2-P 21	Sudáfrica	Vino
ZA24	LR 2-4 7	Sudáfrica	Vino
ZA26	LR 2-6 16	Sudáfrica	Vino
ZA29	LR 3-6 18	Sudáfrica	Vino
CECT 10233	CBS 2247	Sudáfrica	Mosto uva
CBS 7993		Brasil, Río de Janeiro, Parque Nacional Tijuca	Agua dulce del Río Cushvara
UFMG-A1626		Brasil	Destilería
UFMG-A1676		Brasil	Destilería
UFMG-A2040		Brasil	Destilería
UFMG-A2426		Brasil	Destilería
UFMG-A2170		Brasil	Destilería
Sc288c		EE UU, Merced, California	Higo
112M		México	Aguamiel
113M		México	Aguamiel
122M		México	Aguamiel
15M		México	Cultivo Agaves
24M		México	Jugo Agave, Jal.
20M		México	Jugo Agave, Gpe, Jal.
CHA		México	Mezcal, Gro.
192M		México	Pulque, Zapopan
RG1		México	Raicilla, Jal.
SOM		México	Sotol

Continuación Tabla M1

Cepa	Origen	Fuente de aislamiento
94M	México	Tejuino Minerva
102M	México	Tejuino Pavo
103M	México	Tejuino Pavo
107M	México	Tejuino Revolución
109M	México	Tejuino Revolución
183M	México	Tejuino, López Cotilla
175M	México	Tepache, Tlaquepaque
ARS	México	Tequila, Jal.
GU4	México	Tequila, Jal.
MG	México	Tequila, Jal.
169M	México	Tuba, Colima
OX3	México	
19	Perú	Chicha de Jora
20	Perú	Chicha de Jora
21	Perú	Chicha de Jora
22	Perú	Chicha de Jora
30	Perú	Chicha de Jora
31	Perú	Chicha de Jora
51	Perú	Chicha de Jora
54	Perú	Chicha de Jora
55	Perú	Chicha de Jora
56	Perú	Chicha de Jora
58	Perú	Chicha de Jora
59	Perú	Chicha de Jora
61	Perú	Chicha de Jora
63	Perú	Chicha de Jora
68	Perú	Chicha de Jora
69	Perú	Chicha de Jora
73	Perú	Chicha de Jora
75	Perú	Chicha de Jora
77	Perú	Chicha de Jora
79	Perú	Chicha de Jora
84	Perú	Chicha de Jora
90	Perú	Chicha de Jora
91	Perú	Chicha de Jora
1	Perú	Masato
2	Perú	Masato
7	Perú	Masato
12	Perú	Masato
13	Perú	Masato
15	Perú	Masato
18	Perú	Masato
23	Perú	Masato
35	Perú	Masato
39	Perú	Masato
40	Perú	Masato

Materiales y Métodos

Continuación Tabla M1

Cepa	Origen	Fuente de aislamiento
42	Perú	Masato
46	Perú	Masato
47	Perú	Masato
53	Perú	Masato
93	Perú	Masato
94	Perú	Masato
96	Perú	Masato
98	Perú	Masato
99	Perú	Masato
103	Perú	Masato
104	Perú	Masato
7Arg	Argentina	Vino
8Arg	Argentina	Vino
9Arg	Argentina	Vino
10Arg	Argentina	Vino
11Arg	Argentina	Vino
12Arg	Argentina	Vino
13Arg	Argentina	Vino
14Arg	Argentina	Vino
15Arg	Argentina	Vino
16Arg	Argentina	Vino
17Arg	Argentina	Vino
18Arg	Argentina	Vino
19Arg	Argentina	Vino
20Arg	Argentina	Vino
21Arg	Argentina	Vino
22Arg	Argentina	Vino
23Arg	Argentina	Vino
24Arg	Argentina	Vino
25Arg	Argentina	Vino
26Arg	Argentina	Vino
27Arg	Argentina	Vino
28Arg	Argentina	Vino
29Arg	Argentina	Vino
30Arg	Argentina	Vino
31Arg	Argentina	Vino
32Arg	Argentina	Vino
33Arg	Argentina	Vino
34Arg	Argentina	Vino
35Arg	Argentina	Vino
36Arg	Argentina	Vino
L958	Argentina, Mendoza	Vino
L960	Argentina, Mendoza	Vino
L962	Argentina, Mendoza	Vino
L981	Argentina, Mendoza	Vino
L982	Argentina, Mendoza	Vino

Continuación Tabla M1

Cepa		Origen	Fuente de aislamiento
L1005		Argentina, Mendoza	Vino
L1006		Argentina, Mendoza	Vino
L1333	LVCB	Chile	Vino
L1374		Chile, Cauquenes	Vino
L146	Cla-117	Chile, Cauquenes	Vino
L1528		Chile, Cauquenes	Vino
L16		Chile, Cauquenes	Vino
L165		Chile, Cauquenes	Vino
L169		Chile, Cauquenes	Vino
L20		Chile, Cauquenes	Vino
L21		Chile, Cauquenes	Vino
L22		Chile, Cauquenes	Vino
L351		Chile, Cauquenes	Vino
L354		Chile, Cauquenes	Vino
L494		Chile, Cauquenes	Vino
L531		Chile, Cauquenes	Vino
L532		Chile, Cauquenes	Vino
L7 (Cla-016)		Chile, Cauquenes	Vino
L79		Chile, Cauquenes	Vino
L80		Chile, Cauquenes	Vino
L246		Chile, Curicó	Vino
L263		Chile, Curicó	Vino
L269		Chile, Curicó	Vino
L281		Chile, Curicó	Vino
L283		Chile, Curicó	Vino
L1054		Chile, Santiago	Vino
L720		Chile, Santiago	Vino
L757		Chile, Santiago	Vino
L846		Chile, Santiago	Vino
L1325	ALG 510		Vino
L1343	ALG 100		Vino
CBS 2087		China	Flor de <i>Lychee</i>
CBS 1460		Indonesia	Fruta fermentada
CBS 1591		Indonesia, Java	Cacao fermentado
CBS 1480		Japón	Brandy de sorgo
CBS 1201		Japón	Brandy de sorgo
CBS 2421		Japón	Granos de kefir
CECT 10711		Japón	Sake
CBS 435		Japón	Sake
CBS 436		Japón	Sake
CBS 1198		Japón	Sake
CBS 1199		Japón	Sake (Moromi)
CBS 6412		Japón	Sakeye
CBS 6414		Japón	Sakeye
CBS 2992		Pakistán	Vino de palma
Y9		Japón	Vino

Materiales y Métodos

Continuación Tabla M1

Cepa		Origen	Fuente de aislamiento
CH2		Bélgica	Cerveza
G1		Bélgica	Cerveza
11001		Bélgica	Cerveza Lager
CECT 10392	CBS 3081	España (1958)	Alpechín
CECT 10131		España	Flor de <i>Centaurea alba</i>
CECT 10120		España	Fruto de <i>Arbutus unedo</i>
MRM		España	Mermelada
Sc IGAL01	Sc2	España	Olivas en conserva
Sc IGAL03	Sc3	España	Olivas en conserva
ScIGALCON1	Sc1	España	Olivas en conserva
L1321	Lalvin EC1118	Francia, Champagne	Champagne
L1323	ALG804	Francia, Champagne	Champagne
L1330	BSC103	Francia, Champagne	Champagne
CECT 10692	CBS 429	Francia (1899)	Uvas fermentando champagne
NCAIM Y. 770		Hungría	Cerveza
NCAIM Y. 925		Hungría	Pulpa de albaricoque
CECT 1462	NCYC 963	Inglaterra	Cerveza ale
CECT 1387	CBS 7372	Inglaterra	Cerveza draught
CECT 1384	CBS 1782	Irlanda	Cerveza
BAY1		Irlanda, Clonmel	Sidra
C 10		Irlanda, Clonmel	Sidra
MERTY		Irlanda, Clonmel	Sidra
Sc97		Irlanda, Clonmel	Sidra
CBS 8291		Suecia	Agua marina
CBS 8292		Suecia	Agua marina
CBS 7764		Suecia	Salmón
HA1780		Austria	Vino
HA1917		Austria	Vino
HA1870		Austria, Neusiedlersee, Halbturn	Vino
HA1856		Austria, Neusiedlersee-Hügelland, Eisenstadt	Vino
HA1827		Austria, Thermenregion, Pfaffstätten	Vino
HA1931		Austria, Burgenland, Illmitz	Vino Grüner Veltliner
HA1923		Austria, Niederösterreich, Rohrendorf	Vino Grüner Veltliner
HA1922		Austria, Burgenland, Apleton	Vino Perle Von Csaba
HA1936		Austria, Burgenland, Jois	Vino Pinot Noir
HA1930		Austria, Burgenland, Frauenkirchen	Vino St. Laurent
ZIM 1568		Eslovenia, Sežana	Kraski Teran Grape Must
ZIM 2171		Eslovenia, Novo Mesto	Krraljevina Grape Must
ZIM 1914		Eslovenia	Malvasia Grape Must
ZIM 1366		Eslovenia, Koper	Refosk Grape Must
ZIM 2139		Eslovenia, Novo Mesto	Zametna Crnina Grape

Continuación Tabla M1

Cepa	Origen	Fuente de aislamiento	
12686	España, Alicante	Mosto	
CECT 12738	España, Madrid	Mosto	
CECT 12739	España, Toledo	Mosto	
CECT 12688	España, Valencia	Mosto	
CECT 12744	España, Zaragoza	Mosto	
CECT 10557	CBS 5112	España (1962)	Mosto de uva
CECT 11757		España	Vino
CECT 1883		España	Vino
L1329	UCLM S377	España	Vino
CECT 10095	CBS 5835	España (1959)	Vino
CECT 1894 (T73)		España (1987)	Vino
CECT 1882		España, Huelva	Vino de flor, Jerez
CECT 1475	UCD 519	España	Vino sherry, Jerez
CECT 11834	CBS 4070	España (1958)	Vino tinto
L1334	DSMLW05	Francia	Chardonnay, Vino Blanco
L1338	DSM4882	Francia	Merlot, Vino Tinto
ICV28	Uvaferm C.S.2049	Francia	Uvaferm C.S.2049
L1335	UP30Y5	Francia	Vino
L1324	Fermicru VR5	Francia, Borgoña	Vino
CECT 1477		Francia, Bordeaux	Vino espumoso
L1332	VR44	Francia	
NCAIM Y. 678		Hungría	Bebida fermentada: pasas y azúcar
CECT 1479		Hungría	Vino
CECT 11032		Italia (1938)	Mosto
CECT 11827		Suiza (1984)	Levadura seca vínica
CECT 11838	CBS 5287	Rusia (1961)	Uvas
CBS 1399		Suiza	Vino
CECT 11833	CBS 423	Suiza (1924)	Vino
CBS 2897		Suiza, Lausanne	Vino
CBS 1175		Suiza, Montibeux	Vino
CBS 423		Suiza, Riddes	Vino

Para comparar la diversidad genética entre *S. cerevisiae* y su especie más próxima (*S. paradoxus*) se analizaron cepas de *S. paradoxus* originarias de Canadá, México, Estados Unidos, aisladas de pulque, de aguamiel y de *Drosophila* sp. Además se utilizaron cepas de Rusia, España, Holanda, Japón y Sudáfrica, aisladas de exudados de árboles, de insectos, de mantillo, de mayonesa en descomposición y del suelo.

Tabla M2. Cepas de *S. paradoxus* utilizadas en el trabajo, así como el origen geográfico y fuente de aislamiento.

Cepa	Origen	Fuente de aislamiento
79-65	Canadá	
79-140	Canadá	
79-128	Canadá	
CECT11158	EEUU, California	<i>Drosophila</i> sp.
120M†	México, Jal.	Aguamiel, Jal.
115M†	México, Jal.	Aguamiel, Jal
CBS5313	México, Zac.	Pulque
CEC 11152	Japón	Exudado de árbol
CECT1939	Rusia	Exudado de savia de árbol
CECT11426	Rusia, Khazansky District, Biological station of Far East State University	Exudado de <i>Quercus mongolica</i>
CECT11424	Rusia, Ternei City	Exudado de <i>Quercus mongolica</i>
CECT11422	Rusia, Vladivostok, Botanic Garden	Exudado de <i>Quercus mongolica</i>
CECT11144	CBS7400	Mayonesa alterada
CECT10308	MCYC1394 España	Mantillo de <i>Quercus lusitanicus</i>
CECT10175	MCYC544,1 España	Adulto del Lepidóptero <i>Noctua pronuba</i>
CBS406	Holanda	Exudado de <i>Quercus</i> sp.
CECT11157	CBS2908 Sudáfrica	Suelo

Las cepas híbridas *S. cerevisie* x *S. kudriavzevii* se han obtenido de vinos procedentes de varias regiones vónicas de Austria, de Suiza y de Alemania. De cerveza se incluyeron cepas aisladas de cerveza Trapense Chimay de Bélgica, cerveza lager de Alemania. Otras cepas que se incluyeron fueron aisladas de cerveza de Nueva Zelanda y de Inglaterra; así como la aislada de un complemento dietético y una clínica de España.

Tabla M3. Cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* utilizadas en el trabajo, así como el origen y fuente de aislamiento.

Cepa	Origen	Fuente de aislamiento
CECT11002	Bélgica, Louvaine-la-Neuve	Cerveza Trapense Chimay
CECT11003	Bélgica, Louvaine-la-Neuve	Cerveza Trapense Chimay
CECT11004	Bélgica, Louvaine-la-Neuve	Cerveza Trapense Chimay
CECT11011	Nueva Zelanda	Cerveza
CECT1388	Inglaterra	Cerveza
CECT1990	Alemania	Cerveza lager
IF6	España, Valencia	Suplemento dietético
MR25	España	Clínica, Hospital La Fe
HA1835	Austria, Thermenregion, Perchtoldsdorf	Vino
HA1837	Austria, Thermenregion, Perchtoldsdorf	Vino
HA1841	Austria, Thermenregion, Perchtoldsdorf	Vino
HA1842	Austria, Thermenregion, Perchtoldsdorf	Vino
AMH	Alemania	Vino
spg 14-91 (278)	Suiza, Wädenswill	Vino
spg 16-91 (205)	Suiza, Wädenswill	Vino
W27	Suiza, Wädenswill	Vino
W46	Suiza, Wädenswill	Vino
126	Suiza, Wädenswill (1994)	Vino
172	Suiza, Wädenswill (1997)	Vino
319	Suiza, Wädenswill (muy vieja)	Vino
441	Suiza, Wädenswill (2000)	Vino

En el presente trabajo se han utilizado cepas obtenidas de distintas colecciones de cultivo, las abreviaturas utilizadas y el nombre de la colección son:

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia, España.

CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda.

IFO, Institute for Fermentation, Osaka, Japón.

SPG, Swiss Federal Research Station for Fruit-Growing, Viticulture and Horticulture, Wädenswil, Suiza.

Lallemand Inc, Montreal, Canada.

Bulmers cider, Clonmel, Irlanda.

USACH, Universidad de Santiago de Chile, Facultad Tecnológica, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Santiago de Chile, Chile.

Claudio Martínez.

ACBR, Institute of Applied Microbiology, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria. Ksenija Lopandic.

ZIM, Collection of industrial microorganisms, Ljubljana, Eslovenia. Peter Raspor.

UFMG-A, Universidad Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil.

NCAIM Y, National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms, Faculty of Food Sciences, Budapest, Hungría. Péter Gábor.

IWBT, Institute for wine biotechnology. Faculty of Agricultural and Forestry Sciences, Stellenbosch University. Stellenbosch, Sudáfrica. Martin Wilding (ZA).

UNCN, Laboratorio de Microbiología y Biotecnología, Departamento de Química, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Argentina. Christian A. Lopez, (Arg).

Sc, Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, España. Noé Arroyo López.

1.1. Cepas de levaduras aisladas de bebidas de Perú.

Las cepas de chicha y masato, bebidas tradicionales de Perú, fueron cedidas por la Dra. Elena Quillama de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima, Perú. En total se utilizaron 104 cepas, 46 de masato y 58 de chicha. Las cepas de masato se obtuvieron a partir de cuatro tipos de masato elaborados artesanalmente, de la ciudad de Pucallpa, Departamento de Ucayali, Perú, después de 72 horas de fermentación. Los tipos de masato fueron los siguientes: el primero elaborado con masa de yuca sin agregados; el segundo con una masa de yuca masticada; el tercero, al que a la masa de yuca se le adicionó azúcar de caña de azúcar; y el último con masa de yuca masticada con azúcar. Las cepas de chicha se aislaron de esta bebida elaborada en Chalhuanca, Departamento de Apurímac, Perú. Los muestreos se realizaron a las 6h, 24h, 48h, 60h, 72h y 96h. El aislamiento de las cepas de masato y de chicha se realizó tal y como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

1.2. Cepas de levaduras aisladas de bebidas de México.

Las levaduras predominantes de las cepas de diferentes bebidas tradicionales de México se aislaron solo al final del proceso de fermentación por las dificultades de muestreo. En resumen, se analizaron aproximadamente 150 cepas de levadura aisladas de muestras tomadas de bebidas tradicionales que se venden en mercados del centro y la periferia de la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México, tal y como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

2. Medios de cultivo para el crecimiento de levaduras.

2.1. YPD.

Se preparó medio de cultivo YPD con 10 g de extracto de levadura (Pronadisa), 20 g de peptona bacteriológica (Oxoid), 20 g de glucosa (Panreac), disueltos en 1L de agua destilada y se esterizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.2. GPYA.

El medio GPYA se preparó con 5 g de extracto de levaduras (Pronadisa), 5 g de peptona bacteriológica (Oxoid), 40 g de glucosa (Panreac), 20 g de agar bacteriológico (Pronadisa), disueltos en 1L de agua destilada y esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Medio de cultivo para evaluar la fermentación de azúcares.

Para preparar los medios de fermentación de azúcares se utilizó un medio basal compuesto por 2,4 g de extracto de levadura (Pronadisa) y 4 g de peptona (Oxoid) disueltos en 50 ml de agua destilada. Los azúcares: glucosa (Panreac), fructosa (Fluka), maltosa (Merck) y sacarosa (Panreac), se prepararon al disolver 5 g en 50 ml de agua desionizada. El medio basal y cada uno de los azúcares se esterizaron por filtración (filtros de 0,2 μm , Millipore). Se prepararon tubos de ensayo de vidrio con 8,5 ml de agua destilada y campana Durham para monitorear la producción de gas. Se esterizaron en

autoclave a 121°C durante 20 minutos y ya fríos se añadieron 1ml de azúcar y 500 µl del medio basal a cada tubo.

2.4. Medio para la producción de enzimas glicosidasas.

Se preparó medio YNB para la producción de glicosidasas, para ello se disolvieron 1,7 g de YNB (Difco), 5 g de sulfato de amonio y 5 g de glucosa (Panreac), xylosa (Panreac), ramnosa (Sigma) o arabinosa (Sigma) disueltos en 1L de agua destilada a un pH de 5,5. Para preparar medio de cultivo en estado sólido se adicionaron 20 g de agar. Después de solidificar y justo antes de inocular el medio con las cepas, se difundieron sobre la superficie del medio de cultivo en placa 50 µl 5 mM de 4-metilumbeliferil-β-D-xilósido (4-MUX, Sigma), 4-metilumbeliferil-α-L-ramnopiranosido (MUX, Sigma), 4-metilumbeliferil-β-D-glucósido (4-MUG, Sigma) o 4-metilumbeliferil-α-L-arabinofuranósido (4-MUA, Sigma).

2.5. Medios para evaluar actividades enzimáticas.

Para preparar los medios de producción de enzimas se utilizó un medio basal compuesto por 6,7 g de YNB sin aminoácidos (Difco) disuelto en 50 ml de agua destilada. Los azúcares: maltosa (Merck) y fructosa (Fluka), se prepararon al disolver 5 g en 50 ml de agua desionizada. El medio basal y los azúcares se esterilizaron por filtración (filtros de 0,2 µm, Millipore). Se prepararon tubos de ensayo de vidrio con 8,5 ml de agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Ya fríos se les añadieron 1ml de azúcar y 500 µl del medio basal a cada tubo.

En el caso de la actividad amilasa se preparó un medio de cultivo en estado sólido compuesto de 10 g de almidón soluble (Merck), y 20 g de agar bacteriológico (Pronadisa). La esterilización se realizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.6. Medios para evaluar la tolerancia a estrés.

Para evaluar la tolerancia al estrés por temperatura se preparó medio GPYA y se incubaron a 10, 16, 30, 37 y 42°C. Para determinar la capacidad osmotolerante de las cepas se preparó GPYA suplementado con 200, 250 y 300 g/l de glucosa (Panreac), y para determinar la tolerancia a etanol se preparó GPYA suplementado con 10, 12 y 15% de etanol (Panreac). Para estudiar el estrés por pH, se preparó medio GPYA con el pH modificado a 2,8; 3,0 y 3,2 con HCl. Todos los medios se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 20 minutos y en el caso del medio con etanol, se adicionó después de la esterilización y de mantenerse a 50°C durante 30 minutos.

2.7. Medio LB.

El medio de cultivo LB se utilizó para el cultivo de bacterias y se preparó con 10 g de triptona (Pronadisa), 5 g de extracto de levadura (Pronadisa) y 10 g de glucosa (Panreac). El pH se ajustó a 7,0 con NaOH y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

2.8. Medio LB con Amp/IPTG/X-Gal.

Para preparar medio de cultivo LB con Amp/IPTG/X-Gal y seleccionar solo las células bacterianas transformadas, se preparó el medio líquido LB y se agregaron 15 g de agar (Pronadisa) y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Después de enfriarse a 50°C se adicionó la ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, inmediatamente se le añadieron 0,5mM de IPTG y 80 µg/ml de X-Gal.

3. Preparación del inóculo y condiciones de cultivo.

Para preparar el inóculo las células de levaduras se crecieron en medio GPY. Después de 24 h de incubación a 30°C se obtuvo un cultivo fresco, el cual se utilizó para inocular tubos falcon de 15 ml de capacidad con 5 ml de medio GPY en agitación a 200 rpm durante la noche a 30°C. Al día siguiente se ajustaron los cultivos a una $A_{600} = 0,3$ diluyéndolos con medio GPY. Después de 4 h a 30°C en agitación a 200 rpm, los cultivos se lavaron dos veces en

agua destilada estéril y se centrifugaron 1 minuto a 10.000 rpm, y se diluyeron en agua destilada estéril a una $A_{600} = 0,3$.

4. Aislamiento de levaduras.

Para el aislamiento de levaduras a partir de bebidas latinoamericanas fermentadas en forma tradicional, se utilizó 1 ml de cada muestra y fue diluida con 10 ml de agua destilada estéril. Posteriormente 50 μ l fueron distribuidos en la superficie de medio GPYA, al cual se añadió 50 μ g/ml de cloramfenicol, para inhibir el crecimiento bacteriano. Después de una incubación de 2 a 4 días a una temperatura de 30°C, se aislaron distintas colonias al azar y se purificaron en medio GPYA.

5. Caracterización biotecnológica de levaduras aisladas de *S. cerevisiae*.

5.1. Fermentación de azúcares: glucosa, fructosa y maltosa.

Para la fermentación de los azúcares glucosa, fructosa y maltosa se prepararon tubos de ensayo con cada azúcar (ver apartado 2.3). La inoculación se realizó a partir de un cultivo de 24 h y se ajustó antes del inóculo a una $A_{600} = 0,3$ tal y como se ha descrito en el apartado 3. La incubación se realizó a 30°C con agitación 200 rpm durante 48 h. La capacidad de fermentación se midió de acuerdo a la producción de CO₂ que se observó en la campana Durham. Para ello se midió el porcentaje de gas en la campana después de 24 y 48 h, y en algunos casos, con maltosa, a las 72 h.

5.2. Producción de enzimas glicosidasas.

La producción de enzimas glicosidasas se llevó a cabo en medios de cultivo YNB en estado sólido utilizando distintas fuentes de carbono (glucosa, xylosa, arabinosa y ramnosa). La inoculación se realizó a partir de un precultivo ajustado a una $A_{600} = 0,3$, tal y como se ha descrito en el apartado 3. Se determinó una actividad enzimática positiva (+) cuando las cepas con actividad glicolítica hidrolizaron el substrato y liberaron el compuesto 4MU que emite fluorescencia, lo que ocasiona el desarrollo de un halo en el agar. Después de

24 h ó 48 h de incubación a 30°C, se examinó bajo la luz UV de un transiluminador y se observó la presencia de un halo claro alrededor de la colonia.

5.3. Determinación de actividad α -amilasa.

La producción de amilasa se determinó en medio de cultivo en estado sólido con almidón como fuente de carbono. Con el inóculo del apartado 3, se sembraron las placas de cultivo y se incubaron a 30°C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cubrió la superficie de las placas con una solución de Yodo (0,4% de yodo y 2% de KI) para detectar la actividad enzimática mediante la formación de halos en el agar con un transiluminador de luz blanca (De Mot and Verachtert, 1987). El almidón y el yodo forman un complejo de yoduro de almidón, de color azul violáceo. Una actividad enzimática fue positiva (+) cuando las cepas con actividad α -amilasa hidrolizaron el almidón, lo que ocasiona el desarrollo de halos claros alrededor de las colonias.

5.4. Tolerancia a distintos estreses.

Se evaluó la tolerancia a varios parámetros de estrés que sufren las células de levaduras durante una fermentación alcohólica. Los parámetros de estrés evaluados fueron: temperatura (10, 16, 30, 37 y 42°C), estrés osmótico (200, 250 y 300 g/l de glucosa), tolerancia a etanol (con 10, 12 y 15%), y estrés por pH (2,8; 3,0 y 3,2). Se utilizaron para cada estrés los medios descritos en el apartado 2. Para preparar el inóculo y evaluar la tolerancia a los diferentes parámetros, se utilizó el inóculo a partir de un preinoculo de 24 h de crecimiento tal y como se ha descrito en el apartado 3, y con esta dilución se realizaron 5 diluciones seriadas (1:4) de 1ml de volumen final con agua destilada estéril y cada una de ellas se utilizó como inóculo para los medios de cultivo en estado sólido, con un volumen de inoculación de 5 μ l. Las placas de cultivo inoculadas se incubaron a 30°C con excepción del estrés por temperatura, y el desarrollo de las colonias fue revisado cada 24 h durante 5 días consecutivos. En todos los casos se utilizó un control positivo no expuesto

a ningún estrés e incubado a 30°C hasta que las colonias aparecieron en todas las diluciones (24h).

6. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.

6.1. Aislamiento de DNA total de levadura.

La extracción de DNA se llevó a cabo mediante el método descrito por Sherman et al., (Sherman et al., 1986) y adaptado por Querol y colaboradores (Querol et al., 1992b). Las células de levadura se cultivaron en 5 ml de medio GPY durante 12 horas a 30°C y se separaron por centrifugación. El sedimento se resuspendió en 0,5 ml de solución 1 M sorbitol-0.1 M EDTA a pH 7,5. Se adicionó 30 µl de Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation, Tokio, Japón) (1mg/ml), incubándose a 37°C entre 30 y 60 minutos para obtener protoplastos. En el caso de levaduras no-*Saccharomyces*, se añadieron además 30 µl de Novozima (Interspex products Foster City, CA, USA) (1 mg/ml). Una vez transferida la muestra a un tubo de centrifuga de 1,5 ml, los protoplastos se recogieron por centrifugación a 10.000 rpm durante 1 minuto y se incubaron 5 minutos a 65°C en 0,5 ml en 50 mM Tris-HCl (USB, Cleveland, USA) pH 8 y 20 mM EDTA (Panreac) pH 7,4, añadiendo 13 µl de SDS al 10%. Posteriormente se añadieron 0,2 ml de acetato potásico 5 M, manteniendo los tubos en hielo durante 10 minutos para precipitar las proteínas. Se centrifugó a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde el DNA se precipitó mediante la adición de 1 volumen de isopropanol e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. El DNA se lavó con etanol al 70% (v/v), se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, se secó al vacío y se resuspendió en 15-50 µl de agua mQ.

6.2. Oligonucleotidos para amplificar las regiones génicas por PCR.

Los cebadores utilizados para la amplificación de las regiones génicas se diseñaron mediante la comparación de las secuencias disponibles en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (SGD), (<http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/FUNGI/FungiMap>), de las cepas de referencia para las especies *S. cerevisiae* (S288c), *S. kudriavzevii* (IFO 1802,

CBS 8840) y *S. paradoxus* (NRRL-Y-17217, CBS 432), y alineándolas con la ayuda del programa CLUSTAL X, versión para Windows del programa Clustal W (Thompson et al., 1994).

Los cebadores diseñados en este trabajo se muestran en la Tabla M4 donde se describe la secuencia de cada cebador y la posición región diana en el genoma de *Saccharomyces*. Algunos se utilizaron para la identificación de especies de levaduras, por medio de la técnica RFLPs de la región 5,8-ITS (gen ribosomal 5,8S y regiones espaciadoras) o bien mediante la secuenciación de los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen ribosomal 26S, mientras que el resto se utilizaron para el estudio genético evolutivo de las cepas de *S. cerevisiae*, de *S. paradoxus* y de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Roche Diagnostics S.L y Amersham Pharmacia Biotech.

Tabla M4. Oligonucleotidos utilizados en el trabajo.

Primer	Secuencia	Región diana (Cromosoma)
its-1	TCCgTAggTgAACCTgCgg	5,8S-ITS rDna
its-4	TCCTCCgCTTATTgATATgC	(XII)
nl-1	gCATATCAATAAgCggAggAAAAG	Dominios D1/D2- 26S rDNA
nl-4	ggTCCgTgTTTTCAAgACgg	(XII)
BRE5-3	TTCATTCATCAACTTTgAggCCCATgTCAT	Gen <i>BRE5</i>
BRE5-3C	gAAgATgAAggTgTTgAAgCgTTATTgCC	(XIV)
BRE5-5	TgATTATAgCCACgggTgARATgTTYTgg	
CAT8-3	CTACTTggCRTTTTgCCAYTgRAA	Gen <i>CAT8</i>
CAT8-5	AAgAgCAACTATAgYCTgACAAARYTAATgAg	(XIII)
COX2-3	ATTTATTgTTCRTTTAATCA	Gen <i>COX2</i>
COX2-5	ggTATTTTAgAATTACATgA	(mitocondria)
EGT2-3	CCAggCggTRTTATTAgTTTTgTATATRCCACC	Gen <i>EGT2</i>
EGT2-5	CAGATCATTggTTCATAATAgAAggKCAAYTgT	(XIV)
GAL4-3	gCgATTTCAATCTgATTATTRTACARCATCAT	Gen <i>GAL4</i>
GAL4-5	gCTACTCTCCCAAgACCAARAggTC	(XVI)

6.3. Amplificación de la región 5,8S-ITS del DNA ribosómico por PCR.

La región que incluye el gen ribosomal 5,8S y las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 se amplificó utilizando los oligonucleótidos its1 e its4 (White et al., 1990), descritos en la Tabla M4. Para la PCR se preparó una mezcla con 10 µl

de tampón 10X, 2 μ l de cada desoxinucleótido 100 μ M (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1 μ l de cada cebador 50 μ M y 2 unidades de Taq polimerasa (BioTools, B&M Labs S.A., Madrid, España). Se adicionaron 4 μ l de DNA diluido a una concentración 1-50 ng/ μ l al tubo de PCR con la mezcla de reacción y se ajustó a un volumen final a 100 μ l. La reacción de amplificación se realizó con un termociclador Techgene (Techne, Cambridge, UK).

El programa de amplificación fue de la siguiente forma: una desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos de PCR consistentes en una desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55,5°C durante 1 minuto y una extensión a 72°C durante 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa con una electroendosmosis baja al 1,4%, estimando el tamaño de los fragmentos por comparación de su movilidad con la del marcador estándar de 100 pb (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md., USA).

6.4. Amplificación de los dominios D1 y D2 del gen ribosómico 26S.

Para la amplificación de los dominios D1 y D2 del gen ribosómico 26S se utilizaron los cebadores nl-1 y nl-4 descritos en la Tabla M4. Los componentes de la reacción de amplificación, así como las condiciones empleadas y el termociclador, fueron las mismas que las utilizadas para amplificar la región 5,8S-ITS (apartado 6.3).

6.5. Amplificación de los genes para evaluar la diversidad genética.

La amplificación de las diferentes regiones génicas para determinar la variabilidad genética de las cepas se realizó con los mismos componentes de reacción y bajo las condiciones de amplificación a las utilizadas para la región 5,8S-ITS (apartado 6.3). En los casos de las regiones génicas *EGT2* y *CAT8* que se observaron problemas de *primer dimer*, se utilizó la Taq polimerasa FastStart Taq (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y una temperatura de hibridación a 50°C.

Para la región mitocondrial *COX2* se preparó una mezcla con los mismos componentes de reacción que para la región 5,8S-ITS (apartado 6.3), pero con los cebadores *COX2-3* y *COX2-5* (Tabla M4) y distintas condiciones de amplificación: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 45 ciclos con una desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, hibridación a 45°C durante 35 segundos y una extensión a 72°C durante 35 segundos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

6.6. PCR-RFLPs de las cepas híbridas.

Para obtener la secuencia de *S. cerevisiae* en las cepas híbridas de *S. cerevisiae* X *S. kudriavzevii* se amplificó cada una de las siguientes regiones génicas: *CAT8*, *EGT2*, *GAL4* y *BRE5*, siguiendo las condiciones de PCR del apartado 6.3. Las secuencias presentes en la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* se alinearon para cada gen con el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007) y con la ayuda del programa Gene Doc (Nicholas et al., 1997) se eligieron aquellas enzimas que permitieron digerir solo el alelo de *S. kudriavzevii*. Se realizaron las digestiones de los amplificados de las regiones *CAT8*, *EGT2* y *GAL4* con las enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *DdeI*, respectivamente (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) bajo las condiciones del apartado 6.7. Se separó la banda de *S. cerevisiae* de los fragmentos de restricción de *S. kudriavzevii* por electroforesis en geles de agarosa con una electroendosmosis baja al 1,4% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8), que se visualizó con luz UV tras la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/µl) (Sigma). Finalmente, se cortó y purificó la banda de *S. cerevisiae* con el kit Perfectprep® Gel Cleanup de Eppendorf (Hamburgo, Alemania). En el caso de la región *BRE5* se utilizaron cebadores específicos para *S. cerevisiae*.

6.7. Análisis de restricción de los amplificados de la región 5,8S-ITS.

Los amplificados de DNA obtenidos por PCR de la región 5,8S-ITS (ver apartado 6.3), fueron digeridos con los enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Para el caso de

las especies del género *Saccharomyces*, se utilizó adicionalmente la enzima *Scrf I*. La mezcla de reacción contenía 15 µl de DNA genómico, 2,5 µl de tapón 10X específico (Boehringer Mannheim), 1,0 µl de enzima y 6,5 µl de agua. La mezcla se incubó a 37°C durante la noche. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis en geles de agarosa con una electroendosmosis baja al 3% en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) y se visualizaron con luz UV tras la tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/µl) (Sigma). Como marcador de peso molecular se utilizó el “100-bp DNA ladder” (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

6.8. Análisis de restricción del DNA mitocondrial.

El DNA genómico fue digerido con la endonucleasa de restricción *Hinfi* (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) según el protocolo descrito previamente (Querol et al., 1992b). La mezcla de reacción contenía 15 µl de DNA genómico, 2 µl de RNAasa a 500 µg/ml (Boehringer Mannheim), 1,0 µl de enzima y 2,5 µl de tapón 10X específico. La mezcla se incubó a 37°C durante la noche. Los fragmentos de restricción del DNA mitocondrial se separaron en geles de agarosa con una electroendosmosis baja (Pronadisa) al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8) a 100 V. Posteriormente se realizó una tinción en bromuro de etidio (0,5 µg/µl), y los fragmentos se visualizaron con luz UV. El tamaño de los fragmentos se calculó con el marcador de DNA de fago λ digerido con *PstI*.

6.9. Electroforesis en campo pulsante.

Para obtener los cariotipos de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de Perú y México, los cromosomas se separaron en bloques de agarosa (Carle and Olson, 1985). Se lavaron tres veces a 50°C durante 30 minutos con tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0) y dos veces durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los bloques de DNA se incluyeron en los pocillos de un gel de agarosa al 1% de tampón 0,5 x TBE enfriado a 14°C y se sellaron también con agarosa al 1% con tampón 0,5 x TBE.

La separación de los cromosomas se realizó con el equipo CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), y utilizando como marcador estándar cromosomas de *S. cerevisiae* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Las condiciones de electroforesis se detallan a continuación. Se migró a 6V cm^{-1} con un ángulo de 120° durante 24 horas a 14°C . Durante las primeras 14 horas el campo eléctrico pulsó cada 60 segundos y durante las siguientes 10 horas cada 120 segundos. Una vez finalizada la separación de los cromosomas, se tiñó el gel con bromuro de etidio ($0,5\ \mu\text{g/ml}$) (AppliChem, Darmstadt, Alemania) y se visualizó bajo luz ultravioleta.

6.10. Clonación de los productos de PCR.

Cuando se observaron secuencias con mas de un sitio polimórfico, se procedió a su clonación con el kit de clonación pGEM[®] T Easy Vector System II (Promega) para determinar los dos alelos de cada cepa y región génica. Para ello, se preparó la reacción de ligación con un volumen final de $3,3\ \mu\text{l}$ y se incubó durante una noche a 4°C . La transformación se realizó con $20\ \mu\text{l}$ de células competentes JM109 (Promega) y $2\ \mu\text{l}$ de la reacción de ligación, se incubaron en agitación a 200 rpm durante 1,5 h para que los clones expresen el gen de resistencia a ampicilina y luego se sembraron $120\ \mu\text{l}$ en el medio sólido de selección de transformantes LB con Amp/IPTG/X-Gal. La incubación se realizó a 37°C durante 24 h, se identificaron y se aislaron las colonias blancas o positivas para la transformación en medio de cultivo sólido Amp/IPTG/X-Gal.

6.11. PCR de colonia.

En el caso de las bacterias transformadas con DNA de levadura de las diferentes regiones génicas con posiciones heterocigotas, se realizó una PCR de 12 colonias blancas (con el inserto) para encontrar los dos alelos que expliquen las posiciones heterocigotas encontradas en el cromatograma original. Los componentes y las condiciones de amplificación para cada región génica se realizaron tal como se ha explicado en el apartado 7.1, excepto que no se realizó una extracción de DNA, y se utilizaron colonias de bacterias

transformadas. Los cebadores utilizados para cada región génica se muestran en la Tabla M4.

6.12. Secuenciación del DNA.

Los productos de PCR de las regiones de DNA de interés se purificaron con el kit Perfectprep®Gel Cleanup (Eppendorf, Hamburg, Alemania) y en los casos que presentaron *primer dimer* se utilizó el kit High Pure PCR Product Purification (Roche, Mannheim, Alemania) que elimina mejor los restos de cebadores. Para evitar errores en la secuencia se secuenció la cadena de DNA y su complementaria directamente usando el kit BigDye™ Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Warrington, U.K.) siguiendo las instrucciones del proveedor, en un secuenciador automático de DNA Applied Biosystems, Modelo ABI 3730 (Applied Biosystems, Warrington, U.K.). Se utilizaron los mismos cebadores empleados para su amplificación para la reacción de marcaje. El programa de marcaje fue de la siguiente forma: una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, seguida de 99 ciclos consistentes en una desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, hibridación a 50°C durante 5 segundos y una extensión a 60°C durante 4 minutos.

7. Obtención de genotipos.

7.1. Detección de heterocigotos.

El análisis de las secuencias obtenidas se inició con la eliminación de los errores de secuenciación por comparación del cromatograma de la cadena de DNA y su complementaria. Para ello, se importó el cromatograma, se alineó la secuencia y se revisó las coincidencias entre la secuencia y su complementaria para obtener un consenso con el programa informático MEGA versión 4 (Kumar et al., 2004; Tamura et al., 2007). Las posiciones heterocigotas se detectaron cuando las dos cadenas de una misma cepa y región génica se alinearon y se observaron incertidumbres (que los programas identifican como una N), o bien, errores entre la asignación de la base en la secuencia y los picos del cromatograma, en donde el programa asigna la base del pico más grande (C y C) como se observa en la Figura M1. En ambos casos se comprobaron con la

observación de dos picos en ambos cromatogramas. Sin embargo, el programa no detecta todas las posiciones con dobles picos por lo que todas las parejas de cromatogramas fueron estudiadas visualmente.

Es importante revisar visualmente ambos cromatogramas y evitar la pérdida de esta información ya que el programa informático identifica las bases nucleotídicas erróneamente. En el caso de un sitio heterocigoto, las bases identificadas no coinciden en ambas cadenas porque está presente el pico de cada uno de las dos bases (Figura M1), o bien si está presente un “indel” (inserción o delección de nucleótidos en la secuencia de DNA) y se solapan las secuencias a partir de ese punto.

7.2. Identificación y análisis de los alelos de *S. cerevisiae*.

Cuando se observó más de una posición heterocigota en la secuencia consenso de DNA se realizó la clonación del producto de PCR, tal como se explicó en el apartado 6.10. Se realizó una PCR de colonia (apartado 6.11) y se obtuvo la secuencia de los dos alelos de cada cepa en las regiones génicas estudiadas (apartado 6.12). Las posiciones heterocigotas de los cromatogramas de los clones con la secuencia de DNA de uno de los alelos se analizaron y compararon con las secuencias consensos obtenidas previamente para evitar errores de PCR durante la clonación. En general, se secuenciaron seis clones por cada cepa y región génica, y sólo cuando no se encontró el segundo alelo se buscó en más clones hasta encontrarlo. Las secuencias de DNA obtenidas después de la clonación siempre confirmaron la presencia de los sitios heterocigotos detectados en la secuencia consenso de DNA o antes de su clonación.

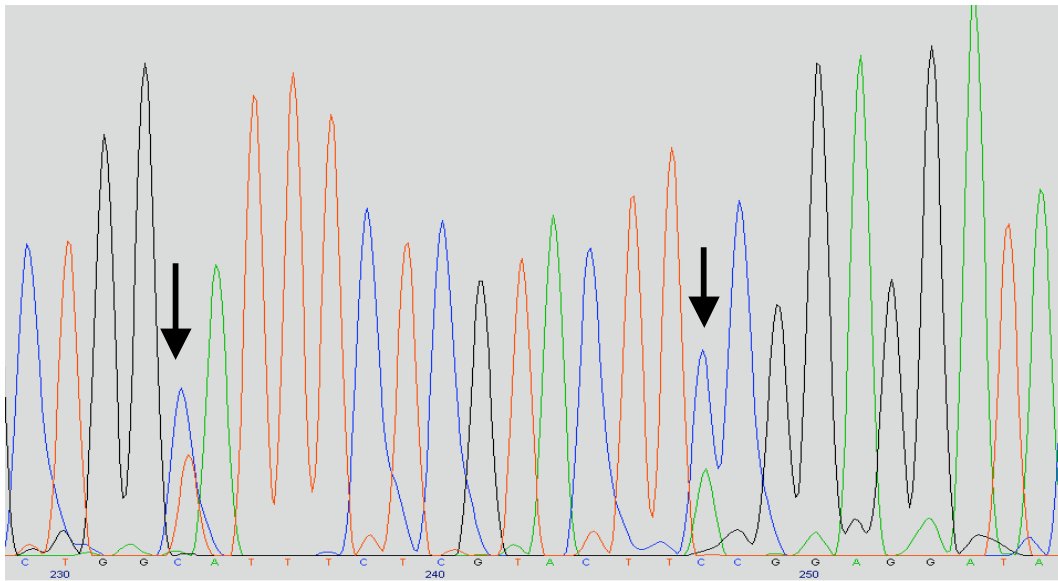


Figura M1. Secuencia de DNA en donde se muestran dos sitios heterocigotos marcados con una flecha y el programa asigna C y C.

Las secuencias de los clones se alinearon y se identificaron las secuencias de DNA idénticas o los diferentes alelos de cada una de las regiones génicas estudiadas con el programa informático Splits Tree versión 4.8 (Huson and Bryant, 2006).

8. Análisis genético poblacional.

8.1. Identificación de recombinación en secuencias de DNA.

La detección de recombinación se realizó con el programa informático DNAsp versión 4.0 (Rozas et al., 2003), que estima R entre sitios adyacentes = $4Nr$ (por gen), donde r , es la tasa de recombinación por generación entre los sitios más distantes (Hudson, 1987). Con este parámetro se calculó el estimador R entre sitios adyacentes = R (por gen) / D , donde D , es el promedio de la distancia nucleotídica (en pares de bases) de la región génica analizada. Además se calculó el número mínimo de eventos de recombinación (R_m) mediante la prueba de los 4 gametos (Hudson and Kaplan, 1985). El resultado incluye el número de eventos de recombinación detectados, un listado de todas las comparaciones de pares de sitios con los 4 tipos de gametos identificados y por último una lista de los eventos de recombinación detectados en todas las comparaciones de pares de sitios donde es posible asignar un evento de

recombinación. Sin embargo, el número de eventos de recombinación es infraestimado por el programa, por lo que se comprobó visualmente en las secuencias de DNA para detectar todos los sitios recombinantes.

8.2. Identificación de conversión génica en secuencias de DNA.

Para la identificación de conversión génica en las secuencias de DNA, primero se dividió los alelos detectados en dos subpoblaciones, una como alelos vínicos y otra como no vínicos, de acuerdo a las posiciones nucleotídicas fijadas en cada grupo. Con el programa informático DnaSP versión 4 (Rozas et al., 2003), se detectó el número de eventos de conversión génica, así como la longitud de la secuencia convertida entre los alelos (Betrán et al., 1997).

8.3. Estimaciones de diversidad genética y pruebas de neutralidad.

La secuencia de DNA de cada una de las regiones génicas estudiadas se utilizó para estimar la diversidad alélica o haplotípica (H) (Nei, 1987) y la diversidad nucleotídica (π), es decir, el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Nei, 1987) con el programa DnaSP versión 4 (Rozas et al., 2003).

Para analizar la hipótesis de que las mutaciones son neutras se estimaron algunos estadísticos que evalúan las desviaciones del modelo neutro con el programa DnaSP versión 4 (Rozas et al., 2003). Uno de ellos es la D de Tajima (Tajima, 1989) que evalúa la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras. Este parámetro toma en cuenta las diferencias entre el número de segregantes y el número promedio de diferencias nucleotídicas.

Otros estimadores son la D^* y F^* de Fu y Li, que evalúan la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras. El estimador D^* es una prueba estadística basada en las diferencias entre η_s , el número total de *singletes* o mutaciones que aparecen una vez entre las secuencias, y η , el número total de mutaciones; mientras que el estadístico F^* se basa en las

diferencias entre ηs , el número total de *singletes*, y k , el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (Fu and Li, 1993).

El número de *singletes* o mutaciones en las ramas externas se calculó bajo el modelo infinito de alelos, por lo que en un sitio polimórfico dado, el número de mutaciones en las ramas externas se cuenta como el número de variantes nucleotídicas en *singletes* distintos, que no están compartidos con el outgroup o secuencia de referencia. Una *singlete* es una variación nucleotídica que aparece solo una vez entre las secuencias. Así el número total de mutaciones en las ramas externas de una genealogía se calculó como la suma del número de mutaciones en las ramas externas de cada sitio polimórfico.

Además se utilizó la prueba multilocus de Hudson, Kreitman y Aguadé (HKA) (Hudson et al., 1987) que se basa en la teoría neutral de evolución molecular propuesta por Kimura (1983) y predice que las regiones del genoma que evolucionan a altas tasas presentaran también altos niveles de polimorfismos dentro de especies. Esta prueba requiere datos de una comparación interespecífica de al menos dos sitios del genoma y de datos de sitios polimórficos intraespecíficos de la misma región de al menos dos especies. En este caso se utilizaron las secuencias de DNA de las regiones génicas estudiadas de todas las cepas de *S. cerevisiae*, que se clasificaron en vínicas y no vínicas. Como secuencia de referencia se utilizaron las secuencias de *S. paradoxus* y se consideraron todas las sustituciones nucleotídicas, o bien sólo las sustituciones sinónimas que no cambian el aminoácido, o no sinónimas en donde el cambio nucleotídico produce un cambio de aminoácido.

Por ultimo, se utilizó la prueba propuesta por McDonald y Kreitman (1991) que evalúa la hipótesis neutra (Kimura M., 1983) y se basa en la comparación de la variación de los cambios sinónimos y de reemplazo o no sinónimos dentro de una especie y entre especies. La prueba se calculó con el programa DnaSP versión 4 (Rozas et al., 2003) y se obtuvo el número de sustituciones sinónimas y de reemplazamiento o no sinónimas dentro de especie, el número de sustituciones fijadas entre especies y el número de diferencias no sinónimas

fijadas entre especies, y con estos datos se calculó la tabla de contingencia de 2 x 2.

8.4. Equilibrio Hardy-Weinberg.

Para detectar si existe equilibrio Hardy-Weinberg, es decir, si los genotipos diploides observados son el producto de una unión al azar de gametos, se utilizó el procedimiento descrito por Gou y Thompson (Guo and Thompson, 1992). Esta prueba es análoga a la prueba exacta de Fisher sobre una tabla de contingencia de 2x2, pero extendida a una tabla de tamaño arbitrario y se realizó con el programa Arlequín versión 3.1 (Excoffier, 2005).

8.5. Desequilibrio de ligamiento entre los alelos.

Para evaluar si existe una asociación entre pares de loci, las secuencias de *S. cerevisiae* se agruparon en cuatro poblaciones vínicas: Argentina, Chile, Europa y Sudáfrica; y cuatro poblaciones no vínicas: chicha, masato, México y Japón. Posteriormente se determinó el desequilibrio de ligamiento en cada población, pero considerando que no se conoce la fase gamética (Slatkin, 1996), mediante el programa Arlequín ver 3.1 (Excoffier, 2005).

8.6. Análisis de estructura poblacional.

Para comparar las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* se estimó el índice de disimilitud entre pares de poblaciones F_{ST} . Este parámetro utiliza la distancia genética para calcular la divergencia entre pares de poblaciones en cada una de las ocho poblaciones de cepas en relación con la variación total, y se estimó con el programa Arlequín (Excoffier, 2005).

9. Análisis filogenético de *S. cerevisiae*.

Se obtuvo la secuencia para cada cepa de *S. cerevisiae* estudiada en las cinco regiones génicas estudiadas, cuatro nucleares y una mitocondrial. Las secuencias obtenidas se alinearon con el programa CLUSTAL X, versión para Windows del programa Clustal W (Thompson et al., 1994), implementado en

MEGA4 (Tamura et al., 2007) y en seguida se identificaron los diferentes alelos tal como se explicó en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos.

Los diferentes alelos detectados para cada una de las cuatro regiones génicas estudiadas se utilizaron para determinar las relaciones evolutivas entre ellos, mediante la construcción de las redes filogenéticas con el método Neighbor-Net (Bryant and Moulton, 2004), implementado en el programa SplitsTree4 (Huson and Bryant, 2006), que se basa en el algoritmo Neighbor-Joining para el análisis filogenético (Saitou and Nei, 1987). Las redes filogenéticas se obtuvieron con los métodos por defecto, que el programa presenta para datos de secuencias de DNA. A partir de las secuencias de DNA, se transformaron en distancias (método Uncorrected_P), es decir, la proporción de posiciones en las cuales dos secuencias son diferentes, y con estos valores se construyeron las redes (algoritmo Neighbor-Net). Por último, para la visualización final del árbol con los “splits” detectados, se utilizó el algoritmo de ángulos iguales (EqualAngle).

Después de identificar los alelos con recombinación y/o conversión génica se eliminaron de cada uno de los alineamientos, y se obtuvo la red filogenética con el método de parsimonia estadística, que estima genealogías por medio del mínimo número de cambios nucleotídicos, con el programa TCS versión 1.21 (Clement et al., 2000). Como outgroup o secuencia de referencia se utilizó *S. paradoxus* lo que permitió colocar la raíz en cada uno de los árboles obtenidos.

10. Origen de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Para determinar el origen de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se amplificó por PCR de regiones nucleares *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4* de las 21 cepas híbridas incluidas en el estudio. El alelo *cerevisiae* se separó mediante restricción del alelo no *cerevisiae*. Con electroforesis, cortando banda y posterior purificación del alelo *cerevisiae* (apartado 6.6), se obtuvo la secuencia del alelo *S. cerevisiae* (apartado 6.12).

Las secuencias del alelo *cerevisie* se alinearon con el programa CLUSTAL X, versión de Windows para el programa Clustal W (Thompson et al., 1994), implementado en MEGA4 (Tamura et al., 2007) y en seguida se identificaron los alelos tal como se explicó en el apartado 7.2. El árbol filogenético se obtuvo con el método Neighbor-Joining con el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007) con la secuencia de *S. paradoxus* como especie de referencia externa para identificar la raíz en cada uno de los árboles obtenidos.

11. Comparación genética de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*

Para analizar la divergencia nucleotídica entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* se amplificaron y secuenciaron las regiones génicas *EGT2*, *CAT8*, *GAL4* y *BRE5* de 17 cepas de *S. paradoxus*. Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTAL X, versión de Windows para el programa Clustal W (Thompson et al., 1994), implementado en MEGA4 (Tamura et al., 2007) y en seguida se identificaron los alelos tal como se explicó en el apartado 7.2. El árbol filogenético se obtuvo con el método Neighbor-Joining con el programa MEGA4 (Tamura et al., 2007) con las secuencias de *S. mikatae*, *S. bayanus* y *S. kudriavzevii* como outgroup para identificar la raíz en cada uno de los árboles obtenidos.

Con las secuencias obtenidas se calculó la divergencia nucleotídica entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* y se determinó el número (Da) y el número promedio (Dxy) de sustituciones nucleotídicas por sitio entre las poblaciones estudiadas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* con el programa informático DnaSP versión 4 (Rozas et al., 2003).

CAPÍTULO 1. Identificación y caracterización de aislados de bebidas tradicionales de Perú y México.

La fermentación es una actividad muy antigua que se ha empleado en todo el mundo para obtener alimentos y bebidas a partir de una gran diversidad de sustratos. Además de ser un proceso sencillo y económico, con ello se mejora el valor nutricional, las propiedades organolépticas y las características funcionales de los sustratos utilizados.

En Latinoamérica se producen y consumen numerosas bebidas fermentadas que se obtienen de frutas, vegetales y cereales, principalmente maíz (ver Tabla I1 de Introducción). Estas se producen a nivel casero o a pequeña escala industrial con procedimientos tradicionales. Los procesos de estas fermentaciones están poco estudiadas, son difíciles de seguir y de reproducir para obtener un producto de buena calidad. En cambio, los alimentos y bebidas fermentadas de África juegan un papel muy importante en la dieta de muchas poblaciones, y aunque la mayoría de estas bebidas también se producen a nivel casero, se han estudiado más que las de Latinoamérica (Aidoo et al., 2006; Jespersen, 2003; Jespersen et al., 2005; Naumova et al., 2003; Nielsen et al., 2005; Nout, 2003; Romano et al., 2006).

De forma habitual, la identificación de especies de levaduras se realiza a través de diversas características morfológicas y pruebas bioquímicas (Barnett, 1990); sin embargo, estas técnicas resultan laboriosas y en ocasiones los resultados que se obtienen son variables e incorrectos. En cambio, la identificación de especies de levaduras con métodos moleculares que se basan en ácidos nucleicos, ha resultado ser una buena alternativa a los métodos convencionales, ya que son más rápidos y precisos. La identificación de levaduras por métodos moleculares se están aplicando para conocer la biodiversidad implicada en las bebidas fermentadas de Europa, África y Asia; sin embargo, la gran diversidad de bebidas tradicionales de América que se

producen y se consumen están poco estudiadas con estas nuevas tecnologías que son mas precisas.

La información disponible sobre las levaduras asociadas a las bebidas tradicionales de Latinoamérica, así como el papel que tienen en su producción es insuficiente. Por ello, resulta interesante determinar si *S. cerevisiae* es la especie predominante de estas bebidas como ocurre en otras fermentaciones, e investigar la diversidad fisiológica y genética de las levaduras aisladas de estos procesos fermentativos, así como determinar la diversidad genética de la especie predominante. Esta información es importante porque ayudará a entender y mejorar las fermentaciones tradicionales de Latinoamérica y es el objetivo principal de presente capítulo. En el presente estudio nos hemos centrado en las levaduras presentes en algunas bebidas tradicionales de Perú (chicha de jora y masato) y de México (tepache, tejuino, pulque, aguamiel, tequila, entre otras).

1.1. Identificación de los aislados de masato.

El masato es una bebida de gran importancia para los indígenas, los nativos y pobladores de las amazonas de Perú, y como muchas otras bebidas contribuye a aportar nutrientes a la dieta en las regiones donde se produce. Esta bebida se obtiene de la fermentación de las raíces de cassava o yuca (*Manihot esculenta* Crantz), las que son cocidas y molidas para obtener una masa. La fermentación es espontánea y dura de 72 a 96 h a temperatura ambiente. En algunas ocasiones, los habitantes de las amazonas de Perú preparan el masato de una forma tradicional, con diferentes motivos para ceremonias religiosas, políticas y económicas.

Las 46 cepas de levaduras del masato analizadas en el presente trabajo fueron aisladas por la Dra. Elena Quillama en Pucallpa Perú, después de 72 h de fermentación a partir de cuatro tipos diferentes de masato: uno a partir de masa de yuca sin agregados (A), masa de yuca masticada (B), masa de yuca con azúcar de caña (C) y masa de yuca masticada con azúcar de caña (D), con 9, 20, 12 y 3 aislados para cada tipo de masato, respectivamente

La identificación de los aislados de masato se realizó siguiendo la metodología descrita por Esteve-Zarzoso *et al.* (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999), que proponen la amplificación de la región 5,8S-ITS y un análisis posterior de los fragmentos de restricción con las enzimas de restricción *CfoI*, *HaeIII* y *Hinfi*. De las 46 cepas identificadas hemos determinado 5 patrones. La Tabla 1.1 muestra el peso molecular de los productos de PCR y los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de los 5 patrones encontrados en los aislados del masato. Al comparar los resultados con los patrones disponibles en la base de datos www.yeast-id.com, se han identificado tres especies de levaduras, *S. cerevisiae*, *Candida albicans* y *C. sorboxylosa* y dos patrones A y B que no pudieron ser identificados al no estar incluidos en dicha base de datos (Tabla 1.1).

Para confirmar la correcta identificación de las especies correspondientes a los patrones de restricción desconocidos encontrados en los aislados de masato (A y B) se secuenciaron los dominios D1/D2 de la región del 26S rRNA

Capítulo 1

y posteriormente se compararon las secuencias nucleotídicas obtenidas en la base de datos (<http://www.ebi.ac.uk/Blas2/index.html>). La secuencia de las cuatro cepas con el patrón A, presentaron un valor de similitud entre 99% y 100% a la secuencia correspondiente de la cepa tipo de *Issatchenkia orientalis* con 1 o 0 diferencias nucleotídicas (Kurtzman and Robnett, 1998). En cambio la secuencia de la cepa con el patrón B, presentó valores de similitud de 100%, 99% y 97% y 0, 1 y 11 diferencias nucleotídicas con *C. humilis*, *C. milleri* y *S. barnetti*, respectivamente (números de acceso [gi|4038760|U69878.1](#), [gi|4038944|U94923.1](#) y [gi|31746939|AY048164.1](#)) (Anexo 1).

Tabla 1.1 Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de masato y chicha de jora de Perú.

AP	CfoI	HaeIII	Hinfi	ScrFI	ESPECIE
Masato					
500	210, 180, 75	380, 90	230, 150, 130		<i>(Issatchenkia orientalis)</i> Patrón A ^{a, b}
500	190, 130, 75	290, 140	475		<i>Candida sorboxylosa</i>
550	290, 270	450, 75	300, 290		<i>Candida albicans</i>
650	270, 175, 150, 50	430, 230	375, 350		Patrón B ^{a, c}
850	375, 325, 125	320, 230, 175, 125	375, 360, 120	400, 320, 120	<i>S. cerevisiae</i>
Chicha de jora					
620	300, 225, 90	250, 450	350, 225, 50		<i>Rhodotorula glutinis</i>
850	375, 325, 125	320, 230, 175, 125	375, 360, 120	400, 320, 120	<i>S. cerevisiae</i>
650	270, 175, 150, 50	430, 230	375, 350		Patrón B ^{a, c}
650	310, 225, 100	650	225, 130, 90		Patrón C ^{a, d}

^a Patrones de digestión no identificados mediante RFLPs 5,8-ITS.

^b Identificación según la homología de las secuencias de los dominios D1/D2 de la región 26S rRNA como *Issatchenkia orientalis*.

^c Homología de la secuencia del dominio D1/D2 de la región del 26S rRNA de 99%, 99%, 97% con *C. humilis*, *C. milleri* *S. barnetti*, respectivamente.

^d Homología de la secuencia del dominio D1/D2 de la región del 26S rRNA con *Rhodospiridium diobovatum* y *Rhodotorula glutinis*.

Algunos de los valores son próximos o mayores de 99%, que es el valor que se requiere para considerarlos como la misma especie (Kurtzman and Robnett, 1998). Por lo tanto, los aislados con el patrón A se identificaron con la especie *Issatchenkia orientalis* al presentar valores de similitud mayores de 99% (Anexo 1). Sin embargo, no fue posible la identificación para los aislados con el patrón B, pues se obtuvieron valores de similitud mayores de 99% para dos especies *C. humilis* y *C. milleri*, y el siguiente en similitud de 99% para *Saccharomyces barnetti*.

Como se ha mencionado, los aislados se obtuvieron de cuatro tipos diferentes de masato, dos con masa de yuca masticada (B y D) y dos con masa de yuca con azúcar (C y D), por ello se analizó la distribución de especies de levaduras identificadas en cada uno de ellos, para determinar si la adición de azúcar o la masa masticada tiene un efecto sobre la distribución de especies de levaduras que participan en la producción de esta fermentación. La distribución de levaduras, en porcentaje de colonias, en cada tipo de masato se muestra en la Tabla 1.2. Se observa que *S. cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis* son las especies predominantes en los cuatro tipos de masato, con más del 80% y 5% de las especies, respectivamente. Se identificaron algunas especies de *Candida* en el masato elaborado con masa de yuca masticada, aunque en todos los casos la especie predominante fue *S. cerevisiae*.

1.2. Identificación de los aislados de chicha de jora.

En el presente estudio se identificaron 58 aislados de varias muestras de chicha de jora con diferentes tiempos de fermentación, aislamientos realizados por la Dra. Elena Quillama. La identificación se realizó siguiendo la metodología descrita previamente (Esteve-Zarzoso et al., 1999) y aplicada para la identificación de los aislados de masato. El análisis del patrón de restricción permitió identificar a *S. cerevisiae* como la especie predominante en todas las diferentes muestras y tiempos de fermentación (desde 6 h hasta 96 h). Sin embargo, se observaron dos patrones de restricción no incluidos en la base de datos consultada www.yeast-id.com (Tabla 1.1, patrón B y C).

Tabla 1.2 Distribución de especies de levaduras identificadas en los cuatro tipos de masato. *A: masa de yuca sin agregados, B: masa de yuca masticada, C: masa de yuca con azúcar de caña y D: masa de yuca masticada con azúcar de caña. Entre paréntesis se indica el número de aislados.

Especies identificadas	Distribución de especies (%)			
	Tipo de masato			
	A*	B	C	D
<i>Issatchenkia orientalis</i>	11 (1)	5 (1)	18 (2)	
<i>Candida sorboxylosa</i>		5 (1)		
<i>Candida albicans</i>		5 (1)		
<i>C. humilis</i> , <i>C. milleri</i> <i>S. barnetti</i>		5 (1)		
<i>S. cerevisiae</i>	89 (8)	80 (18)	82 (9)	100 (4)
Total de aislados	9	22	11	4

El análisis de restricción de la región 5,8-ITS no permitió una identificación correcta para todas las colonias aisladas. La alternativa que seguimos para la identificación de los patrones de digestión no identificados con la restricción de la región 5,8-ITS fue la comparación de secuencias nucleotídicas de los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen 26S (Kurtzman and Robnett, 1998) y aplicada para los patrones de digestión no identificados en los aislados de masato.

Seis cepas presentaron el perfil de restricción con el patrón B, también encontrado en las cepas de masato, y que mostraron una homología en la secuencia de los dominios D1/D2 del 26S rRNA de 100%, 99% y 97%, que corresponden a 0, 1 y 1 diferencia nucleotídica con *C. humilis*, *C. milleri* y *S. barnetti*, respectivamente (números de acceso [gi|4038760|U69878.1](#), [gi|4038944|U94923.1](#) y [gi|31746939|AY048164.1](#)). La secuencia de un aislado con el patrón de restricción C presentó una secuencia de los dominios D1/D2 con valores de similitud de 99% y 1 diferencia nucleotídica con *Rhodospodium diobovatum* y *Rhodotorula glutinis* (números de acceso [gi|6273191|AF189914.1](#) y [gi|90398887|AM160643.1](#)) (Anexo 1).

La identificación de levaduras aisladas a partir de la fermentación de yuca y maíz para la obtención de masato y chicha de jora respectivamente en Perú, han mostrado que las especies de levaduras involucradas en este tipo de fermentaciones tradicionales son muy similares a otras bebidas alcohólicas como son el vino y la sidra, en donde *S. cerevisiae* es la especie dominante del proceso y por tanto responsables de la fermentación. Cabe destacar que los patrones B y C (Tabla 1.1) no pudieron ser identificados correctamente por ninguna de las dos técnicas ensayadas y podrían tratarse de dos nuevas especies.

1.3. Análisis de polimorfismos del DNA mitocondrial de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masato y chicha de jora.

Como hemos comentado previamente, la especie *S. cerevisiae* resultó ser la especie predominante tanto en la fermentación de masato como de chicha de jora, bebidas tradicionales de Perú. Por ello se evaluó la biodiversidad de aislados de esta especie a lo largo de ambas fermentaciones mediante el análisis de restricción del mtDNA. Estudios previos demostraron que el análisis de restricción del mtDNA con la enzima de restricción *Hinfl* permite detectar la mayor variabilidad genética en fermentaciones de vino y sidra (Morrissey et al., 2004; Querol et al., 1994). Aplicando la misma metodología en el presente estudio se detectaron 12 patrones de restricción del mtDNA entre las 39 colonias identificadas como *S. cerevisiae* que fueron aisladas durante la fermentación de los diferentes tipos de masato (Figura 1.1 y en la Tabla 1.3), (se muestra la frecuencia de los diferentes patrones de mtDNA en los diferentes tipos de masato).

En el masato elaborado con yuca sin agregados se detectaron siete patrones de mtDNA y cuatro en el elaborado con yuca masticada. Al adicionar azúcar a la masa de yuca se encontraron cinco patrones, pero en el masato elaborado con masa de yuca masticada y con azúcar solo se detectó uno de ellos. El patrón de restricción de mtDNA más frecuente fue el número 1, que se detectó en los cuatro tipos de masato estudiados. El patrón 2 se detectó en casi todos los tipos de masato estudiados, excepto en el masato elaborado con

masa de yuca masticada y con azúcar, en donde solo se encontró el patrón 1. Los patrones 1, 2, 8 y 9 están presentes sólo en el masato elaborado con yuca masticada sin agregados. Los patrones 8 y 9 fueron detectados sólo en el masato elaborado con masa de yuca masticada, y los patrones 5, 10 y 12 se detectaron en la masa de yuca con azúcar.

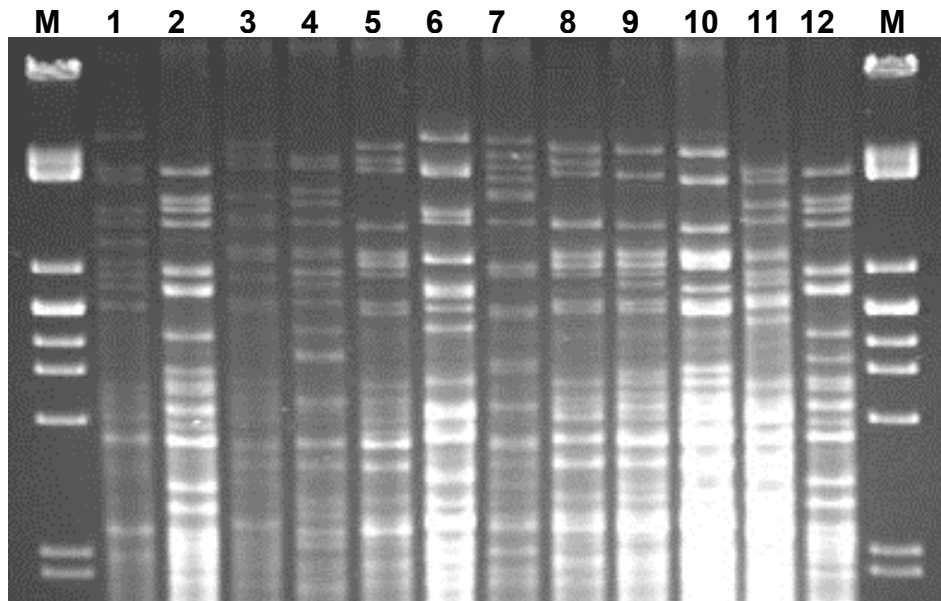


Figura 1.1. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa *Hinfi* de los aislados de *S. cerevisiae* de masato. El DNA del fago λ digerido con *PstI* se utilizó como marcador (M).

Al analizar las cepas de chicha de jora mediante el mismo análisis, restricción del mtDNA con la enzima de restricción *Hinfi*, se han podido diferenciar 17 patrones entre las 50 colonias de *S. cerevisiae* aisladas en las fermentaciones de maíz (Figura 1.2). La frecuencia de los patrones de restricción del mtDNA en los diferentes tiempos de fermentación se muestra en la Tabla 1.4. Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de chicha de jora fueron obtenidas a partir de muestras de fermentaciones tradicionales para la producción de esta bebida en la ciudad de Chalhuanca, Apurimac en Perú en los tiempos de fermentación de 6, 24, 48, 72 y 96 h.

Tabla 1.3. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA (%) de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidos de diferentes muestras de masato. Entre paréntesis se indica el número de aislados.

Patrón de mtDNA	Tipo de fermentación del maíz para la preparación del masato			
	Sin agregados (A)	Masticada (B)	Con azúcar (C)	Masticada y con azúcar (D)
1	14,3 (1)	25 (1)	20 (1)	100 (1)
2	14,3 (1)	25 (1)	20 (1)	
3	14,3 (1)			
4	14,3 (1)			
5			20 (1)	
6	14,3 (1)			
7	14,3 (1)			
8		25 (1)		
9		25 (1)		
10			20 (1)	
11	14,3 (1)			
12			20 (1)	
Total	100 (7)	100 (4)	100 (5)	100 (1)

Aunque los muestreos a 48 y 72 h de fermentación fueron más completos al disponer de un mayor número de aislados, se observó que el patrón 1 estaba presente en todos los tiempos de fermentación analizados y que fue el más frecuente. El patrón 2 fue el segundo más detectado, se encontró en las fermentaciones a 48 y 72 h. En las muestras con 6, 24 y 96 h de fermentación sólo se encontró el patrón 1. Los patrones 4, 5, 13, 14 y 15 se observaron a 48 h, mientras que los patrones 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 16 y 17 sólo se encontraron a 72 h.

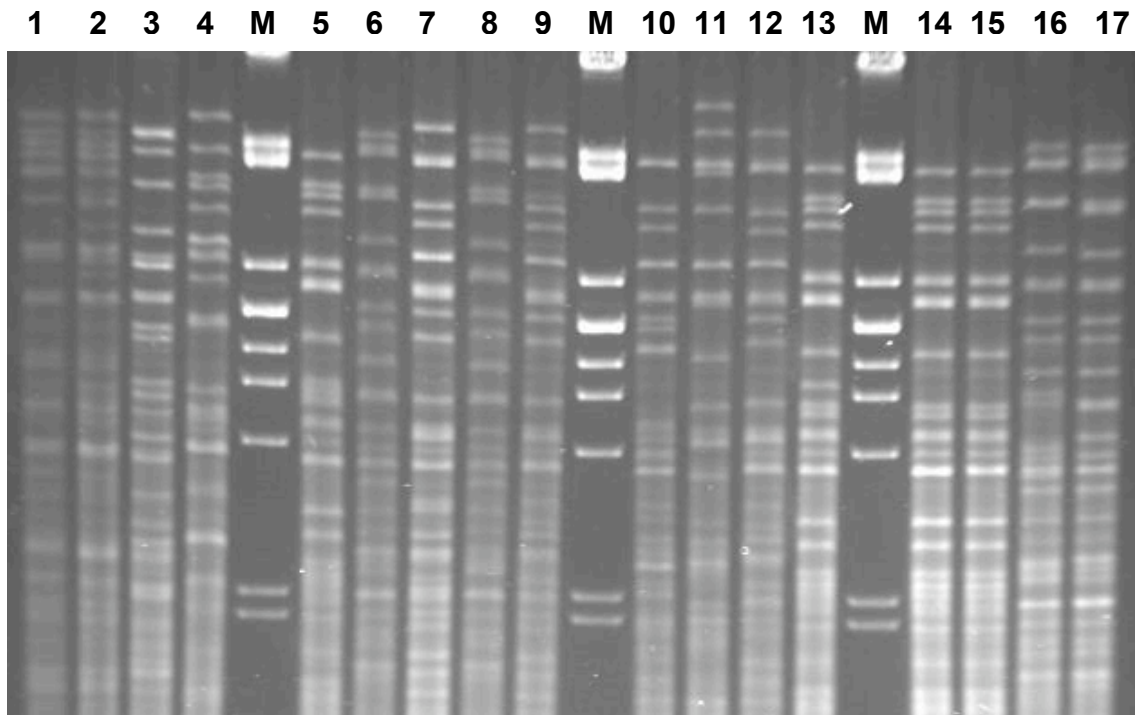


Figura 1.2. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa *Hinfl* de los aislados de *S. cerevisiae* de chicha de jora. El DNA del fago λ digerido con *PstI* se utilizó como marcador (M).

Tabla 1.4. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA (%) de *Saccharomyces cerevisiae* de las diferentes muestras de chicha de jora. Entre paréntesis se indica el número de aislados.

Patrón de mtDNA	Tiempo de fermentación del maíz para la elaboración de la chicha (h)				
	6	24	48	72	96
1	100 (1)	100 (1)	14 (3)	4 (1)	100 (2)
2			5 (1)	4 (1)	
3				4 (1)	
4			23 (5)		
5			23 (5)		
6				17 (4)	
7				29 (7)	
8				4 (1)	
9				8 (2)	
10				4 (1)	
11				8 (2)	
12				4 (1)	
13			18 (4)		
14			9 (2)		
15			9 (2)		
16				8 (2)	
17				4 (1)	
Total	100 (1)	100 (1)	100 (22)	100 (24)	100 (2)

1.4. Análisis del patrón de bandas de cromosomas de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masato y chicha de jora.

Otra de las técnicas aplicadas para determinar variabilidad entre las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones tradicionales de Latinoamérica fue el polimorfismo cromosómico, metodología que ha permitido determinar la diversidad genética de las cepas industriales de *S. cerevisiae* (Codón and Benítez, 1995; Guillamón et al., 1996). La caracterización de bandas de

cromosomas por electroforesis en campo pulsante de las cepas aisladas de masato y chicha de jora se realizó después de seleccionar una cepa de cada patrón de mtDNA. Se observó que todas las cepas presentaron un patrón de bandas correspondientes a 16 cromosomas, típico de *S. cerevisiae* cuyo tamaño varía entre 200 a 1900 kbp (Figuras 1.3 y 1.4). De acuerdo a los perfiles de cromosomas se detectaron tres patrones diferentes entre las 12 cepas de masato con diferente patrón de mtDNA. Las cepas con el patrón de restricción del mtDNA 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mostraron el mismo cariotipo. La cepa con el patrón 12 de mtDNA mostró pocas diferencias en el perfil cromosómico respecto al grupo anterior y la cepa que mostró más diferencias fue la del patrón 11 de mtDNA.

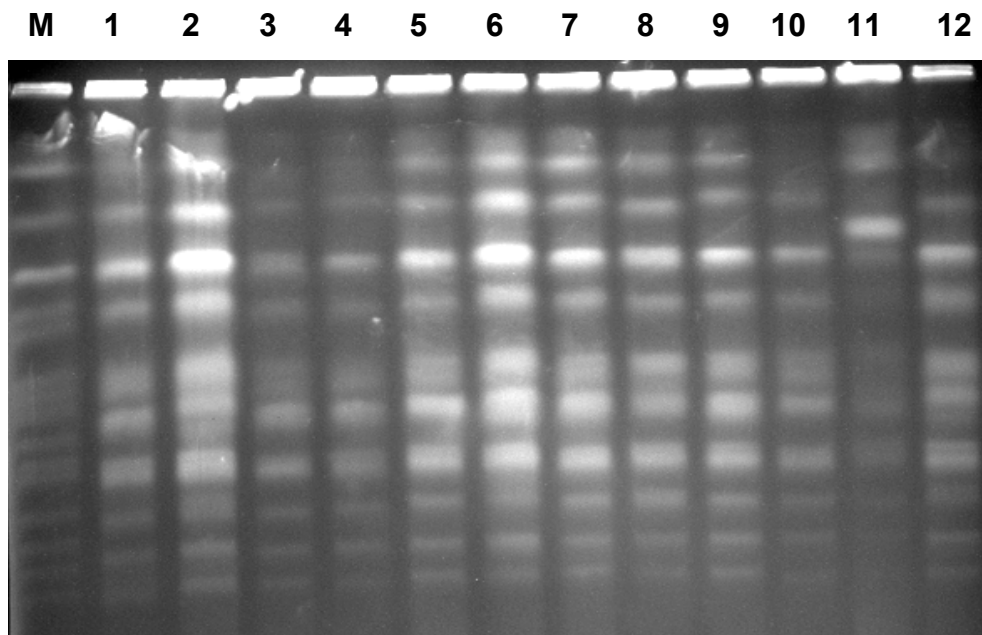


Figura 1.3. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de *S. cerevisiae* de masato.

De acuerdo a los perfiles de cromosomas se detectaron seis patrones diferentes entre las 17 cepas de chicha con diferente patrón de mtDNA. Las cepas con los patrones de restricción de mtDNA 1, 2, 3, 4, 5 y 8 mostraron el mismo cariotipo. Las cepas con los patrones de restricción de mtDNA 9, 11, 12, 13, 14, 15 y 17 mostraron un cariotipo con pocas diferencias respecto al grupo

anterior. Además se detectó que los patrones de mtDNA 6, 7, 10 y 16 presentaron un cariotipo diferente a los otros dos grupos y entre ellos.

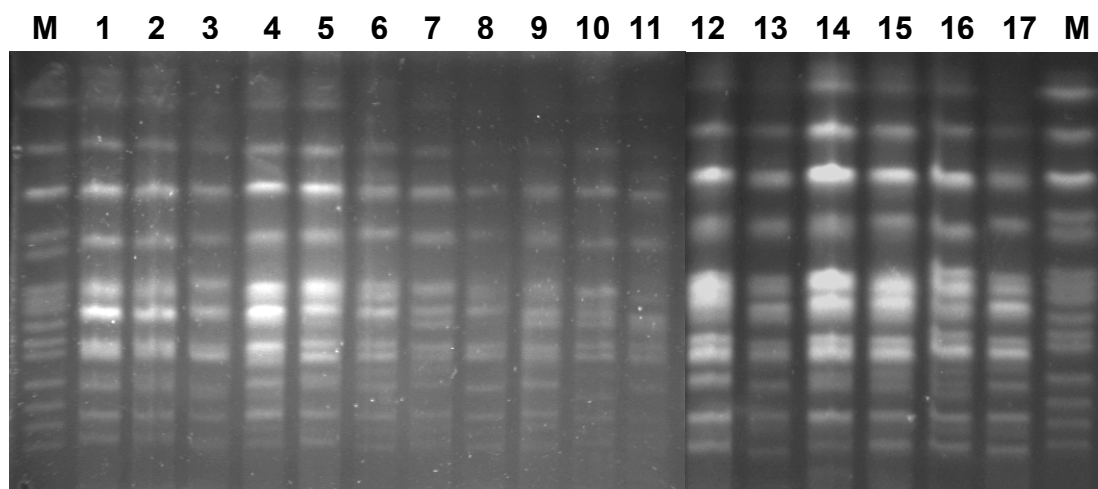


Figura 1.4. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de *S. cerevisiae* de chicha de jora.

1.5. Bebidas fermentadas tradicionales de México

También en México existe una gran diversidad de bebidas tradicionales que se fermentan de forma tradicional y para ello se utiliza una gran gama de sustratos. Algunos ejemplos son la savia de plantas de *Agave* spp. para la producción de tequila, aguamiel, pulque, lechuguilla; de palma de coco para la obtención de tuba. De cereales, principalmente el maíz se obtiene el tejuino, y de frutas como la piña se obtiene el tepache. En general, todas las bebidas son obtenidas de forma casera y con tecnologías tradicionales, por lo que la calidad del producto no es constante.

Dada la carencia de información sobre la diversidad de especies de levaduras que están presentes en las fermentaciones tradicionales en bebidas en México, se aislaron para llevar a cabo su identificación con técnicas moleculares, colonias obtenidas de diversas bebidas tradicionales del occidente de México.

1.5.1. Identificación de los aislados de agave.

En este estudio se aislaron 78 colonias diferentes de varias bebidas fermentadas de México elaboradas con *Agave* spp., tal como se explicó en el apartado 4 de Materiales y Métodos. Del total, 29 se obtuvieron de campos de cultivo de *Agave tequilana* y 21 de jugo de agave tequilero fermentado que se utiliza para la elaboración del tequila. A partir de la savia de *Agave* spp. sin fermentar se obtiene el aguamiel y después de fermentar el pulque. De estas dos bebidas se aislaron 20 y 6 cepas respectivamente; y por último, de la bebida lechuguilla se obtuvieron dos aislados.

En la Tabla 1.5, se muestra el peso molecular de los productos de PCR y los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de los diferentes patrones encontrados en las levaduras aisladas de agave. Con el análisis de los patrones de restricción de la región 5,8S-ITS (Esteve-Zarzoso et al., 1999) y la comparación en la base de datos www.yeast-id.com se identificaron los diferentes aislados. En el agave tequilero se identificaron siete especies de levaduras que son las siguientes: *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. marxianus var drosophilarum*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guilliermondii*, *Candida ethanolica* y *Clavispora lusitaniae*. En el aguamiel se identificaron cinco especies: *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida ethanolica*, *Pichia kluyveri* y *S. paradoxus*; en el pulque se identificaron cuatro especies, *Candida ethanolica*, *Kluyveromyces marxianus*, *Clavispora lusitaniae* y *S. cerevisiae*; y de la fermentación de *Agave lechuguilla* se identificaron las especies *Pichia galeiformis* y *Candida pararugosa* (Tabla 1.5).

Como algunos perfiles de restricción no coincidían con los de la base de datos de levaduras (www.yeast-id.com) se decidió analizar la secuencia de los dominios D1/D2 de la región del 26S rRNA a través de la comparación con las secuencias de las bases de datos (<http://www.ebi.ac.uk/Blas2/index.html>). Se encontraron valores de similitud mayores o iguales a 99%, con 1 o menos diferencias nucleotídicas para *Issatchenkia orientalis*, *Pichia guilliermondii*, *K. marxianus var drosophilarum* y *Pichia galeiformis* que corresponden a los perfiles no identificados B, C, D y E de la Tabla 1.5. Además se encontró que el patrón de restricción A, corresponde a *Clavispora lusitaniae*, aún cuando la

secuencia del dominio D1/D2 presenta una similitud de 91% o 94% con la secuencia de la cepa Tipo CBS-6936 y la cepa Isotipo CBS-4413 con 29 y 30 diferencias nucleotídicas (Anexo 1).

Al analizar la distribución de especies aislados de productos fermentados con agave se encontró que la especie predominante en los campos de cultivo así como en las fermentaciones de jugo tequilero es *Clavispora lusitaniae* con el 60% de los aislados, le siguió *S. cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* con 12%, *Issatchenkia orientalis* con 8%, *Pichia guilliermondii* con el 4% y *K. marxianus var drosophilarum* y *Candida ethanolica* con 2% cada una. En aguamiel, *S. cerevisiae* resultó ser la especie predominante con el 40% de los aislados, con un 20% *S. paradoxus* y *Candida ethanolica*, 15% *Kluyveromyces marxianus* y 5% *Pichia kluyveri*. En pulque las especies predominantes son *Kluyveromyces marxianus* con el 40% y *S. cerevisiae* con el 30% de los aislados, en menor frecuencia se encontraron *Candida ethanolica* con 20% y *Clavispora lusitaniae* con el 10%.

Tabla 1.5. Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de bebidas elaboradas con *Agave* spp.

AP	CfoI	HaeIII	HinfI	ScrFI	ESPECIE	%
Tequila						
380	220+80	380	190+180		<i>Clavispora lusitaniae</i> A ^{a, b}	60
450	150+90+80+50	320+90	240+190		<i>Candida ethanolica</i>	2
500	200+180+50	360+75	230+160+140		<i>Issatchenkia orientalis</i> B ^{a, b}	8
600	290+250	400+130+70	310+290		<i>Pichia guilliermondii</i> C ^{a, b}	4
700	290+180+170+80	630+70	260+190+120+50		<i>K. marxianus</i>	12
740	290+190+170 70	600	260+190+120		<i>K. marxianus</i> var. <i>drosophilum</i> D ^{a, b}	2
850	375+340+140	320+230+175+125	380+380+125	400+325+140	<i>S. cerevisiae</i>	12
Aguamiel						
450	140+90+50	290+70	240+190		<i>Candida ethanolica</i>	20
450	170+120+80	360+120	250+200		<i>Pichia kluyveri</i>	5
700	290+180+170+80	630+70	260+190+120+50		<i>K. marxianus</i>	15
850	350+320+130	320+230+175+125	375+350+110	400+325+140	<i>S. cerevisiae</i>	40
850	375+350+130	320+230+170+120	375+350+120	520+320	<i>S. paradoxus</i>	20
Pulque						
380	210+80	380	180+180		<i>Clavispora lusitaniae</i>	10
400	150+90	290+70	240+190		<i>Candida ethanolica</i>	20
700	290+180+170+80	630+70	260+190+120+50		<i>K. marxianus</i>	40
850	375+350+130	320+230+170+120	375+350+120	400+320+120	<i>S. cerevisiae</i>	30
Lechuguilla						
400	250+180	400	230+200		<i>Candida pararugosa</i>	50
450	230+110+50+40	290+90	250+210		<i>Pichia galeiformis</i> E ^{a, b}	50

^a Patrones de digestión no identificados por restricción. ^b Identificación según la homología de las secuencias de los dominios D1/D2 de la región 26S rRNA.

1.5.2. Identificación de los aislados de tejuino.

El tejuino es una bebida refrescante que se elabora a partir de la fermentación de la masa elaborada con granos de maíz blanco, que se produce en el occidente de México. En este estudio se identificaron 50 aislados de levaduras de esta bebida que se obtuvieron de muestras de fermentaciones en la zona metropolitana de Guadalajara, Jalisco, en México. En la Tabla 1.6, se muestra las cepas identificadas mediante el análisis de restricción de la región 5,8S-ITS (Esteve-Zarzoso et al., 1999) y de la comparación en la base de datos www.yeast-id.com. La biodiversidad de levaduras encontrada en tejuino está compuesta de las siguientes especies: *S. cerevisiae*, *Issatchenkia orientalis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida tropicalis*, *Clavispora lusitaniae*, *Pichia kluyveri*, *S. paradoxus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Issatchenkia terrícola*, *Hanseniaspora vineae*, *H. Guilliermondii* y *Candida sorbosa*.

Se obtuvo la secuencia de los dominios D1/D2 de la región del 26S rRNA de las cepas con los perfiles de restricción que no permitieron su identificación para comparar la similitud con la base de datos de secuencias, y se encontraron valores de similitud iguales o mayores de 99% para *Candida tropicalis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Hanseniaspora vineae* e *Issatchenkia terrícola*, con 2 o menos diferencias nucleotídicas (Patrón F, G, H, e I, Tabla 1.6 y Anexo 1).

Tabla 1.6. Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tejuino.

AP	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>ScrFI</i>	ESPECIE	%
380	200+80	380	190+180		<i>Clavispora lusitaniae</i>	8
410	120+90+80+70+60+40	280+130	230+100		<i>Issatchenkia terricola</i> F ^{a,b}	2
450	160+90+50	320+60	250+190		<i>Pichia kluyveri</i>	6
450	220+100+60+60	290+70+50	250+110+100		<i>Candida sorbosa</i>	2
500	220+180+50	370+80	230+175+150		<i>Issatchenkia orientalis</i>	24
510	290+250	430+80	250+250		<i>Candida tropicalis</i> G ^{a, b}	10
600	290+220+100	390+210	330+220+50		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> H ^{a, b}	2
750	340+330+100	730	350+200+160+50		<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	2
750	310+310+120	730	360+340+120		<i>Hanseniaspora uvarum</i>	12
850	370+340+130	320+230+175+125	370+190+110	400+325+140	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
850	340+320+130	320+250+175+150	375+350+110	520+320	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	2
870	270+260+140+125+80	670+60	410+380+360		<i>Hanseniaspora vineae</i> I ^{a, b}	2

^a Patrones de digestión no identificados por restricción. ^b Identificación según la homología de las secuencias de los dominios D1/D2 de la región 26S rRNA.

1.5.3. Identificación de los aislados de tepache.

El tepache es una bebida dulce refrescante de bajo contenido alcohólico elaborado con piña o con granos de maíz, azúcar morena y agua que se fermenta durante uno o dos días (Wacher-Rodarte, 1995). Después de este tiempo de fermentación se obtiene una bebida alcohólica y finalmente se produce vinagre. En este trabajo se aislaron 9 cepas de levaduras de tepache obtenido por fermentación de piña en Guadalajara, Jalisco, México. En la Tabla 1.7, se muestra el peso molecular de los productos de PCR y los fragmentos de restricción de la región 5,8S-ITS de los diferentes patrones encontrados en las levaduras aisladas de tepache. Con el análisis del patrón de restricción se identificaron las especies *Candida humilis*, *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia occidentalis* y *S. cerevisiae*. Al analizar la distribución de cepas se encontró que *Candida humilis* es la especie predominante con el 56%, le siguió *Pichia kluyveri* con el 22% y las especies *Issatchenkia occidentalis* y *S. cerevisiae* con el 11%.

Tabla 1.7. Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tepache.

AP	CfoI	HaeIII	HinI	ScrFI	ESPECIE	%
650	240+170+140	410+220	340+290		<i>Candida humilis</i>	55,5
450	220+100+50	290+70	240+100+90		<i>I. occidentalis</i>	11,5
450	170+120+80	360+120	250+200		<i>Pichia kluyveri</i>	22,2
850	375+350+130	320+230+170+120	375+350+120	400+320+130	<i>S. cerevisiae</i>	11,1

1.5.4. Identificación de los aislados de tuba.

La tuba es una bebida refrescante que se obtiene de la fermentación de la savia de la palma, y se produce en el occidente de México. En este estudio se identificaron 8 cepas aisladas de tuba, y se encontraron cuatro patrones de restricción que corresponden a *Issatchenkia orientalis*, *Clavispora lusitaniae*, *S. cerevisiae* y *Candida humilis* (Tabla 1.8). La especie predominante en la tuba fue *Issatchenkia orientalis* con 63% y las otras dos especies con el 13% cada una.

Tabla 1.8. Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de tuba.

AP	CfoI	HaellI	HinfI	ScrFI	ESPECIE	%
500	200+180+50	380+80	220+150+140		<i>Issatchenkia orientalis</i>	62,5
380	220+80	370	190+180		<i>Clavispora lusitaniae</i>	12,5
620	250+180+150	320+220	330+280		<i>Candida humilis</i>	12,5
850	375+350+130	320+230+170+120	350+350+120	400+325+140	<i>S. cerevisiae</i>	12,5

1.5.5. Identificación de los aislados de *Drosophila*.

La mosca de la fruta *Drosophila* es un vector de levaduras y es común encontrarla cerca de substratos ricos en azúcares. En este trabajo se aislaron 25 cepas de levaduras a partir de la captura de ejemplares de mosca de la fruta *Drosophila* (frutas en mercados de la ciudad de Guadalajara, Jalisco, México) las que se dejaron en la placa de cultivo durante 30 minutos, así el medio de cultivo se inoculó mediante el contacto del insecto con el medio. Las especies de levaduras aisladas de la mosca de la fruta *Drosophila* identificadas por medio del análisis de restricción de región 5.8S-ITS corresponden a las especies *Pichia kluyveri* *Hanseniaspora guilliermondii*, *Issatchenkia orientalis* y *Clavispora lusitaniae* (Tabla 1.9). Cabe destacar que no se aisló ninguna levadura fermentativa como es el caso de las especies del género *Saccharomyces*.

Tabla 1.9. Peso molecular del producto de PCR amplificado (AP en pares de bases) y de los fragmentos de restricción (pares de bases) de la región 5,8S-ITS de las diferentes especies de levaduras aisladas de *Drosophila*.

AP	CfoI	HaellI	HinFI	ESPECIE	%
750	320+320+110	750	350+200+180	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	28
500	210+190+75	380+90	230+170+150	<i>Issatchenkia orientalis</i>	20
450	150+100+50	360+70	250+210	<i>Pichia kluyveri</i>	32
380	200+80	380	190+180	<i>Clavispora lusitaniae</i>	20

1.6. Distribución de cepas aisladas en México.

La distribución de especies de levaduras en las bebidas fermentadas tradicionales de México se muestra en la Tabla 1.10. Las especies predominantes son *Clavispora lusitaniae*, *S. cerevisiae* e *Issatchenkia orientalis* con 41, 33 y 26 aislados. *C. lusitaniae* se encontró principalmente en agave, mientras que *S. cerevisiae* e *I. orientalis* en tejuino. *S. cerevisiae* está presente en todas las bebidas estudiadas, y solo la lechuguilla y en los aislados de la mosca de la fruta no se encontró esta especie. Cabe resaltar que se identificó *S. paradoxus* en aguamiel y tejuino con 4 y 1 aislados, respectivamente. La bebida con mayor diversidad de especies identificadas es el tejuino con el 60% de especies, es decir 12 de las 20 especies identificadas en las bebidas mexicanas. Le siguió el agave con el 35% de las especies y el tepache, la tuba y en *Drosophila* con el 20%.

Al analizar la distribución de especies aislados de productos fermentados con agave tequilero se encontró que la especie predominante en los campos de cultivo así como en las fermentaciones de jugo tequilero es *C. lusitaniae* con el 60% de los aislados, le siguió *S. cerevisiae* y *K. marxianus* con 12%, *I. orientalis* con 8%, *Pichia guilliermondii* con el 4% y *K. marxianus var drosophilorum* y *Candida ethanolica* con 2% cada una; en el aguamiel, *S. cerevisiae* resultó ser la especie predominante con el 40% de los aislados, con

un 20% *S. paradoxus* y *C. ethanolica*, 15% *K. marxianus* y 5% *Pichia kluyveri*. En pulque las especies predominantes son *K. marxianus* con el 40% y *S. cerevisiae* con el 30% de los aislados, en menor frecuencia se encontraron *Candida ethanolica* con 20% y *C. lusitaniae* con el 10%.

En tejuino la especie predominante es *S. cerevisiae* con 28% e *I. orientalis* con 24% de los aislados. Le siguieron las especies *H. uvarum*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* y *P. kluyveri* con 12%, 10%, 8% y 6%, respectivamente. Las seis cepas restantes que se encontraron en tejuino están presentes en un 2%, cada una. De las cuatro especies identificadas en tepache, la especie predominante es *C. humilis* con el 55%, *P. kluyveri* con 22%, y las especies *I. occidentalis*, y *S. cerevisiae* con el 11% cada una. En tuba *I. orientalis* resultó la especie predominante con el 62%. Con el 13% se encontró a *C. humilis*, *C. lusitaniae* y *S. cerevisiae*.

Tabla 1.10. Distribución de las especies de levaduras identificadas en bebidas fermentadas tradicionales de México.

Especie	Tipo de bebida/substrato								Total
	Número de cepas								
	Tequila	Aguamiel	Pulque	Lechuguilla	Tejuino	Tepache	Tuba	<i>Drosophila</i>	
<i>Candida ethanolica</i>	1	4	2						7
<i>Candida humilis</i>						5	1		6
<i>Candida pararugosa</i>				1					1
<i>Candida sorbosa</i>					1				1
<i>Candida tropicalis</i>					5				5
<i>Clavispora lusitaniae</i>	30		1		4		1	5	41
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>					1			7	8
<i>Hanseniaspora uvarum</i>					6				6
<i>Hanseniaspora vineae</i>					1				1
<i>Issatchenkia occidentales</i>						1			1
<i>Issatchenkia orientalis</i>	4				12		5	5	26
<i>Issatchenkia terricola</i>					1				1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	6	3							9
<i>K. marxianus var drosophilarum</i>	1								1
<i>Pichia galeiformis</i>				1					1
<i>Pichia guilliermondii</i>	2								2
<i>Pichia kluyveri</i>		1			3	2		8	14
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>					1				1
<i>S. cerevisiae</i>	6	8	3		14	1	1		33
<i>S. paradoxus</i>		4			1				5
Total	50	20	6	2	50	9	8	25	170

1.7. Análisis del patrón de restricción del mtDNA

Como hemos comentado previamente, la especie *S. cerevisiae* resultó ser la especie predominante en aguamiel, pulque y tejuino, bebidas tradicionales obtenidas de la fermentación de agave y maíz. Por ello se evaluó la variabilidad genética de las cepas de *S. cerevisiae* con el patrón de restricción del mtDNA con la enzima de restricción *Hinfl* (Morrissey et al., 2004; Querol et al., 1994). Con la misma metodología, se detectaron 13 patrones de restricción del mtDNA diferentes entre las 33 colonias identificadas como *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de México (Figura 1.5).

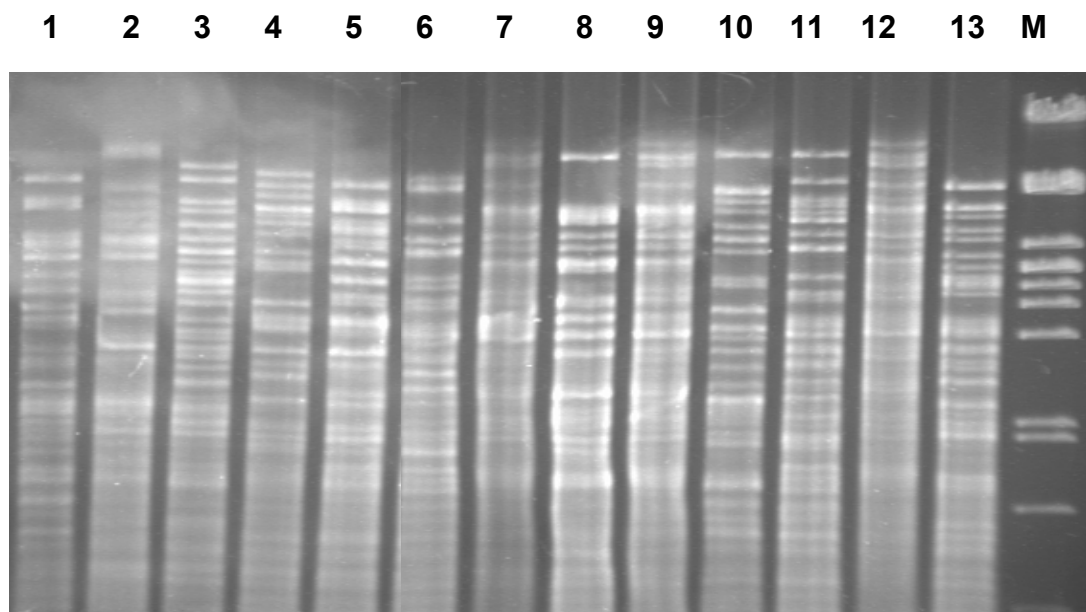


Figura 1.5. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la endonucleasa *Hinfl* de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas de México. El DNA del fago λ digerido con *Pst*I se utilizó como marcador (M).

Las cepas de *S. cerevisiae* se aislaron en seis de las bebidas tradicionales de México: 14 cepas de tejuino, 8 en aguamiel, 6 en agave, 3 en pulque y 1 en tepache y tuba. En el caso de *S. paradoxus* se identificaron 5 cepas, 4 en aguamiel y 1 en tejuino, todas con un mismo patrón de mtDNA. En la Tabla 1.11 se muestra el análisis de la frecuencia de los diferentes patrones de mtDNA en los diferentes tipos de bebidas fermentadas. En general, se observa

que cada patrón de mtDNA está presente en una bebida, y solo el tipo 8 está compartido por el aguamiel y pulque; y el 12 está presente en aguamiel y tepache. En agave solo se encontraron los patrones 1, 2 y 3. Los patrones 4, 5, 6, 7, 10 y 11 se detectaron solo en tejuino. En aguamiel se observaron los patrones 8 y 12 y en pulque solo el patrón 8. El patrón 9 y 12 solo se encontró en tuba y tepache respectivamente.

Tabla 1.11. Distribución de los patrones de restricción del mtDNA (%) de *S. cerevisiae* detectados en muestras de bebidas tradicionales de México. Entre paréntesis se indica el número de aislados.

Patrón de mtDNA	Tipo de bebida					
	Agave	Tejuino	Aguamiel	Pulque	Tuba	Tepache
1	16,7 (1)					
2	16,7 (1)					
3	66,7 (4)					
4		28,6 (4)				
5		28,6 (4)				
6		7,1 (1)				
7		14,3 (2)				
8			75 (6)	100 (3)		
9					100 (1)	
10		14,3 (2)				
11		7,1 (1)				
12			25 (2)			
13						100 (1)
Total	100 (6)	100 (14)	100 (8)	100 (3)	100	100

1.8. Análisis del patrón de bandas de cromosomas.

Otra de las técnicas aplicadas para determinar variabilidad entre las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones tradicionales de Latinoamérica fue el polimorfismo cromosómico. Esta metodología ha permitido determinar la diversidad genética de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* y que se ha aplicado

a las cepas de *S. cerevisiae* de Perú. La caracterización de bandas de cromosomas por electroforesis en campo pulsante de las cepas aisladas de bebidas tradicionales de México se realizó después de seleccionar una cepa de cada patrón de mtDNA. Se observó que todas las cepas presentaron un patrón de bandas correspondientes a los 16 cromosomas, típico de *S. cerevisiae* cuyo tamaño varía entre 200 a 1900 kbp (Figura 1.6). Se identificaron 8 patrones diferentes, lo que demuestra que las cepas de bebidas tradicionales de México son más variables a nivel cromosómico que las cepas de Perú, donde se detectó un número menor de patrones.

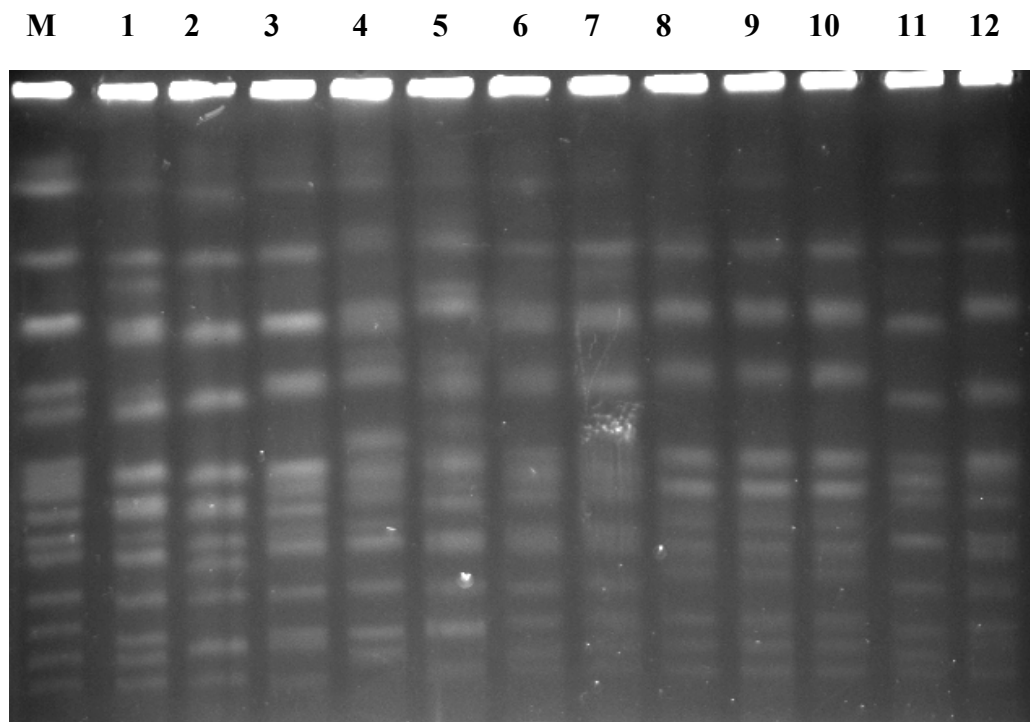


Figura 1.6. Patrones de bandas de cromosomas de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas de México.

1.9. Propiedades fisiológicas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de Perú.

Los aspectos fisiológicos de importancia ecológica en las fermentaciones naturales son la capacidad de fermentar el azúcar presente en los alimentos y bebidas, y la tolerancia a diferentes tipos de estrés. El almidón es el azúcar

fermentable presente en la yuca para producir masato y del maíz para la producción de la chicha de jora. En ambos casos la saliva es la fuente de amilasa para la conversión a maltosa y glucosa. En algunas zonas urbanas de Perú, en lugar de saliva se adiciona camote o azúcar y en estos casos el azúcar a fermentar es maltosa, glucosa y fructosa. Pocas cepas de *S. cerevisiae* son capaces de fermentar maltosa, tan sólo las cepas panaderas y esto puede ser una característica importante de las cepas aisladas del masato y chicha de jora. En el presente trabajo se analizó la capacidad de fermentar estos tres azúcares en las cepas de masato y chicha de jora, en comparación con seis controles que incluyen tres cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae* y tres de *S. bayanus*

1.9.1. Capacidad de fermentar diferentes azúcares.

En la Tabla 1.12 se muestra la capacidad de fermentar glucosa, fructosa y maltosa de las 29 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de Perú con diferente patrón de mtDNA. Todas las cepas de *Saccharomyces* aisladas de masato y chicha tienen la capacidad de fermentar glucosa y fructosa (Kurtzman and Fell, 2000). Las cepas de *S. cerevisiae* de masato y chicha de jora presentaron la capacidad de fermentar maltosa después de 48 h; sin embargo, no todas las cepas vínicas de *Saccharomyces* fermentaron la maltosa. En particular, las cepas vínicas Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc (*S. cerevisiae* comercial) y CECT12930 (*S. bayanus*) no fermentaron dicho azúcar, incluso después de 72 h.

Tabla 1.12. Fermentación de glucosa, fructosa y maltosa de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de Perú.

Cepa	Origen	Fermentación de azúcar (5%)		
		Glucosa	Fructosa	Maltosa
Aislados de <i>S. cerevisiae</i> masato, Perú				
1	Masato, Perú	+	+	+
2	Masato, Perú	+	+	+
3	Masato, Perú	+	+	+
4	Masato, Perú	+	+	+
5	Masato, Perú	+	+	+
6	Masato, Perú	+	+	+
7	Masato, Perú	+	+	+
8	Masato, Perú	+	+	+
9	Masato, Perú	+	+	+
10	Masato, Perú	+	+	+
11	Masato, Perú	+	+	+
12	Masato, Perú	+	+	+
Aislados de <i>S. cerevisiae</i> chicha, Perú				
13	Chicha, Perú	+	+	+
14	Chicha, Perú	+	+	+
15	Chicha, Perú	+	+	+
16	Chicha, Perú	+	+	+
17	Chicha, Perú	+	+	+
18	Chicha, Perú	+	+	+
19	Chicha, Perú	+	+	+
20	Chicha, Perú	+	+	+
21	Chicha, Perú	+	+	+
22	Chicha, Perú	+	+	+
23	Chicha, Perú	+	+	+
24	Chicha, Perú	+	+	+
25	Chicha, Perú	+	+	+
26	Chicha, Perú	+	+	+
27	Chicha, Perú	+	+	+
28	Chicha, Perú	+	+	+
29	Chicha, Perú	+	+	+
Cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i>				
Lalvin T73, Lallemand	Vino, Alicante, España	+	+	+
Uvaferm CEG, Danstar	Vino, Eppernay, Francia	+	+	+
Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc.	Vino, Coñac, Francia	+	+	-
Cepas vínicas de <i>S. bayanus</i>				
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	+	+	+
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	+	+	+
CECT 12930	Vino, España	+	+	-

1.9.2. Actividad α -amilasa.

Como se ha mencionado previamente la elaboración del masato y chicha es mediante la fermentación de substratos ricos en almidón, como es el maíz y la yuca. Para determinar si las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de Perú están adaptadas a ambientes amiláceos, se determinó la actividad amilasa de las cepas de *S. cerevisiae* con diferente perfil de mtDNA en comparación con cepas controles mediante la identificación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia después de 48 h de incubación, en un medio de cultivo sólido con almidón como fuente de carbono a 30°C (De Mot and Verachtert, 1987). De las 29 cepas de masato y chicha evaluadas, solo las cepas con el patrón de mtDNA 3, 5, 7, 8 y 9, aisladas de masato y la 24 y 28 de chicha formaron un halo alrededor del cultivo, lo que indica una actividad amilasa positiva (+) (Tabla 1.13). En el caso de las cepas vínicas utilizadas como representantes de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, ninguna formó el halo, lo que sugiere, que no producen ni secretan amilasas en el medio. Los resultados obtenidos sugieren que las cepas de masato y chicha están mejor adaptadas a las fermentaciones tradicionales y pueden tener un papel importante para la producción de estas bebidas ya que podrían utilizar el almidón presente en la yuca y el maíz.

Tabla 1.13. Actividad α -amilasa de los aislados identificados como *S. cerevisiae* de las bebidas fermentadas tradicionales de Latinoamérica en comparación con cepas control de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Cepa	Origen	Producción de amilasa
1	Masato, Perú	-
2	Masato, Perú	-
3	Masato, Perú	+
4	Masato, Perú	-
5	Masato, Perú	+
6	Masato, Perú	-
7	Masato, Perú	+
8	Masato, Perú	+
9	Masato, Perú	+
10	Masato, Perú	-
11	Masato, Perú	-
12	Masato, Perú	-
13	Chicha, Perú	-
14	Chicha, Perú	-
15	Chicha, Perú	-
16	Chicha, Perú	-
17	Chicha, Perú	-
18	Chicha, Perú	-
19	Chicha, Perú	-
20	Chicha, Perú	-
21	Chicha, Perú	-
22	Chicha, Perú	-
23	Chicha, Perú	-
24	Chicha, Perú	+
25	Chicha, Perú	-
26	Chicha, Perú	-
27	Chicha, Perú	-
28	Chicha, Perú	+
29	Chicha, Perú	-
Cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i>		
Lalvin T73, Lallemand	Vino, Alicante, España	-
Uvaferm CEG, Danstar	Vino, Eppernay, Francia	-
Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc.	Vino, Coñac, Francia	-
Cepas de <i>S. bayanus</i>		
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	-
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	-
CECT 12930	Vino, España	-
Control: Cinta Roja	Panadera	+

1.9.3. Crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés.

En una fermentación alcohólica para la producción de vino y sidra, las células de levaduras están bajo diferentes condiciones de estrés. Al inicio del proceso de producción los factores de estreses son el osmótico, ocasionado por una alta concentración de glucosa y un pH muy bajo. Y al final de la fermentación alcohólica se presenta estrés por alcohol y bajo contenido en nitrógeno. Las condiciones de estrés en las bebidas tradicionales de Perú son un poco diferentes teniendo en cuenta el proceso. La concentración de azúcares en estos procesos al inicio de la fermentación es de 85 g/L, muy por debajo de lo que se encuentra en mosto de uva que oscila entre 180 a 250 g/L; el pH en la pasta de yuca y masa de maíz no se puede considerar una condición estresante ya que es de 4,5 frente a 2,9 a 3,2 en vinos. Es decir, las levaduras de masato y chicha de jora no tienen que crecer en condiciones tan extremas como las vónicas. Sin embargo, para comparar la capacidad de adaptación a estrés de las levaduras aisladas de masato y chicha de Jora con la de cepas vónicas de *S. cerevisiae*, se evaluó la tolerancia a cuatro condiciones de estrés, pH bajo, alta concentración de azúcar, temperatura y etanol tanto con las cepas aisladas de masato y chicha de jora como las cepas control.

La Tabla 1.14 muestra la capacidad de crecer de las cepas en las diferentes condiciones de estrés evaluadas. El desarrollo de la colonia en la sexta dilución está indicada por el número 6, en la quinta dilución por el 5 y así hasta la primera dilución con el número 1. El número 0 indica que la cepa no tolera la condición de estrés y no hay crecimiento. La tolerancia a un pH bajo se determinó al observar el desarrollo de las colonias sobre los medios de cultivo a pH 2,8; 3,0 y 3,2 después de 24 h de incubación a 30°C. En general, las cepas de masato y chicha de jora crecieron en todas las diluciones a los tres pH ensayados. Los resultados obtenidos muestran una tolerancia similar al bajo pH entre las cepas de chicha y de masato y las cepas vónicas, aún cuando el pH del masato y chicha esta cercano a 5. Las mismas observaciones se detectaron con el estrés osmótico, es decir, todas las cepas de *Saccharomyces* de masato, chicha, vónicas comerciales de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*

evaluadas, presentaron un crecimiento en los medios de cultivo con 200, 250 y 300 g/L de glucosa después de una incubación de 24 h a 30°C.

Una de las principales diferencias observadas entre las cepas es la capacidad de crecer a diferentes temperaturas y la tolerancia a etanol. El crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* de masato y chicha, así como las vónicas, se evaluaron al crecerlas en medio GPYA incubado a 10, 16, 30 y 37°C para evaluar la tolerancia a bajas y altas temperaturas. El crecimiento a 30°C y 37°C se registró a las 24 h de incubación, a 16°C después de 3 días y a 10°C después de 6 días de incubación. Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas analizadas crecieron a 16, 30 y 37°C; sin embargo, solo las cepas de *S. bayanus* lograron crecer a 10°C y fueron capaces de formar colonias en todas las diluciones evaluadas. Las cepas de masato y las vónicas sólo crecieron en las primeras 3 diluciones. Cabe destacar que las cepas de chicha de jora lograron crecer en las cuatro primeras diluciones, excepto las cepas 13, 14, 15, 16 y 26 que crecieron hasta la quinta dilución y las cepas 22 y 29 que solo crecieron hasta la tercera dilución; mientras que las cepas vónicas de *S. cerevisiae* ensayadas no fueron capaces de crecer en la cuarta dilución a 10°C.

Otra diferencia fisiológica detectada es la capacidad de crecer a 42°C. En este caso sólo las cepas de masato (1, 6 y 12) crecieron en todas las diluciones, y todas las de chicha de jora (excepto la 14, 16, 25, 26, 27 y 28) no crecieron hasta la quinta y/o sexta dilución. Cabe resaltar que la capacidad de crecer a 42°C solo se observó en las cepas peruanas, pero no se ha observado en las cepas vónicas. Probablemente esta característica esté asociada al proceso fermentativo que se realiza de forma muy tradicional donde no se controla la temperatura y en zonas donde la temperatura ambiente puede alcanzar 42°C (Riofrío et al., 2003).

Otra característica importante para una fermentación alcohólica es la tolerancia a etanol, y aquí también se encontraron diferencias entre las cepas estudiadas. El crecimiento de las cepas de *Saccharomyces* se estudió en condiciones de estrés por etanol en GPYA con 10, 12 y 15% de etanol. Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas de *Saccharomyces*

evaluadas fueron capaces de crecer con 10% de etanol en todas las diluciones, excepto las cepas 17 y 27 aisladas de chicha, que presentaron un crecimiento hasta la cuarta y quinta dilución. Al igual que en el caso de la temperatura estas diferencias pueden estar asociadas al proceso.

Todas las cepas de *S. cerevisiae* comerciales y las de masato crecieron en GPYA con 12% de etanol en la mayoría de las diluciones (hasta quinta o sexta dilución) y se consideraron tolerantes al etanol. Las cepas de chicha mostraron un comportamiento específico para cada cepa, así nueve cepas resultaron tolerantes a etanol, al desarrollar colonias en la quinta o sexta dilución; pero otras cinco, no crecieron más allá de la cuarta dilución, por lo que se consideraron sensibles al etanol. Ninguna de las cepas de *S. bayanus* mostró crecimiento hasta la sexta dilución, por lo que se consideraron como cepas más sensibles que las de masato (Tabla 1.14).

En el medio GPYA con 15% de etanol también se observó un comportamiento específico para cada cepa. La mayoría de las cepas vínicas y de masato fueron capaces de crecer hasta la quinta o sexta dilución, excepto la cepa vínica Fermiblanc Arom que creció solo hasta la segunda dilución, y la número 11 de masato, que no creció en ninguna dilución. Las cepas de *S. bayanus* no crecieron, excepto la cepa CECT12930 que creció hasta la quinta dilución

Entre las cepas de bebidas tradicionales de Perú y las vínicas no se detectaron diferencias en la tolerancia a pH bajos y altas concentraciones de glucosa, pues todas desarrollaron colonias en la sexta dilución. En relación a estrés por temperatura se encontró que las cepas de masato toleran bajas temperaturas en forma semejante que las cepas vínicas. En cambio, las cepas aisladas de chicha resultan más tolerantes a bajas temperaturas que las de masato y un poco menos que las *S. bayanus*, ya que lograron crecimiento de colonias hasta la cuarta y quinta dilución.

Tabla 1.14. Tolerancia a pH, glucosa, temperatura y etanol, como factor de estrés de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de Perú, indicado por los números desde el 0 (sin crecimiento) a 6 (desarrollo de la colonia en la dilución 6). El color del resaltado del número indica el crecimiento, bueno (verde), regular (amarillo) y malo (rojo). ¹: Las diferentes cepas corresponden a cada uno de los patrones de restricción obtenidos por RFLP del mtDNA.

Cepa ¹	pH			Glucosa (g l ⁻¹)			Temperatura (°C)					Etanol (%)		
	2,8	3,0	3,2	200	250	300	10	16	30	37	42	10	12	15
1	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
2	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
3	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
4	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
5	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
6	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
7	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
8	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	5	5
9	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
10	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	5
11	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	0
12	6	6	6	6	6	5	2	6	6	6	6	6	6	2
13	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	5	0
14	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	5	0
15	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	4	0
16	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	0	0
17	6	6	5	6	6	6	4	6	6	6	6	4	4	0
18	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	0
19	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	2
20	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	0
21	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	0
22	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	0
23	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	3	0
24	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	6	0
25	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	4	0
26	6	6	6	6	6	6	5	6	6	6	6	6	0	0
27	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	5	3	0
28	6	6	6	6	6	6	4	6	6	6	6	6	2	0
29	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
Lalvin T73	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	6
Uvaferm	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	6	5
Fermiblanc	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	6	6	5	2
CECT12638	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	4	0
CECT12669	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	3	0
CECT12930	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	5	5

Bajo un estrés por altas temperaturas, las cepas de bebidas tradicionales de Perú resultaron ser más tolerantes, al lograr un crecimiento hasta la sexta dilución, mientras que las cepas controles no crecieron en ninguna dilución. Por último, las cepas de masato toleran más el etanol que las cepas de chicha, al igual que las cepas vónicas. Al considerar la tolerancia a los estreses osmótico y por pH, se observa que las cepas de masato y chicha de jora toleran las condiciones de una fermentación vónica.

Se identificaron a las cepas 1 y 6 de masato y la 29 de chicha como las cepas más adaptadas a variaciones en la temperatura de crecimiento, ya que se detectó el desarrollo de colonias en todas las diluciones bajo todas las condiciones de estrés, excepto a una temperatura de 10°C que formaron colonias en la tercera dilución. Sin embargo, son más tolerantes que las cepas comerciales utilizadas como controles, pues las vónicas de la especie *S. cerevisiae* no crecen a 42°C y las *S. bayanus* no forman colonias a altas temperaturas (37 y 42°C) y no toleran altas concentraciones de etanol. Con estos datos se puede concluir que las cepas de chicha y de masato presentan adaptaciones fisiológicas para llevar a cabo una fermentación vónica, es decir, son capaces de tolerar las condiciones tan estresantes de una fermentación vónica. Además con análisis filogenético del capítulo 2, se demuestra que las cepas de Perú presentan alelos detectados en las cepas aisladas de vino, lo que confirma la sospecha de que son capaces de llevar a cabo una fermentación vónica.

1.9.4. Producción de glicosidasas.

Una propiedad interesante de las cepas vónicas es la producción de enzimas que le confieran características organolépticas agradables al vino. Las enzimas glicosidasas se producen y secretan al espacio periplasmático y al medio de cultivo, en donde interactúan con precursores no volátiles de la uva liberando los compuestos aromáticos (Charoenchai et al., 1997). Debido a la importancia que tienen estas enzimas en las características de los aromas en bebidas fermentadas, en el presente apartado hemos analizado la producción de enzimas glicosidasas: glucosidasas y xilosidasas de las cepas de Perú en

comparación con las cepas comerciales de levaduras vínicas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4 de Material y Métodos. En la Tabla 1.15 se indica las levaduras que dieron positivo en la producción de estas enzimas.

En general todas las cepas de masato dieron positivo para las actividades glucosidasa y xilosidasa, excepto las cepas número 11 y 12. Todas las cepas de chicha de jora producen glucosidasas, con excepción de la número 27, pero solo siete de las cepas producen xilosidasas. Se evaluó la producción de otras dos enzimas glicosidasas, la ramnosidasa y la arabinoxilosidasa pero no se detectó actividad para estas enzimas en las cepas de bebidas tradicionales de Perú. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que las cepas aisladas de chicha de jora y de masato pueden conferir un aroma y sabor agradable a ambas bebidas, ya que son capaces de producir glicosidasas, enzimas que se ha mencionado que mejoran el aroma en vinos (Charoenchai et al., 1997). Todas las cepas controles de *S. cerevisiae* y de *S. bayanus* estudiadas presentaron glucosidasa y xilosidasa, aunque *S. bayanus* produce un halo de menor tamaño para ambas actividades.

Tabla 1.15. Producción de glucosidasa y xilosidasa de las cepas de las bebidas tradicionales de Perú. ND: actividad enzimática no determinada.

Cepa	Origen	Producción de glicosidasas	
		Glucosidasa	Xilosidasa
Aislados de <i>S. cerevisiae</i>			
1	Masato, Perú	+	+
2	Masato, Perú	+	+
3	Masato, Perú	+	+
4	Masato, Perú	+	+
5	Masato, Perú	+	+
6	Masato, Perú	+	+
7	Masato, Perú	+	+
8	Masato, Perú	+	+
9	Masato, Perú	+	+
10	Masato, Perú	+	+
11	Masato, Perú	-	-
12	Masato, Perú	-	-
Aislados de <i>S. cerevisiae</i>			
13	Chicha, Perú	+	-
14	Chicha, Perú	+	-
15	Chicha, Perú	+	-
16	Chicha, Perú	+	+
17	Chicha, Perú	+	+
18	Chicha, Perú	+	+
19	Chicha, Perú	+	-
20	Chicha, Perú	+	-
21	Chicha, Perú	+	+
22	Chicha, Perú	+	-
23	Chicha, Perú	+	-
24	Chicha, Perú	+	+
25	Chicha, Perú	+	+
26	Chicha, Perú	+	-
27	Chicha, Perú	-	-
28	Chicha, Perú	+	+
29	Chicha, Perú	+	-
Cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i>			
Lalvin T73,	Vino, Alicante, España	+	+
Uvaferm CEG,	Vino, Eppernay,	+	+
Danstar	Francia		
Fermiblanc Arom	Vino, Coñac, Francia	+	+
DSM-Gist Broc.			
Cepas vínicas de <i>S. bayanus</i>			
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	+	+
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	+	+
CECT 12930	Vino, España	+	+
Lalvin T73	Expresa β -D-	+	ND
Recombinante	glucosidasa		
CECT 10389	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	ND	+

1.10. Propiedades fisiológicas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de México.

En México se producen bebidas fermentadas a partir de diferentes substratos, entre ellos el tequila, el aguamiel, el pulque, el tepache y el tejuino que se obtienen de la savia de diferentes especies de *Agave*, de frutas como la piña, y de masa de maíz y en estos casos el azúcar a fermentar es glucosa, fructosa y maltosa. Por ello, es importante conocer si las diferentes cepas aisladas de estas bebidas presentan un perfil de fermentación característico entre las diferentes condiciones de fermentación para la obtención de las bebidas. En el presente estudio se analizó la capacidad de fermentar estos tres azúcares en las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de estas bebidas de México, en comparación con seis controles que incluyen tres cepas vínicas comerciales de *S. cerevisiae* y tres cepas de *S. bayanus*.

1.10.1. Capacidad de fermentar diferentes azúcares.

La capacidad de fermentar glucosa, fructosa y maltosa de las cepas aisladas de bebidas tradicionales de México se determinó con la metodología descrita en el apartado 5.1 de Material y Métodos y se muestra en la Tabla 1.16. Todos los aislados identificados como *S. cerevisiae*, obtenidos de agave, tejuino, aguamiel, tepache y pulque presentaron la capacidad de fermentar glucosa, fructosa y maltosa después de 48 h, con excepción del aislado 2 de agave que fermentó glucosa y fructosa pero no la maltosa; sin embargo, no todas las cepas vínicas de *Saccharomyces* fermentaron la maltosa, así pues las cepas vínicas Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc (*S. cerevisiae* comercial) y CECT12930 (*S. bayanus*) no fermentaron dicho azúcar, incluso después de 72 h como hemos indicado previamente.

Tabla 1.16. Fermentación de glucosa, fructosa y maltosa de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de México.

Cepa	Origen	Fermentación de azúcar (5%)		
		Glucosa	Fructosa	Maltosa
<i>Asilados de S. cerevisiae</i>				
1	Agave	+	+	+
2	Agave	+	+	-
3	Agave	+	+	+
4	Agave	+	+	+
5	Tejuino	+	+	+
6	Tejuino	+	+	+
7	Tejuino	+	+	+
8	Tejuino	+	+	+
9	Aguamiel	+	+	+
10	Aguamiel	+	+	+
11	Aguamiel	+	+	+
12	Tepache	+	+	+
13	Tejuino	+	+	+
14	Pulque	+	+	+
<i>Cepas comerciales de S. cerevisiae</i>				
Lalvin T73, Lallemand	Vino, Alicante, España	+	+	+
Uvaferm CEG, Danstar	Vino, Eppernay, Francia	+	+	+
Fermiblanc Arom DSM- Gist Broc.	Vino, Coñac, Francia	+	+	-
<i>Cepas vínicas de S. bayanus</i>				
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	+	+	+
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	+	+	+
CECT 12930	Vino, España	+	+	-

1.10.2. Actividad α -amilasa.

Como se ha mencionado previamente algunas bebidas tradicionales de México están elaboradas con maíz como substrato, tal es el caso del tejuino, que involucra la fermentación de masa de maíz, el cual es rico en almidón. Para determinar si las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de México están adaptadas a ambientes amiláceos, se determinó la actividad α -amilasa de las cepas de *S. cerevisiae* con diferente perfil de mtDNA en comparación con cepas controles, con la misma metodología llevada a cabo con las cepas de Perú y que consiste en la identificación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia en crecimiento, en un medio de cultivo sólido

con almidón como fuente de carbono después de 48 h de incubación a 30°C (De Mot and Verachtert, 1987).

En la Tabla 1.17 se presenta la producción de α -amilasa de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de México. De las 14 cepas analizadas, sólo las cepas con el patrón de mtDNA 3, 6, 7 y 11 formaron un halo de hidrólisis alrededor del cultivo, lo que indica una actividad α -amilasa positiva (+). Las 10 cepas restantes no presentaron el halo, igual que las seis cepas controles de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*. Las cepas 6 y 7, se obtuvieron de tejuino, bebida elaborada con masa de maíz, por lo que estas cepas pueden tener un papel importante en la elaboración de esta bebida, ya que presentan una actividad α -amilasa positiva.

Tabla 1.17. Producción de amilasa de los aislados identificados como *S. cerevisiae* de las bebidas fermentadas tradicionales de México en comparación con cepas vínicas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Cepa	Origen	Producción de α -amilasa
1	Agave	-
2	Agave	-
3	Agave	+
4	Agave	-
5	Tejuino	-
6	Tejuino	+
7	Tejuino	+
8	Tejuino	-
9	Aguamiel	-
10	Aguamiel	-
11	Aguamiel	+
12	Tepache	-
13	Tejuino	-
14	Pulque	-
Cepas comerciales de <i>S. cerevisiae</i>		
Lalvin T73, Lallemand	Vino, Alicante, España	-
Uvaferm CEG, Danstar	Vino, Eppernay, Francia	-
Fermiblanc Arom DSM-Gist Broc.	Vino, Coñac, Francia	-
Cepas de <i>S. bayanus</i>		
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	-
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	-
CECT 12930	Vino, España	-
Control: Cinta Roja	Panadera	+

1.10.3. Crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés.

Como se ha mencionado previamente, la fermentación alcohólica involucra que las células de levaduras están bajo diferentes condiciones de estrés. Las condiciones para la producción de tequila son algo comparables, es decir, que al inicio de la fermentación la concentración de azúcares es de 14°Brix, del cual el 90% es fructosa, y al final de la fermentación una concentración final de etanol de 6°Gay-Lussac, con una concentración de nitrógeno de 0,02% (Lachance, 1995). Sin embargo, las condiciones en las que se realiza la fermentación para la obtención de pulque, tepache, tejuino y aguamiel, son más semejantes a las de bebidas de Perú, que a las de una fermentación vínica (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b). Por lo tanto, las cepas aisladas de agave pueden crecer en condiciones tan extremas como las vínicas, pero no las de otras bebidas. Para confirmar lo anterior, se evaluó la tolerancia a cuatro condiciones de estrés, pH bajo, alta concentración de azúcar, temperatura y etanol tanto con las cepas aisladas de agave, como las de pulque, tepache, tejuino y aguamiel, para compararlas con las cepas control.

La Tabla 1.18 muestra la capacidad de crecer, de las cepas de *Saccharomyces* de México, en las diferentes condiciones de estrés evaluadas. Como se ha explicado previamente, el desarrollo de la colonia está indicado por un número, es decir, el desarrollo de la colonia en la sexta dilución está indicada por el número 6, en la quinta dilución por el 5 y así hasta la primera dilución con el número 1. El número 0 indica que la cepa no tolera la condición de estrés y no hay crecimiento.

La tolerancia a un pH bajo se determinó al observar el desarrollo de las colonias sobre los medios de cultivo a pH 2,8; 3,0 y 3,2 después de 24 h de incubación a 30°C. Las cepas de agave como las de pulque, tepache, tejuino y aguamiel, crecieron en todas las diluciones a los tres pH estudiados. En general, los resultados obtenidos muestran una tolerancia similar a un bajo pH de las cepas de agave, pulque, tepache, tejuino y aguamiel, así como las cepas vínicas, aún cuando el pH de las bebidas de México está cercano a 5. En el caso de la cepa 3 no creció más de la quinta dilución en los tres pH estudiados. Las mismas observaciones se detectaron con el estrés osmótico, es decir,

todas las cepas de *Saccharomyces* de México, las vónicas evaluadas, presentaron un crecimiento en los medios de cultivo con 200, 250 y 300 g/L de glucosa después de una incubación de 24 h a 30°C.

Como se ha demostrado antes con las cepas de Perú, uno de las principales diferencias entre las cepas de México, es la capacidad de crecer a diferentes temperaturas y la tolerancia a etanol. El crecimiento de las cepas de las bebidas de México y las cepas comerciales utilizadas como controles, se evaluó en placas de petri con GPYA incubadas a 10, 16, 30, 37 y 42°C para evaluar la tolerancia a bajas y altas temperaturas. El crecimiento a 30 y 37°C se registró a las 24 h de incubación, a 16°C después de 3 días y a 10°C después de 6 días de incubación. La Tabla 1.18 muestra que todas las cepas estudiadas crecieron a 16, 30 y 37°C, (excepto la 5 y 8, que crecieron a 37°C hasta la quinta dilución). A una temperatura de 10°C las cepas de *S. cerevisie* de México y las comerciales crecieron hasta una tercera dilución, solo las cepas 13 y 14 crecieron a una segunda dilución, y solo las cepas de *S. bayanus* lograron crecer a 10°C y fueron capaces de formar colonias en todas las diluciones evaluadas.

Como se ha observado con las cepas de Perú, otra diferencia fisiológica detectada en las cepas de México es la capacidad de crecer a 42°C; sin embargo, no se observaron diferencias entre las cepas, ya que solo la cepa 6 creció hasta la tercera dilución y las cepas 2, 3, 4, 5, 9, y 11 hasta la primera dilución. En cambio el resto no crecieron en ninguna dilución, igual que las cepas comerciales de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* evaluadas. Probablemente, esta característica no este asociada a las cepas de México, aun cuando la temperatura de estos procesos tradicionales no se controla y la temperatura ambiente no alcanza los 40°C.

Tabla 1.18 Tolerancia a pH, glucosa, temperatura y etanol, como factor de estrés de los aislados de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de México, indicado por los números desde el 0 (sin crecimiento) a 6 (desarrollo de la colonia en la dilución 6). El color del resaltado del número indica el crecimiento, bueno (verde), regular (amarillo) y malo (rojo). ¹: Las diferentes cepas corresponden a cada uno de los patrones de restricción obtenidos por RFLP del mtDNA.

Cepa ¹	pH			Glucosa (gl ⁻¹)			Temperatura (°C)					Etanol (%)		
	2,8	3,0	3,2	200	250	300	10	16	30	37	42	10	12	15
1	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	0	6	6	5
2	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	1	6	5	5
3	5	5	5	6	6	6	2	6	6	6	1	6	6	6
4	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	1	6	6	6
5	6	6	6	6	6	6	2	6	6	5	1	6	5	5
6	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	3	6	6	6
7	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	0	6	6	6
8	6	6	6	6	6	6	2	6	6	5	0	6	6	6
9	6	6	6	6	6	6	2	6	6	6	1	6	6	6
10	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	0	6	6	6
11	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	1	6	6	5
12	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	0	5	5	5
13	6	6	6	6	6	6	1	6	6	6	0	6	6	6
14	6	6	6	6	6	6	1	6	6	6	0	6	6	6
Lalvin T73	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	0	6	6	6
Uvaferm	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	0	6	6	5
Fermiblanc	6	6	6	6	6	6	3	6	6	6	0	6	5	2
CECT12638	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	4	0
CECT12669	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	3	0
CECT12930	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	6	5	5

Respecto a la tolerancia al etanol, también se encontraron diferencias entre las cepas estudiadas. El crecimiento de las cepas de *Saccharomyces* se estudió en condiciones de estrés por etanol en GPYA con 10, 12 y 15% de

etanol. Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas de *Saccharomyces* evaluadas fueron capaces de crecer con 10% de etanol en todas las diluciones, excepto la cepa 12 aislada de tepache, que presentó un crecimiento hasta la quinta dilución. Al igual que en el caso de la temperatura, estas diferencias pueden estar asociadas al proceso, ya que en el caso de la fermentaciones de México, la máxima producción de alcohol es de 10%.

Todas las cepas de *S. cerevisiae* comerciales y las de México crecieron en GPYA con 12% de etanol en la mayoría de las diluciones (hasta quinta o sexta dilución) y se consideraron tolerantes al etanol. Ninguna de las cepas de *S. bayanus* mostró crecimiento hasta la sexta dilución, por lo que se consideraron como cepas más sensibles que las de México (Tabla 1.18).

En el medio GPYA con 15% de etanol también se observó un comportamiento específico para cada grupo de cepas. La mayoría de las cepas vónicas y de México fueron capaces de crecer hasta la quinta o sexta dilución, excepto la cepa vónica Fermiblanc Arom que creció solo hasta la segunda dilución. Las cepas vónicas de *S. bayanus* no crecieron, excepto la cepa CECT12930 que creció hasta la quinta dilución.

Entre las cepas de bebidas tradicionales de México y las vónicas no se detectaron diferencias en la tolerancia a pH bajos y altas concentraciones de glucosa, pues todas desarrollaron colonias en la sexta dilución (excepto la 3, que creció hasta la quinta dilución). En relación a estrés por temperatura se encontró que las cepas de México toleran bajas temperaturas un poco menos que las cepas vónicas, ya que lograron crecimiento de colonias desde la primera hasta la tercera dilución. Bajo un estrés por altas temperaturas, las cepas de bebidas tradicionales de México resultaron ser un poco más tolerantes, pues solo 6 cepas lograron crecer hasta la primera dilución y solo una hasta la tercera dilución, mientras que las cepas controles no crecieron en ninguna dilución.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas de bebidas de México toleran un pH bajo, son osmotolerantes igual que las cepas comerciales de *S.*

cerevisiae y de *S. bayanus*; sin embargo, toleran etanol igual que las cepas de *S. cerevisiae* y más que las *S. bayanus*. Esto hace suponer que las cepas de México juegan un papel importante en las fermentaciones tradicionales para la obtención de diversas bebidas alcohólicas, ya que presentan las adaptaciones fisiológicas características de una fermentación alcohólica. Además como en el caso de las cepas de Perú, y de acuerdo al análisis filogenético del capítulo 2, las cepas de México presentan alelos detectados en las cepas vnicas.

1.10.4. Producción de glicosidasas.

Una característica interesante de las cepas vnicas es la producción de enzimas que le confieran aromas agradables al vino, tal como hemos comentado anteriormente. Por la importancia que tienen estas enzimas sobre las características de los aromas en bebidas fermentadas, en el presente apartado hemos analizado la producción de enzimas glicosidasas: glucosidasas y xilosidasas de las cepas de México en comparación con las cepas comerciales de levaduras vnicas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4 de Material y Métodos, al igual que se hizo con las cepas aisladas de Perú. La producción de enzimas glucosidasa y xilosidasa de las cepas de México en comparación con las cepas comerciales de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* se indica en la Tabla 1.19. Todas las cepas controles de *S. cerevisiae* y de *S. bayanus* estudiadas presentaron glucosidasa y xilosidasa, aunque *S. bayanus* produce un halo de menor tamaño para ambas actividades. En general todas las cepas producen glucosidasa y xilosidasa, excepto la cepa con el patrón mtDNA numero 2. Estos resultados permiten sospechar que las cepas de México pueden participar en la producción de compuestos que dan aromas agradables a las bebidas de México, ya que estas fermentaciones presentan aromas y sabores agradables.

Tabla 1.19. Producción de glucosidasas y xilosidasas de las cepas de las bebidas tradicionales de México. ND: actividad enzimática no determinada.

Cepa	Origen	Producción de glicosidasas	
		Glucosidasa	Xilosidasa
<i>Aislados de S. cerevisiae</i>			
1	Agave	+	+
2	Agave	-	-
3	Agave	+	+
4	Agave	+	+
5	Tejuino	+	+
6	Tejuino	+	+
7	Tejuino	+	+
8	Tejuino	+	+
9	Aguamiel	+	+
10	Aguamiel	+	+
11	Aguamiel	+	+
12	Tepache	+	+
13	Tejuino	+	+
14	Pulque	+	+
<i>Cepas comerciales de S. cerevisiae</i>			
Lalvin T73, Lallemand	Vino, Alicante, España	+	+
Uvaferm CEG, Danstar	Vino, Eppernay, Francia	+	+
Fermiblanc Arom	Vino, Coñac, Francia	+	+
<i>Cepas vínicas de S. bayanus</i>			
CECT 12638	Mosto, Cádiz, España	+	+
CECT 12669	Uva, La Rioja, España	+	+
CECT 12930	Vino, España	+	+
Lalvin T73 Recombinante	Expresa β -D-glucosidasa	+	ND
CECT 10389	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	ND	+

1.11. Discusión.

En el presente estudio, se identificaron y caracterizaron con metodologías moleculares los aislados de levaduras de diversas bebidas de Latinoamérica, para conocer la biodiversidad de levaduras que participan en su producción. El análisis de los patrones de restricción de la región ITS-5,8S propuesto para el estudio de levaduras vínicas (Esteve-Zarzoso et al., 1999; Fernández-Espinar et al., 2000; Guillamón et al., 1998), permitió la identificación de las diferentes levaduras aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica, tal como se ha utilizado para otras bebidas como es el vino de arroz (Jeyaram et al., 2008). Cuando hubo duda sobre la asignación de especie porque el patrón de restricción no estaba incluido en la base de datos consultada www.yeast-id.com o para confirmar lo observado con los patrones de digestión, se procedió a la secuenciación de los dominios D1/D2 de la región 26S, tal como lo proponen Kurtzman y Robnett (1998). Así, con estas metodologías se identificaron los aislados de bebidas tradicionales de Perú y de México, y solo hubo duda en dos de los patrones de restricción, lo que indicaría que pueden ser especies nuevas; sin embargo, es necesario un estudio más detallado para confirmarlo.

El análisis de los patrones de restricción permitió identificar a *S. cerevisiae* como la especie predominante en las dos bebidas tradicionales de Perú, el masato y la chicha de jora, lo que concuerda con lo descrito en otras bebidas, tales como, pito de Ghana y Burkina Faso (Glover et al., 2005; van der Aa Kuhle et al., 2001), cachaza de Brasil (Guerra et al., 2001) y diversas bebidas tradicionales de África (Jespersen, 2003). Aunque para otras bebidas se han identificado *I. orientalis* y/o *Candida tropicalis* como especie predominantes, también *S. cerevisiae* está presente pero en menor frecuencia, tal es el caso de las bebidas *togwa* y *attiéké* (Coulin et al., 2006; Mugula et al., 2003); y en otros como el *fufu*, donde las especies dominantes son *Candida krusei*, *C. tropicalis* y *Zygosaccharomyces bailii*, lo que indica que cada producto presenta una diversidad de levaduras asociada.

En el caso de las levaduras aisladas de bebidas fermentadas tradicionales de México, se observó que presentan una biodiversidad diferente, esto dado por las condiciones de fermentación, el substrato y el azúcar principal del que

esta compuesto. Se identifico que *Clavispora luisitaniae* es la especie predominante entre los aislados de agave tequilero. Este resultado coincide con lo descrito previamente donde se detalla las comunidades de levaduras en una fermentación de tequila (Lachance, 1995), ya que la mayoría de las levaduras identificadas en el presente estudio se aislaron de plantas frescas de agave y los pocos caso de *S. cerevisiae* corresponden a la fermentación de jugo de agave.

Otras bebidas elaboradas con agave pero con otras especies, son el pulque y el aguamiel, donde se identificó que *S. cerevisiae* y *Candida ethanolica* predominan en estas fermentaciones, y aunque son pocas las especies identificadas, esto no coincide con lo mencionado en otro estudio donde se propone a la especie *S. cerevisiae*, bajo el nombre específico de *S. carbajali* como microorganismo para la producción del pulque (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b) y que actualmente se considera sinónimo de *S. paradoxus*. Cabe resaltar que en el aguamiel se encontró esta especie, tal como se ha descrito previamente (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953a), lo que indica que esta especie y no *S. cerevisiae*, puede estar implicada en la producción de esta bebida, dato muy interesante ya que son pocos los trabajos donde se ha descrito a *S. paradoxus* relacionado con fermentaciones (Redzepovic et al., 2002; Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b), ya que su habitat natural es asociado a árboles, suelo e insectos.

Cabe destacar que, entre las bebidas estudiadas, el tejuino mostró la mayor diversidad de levaduras; sin embargo, se identificó a *S. cerevisiae* y a *I. orientalis* como las especies predominantes, lo que es de esperar pues es una bebida refrescante con bajo contenido alcohólico hecha a base de maíz. Y aunque en otras bebidas de maíz como el *kenkey* se ha mencionado la presencia de otras especies de levaduras esto puede ser debido a los diferentes tipos de ingredientes utilizados o las diferentes condiciones tecnológicas y ambientales para su elaboración (Gadaga et al., 1999).

La tuba es otra bebida alcohólica, que se obtiene de la fermentación de la savia de palma, en la que se ha detectado la especie *S. cerevisiae*, pero en

menor frecuencia, pues en el presente estudio se encontró que *I. orientalis* es la especie predominante. Estos resultados difieren de estudios previos, en donde se ha descrito a *S. cerevisiae* como la especie predominante (Amoa-Awua et al., 2007). Esto es debido a que se aislaron cepas de pocas muestras, por lo que es necesario un muestreo mas completo para tener la diversidad de levaduras implicadas en la producción de esta bebida.

El patrón de restricción del mtDNA con la enzima de restricción *HinfI* (Morrissey et al., 2004; Querol et al., 1994) y el polimorfismo cromosómico (Guillamón et al., 1996) son técnicas muy utilizadas para determinar la variabilidad genética en cepas vínicas. El análisis de diversidad genética de *S. cerevisiae* por medio de estas dos técnicas, permitió demostrar que las cepas de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de Perú y México presentan una gran diversidad genética.

El análisis de los cariotipos se ha utilizado para detectar la gran variabilidad genética que muestran las cepas de *S. cerevisiae* de África (van der Aa Kuhle et al., 2001), en el caso de las bebidas tradicionales de Latinoamérica, no es la excepción, ya que hemos detectado varios patrones. Sin embargo, en el caso de las bebidas de México la diversidad genética detectada es mayor en comparación con la de Perú, y esto es porque se incluye diversas bebidas elaboradas con diferentes substratos, y no solo dos como es el caso de Perú. Por otro lado, el análisis de restricción del mtDNA es una de las técnicas más utilizadas para detectar la diversidad intraespecífica de las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar et al., 2001; López et al., 2001; Nadal et al., 1996). En el caso de las de Latinoamérica se detectó una gran variabilidad, tal como se ha demostrado para cepas vínicas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar et al., 2001; López et al., 2001; Nadal et al., 1996), así como para bebidas tradicionales como es el Hamei de la India (Jeyaram et al., 2008) o bebidas de África (Jespersen et al., 2005; van der Aa Kuhle et al., 2001).

La mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica presentan propiedades tecnológicas que potencialmente son adecuadas para una fermentación vínica, lo que puede ser una nueva fuente

de variabilidad genética para mejorar los procesos industriales. Esto incluye la tolerancia a condiciones tan estresantes como una fermentación alcohólica para la producción de vino, es decir, a un estrés osmótico por una alta concentración de glucosa, un pH muy bajo, y al final de la fermentación, un estrés por alcohol y bajo contenido de nitrógeno (Cardona et al., 2007). Probablemente ésta sea una característica específica de *S. cerevisiae*, porque para la producción de las bebidas tradicionales de Latinoamérica las condiciones no son tan extremas como las de una fermentación vínica.

Otra propiedad tecnológica interesante en las cepas de *S. cerevisiae* es la fermentación de azúcares que pueden estar en los diferentes substratos utilizados para la elaboración de estas bebidas tradicionales de Latinoamérica. Las cepas de *S. cerevisiae* muestran la capacidad de fermentar los tres azúcares estudiados. Esto se explica porque el substrato utilizado para la producción de estas fermentaciones contiene glucosa, fructosa y maltosa, en diferentes proporciones como azúcares principales (Ortiz-Basurto et al., 2008; Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b).

El papel de las glicosidasas en la industria de las fermentaciones vínicas contribuyen en la liberación de compuestos aromáticos a partir de precursores no aromáticos (Charoenchai et al., 1997). En general, las cepas de Latinoamérica presentan capacidad de producir glicosidasas, lo que explica que las bebidas tradiciones presentan sabores y aromas agradables.

CAPÍTULO 2. Variabilidad genética de *Saccharomyces cerevisiae* de fermentaciones tradicionales de Latinoamérica.

Los alimentos y bebidas fermentadas tradicionales de Latinoamérica se obtienen de frutas, de vegetales y de cereales, principalmente maíz. En general se producen a nivel casero o industrialmente en pequeña escala con el uso de procedimientos tradicionales poco estudiados. Algunas de estas bebidas, como el pulque y la chicha, son obtenidas de procesos tradicionales muy antiguos que se han desarrollado durante el neolítico americano, en las civilizaciones precolombinas mesoamericana y andina. Los europeos introdujeron nuevos procesos de fermentación, tales como la producción de vino y la destilación de tequila, y cabe mencionar que las cepas de *Saccharomyces* spp. de bebidas tradicionales de Latinoamérica han estado aisladas hasta el descubrimiento del Nuevo Mundo por los españoles en 1492.

S. cerevisiae es una de las especies más importantes en biotecnología y la industria de los alimentos y bebidas, tal y como hemos discutido anteriormente, y es el organismo eucarionte más utilizado como modelo en estudios bioquímicos, de genética clásica, biología celular y molecular. Aunque se dispone de una amplia información de esta especie, son pocas las cepas que se han utilizado que sólo representan una pequeña parte de la diversidad de la especie, por lo que se conoce muy poco sobre su historia evolutiva. Los pocos estudios sobre diversidad genética se han centrado en levaduras aisladas de vino, cerveza o pan, conociéndose poco de las características de las levaduras aisladas de procesos fermentativos tradicionales, especialmente de bebidas fermentadas elaboradas en Latinoamérica.

En el presente trabajo se realizó un estudio genético con diversas poblaciones de *S. cerevisiae*, las aisladas de bebidas tradicionales de Perú y de México, así como las vnicas introducidas en Argentina y Chile, y se han comparado con las cepas vnicas y de otros procesos fermentativos de otras regiones geográficas (Europa, África y Asia). La finalidad de este estudio es

conocer si todas las cepas pertenecientes a *S. cerevisiae* comparten un origen común o no, así como determinar el impacto que sufrieron las poblaciones autóctonas con la introducción de las fermentaciones importadas por los europeos, principalmente vónicas.

2.1 Reconstrucción filogenética de *S. cerevisiae*.

Se ha mencionado que las cepas vónicas de *S. cerevisiae* son un grupo de cepas muy homogéneo con poca variabilidad genética y que son el resultado de un proceso de domesticación (Fay and Benavides, 2005a), por lo que es interesante el estudio de la historia evolutiva de *S. cerevisiae* tomando en cuenta poblaciones vónicas y no vónicas de diferente origen geográfico.

Para determinar las relaciones entre cepas vónicas y las no vónicas, se obtuvo la secuencia de 4 regiones nucleares *EGT2* (Early G₁ transcript 2), *CAT8* (CATabolite repression), *BRE5* (BREfeldin A sensitivity) y *GAL4* (GALactose metabolism) de 253 cepas de *S. cerevisiae* aisladas de diferente origen geográfico y de diversos procesos fermentativos o ambientes naturales (Tabla M1). Entre ellas se incluye a 128 cepas vónicas (64 de Europa y Sudáfrica, y otras 64 de Argentina y Chile); 118 cepas aisladas de ambientes no vónicos, principalmente de bebidas tradicionales de Latinoamérica, pero también de sidra, de cerveza y de sake; y 7 de ambientes naturales como son flores, plantas, agua dulce o marina y peces.

La selección de las regiones génicas no fue al azar. En un trabajo previo (González et al., 2008) se identificaron 34 regiones génicas, al menos una en cada extremo de los 16 cromosomas que componen el genoma de *Saccharomyces* con una similitud de aminoácidos mayor del 70% entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus* para utilizar zonas que pudieran estar conservadas y nos permita el diseño de los cebadores y con esto incrementar la probabilidad de amplificar la región génica. Utilizando esos cebadores, se obtuvo la secuencia de al menos 3 cepas de *S. cerevisiae* de diferente origen geográfico de las 34 regiones y se estimó la diversidad nucleotídica (π , o proporción promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre todos los posibles

combinaciones de secuencias). En la Tabla 2.1 se muestra las regiones génicas con la diversidad nucleotídica estimada. Se seleccionaron *EGT2*, *BRE5* y *CAT8* por que, con excepción de *BUD14*, son las que dieron mayor diversidad nucleotídica. Además se incluyó *GAL4* debido a la presencia de una deleción de 15 pb que podía utilizarse como marcador, ya que se trata de un suceso raro. A pesar de que la región génica *BUD14* presentó una de las de mayor diversidad nucleotídica, no se seleccionó por los problemas de amplificación y secuenciación de esta región al presentar un tamaño de amplificado de más de 1000 pb, lo que implicaba el uso de cebadores internos para su secuenciación. Además se incluyó el gen mitocondrial *COX2*, que es una región muy variable e informativa a la hora de determinar las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo *Kluyveromyces* (Belloch et al., 2000; Kurtzman and Robnett, 2003) y *Saccharomyces* (Kurtzman and Robnett, 2003).

Tabla 2.1. Diversidad nucleotídica de diferentes regiones génicas del genoma de *Saccharomyces*. n, muestra secuenciada; l, longitud de la región amplificada; S, sitios segregantes (variables); π , diversidad nucleotídica (número medio de sustituciones nucleotídicas por sitio).

Cromosoma	Región génica	n	l	S	π
XIV	<i>EGT2</i>	4	433	11	0,0139
I	<i>BUD14</i>	5	1034	18	0,0084
XIV	<i>BRE5</i>	4	774	11	0,0078
XIII	<i>CAT8</i>	21	780	21	0,0075
XIV	<i>MET2</i>	21	600	13	0,0060
XVI	<i>GAL4</i>	4	710	7	0,0054
V	<i>MET6</i>	23	683	12	0,0048
XI	<i>CBT1</i>	4	484	4	0,0045
III	<i>MRC1</i>	3	719	4	0,0037
II	<i>OPY1</i>	15	683	8	0,0036
III	<i>KIN82</i>	3	780	4	0,0034
XVI	<i>JIP5</i>	4	709	3	0,0023
VI	<i>GSY1</i>	14	741	5	0,0021
VIII	<i>CBP2</i>	4	747	2	0,0014
VII	<i>KEL2</i>	3	1078	0	0,0000

Las regiones génicas utilizadas para el análisis son codificantes y se describen a continuación: *CAT8* (CATabolite repression), el producto de este gen es un activador transcripcional que actúa después de agotarse la glucosa en el medio y regula positivamente una serie de genes tales como *ADH2* (Tachibana et al., 2005); *EGT2* (Early G₁ transcript 2), gen que codifica una endoglucanasa unida a membrana, necesaria para una separación celular en el tiempo adecuado (fase G₁ del ciclo celular) después de la citocinesis (Kovacech et al., 1996); *BRE5* (BREFeldin A sensitivity), esta región codifica un cofactor de proteasa de ubiquitina que forma un complejo de desubiquitinación con Ubp3p que corregula el transporte entre el retículo endoplásmico y los compartimentos del aparato de Golgi. Al mutar el gen la célula es sensible a brefeldina A (Murén, 2001). Recientemente se ha descrito que este gen es necesario para mantener niveles adecuados de conversión génica durante la meiosis (Jordan et al., 2007); *GAL4*, (GALactose metabolism), es un factor de transcripción que se une a DNA, que es necesario para la activación de los genes *GAL* en respuesta a la galactosa. Se activa por Gal3p y es reprimido por Gal8 (Traven et al., 2006). El gen mitocondrial *COX2*, codifica la subunidad 2 del complejo citocromo c oxidasa, el aceptor terminal de la cadena transportadora de electrones que se encuentra en la membrana de la mitocondria (Taanman and Capaldi, 1992).

Después de obtener las secuencias de *S. cerevisiae* directamente a partir del producto amplificado de cada región génica, cuando se detectó más de un sitio polimórfico debido a la presencia de dos alelos en cepas heterocigotas, se procedió a la clonación del producto de PCR para la obtención de la secuencia de cada alelo (fase haploide), como se mencionó en el apartado 7.2 de Materiales y Metodos. Se detectaron las posiciones variables en las secuencias homocigotas y las haploides de las heterocigotas para identificar los alelos. Después de obtener las secuencias de *S. cerevisiae* de cada región génica se determinó la presencia de señales de recombinación o conversión génica, por medio de los programas DNAsp y Splits Tree, para eliminarlas y evitar errores en el análisis filogenético (Haydon et al., 2004)

Para identificar la zona del genoma de *S. cerevisiae* más variable, se determinó la diversidad nucleotídica de las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* y se comparó en cada una de las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial. El estudio de la diversidad génica de las cuatro regiones estudiadas en *S. cerevisiae* se muestra en la Tabla 2.2, donde se observa que de las cuatro regiones nucleares, *EGT2* mostró una mayor diversidad nucleotídica (0.00982) y la menor en *GAL4* (0.00442). En cuanto a la diversidad de alelos la menor fue en *EGT2* (0,613), le siguió *GAL4* (0,760) y las otras dos regiones con la mayor diversidad alélica (>0,9). De acuerdo con estos resultados la región nuclear con mayor variabilidad génica es *EGT2*, le sigue *CAT8* y *BRE5*, pero de las cinco regiones analizadas la mitocondrial *COX2* presentó la mayor diversidad nucleotídica.

Tabla 2.2. Diversidad genética de las cuatro regiones nucleares y una mitocondrial de *S. cerevisiae*. n, muestras secuenciadas; l, longitud de la región amplificada; S, sitios segregantes (variables); π , diversidad nucleotídica (número medio de sustituciones nucleotídicas por sitio), Hd, diversidad alélica.

Región génica	No. Alelos	n	l	S	π	Hd
<i>EGT2</i>	49	504	336	35	0,00982	0,613
<i>CAT8</i>	87	482	714	76	0,00833	0,907
<i>BRE5</i>	94	498	681	83	0,00777	0,918
<i>GAL4</i>	85	488	555	48	0,00442	0,760
<i>COX2</i>	45	254	585	90	0,21840	0,938

Para determinar la historia evolutiva con información de una especie o intraespecífica, como es nuestro caso con *S. cerevisiae*, donde se utiliza una gran cantidad de datos, la variabilidad genética es baja. Además, es posible que algunos procesos evolutivos como la recombinación y la hibridación generen diversas relaciones entre los alelos, y el soporte estadístico del análisis filogenético sea bajo. En este caso, la obtención de una red filogenética, es la mejor opción para detectar las relaciones filogenéticas entre los distintos alelos, porque considera los posibles fenómenos de recombinación

y conversión génica. La representación gráfica de estos fenómenos en el análisis filogenético es a través de redes, que representan las posibles relaciones entre los alelos. Además, el uso de secuencias de la misma especie ocasiona que los valores de bootstrap sean bajos, y por ello no se muestran.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada una de las regiones génicas analizadas.

2.2 Análisis de secuencias de *EGT2* en *S. cerevisiae*.

Se utilizaron los cebadores EGT2-5 y EGT2-3 (Tabla M4, Materiales y Métodos) para obtener la secuencia de la región génica *EGT2* con la metodología descrita en el apartado 6.5. El alineamiento de las secuencias de la región génica *EGT2* para 246 cepas de *S. cerevisiae* presentó una longitud de 336 pb, con las cuales se obtuvo la red filogenética por el método de NeighborNet implementado en el programa Splits Tree (Huson and Bryant, 2006) que se muestra en la Figura 2.1. Se identificaron un total de 49 alelos de los que 19 se encontraron en cepas vínicas (identificados con un círculo rojo) (Figura 2.1a) y 36 en las cepas no vínicas, señalados con un círculo en azul (Figura 2.1b). Como se puede ver la mayoría de los alelos presentes en las cepas vínicas forman un grupo monofilético (Figura 2.1a), en cambio los alelos de las cepas no vínicas se distribuyen en toda la red (Figura 2.1b). Los alelos 3, 5, 8, 10, 11 y 13 están presentes tanto en cepas vínicas como no vínicas. Al comparar la distribución de alelos se comprobó que la población de cepas vínicas es muy homogénea y con poca variabilidad genética. En cambio, las cepas de ambientes no vínicos forman una población muy heterogénea con mucha variabilidad genética.

Para determinar si la distribución de alelos no v́nicos es debido a que provienen de diferente origen geogŕfico y fuente de aislamiento, se analizó la distribución de alelos considerando estos factores. La distribución de alelos de cepas v́nicas para la región génica *EGT2* se muestra en la Figura 2.1c. Los 13 alelos de las cepas v́nicas de Argentina y de Chile forman un grupo, y solo el alelo 13 está fuera del grupo. Este alelo está presente en una cepa v́nica de Chile en heterocigosis, con el alelo 3, que es el alelo más frecuente entre las cepas v́nicas estudiadas. La distribución de alelos de las cepas v́nicas de Sudáfrica en la red filogenética muestra que de los 5 alelos detectados, 3 se agrupan con la mayoría de los alelos v́nicos. La mayoría de las cepas presentan el alelo 3, que es el más frecuente detectado en las cepas v́nicas. Los alelos 11 y 49, que se agruparon con los no v́nicos, están presentes en 3 cepas homocigotas con los alelos v́nicos 3 y 50. El análisis de la distribución de alelos de las cepas v́nicas de Europa con 2 alelos detectados en cepas de España, 3 alelos en cepas de Francia y 5 alelos en las cepas del centro de Europa (Austria, Suiza, Eslovenia), muestra que se forma un grupo, con excepción del alelo 11, presente en la cepa 2897 de Suiza, en heterocigosis con el alelo 15.

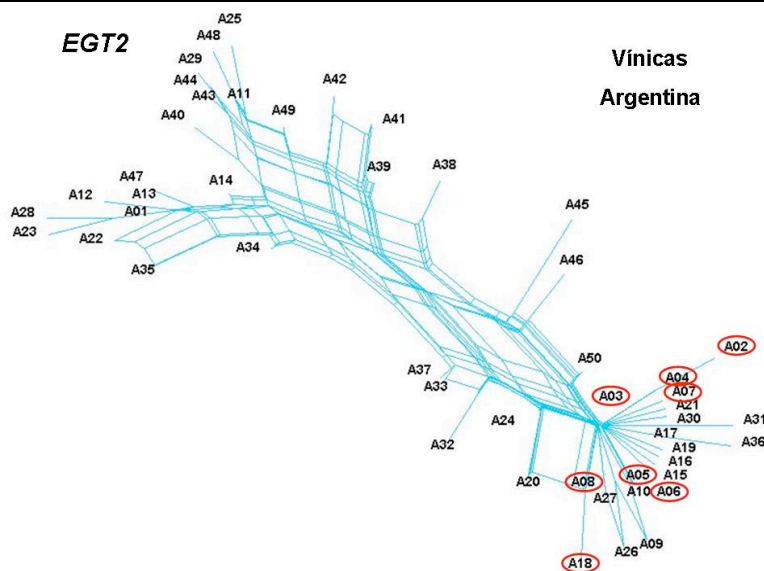
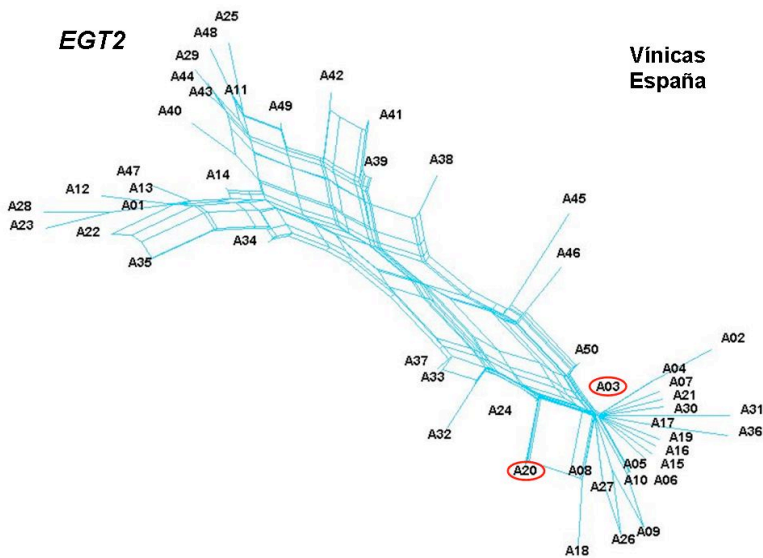
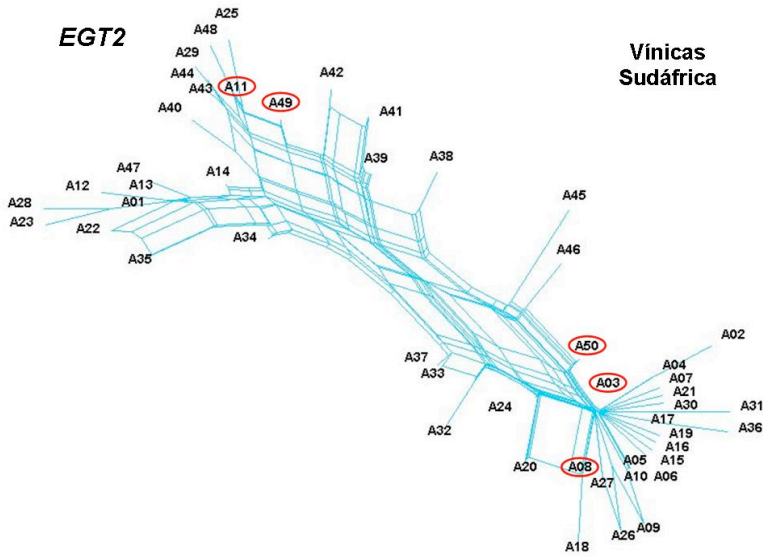
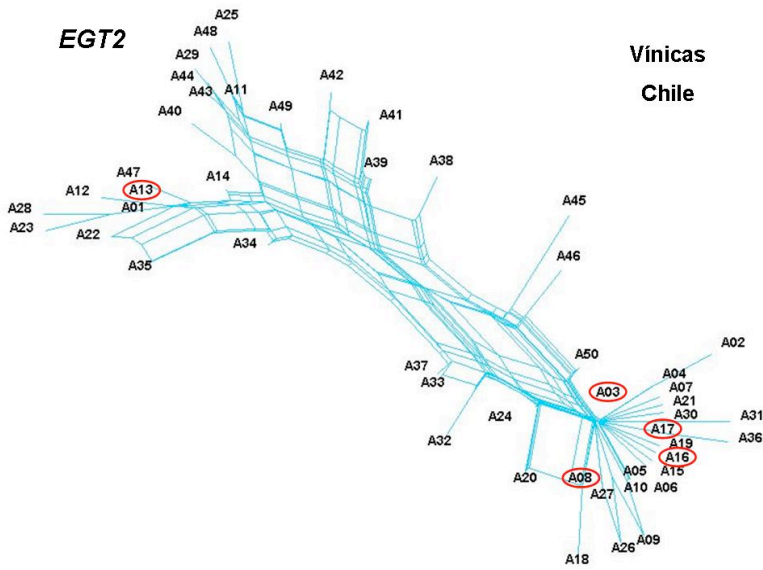
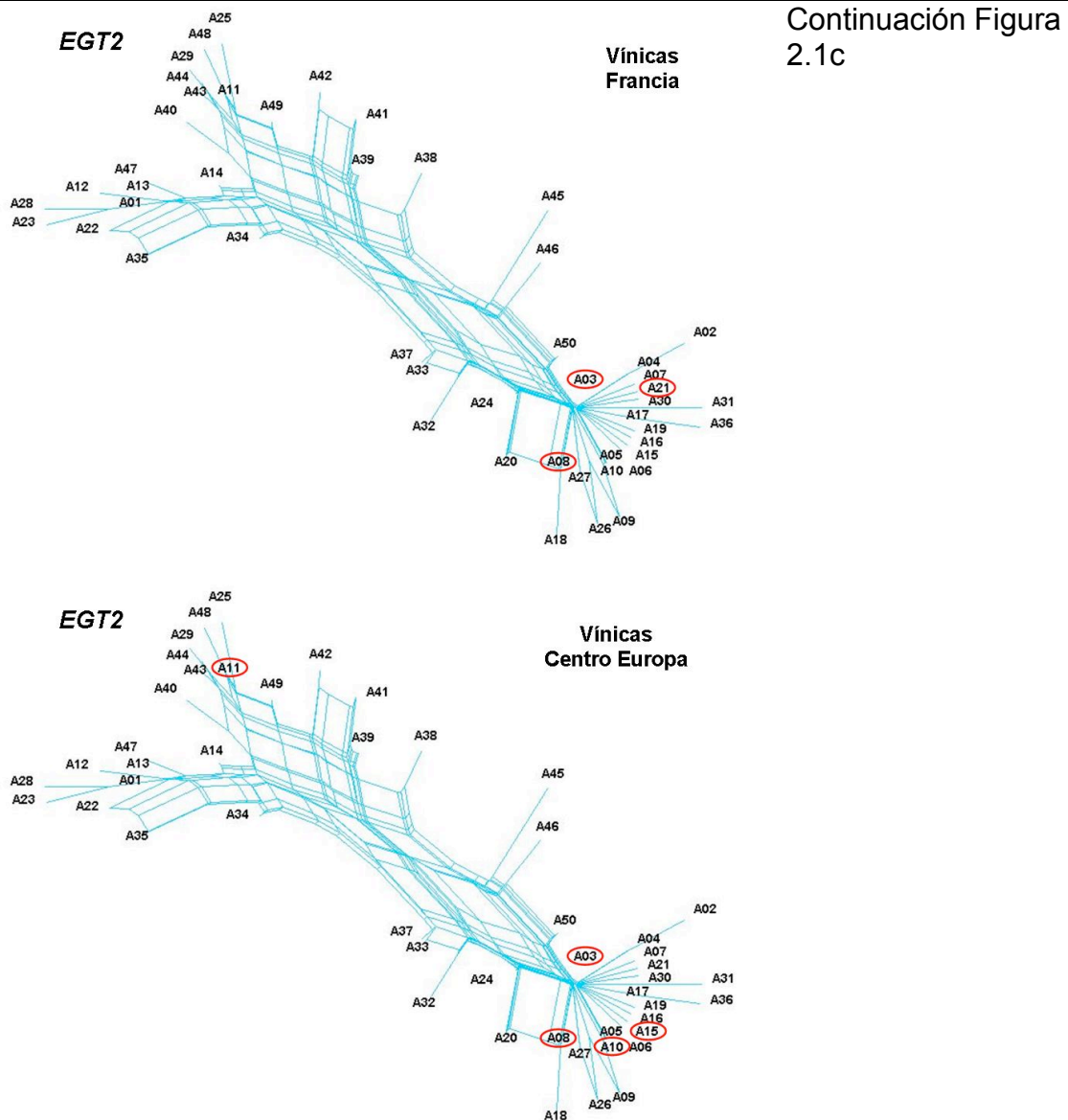


Figura 2.1c. Red filogenética de la región nuclear *EGT2* con los alelos detectados en las poblaciones v́nicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones v́nicas se indica en un círculo rojo.

Continuación Figura 2.1c





La distribución de alelos de cepas no vónicas para la región *EGT2* se muestra en la Figura 2.1d. Las 5 cepas de destilerías y una cepa de agua de río de Brasil, presentaron alelos que se distribuyen en el grupo vónico. La cepa de agua de río y una de destilerías presentan uno de los alelos del grupo no vónico (1 o 14), y el alelo 3 del grupo vónico, que es el más frecuente en cepas vónicas. Los alelos de las cepas de sake y otras fermentaciones no vónicas de Japón, se distribuyen en la red filogenética, con 4 en el grupo no vónicos y 1 en los vónicos. Los 2 alelos de las cepas asiáticas no vónicas se distribuyen uno en cada grupo. Cabe mencionar que el alelo 24, que se agrupa con los vónicos, se detectó en la cepa CBS436 en heterocigosis con el alelo 11, y que es probable

que presente recombinación, pues se observa una red donde están involucrados los dos alelos.

Como se ha observado, en las cepas de fermentaciones no vínicas los alelos se distribuyen por toda la red. Esto se observa claramente entre los alelos de las cepas de masato y de chicha de jora de Perú. De los 13 alelos detectados en las cepas de masato, 5 se agruparon con los de las cepas vínicas y 8 con los no vínicos. Algo similar ocurre con las cepas de chicha, de los 14 alelos detectados, 6 se agrupan con los vínicos y 8 con los no vínicos. Una de las ventajas de las redes filogenéticas es la detección de probables fenómenos de recombinación, que se pueden observar en algunos alelos de las cepas de Perú. Como ejemplo, los alelos 37 y 38 que están presentes en las cepas heterocigotas de masato 46PE y 39PE, y el alelo 33 que se encuentra en homocigosis en la cepa 68PE de chicha de jora.

Las cepas mexicanas aisladas de fermentaciones de agave presentan 6 alelos diferentes, y están distribuidos en toda la red filogenética. Los alelos 26 y 27 se agruparon con los alelos de cepas vínicas, mientras que los alelos 11, 13, 28 y 29 se agruparon con los no vínicos. Asimismo, los alelos de cepas de otras fermentaciones mexicanas se distribuyen en toda la red filogenética, y no forman un grupo. La distribución de alelos de cepas africanas de fermentaciones no vínicas también muestra una distribución en toda la red filogenética ya que de los 4 alelos detectados 3 se agrupan con los no vínicos y uno con los vínicos. Las tres cepas estudiadas resultaron ser heterocigotas para esta región génica, y es importante mencionar que la cepa CBS8857 aislada de cerveza de sorgo de Burkina Faso, es heterocigota, con un alelo vínico y el otro no vínico.

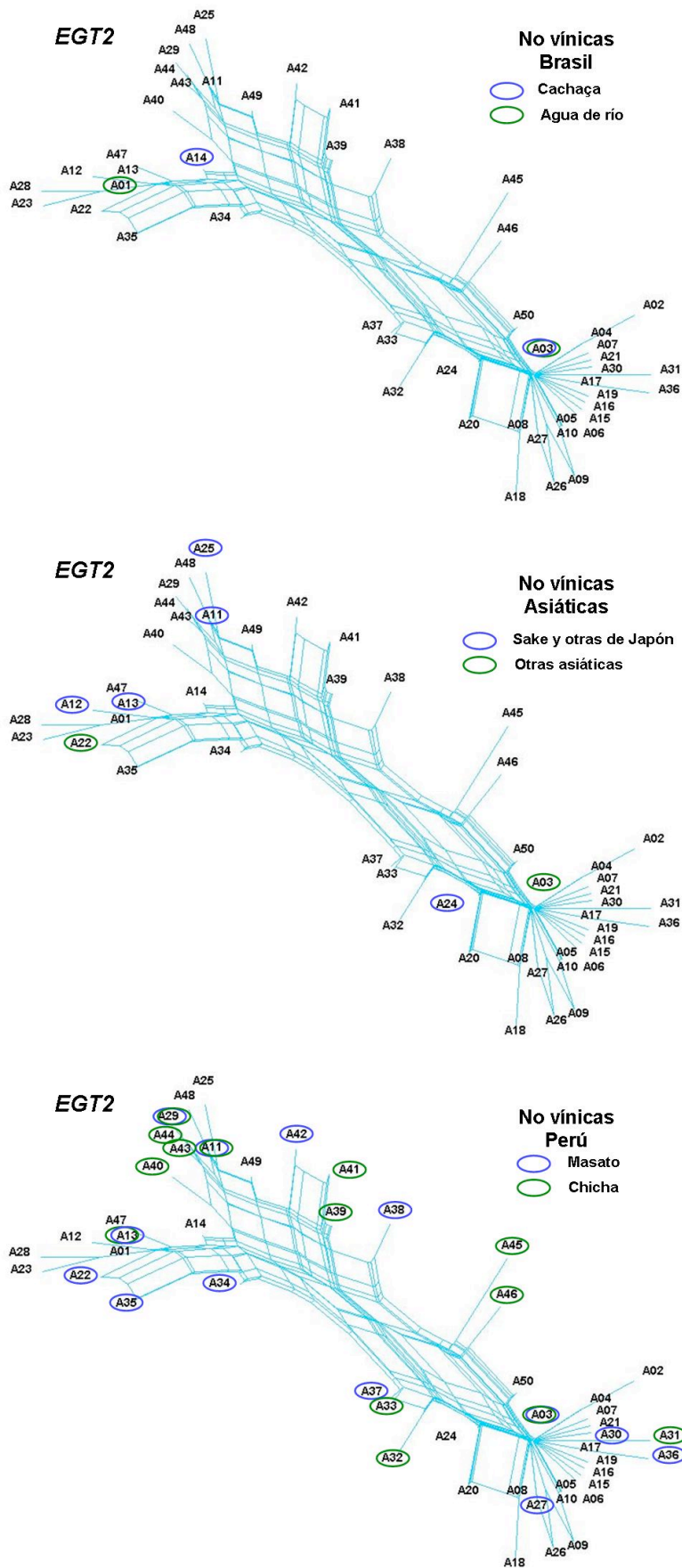
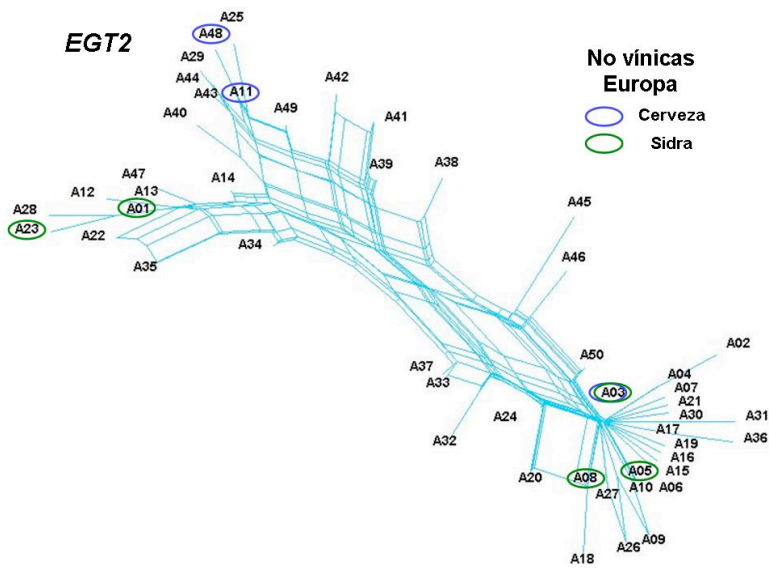
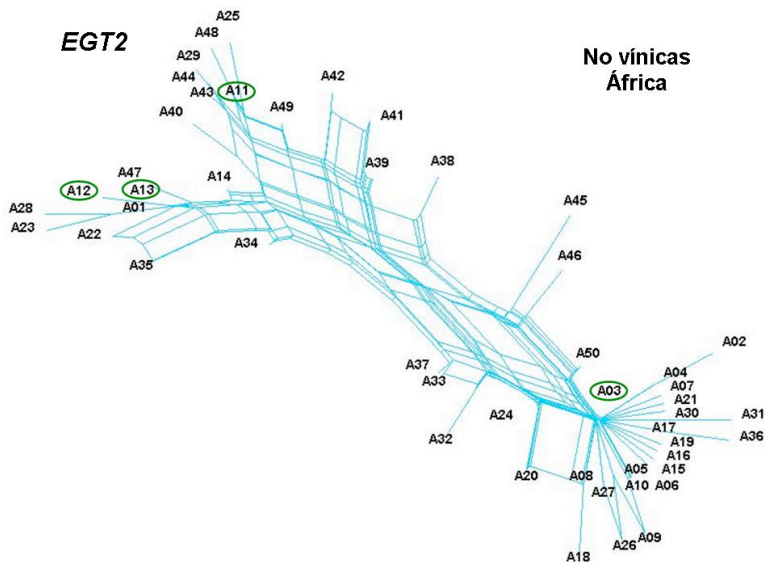
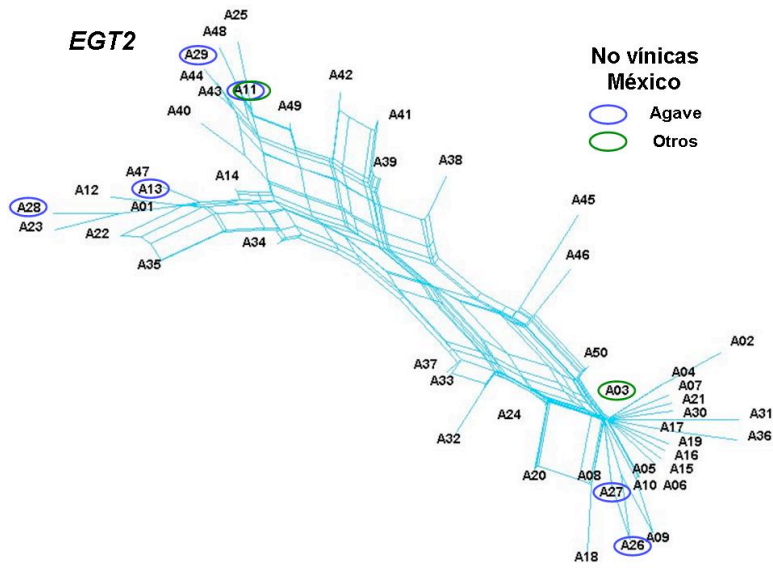
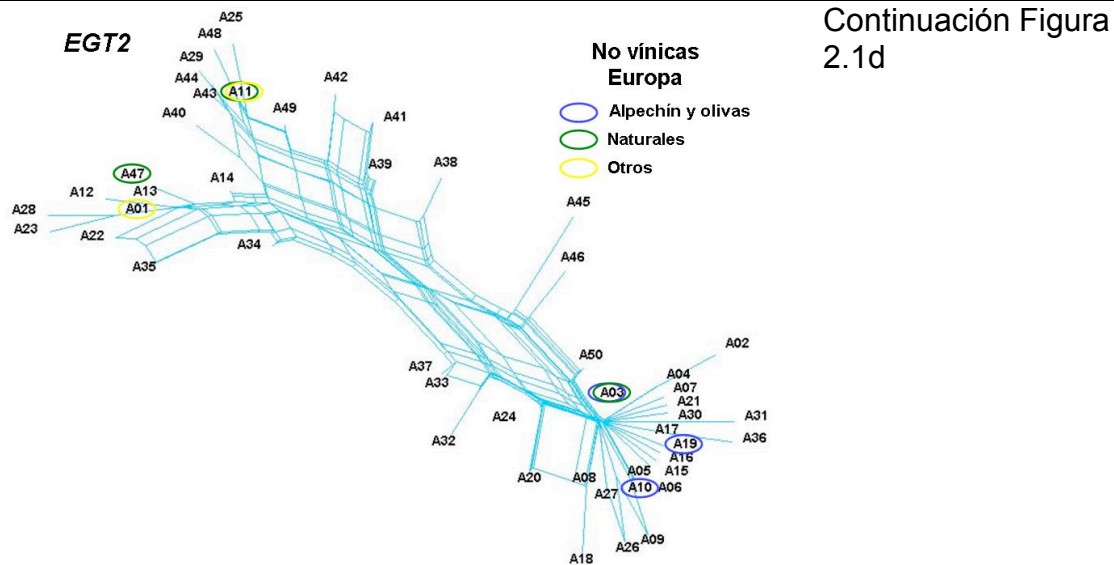


Figura 2.1d. Red filogenética de la región nuclear *EGT2* con los alelos detectados en las poblaciones no vînicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones no vînicas se indica en un círculo azul, verde o amarillo.

Continuación Figura 2.1d





Los alelos de cepas europeas aisladas de cerveza y sidra no forman un grupo como las cepas vnicas europeas, sino que se distribuyen a lo largo de toda la red filogenética (Figura 2.1d). Los alelos 11 y 48 de cepas cerveceras se agruparon con los de cepas no vnicas y el alelo 3 con los vnicos; y de los 5 alelos de cepas de sidra, 2 se agruparon con los no vnicos y 3 con los vnicos. La distribución de los alelos del resto de cepas europeas aisladas de ambientes naturales (alpechín, olivas y otros), se muestra en la Figura 2.1d. Los 3 alelos de cepas de alpechín y olivas se agrupan con los alelos de las cepas vnicas, los 2 de otros ambientes con los no vnicos, y los 3 de ambientes naturales se distribuyen en los dos grupos, 2 alelos en los no vnicos y uno con los vnicos.

Al considerar las diferentes poblaciones geográficas y la fuente de aislamiento de las cepas de *S. cerevisiae*, la distribución de alelos en la red filogenética muestra que las cepas vnicas de nuevo forman un grupo monofilético, aun cuando se analizan las diferentes poblaciones o cuando se incluyen todas las cepas aisladas de ambientes vnicos. Solo uno o dos alelos (que están presentes en cepas heterocigotas, 1 de Chile, 2 de Sudáfrica y 1 de Suiza) en algunas de las poblaciones estudiadas no se agruparon con los alelos vnicos. En cambio, las cepas aisladas de ambientes no vnicos, como son las de cachaça, sake, masato, chicha, agave, cerveza y sidra, presentan alelos tanto del grupo vnicico como del no vnicico.

Otra forma de comparar la variabilidad genética de secuencias es mediante la estima de la diversidad nucleotídica (π), definida como la proporción promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre todas las posibles comparaciones de secuencias; y θ , definida como la proporción de polimorfismos nucleotídicos observados en la muestra dividido entre el tamaño de la muestra; H_d o diversidad génica, la probabilidad de elegir 2 secuencias al azar, y sean diferentes. Las estimas de diversidad nucleotídica de las cepas vínicas y no vínicas se obtuvieron con el programa DNAsp y se muestran en la Tabla 2.3.

Al comparar la diversidad genética entre las cepas vínicas y no vínicas, se observó una mayor variabilidad en las cepas no vínicas que en las vínicas, lo que indica de nuevo que las cepas vínicas forman una población muy homogénea y con poca variabilidad genética. Esto se observa en los resultados obtenidos, de un total de 246 cepas de *S. cerevisiae*, con 492 copias del gen o alelos, 256 provienen de cepas vínicas y 236 de ambientes no vínicos, en las cuales se detectaron 21 y 27 sitios polimórficos, con 19 y 35 haplotipos o alelos distintos, respectivamente. La diversidad de alelos también es mayor en las cepas no vínicas que en las vínicas con 0,360 y 0,792 respectivamente. La diversidad nucleotídica por sitio se estimó en 0,00209 y 0,01412, es decir, siete veces mayor en las cepas no vínicas (Tabla 2.3).

Se analizó la frecuencia del número de diferencias mediante la comparación de pares de secuencias nucleotídicas utilizando el programa DNAsp, tanto con los alelos encontrados en cepas vínicas como en las cepas no vínicas. La representación gráfica de estas comparaciones para la región génica *EGT2* se muestra en la Figura 2.2. Los resultados obtenidos demuestran que las cepas vínicas presentan alelos con pocas diferencias nucleotídicas, en cambio entre las cepas no vínicas las diferencias son mayores.

Tabla 2.3. Diversidad genética de cepas vónicas y no vónicas de *S. cerevisiae* para la región génica *EGT2*. n, número de secuencias; S, Sitios segregantes o polimórficos; π , Diversidad nucleotídica (Tajima, 1983); θ , Diversidad nucleotídica (Watterson, 1975); Hd, Diversidad alélicas o haplotípica (Nei, 1987).

	Alelos de cepas		Total
	vónicas	no vónicas	
n	256	236	492
S	21	27	35
No. alelos	19	35	49
Hd	0,360	0,792	0,614
π	0,00209	0,01412	0,00987
θ	0,01021	0,01331	0,01533

La mayoría de los alelos de cepas vónicas son idénticos, ya que el 64% de las comparaciones de pares de secuencias presentan cero diferencias, y el 24% de las comparaciones presentan una diferencia. En cambio con los alelos de las cepas no vónicas, solo el 20% de las comparaciones de secuencias son iguales, es decir, sin diferencias entre ellas; el 24% de las comparaciones muestran ocho diferencias, el 15% con nueve diferencias y sólo el 12% con una diferencia.

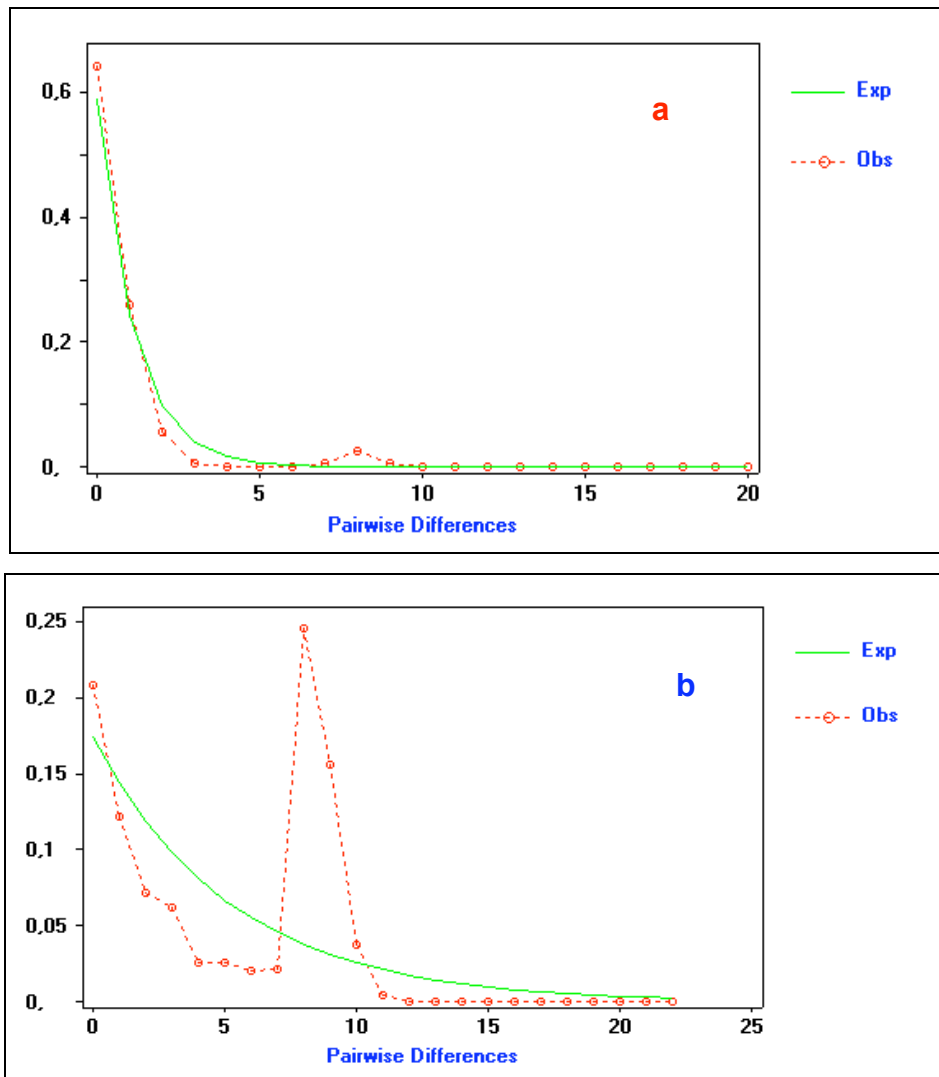


Figura 2.2. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de *EGT2* de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de *S. cerevisiae* (Obs) y bajo una población estable de tamaño constante y sin recombinación (Exp).

Como se ha mencionado en las redes de la Figura 2.1 más de una unión entre dos alelos indica la presencia de recombinación o conversión génica. Por estos indicios de recombinación, se procedió a la detección de recombinación y/o conversión génica con el programa DNAsp, que detecta el número y las posiciones nucleotídicas con probables fenómenos de recombinación o conversión génica. El mínimo número de sucesos de recombinación detectados para la región génica *EGT2* es de 7, entre los sitios (6,70), (75,101), (121,131), (131,177), (177,201) (201,252) y (252,294). Como este parámetro es una infraestima y para evitar errores en el análisis filogenético, se comprobó

visualmente (mediante la comparación de cambios nucleotídicos entre las distintas secuencias) la detección de los fenómenos de recombinación, y se identificó a 14 alelos con recombinación y 35 indicios de recombinación.

Como se ha observado que la población de cepas vínicas es muy homogénea y con poca variabilidad genética, es posible la denominación de alelo vínico al que está presente en las cepas vínicas, y alelo no vínico a los presentes solo en cepas de otros procesos de fermentación o de ambientes naturales. Después de establecer los alelos en grupos vínicos y no vínicos, los 14 alelos detectados con recombinación y de acuerdo a la mayor similitud se incluyeron en cada uno de estos grupos y se procedió a identificar la conversión génica, mediante el uso del programa DNAsp. Así, el grupo de alelos vínicos está formado por 25 alelos, 22 vínicos no recombinantes y los tres recombinantes 20, 32 y 37. El grupo no vínico está formado por los 13 alelos no vínicos y se incluye a los 12 recombinantes 33, 34, 38-46 y 49. Se identificaron 6 alelos con conversión génica, cuatro que están incluidos en el grupo no vínico y dos de los vínicos.

Para el análisis filogenético no se tomaron en cuenta los alelos con signos de recombinación o conversión génica, ya que pueden enmascarar las relaciones entre los alelos. Sólo se utilizaron los 35 alelos restantes para obtener el árbol filogenético mediante parsimonia estadística con el programa TCS1.21 (Clement et al., 2000), que relaciona los alelos según el menor número de cambios nucleotídicos, tal como se muestra en la Figura 2.3. Claramente se formaron dos grupos de alelos, en uno de ellos están los alelos de las cepas vínicas de Europa (Austria, Bélgica, Suiza, España, Francia, Hungría, entre otras), Argentina, Chile y Sudáfrica, con alelos presentes en cepas de Perú, México y Japón. De los 35 alelos analizados, 22 resultaron ser vínicos y 13 no vínicos, y cabe mencionar que la mayoría de las cepas vínicas presentan el alelo 3. En el otro grupo están los de las cepas aisladas de fermentaciones no vínicas, y de ambientes naturales de México, Perú, Nigeria, Sudáfrica, Indonesia, Pakistán y Rusia con alelos mostrados por cepas procedentes de Brasil, Irlanda, Burkina Faso, Ghana, Japón.

Para explicar este comportamiento se identificaron las posiciones variables que presentaron los cambios nucleotídicos de los 49 alelos identificados entre las secuencias de las cepas de *S. cerevisiae* y que se muestra en la Figura 2.4. Se observa que los cambios nucleotídicos **AATTTCTA** son característicos de las cepas vnicas, mientras que los cambios **YGCCCTCT** están presentes en cepas no vnicas en las posiciones nucleotídicas número 48, 70, 75 121, 131, 201, 252 y 294.

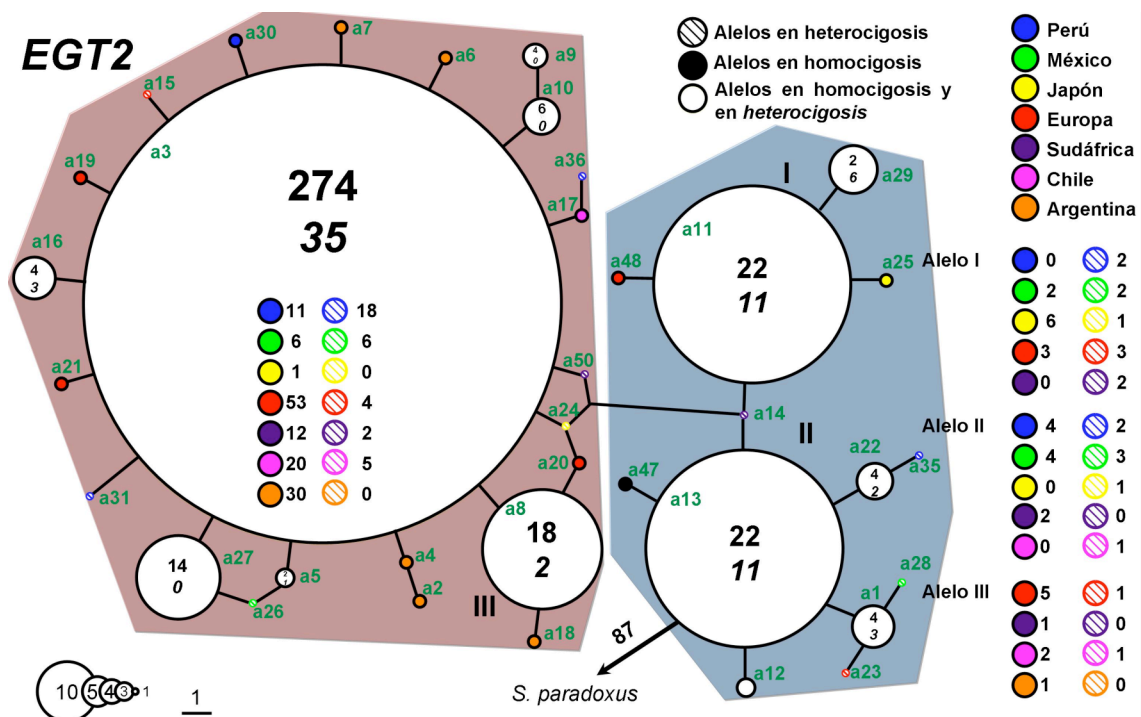


Figura 2.3. Árbol obtenido con parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas (longitud de las ramas) necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica *EGT2*. Las cepas que presentan el mismo alelo están incluidas dentro del círculo que es proporcional a su frecuencia. La raíz del árbol está indicada por una flecha, y se utilizó como “outgroup” la secuencia de la región génica *EGT2* de *S. paradoxus*. El grupo con los alelos de cepas vnicas está indicado en fondo marrón y el grupo con los alelos de cepas no vnicas en azul.

En la Figura 2.3 se muestra el árbol filogenético donde se observan los dos grandes grupos de alelos: los vnicos y los no vnicos. Al analizar los cambios polimórficos de los alelos vnicos y no vnicos, que se muestra en la Figura 2.4, se observa que 13 de los 49 alelos son no vnicos (en azul), 22 son vnicos (en rojo) y 14 se consideraron recombinantes y/o con conversión génica, ya que

presentaron parte de los cambios nucleotídicos típicos de alelos vínicos y de los no vínicos. Los alelos vínicos detectados son el 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 27, 30, 31, 36, 37, 45 y 50 con los cambios nucleotídicos **AATTCTA** (rojo) de cepas vínicas de Europa, Argentina, Chile, Sudáfrica, etc. (Figura 2.4). En cambio, los alelos no vínicos son: el 1, 11, 12, 13, 14, 22, 23, 25, 28, 29, 35, 47 y 48 con los cambios **YGCCCTCT** (azul) en las posiciones nucleotídicas 48, 70, 75, 121, 131, 201, 252 y 294 y que se encontraron en cepas de fermentaciones no vínicas de México, Brasil, Perú, Irlanda, Ghana, Japón, Burkina Faso, Inglaterra y Rusia (Figura 2.4).

Los alelos con recombinación se muestran en la Figura 2.5, y es posible diferenciar tres grupos, el primero como recombinante o bien un alelo vínico con dos convergencias, que se muestra en el alelo 32 en una cepa de Perú, que mostraron los cambios nucleotídicos **AGCTTCTA**, los cambios **A--TTCTA** característicos de alelos vínicos y la **-GC-----** de no vínicos. El segundo grupo se consideran alelos recombinantes o silvestres con dos convergencias, con los alelos 49 y 43 que son alelos de cepas de Sudáfrica y Perú y presentan los cambios **TGCCTTTT** y **TGCCCTTA**, respectivamente. En el tercer grupo están los 11 alelos recombinantes y son el 33, 34, 38, 37, 39, 40, 41, 42, 44, 45 y 46, todos encontrados como alelos en cepas de Perú. En estos alelos se identifican los puntos de recombinación por lo que no cabe duda de que no se trata de convergencia, como en los dos grupos anteriores. Como ejemplos, el alelo 33 que presenta los cambios **TGCTTCTA**, la primera parte de la secuencia es no vínica (azul), mientras que la segunda parte es vínica (en rojo); en cambio, el alelo 45 con los cambios **AATTTCT**, con la primera parte vínica (en rojo) y la segunda parte no vínica (en azul) (Figura 2.5).

Se identificaron 6 alelos con conversión génica, cuatro que están incluidos en el grupo no vínico y dos de los vínicos. Los alelos con conversión génica se muestran en la Figura 2.5. Del grupo no vínico son: el 33 con una zona de 81 pb entre los sitios 121-201, el 38 con una zona de 6 pb en los sitios 70-75, el 45 y 46 con 52 pb entre las posiciones nucleotídicas 70-121. Del grupo vínico es el alelo 32 con una zona de 6 pb en los sitios 70-75, y el 37 con 154 pb en la zona entre los sitios 48-201.

	11111111122222222222333333	Origen de las cepas
	44677700122357800123555899001333	
Alelo	34618805919912137417772238134298046	
A01	TATTTAGCAGAGCCCTTATGGCGCCTTTATTAGT	
A37	..C...AT...T.T...T...A.....	PE
A45	..C.A.AT...T.T...A.....	PE
A32	..C.A...T.T...C.T.T...A.....	PE
A33	..C...T.T...C...T...A.....	PE
A46	..C.A.AT...T...C.....	PE
A34	..C...T...A.....	PE
A38	..C.A.AT...C...T.....	PE
A39	..C.A...T.C...T...A.....	PE
A40	..C...A...C.C...T...A.....	PE
A41	..C.A...A...T.C...T...A.....	PE
A42	..C.A...A...T.C...T.....	PE
A43	..C...A...C...T...A.....	PE
A44	..C.A...A...C...T.....	PE
A49	..C...T.C...T.....	ZA

Figura 2.5. Posiciones nucleotídicas polimórficas en alelos recombinantes o con conversión génica de *S. cerevisiae* en la región génica *EGT2*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color en rojo indica cambios nucleotídicos característicos de alelo vínicos y en azul de alelos no vínicos. La secuencia resaltada en turquesa muestra las zonas con posible conversión génica.

Se analizó la frecuencia de alelos vínicos y no vínicos para determinar la distribución de alelos en homocigosis y en heterocigosis en la región génica *EGT2* de las cepas de *S. cerevisiae*. La distribución de alelos en homocigosis y heterocigosis de las cepas estudiadas se presenta en la Figura 2.3, en la que se observa una cantidad mayor de alelos homocigotos en las cepas vónicas que en las no vónicas. Se identificaron 25 alelos en homocigosis distribuidos en 16 alelos vónicos, 8 no vónicos y 1 recombinante. De los 22 alelos identificados como vónicos se determinó que 16 de ellos son homocigotos y sólo seis, el 15, 24, 26, 31, 36 y 50 se encontraron en heterocigosis, en cepas aisladas de vino de Suiza, sake de Japón, tequila de México, chicha y masato de Perú, y en vino de Sudáfrica, respectivamente.

Ocho de los 13 alelos no vónicos detectados, el 1, 11, 13, 25, 29, 47, 48 y 22 están en homocigosis en la cepa de laboratorio Sc288e aislada de higo fermentado en Estados Unidos, la NCAIM Y 925 aislada de pulpa de melocotón

en Hungría, la CECT10691 aislada de vino de palma en Costa de Marfil, la CECT11838 de uvas en Rusia, la CBS1591 de un cacao fermentado de Indonesia y la CBS2992 de vino de palma de Pakistán, entre otras. Por último, el alelo 33, es el único recombinante en homocigosis y se encuentra en la cepa 68PE de chicha de jora de Perú.

Con estos resultados, se muestra que las cepas aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica presentan una estructura poblacional heterogénea que se observa en el árbol filogenético (Figura 2.3) y en los genotipos con las diferentes combinaciones de alelos, que se muestran en la Figura 2.6. Es posible identificar 3 grupos de cepas homocigotas y 5 de cepas heterocigotas con diversas combinaciones de alelos. Los tres grupos homocigotos son los siguientes: homocigotos con alelos vínicos, por ejemplo, las cepas 102MX y 12PE, que presentan el alelo vínico 3 en homocigosis; homocigotos con alelos no vínicos como las cepas 112MX y 30PE que presentan el alelo 13 en homocigosis; y tercer grupo de cepas homocigotas con alelos recombinantes vínicos / no vínicos como la cepa 68PE que presenta el alelo 33 recombinante en homocigosis.

Los 5 grupos de cepas heterocigotas detectados están compuestos por cepas heterocigotas para alelos vínicos, para alelos no vínicos y para alelos recombinantes, cepas heterocigotas que presentan un alelo vínico y otro no vínico y las que presentan un alelo recombinante y el otro vínico o no vínico

Algunos ejemplos de cepas heterocigotas se muestran en la Figura 2.6, en donde se aprecia la gran diversidad de genotipos encontrados en las cepas latinoamericanas. Como heterocigoto con alelos vínicos está la cepa 84PE con los alelos 3 y 31, y con alelos no vínicos la cepa 192MX con los alelos 13 y 28. Como ejemplo de cepas heterocigotas con alelos vínicos y no vínicos, la 175MX y 35PE con los alelos 3 y 13, y la 18PE y 93PE con los alelos 3 y 22. Además, se encontraron cepas con un alelo recombinante y otro vínico o no vínico. La cepa 21PE es heterocigota para el alelo vínico 3 y el recombinante 45. Con un alelo no vínico y el otro recombinante está la cepa 46PE que

presenta el alelo 29 como no vínico y el 37 como recombinante; y la cepa 58PE con el alelo no vínico 13 y el recombinante 32.

En menor frecuencia se ha observado la presencia de heterocigotos entre las cepas aisladas de otros procesos fermentativos, y sólo se han encontrado 12 genotipos heterocigotos en 21 cepas, nueve vónicas de Chile, Sudáfrica, Francia y Suiza; dos de sidra de Irlanda; dos de sake de Japón; tres de cerveza de sorgo de Burkina Faso y Ghana; dos de Brasil aisladas de agua dulce y de destilerías; una cervecera de Inglaterra y una de agua de mar de Suecia.

Cepa	Alelo	Posición nucleotídica polimórfica
		11111111122222222222333333
		44677700122357800123555899001333
		34618805919912137417772238134298046
Sc288e	A01	TATTTAGCAGAGCCCTTATGGCGCGCTTTATTAGT
102MX y	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
12PE	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
112MX y	A13	..C.....
30PE	A13	..C.....
68PE	A33	..C.....T.T...C...T...A.....
	A33	..C.....T.T...C...T...A.....
84PE	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
	A31	..C.A.AT...T.T...C...T...GA.G....
192MX	A28T.....
	A13	..C.....
175MX y	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
35PE	A13	..C.....
18PE y	A22	..C.....A.....
93PE	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
46PE	A37	..C...AT...T.T...T...A.....
	A29	..C.....A.....C...T.....
21PE	A03	..C.A.AT...T.T...C...T...A.....
	A45	..C.A.AT...T.T...A.....

Figura 2.6. Ejemplos de combinaciones alélicas en cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica *EGT2*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color en rojo indica cambios nucleotídicos de alelo vínico y en azul de alelo no vínico.

Como resumen, el análisis de ésta región génica nos permitió diferenciar dos grupos de alelos monofiléticos. Un grupo denominado “vínico” que incluye todos los alelos presentes en cepas vónicas, muchos de los cuales también se

encuentran en cepas no vínicas. El otro grupo contiene alelos que solo se encuentran en cepas no vínicas. Además se observó que la mayoría de las cepas vínicas son homocigotas para el gen *EGT2*, en cambio la heterocigosis es más frecuente entre las cepas no vínicas. Es interesante destacar que las cepas vínicas presentan poca variabilidad genética, en comparación con las no vínicas con mayor variabilidad genética y con una estructura genética compleja.

2.3 Análisis de secuencias de *CAT8* en *S. cerevisiae*.

Siguiendo la misma metodología descrita para el gen *EGT2* y utilizando los cebadores CAT8-5 y CAT8-3 (Tabla M4, Materiales y Métodos) se obtuvieron las secuencias de la región génica *CAT8* de 239 cepas de *S. cerevisiae* de diferente origen geográfico y substrato (Tabla M1, Materiales y Métodos). El alineamiento de las secuencias de la región *CAT8* de *S. cerevisiae* presentó una longitud de 714 pb, que se utilizó para la obtención de la red filogenética por el método de NeighborNet implementado en el programa Splits Tree (Huson and Bryant, 2006) y que se muestra en la Figura 2.7. En total se obtuvieron las secuencias de *CAT8* de las mismas cepas analizadas en el apartado anterior. En el caso de *CAT8* se detectaron 87 alelos distintos para los que se obtuvo la red filogenética que los relaciona (Figura 2.7). Tal como se observó con la región génica *EGT2*, se detectaron dos grupos de alelos: la gran mayoría de alelos presentes en las cepas vínicas se sitúan en un grupo monofilético, en cambio los alelos presentes en las cepas no vínicas se distribuyen en toda la red filogenética.

Los 31 alelos presentes en las cepas vínicas se muestran con un círculo rojo (Figura 2.7a) y los 64 presentes en las cepas no vínicas con un círculo azul (Figura 2.7b). En general los alelos de las cepas no vínicas están distribuidos tanto en el grupo monofilético donde se encuentran la mayoría de alelos vínicos como en el resto de la red. En cambio los alelos de las cepas vínicas forman un solo grupo, excepto cuatro de ellos, los alelos 5, 77, 78 y 79 presentes en cepas de Sudáfrica y Suiza que se agrupan con alelos no vínicos. Ocho alelos, 5, 26, 31, 32, 33, 46, 52 y el 55 están presentes tanto en cepas vínicas como no vínicas.

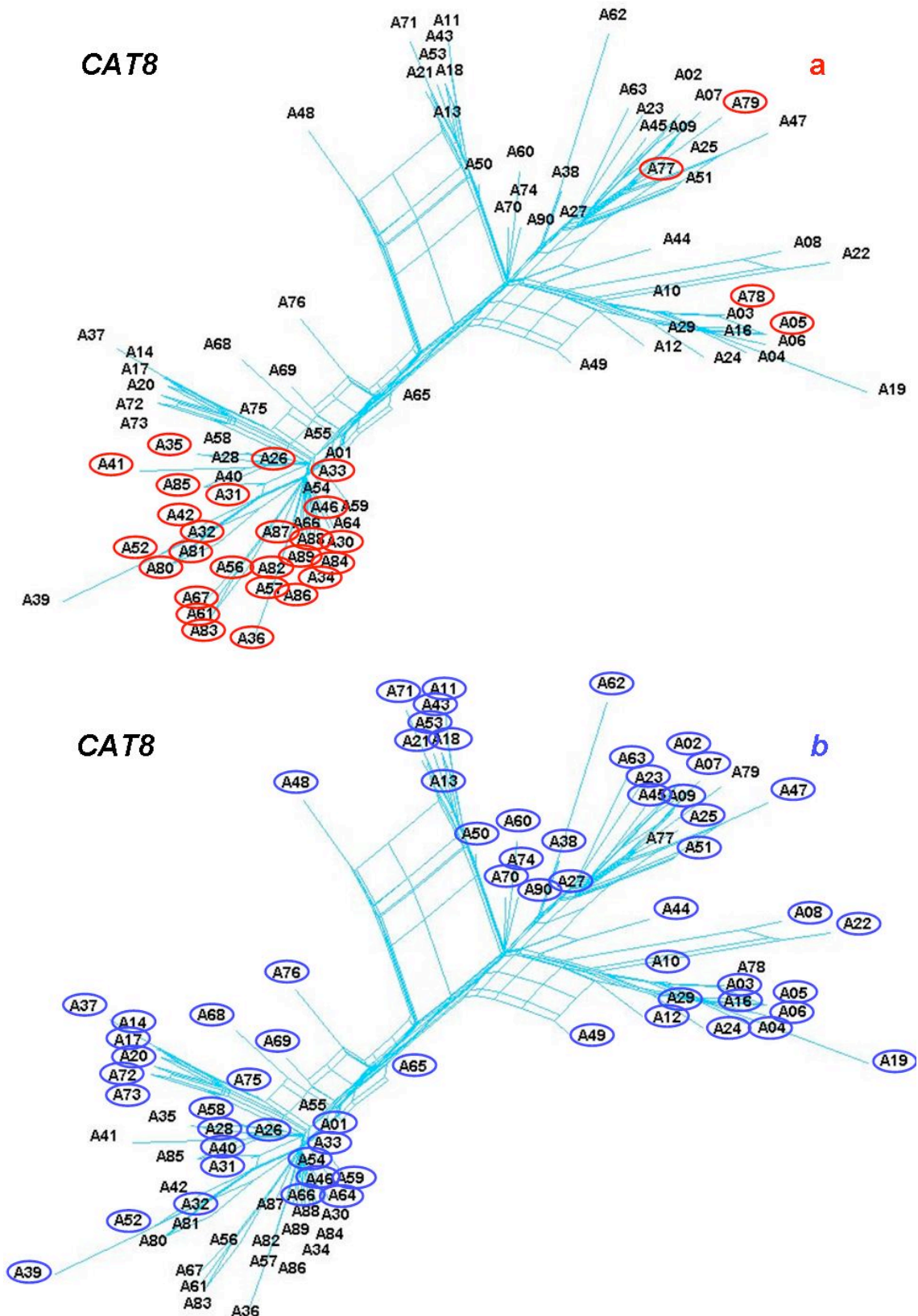


Figura 2.7. Red filogenética de la región nuclear CAT8 con los alelos detectados entre las cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos detectados en cepas vínicas se indica en un círculo rojo (a) y los de cepas no vínicas en círculo azul (b).

La distribución de alelos v́nicos y no v́nicos observada en la red filogenética era de esperarse, pues las cepas no v́nicas provienen de diferentes ambientes, lo que provocaría una distribución de alelos en toda la red. Por ello, se comparó la distribución de alelos de las cepas v́nicas y no v́nicas, pero no solo considerando la fuente de aislamiento, sino también el origen geográfico de las cepas, para ver si se observa el mismo comportamiento de las cepas v́nicas en las poblaciones no v́nicas.

La distribución de los alelos de las poblaciones v́nicas para la región génica CAT8 se muestra en la Figura 2.7c. Como era de esperarse los alelos de las cepas v́nicas de Argentina y Chile, con 11 y 9 alelos, forman un solo grupo, previamente considerado como v́nico (Figura 2.7a). Las cepas de Sudáfrica presentan una distribución diferente, ya que de los 8 alelos diferentes detectados se distribuyen por todo el árbol filogenético, 4 en el grupo de alelos v́nicos, y los otros 4 en el grupo de los no v́nicos, alelos presentes en 6 cepas homocigotas (Figura 2.7c). La distribución de los 24 alelos presentes en las cepas v́nicas de Europa (España, Francia y centro de Europa), es la misma que la de las cepas v́nicas de Argentina y Chile, es decir, todos los alelos forman un solo grupo, excepto la cepa 2897 de Suiza (Figura 2.7c).

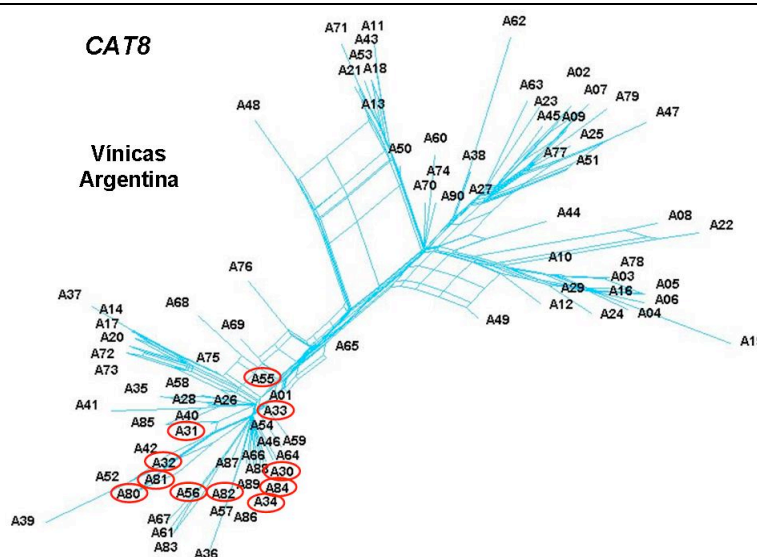
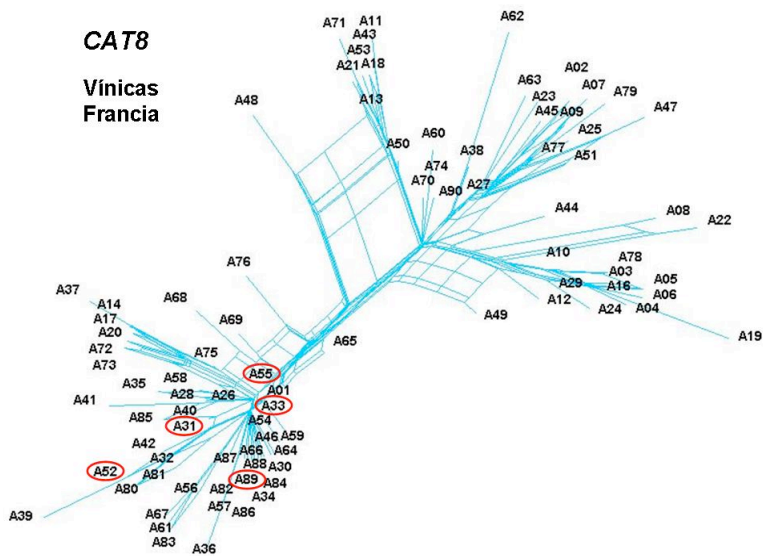
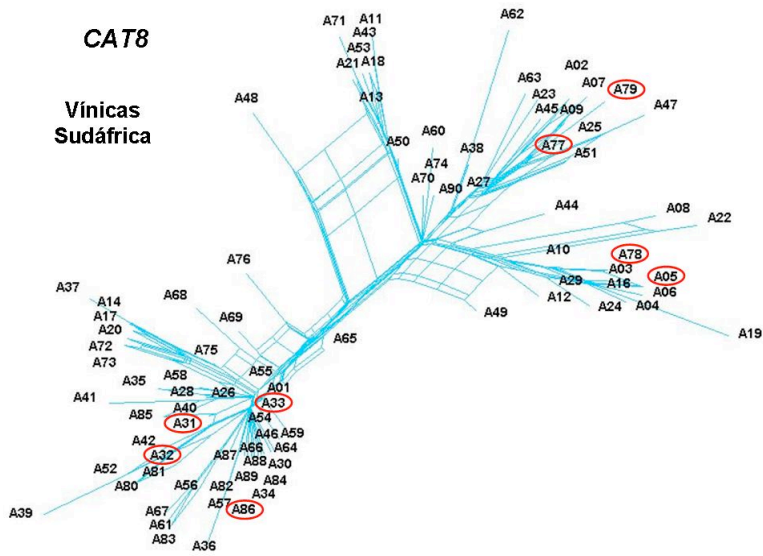
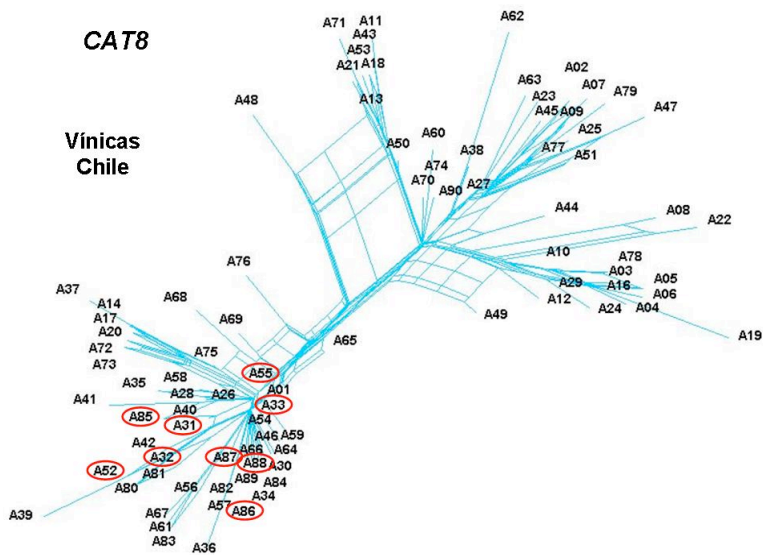
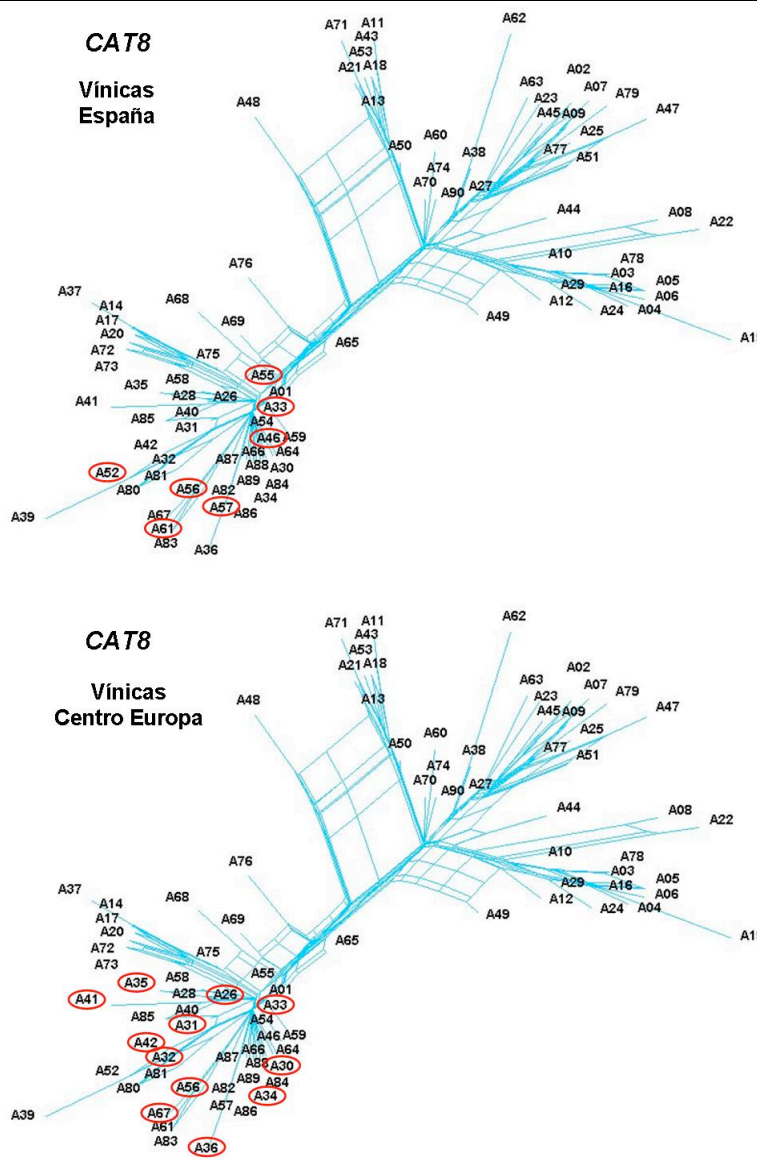


Figura 2.7c. Red filogenética de la región nuclear CAT8 con los alelos detectados en las poblaciones v́nicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones v́nicas se indica con un círculo rojo.



Continuación Figura 2.7c



La distribución de alelos entre las poblaciones de cepas no vnicas se muestra en la Figura 2.7d. Los 7 alelos de las cepas de destilerías y el aislado de río de Brasil, se distribuyen de la siguiente forma: 4 alelos en el grupo de alelos vnicos y 2 alelos en el grupo de alelos no vnicos, presentes en la cepa 1676 y uno que está presente en homocigosis con la cepa CBS7993, aislada de agua de río. La población de cepas de sake y otras fermentaciones de Japón, se agruparon 6 alelos dentro del grupo de alelos no vnicos. Los 4 alelos del resto de cepas no vnicas asiáticas, se agrupan dos en el grupo vnico y dos en el no vnico. Los 23 alelos de las 45 cepas, 22 de masato y 23 de chicha de jora del Perú se agruparon entre los alelos de cepas no vnicas, excepto 6 cepas que presentan uno de los alelos vnicos 14, 17 y 20 y otro de los no

vínicos 3 y 18. La distribución de alelos de las cepas aisladas de agave y otras fermentaciones de México también se muestra en la Figura 2.7d. Los 15 alelos de cepas aisladas de agave se distribuyen en los dos grupos de alelos, 11 entre los no vínicos y 4 con los vínicos. Esto mismo se observa entre los alelos de las cepas de otras fermentaciones de México con 8 alelos en el grupo no vínicico y 3 en el vínicico. A diferencia de las cepas vínicas, se observan cepas heterocigotas con alelos vínicos y no vínicos, como se ha observado en la población de Perú. Como ejemplo, el alelo vínicico 29 y el no vínicico 24 están presentes en la cepa OX3 de tequila. Otro ejemplo, son las cepas 112M y 113M de aguamiel con el alelo vínicico 33 y el no vínicico 47. Los alelos de cepas aisladas de otras fermentaciones también están presentes en los dos grupos, 7 entre los no vínicos y 3 en los vínicos. Un punto interesante que se observa, es la probable recombinación en el alelo 48 y 49, que están cerca pero no se agrupa con los no vínicos, y los presentan la cepa 169M de tuba y la 183M de tejuino.

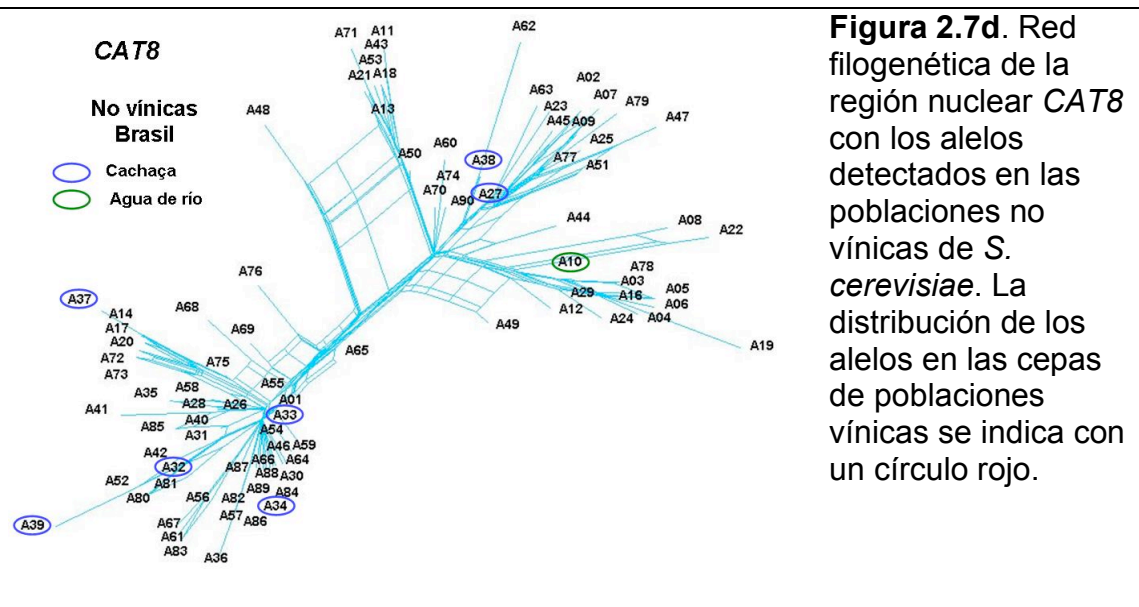
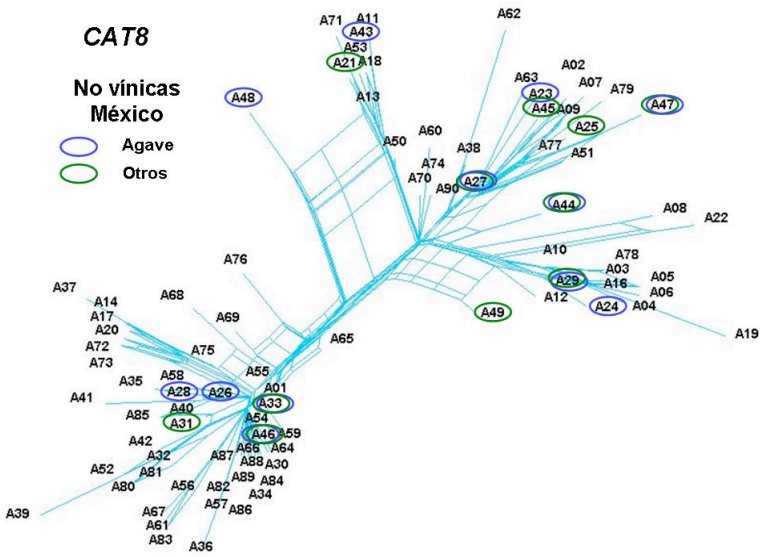
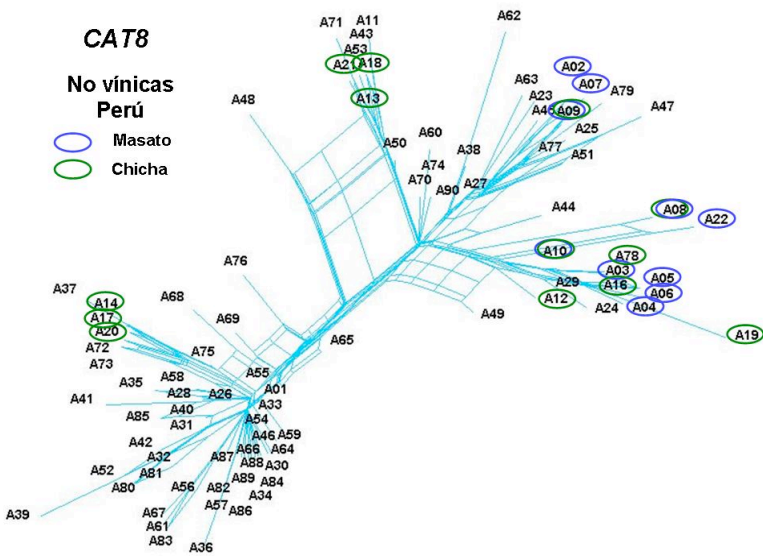
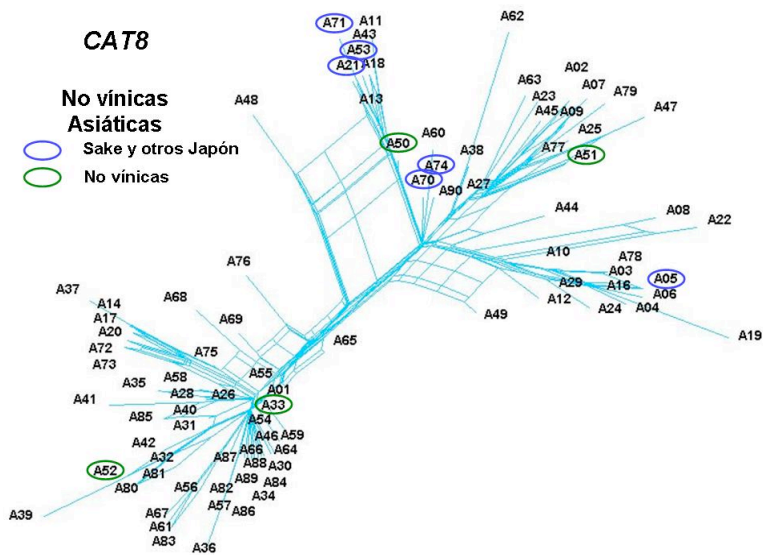


Figura 2.7d. Red filogenética de la región nuclear CAT8 con los alelos detectados en las poblaciones no vínicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones vínicas se indica con un círculo rojo.

Continuación Figura 2.7d



Aunque se incluyeron pocas cepas de fermentaciones tradicionales de África, es posible observar una distribución de alelos semejante a la de otras fermentaciones tradicionales. De los 7 alelos detectados, 5 se agruparon entre los vínicos, y están presentes en 3 cepas homocigotas y dos en cepas heterocigotas. Además, es probable que el alelo 76 presente en la cepa CBS8858 sea recombinante, ya que se encuentra situado cerca pero no incluido en el grupo de alelos vínicos.

Las cepas no vínicas europeas con 6 alelos, 4 de cepas de cerveza y 2 de sidra, están distribuidas en el grupo vínico, y sólo el alelo 10, presente en dos cepas de cerveza en homocigosis, se agrupó con los no vínicos. Por último, en la distribución de cepas europeas de ambientes naturales, alpechín, olivas y otros, se observa que, los alelos de las cepas de alpechín y de oliva se agrupan con los no vínicos, mientras que, los 4 alelos de cepas de ambientes naturales lo hacen en el grupo vínico. Los alelos vínicos 31 y 33, se presentan en la cepa CBS7764 aislada de salmón en Suecia. También se han detectado cepas heterocigotas, con un alelo vínico y el otro no vínico como son las cepas HU925 y la CECT10131, aisladas de melocotón en Hungría y de flor en España, respectivamente.

Al considerar las diferentes poblaciones geográficas y la fuente de aislamiento de las cepas de *S. cerevisiae*, la distribución de alelos en la red filogenética para la región génica *CAT8* es semejante a la de la región génica *EGT2*, ya que se observa que los alelos de las cepas vínicas forman un grupo homogéneo. Sólo en dos poblaciones, Sudáfrica y centro de Europa, se detectan algunos alelos que se agruparon con los no vínicos (4 de Sudáfrica y 1 de Suiza). En cambio, los alelos de las cepas aisladas de ambientes no vínicos, de cachaça, chicha, agave y cerveza, presentan una distribución tanto en el grupo de alelos vínicos como en el de no vínicos.

Para comparar la diversidad genética de las cepas vínicas con las no vínicas se obtuvieron estimas de diversidad genética mediante el uso del programa DNAsp, que se muestran en la Tabla 2.4. De forma similar a lo observado en la región génica *EGT2*, los resultados obtenidos indican que la

población de cepas vínicas es muy homogénea con menor variabilidad genética que las cepas no vínicas. El análisis se realizó con 244 secuencias de cepas vínicas y 234 de cepas no vínicas, en donde se identificaron 36 y 60 sitios polimórficos, distribuidos en 31 y 64 alelos distintos, respectivamente. La diversidad alélica es de 0,802 para las cepas vínicas, y de 0,939 para las cepas no vínicas. La diversidad nucleotídica por sitio, π , se estimó en 0,00351 para cepas vínicas y 0,00977 para no vínicas; y el estimador de θ de Watterson es de 0,00830 y 0,01394, respectivamente.

Tabla 2.4. Diversidad genética de cepas vínicas y no vínicas para la región génica *CAT8*. n, número de secuencias; S, Sitios segregantes o polimórficos; π , Diversidad nucleotídica (Tajima, 1983); θ , Diversidad nucleotídica (Watterson, 1975); Hd, Diversidad alélica (Nei, 1987).

	Alelos de cepas		Total
	vínicas	no vínicas	
n	244	234	478
S	36	60	75
No. alelos	31	64	87
Hd	0,802	0,939	0,909
π	0,00351	0,00977	0,00847
θ	0,00830	0,01394	0,01557

Se analizó la frecuencia del número de diferencias entre los alelos de cepas vínicas y los de las cepas no vínicas mediante la comparación de pares de secuencias nucleotídicas, utilizando el programa DNAsp. La representación gráfica de estas comparaciones para la región génica *CAT8* se muestra en la Figura 2.8. Tal como se ha observado en *EGT2*, los resultados obtenidos demuestran que las cepas vínicas presentan alelos con pocas diferencias nucleotídicas en comparación con los alelos de las cepas no vínicas, ya que el 82% de las comparaciones de los alelos de las cepas vínicas presentan cuatro o menos diferencias; con la siguiente distribución de frecuencias: el 28% de las comparaciones presentan una diferencias, el 21% con dos diferencias, el 20% con cero diferencias y el 13% con tres diferencias (Figura 2.8a). Por otro lado, las comparaciones de alelos de las cepas no vínicas muestran una distribución

diferente a la de las cepas vónicas. El 40% de las comparaciones presentan de 8 a 10 diferencias y solo el 6% y 8% con 0 y 1 diferencia (Figura 2.8b).

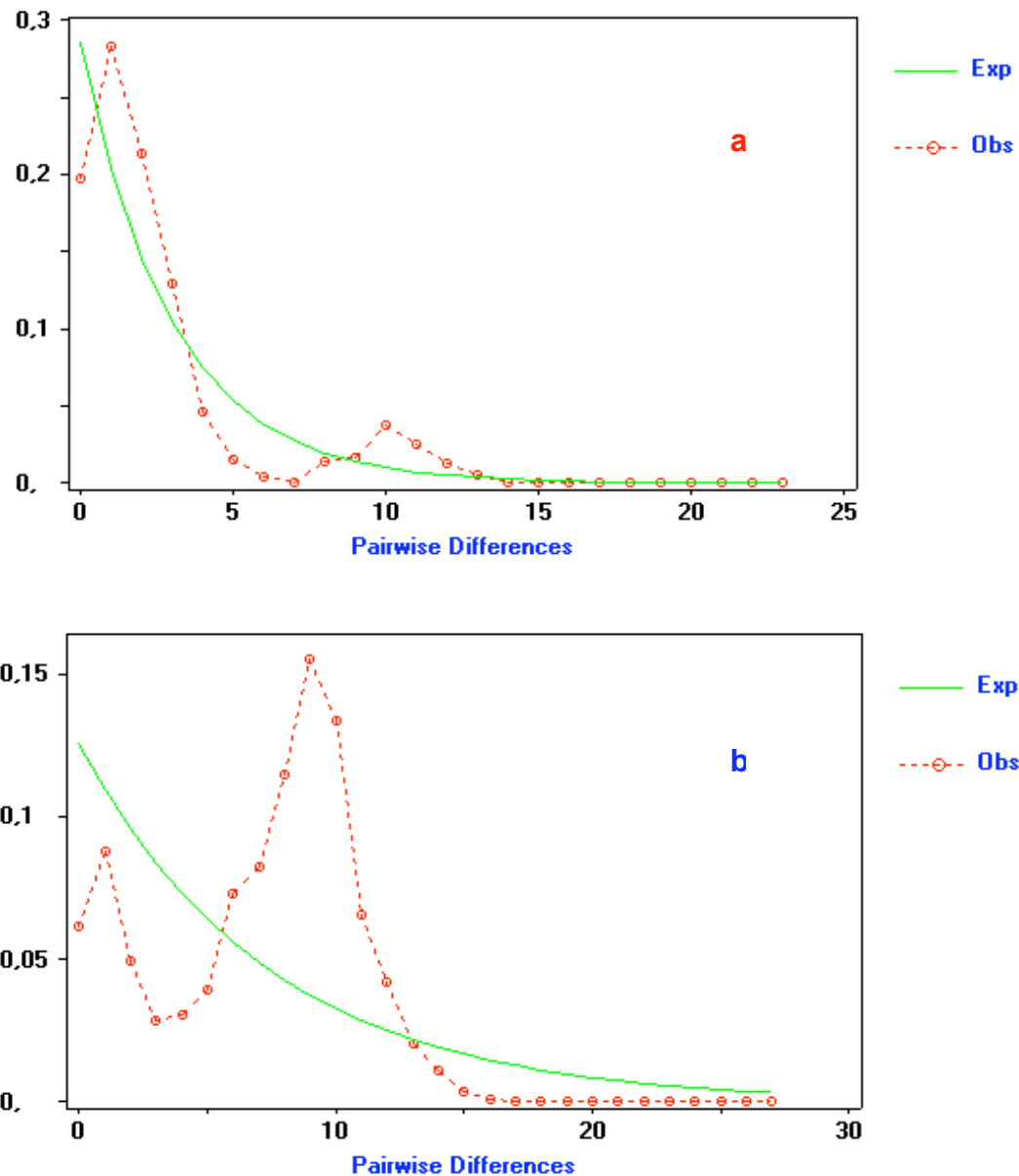


Figura 2.8. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de *CAT8* de cepas vónicas (a) y de cepas no vónicas (b) de *S. cerevisiae* (Obs) y bajo una población estable de tamaño constante y sin recombinación (Exp).

La estructura en red de la filogenia de los alelos de la región génica *CAT8* (Figura 2.7), es debida a la presencia de recombinación o conversión génica, por lo que se procedió a su identificación mediante el programa DNAsp, que detecta el número y las posiciones nucleotídicas con probables fenómenos de recombinación o conversión génica. El mínimo número de sucesos de recombinación detectados para la región génica *CAT8* es de 8, entre los sitios: (60,97), (126,139), (139,207), (207,291), (291,344), (344,426), (426,453) y (460,607), y para evitar errores en el análisis filogenético se comprobó visualmente los fenómenos de recombinación. Como resultado de este análisis, se detectaron 6 alelos con recombinación y 82 sin señales de recombinación.

Siguiendo el planteamiento de que las cepas vínicas forman un grupo muy homogéneo y con poca variabilidad genética, se denominó alelo vínico al que está presente en cepa vínica, y alelo no vínico a los restantes, que sólo se encuentran en cepas de otros procesos de fermentación o de ambientes naturales. Así los alelos se agruparon en vínicos y no vínicos, y los que se detectaron con recombinación se incluyeron en el grupo de haplotipos vínicos para identificar la presencia de conversión génica entre los dos grupos, con el programa DNAsp. Después de formar los dos grupos la distribución de alelos fue la siguiente: el grupo vínico está compuesto por 41 alelos vínicos y los 6 con recombinación y el grupo de los no vínicos con 41. Se detectaron dos alelos con conversión génica, uno en el grupo de alelos vínicos y otro en el de los no vínicos (Figuras 2.10 y 2.11). El alelo 48 de la población no vínica presentó una zona de conversión de 128 pb entre los sitios 482-609; en el grupo de alelos vínicos el 76 muestra una zona de conversión génica de 80 pb entre los sitios 62-141.

Los 6 alelos con recombinación y/o conversión génica no se incluyeron en el análisis filogenético final, y se utilizaron 82 para la obtención del árbol filogenético mediante parsimonia con el programa TCS1.21 (Figura 2.9). El árbol filogenético de la región *CAT8* con los 82 alelos vínicos y no vínicos detectados presenta una topología similar a la obtenida con *EGT2*, en donde se diferenciaron de nuevo los dos grupos de alelos: los vínicos y los no vínicos.

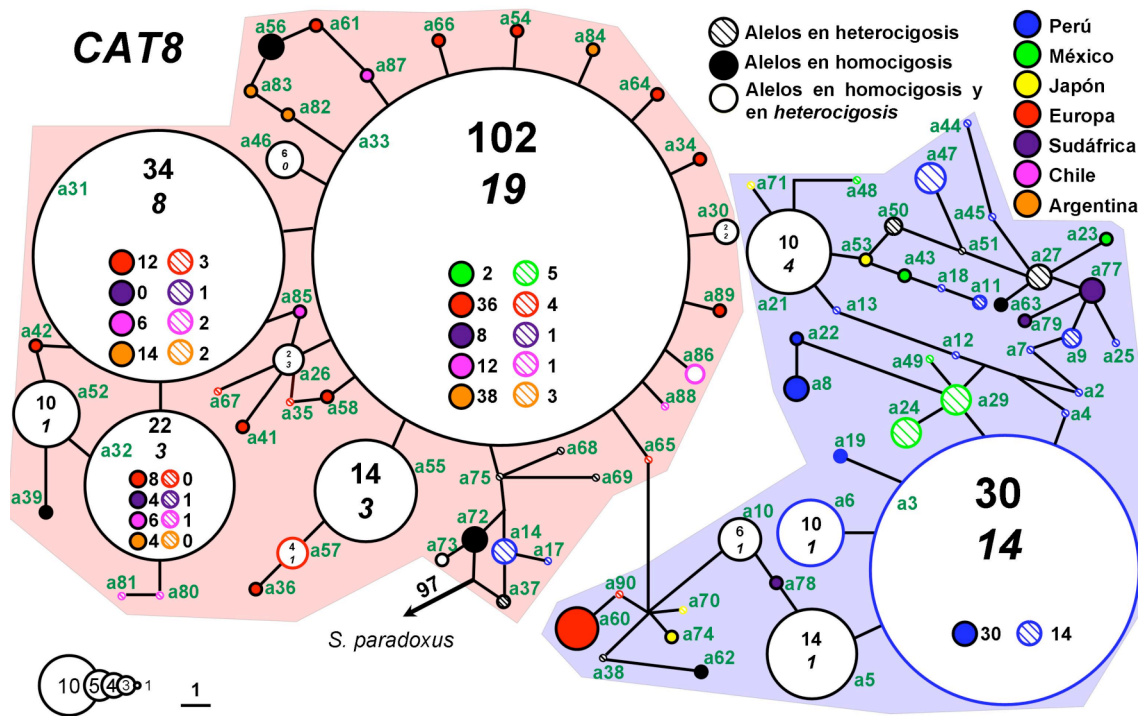


Figura 2.9. Árbol obtenido con máxima parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas (longitud de las ramas) necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica *CAT8*. Las cepas que presentan el mismo alelo están incluidas dentro del círculo que es proporcional a su frecuencia. La raíz del árbol está indicada por una flecha, y se utilizó como outgroup la secuencia de la región génica *CAT8* de *S. paradoxus*. El grupo con los alelos de cepas vnicas está indicado en fondo marrón y el grupo con los alelos de cepas no vnicas en azul.

De acuerdo al análisis filogenético se determinó que de los 82 alelos identificados, 41 alelos son vnicos y 41 no vnicos. El grupo de alelos vnicos incluye los presentes en las cepas vnicas de Europa, Argentina y Chile, que también se encuentran en cepas de fermentaciones naturales de México y Perú, aunque el alelo 33 incluye a la mayoría de las cepas vnicas. El grupo de alelos no vnicos incluye aquellos presentes en cepas de bebidas tradicionales de Perú, México, Sudáfrica, Japón, Rusia, Burkina Faso, Bélgica, Pakistán, Indonesia, Brasil y Hungría.

Para explicar la distribución de alelos de las cepas de *S. cerevisiae* en el árbol filogenético de la región génica *CAT8*, se identificaron las posiciones variables de los 82 alelos. Los cambios nucleotídicos diagnóstico que

diferencian los alelos de cepas vínicas son **CTTGC**, y para los no vínicos son **TCCAT**, en las posiciones nucleotídicas número 62, 141, 293, 482 y 539 (Figuras 2.10 y 2.11). Se determinó que 41 alelos son vínicos (secuencia en azul), 41 no vínicos (secuencia en rojo) y 6 con indicios de recombinación (Figura 2.12).

Los alelos vínicos secuenciados se muestran en la Figura 2.10 y se clasificaron en varios grupos, con algunos cambios nucleotídicos que los identifican. El primer grupo con 11 alelos el 33, 84, 88, 46, 54, 86, 89, 30, 66, 34, 64 y 65, con los cambios nucleotídicos **CTTGC** característicos de los alelos vínicos que están presentes en cepas vínicas de Europa, Argentina y Chile, y de fermentaciones naturales de México, cerveza de Inglaterra y sidra de Irlanda. El segundo grupo con los alelos 35, 41, 26, 85 y 67 con el cambio **T** en las posiciones nucleotídicas 99 y 141 y que se encuentra en cepas vínicas de Austria, Suiza, Chile y cepas aisladas de agave de México. El alelo 58 con un cambio respecto al alelo 35 se presenta en la cepa CECT10120 de un arbusto de España. En el tercer grupo están los alelos 52, 39, 32 y 80 con los cambios **CT** en las posiciones nucleotídicas 462 y 609 en las cepas vínicas de España, Chile, Eslovenia, Austria, Suiza, Sudáfrica y Argentina, y de destilerías de Brasil, con alelos en China. Además se agrupan los alelos 31, 42 y 81 con dos cambios respecto al alelo 32, que se presentan en cepas vínicas de Austria, Eslovenia, Francia, Suiza, Sudáfrica, Argentina y Chile, una cepa de una fermentación tradicional de México, agua marina y de salmón de Suecia. El cuarto grupo con los alelos 56, 61, 83 y 82 con el cambio **T** en la posición nucleotídica 494, en las cepas vínicas de España y Argentina. El alelo 87 con dos cambios respecto al alelo 56. El quinto grupo con los alelos 55, 57 y 36 que tienen un cambio nucleotídico **C** en la posición 448, en cepas vínicas de España, Sudáfrica, Francia, Hungría y Argentina. El sexto grupo con los alelos 75, 73, 72, 14, 37, 17, 68 y 69, con el cambio **T** en la posición 453 presente en cepas de Sudáfrica, Nigeria, Ghana, Perú, Brasil y Japón.

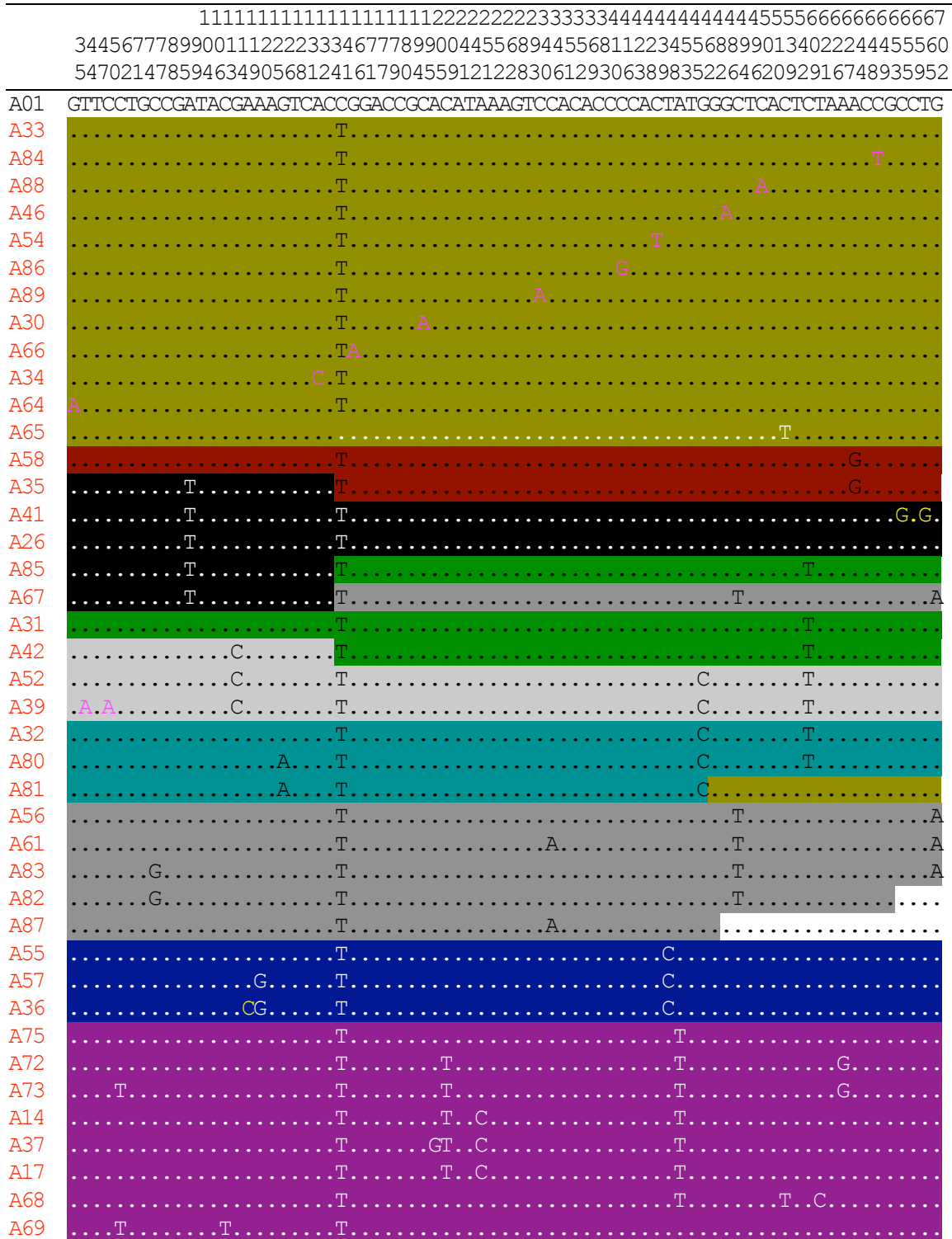


Figura 2.10. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos vínicos de *S. cerevisiae* en la región génica *CAT8*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color del resaltado indica los diferentes alelos que componen cada grupo de alelos vínicos detectado.

Por último, están los alelos únicos o los que presentan cambios nucleotídicos característicos de más de un grupo que podrían haberse formado por recombinación o conversión génica entre alelos vínicos, aunque no puede descartarse la convergencia. Los alelos son 35, 85, 67, 31, 42, 81, 87, 58, 65 y 59 de cepas vínicas de Austria, Chile, Suiza, Eslovenia, Francia y Argentina; de sidra de Irlanda y de ambientes naturales en Europa, tales como agua de mar y salmón de Suecia y flor de *Centaurea alba* y de insecto *Arbutus unedo* de España.

Los alelos recombinantes detectados con cambios nucleotídicos propios de alelos vínicos y de no vínicos son el 1, 20, 28, 40, 59 y 76. Todos son alelos de ambientes no vínicos: dos de bebidas tradicionales de Latinoamérica, uno de Perú (alelo 20) y el otro de México (alelo 28); dos de frutas, uno de higo en EE. UU. (alelo 1) y el otro de melocotón de Hungría (alelo 40); uno de flor de España (alelo 59) y uno de cerveza de sorgo de Burkina Faso (alelo 76). Es interesante mencionar que el alelo 1 corresponde a la cepa S288c, la primera cepa de *S. cerevisiae* con el genoma secuenciado.

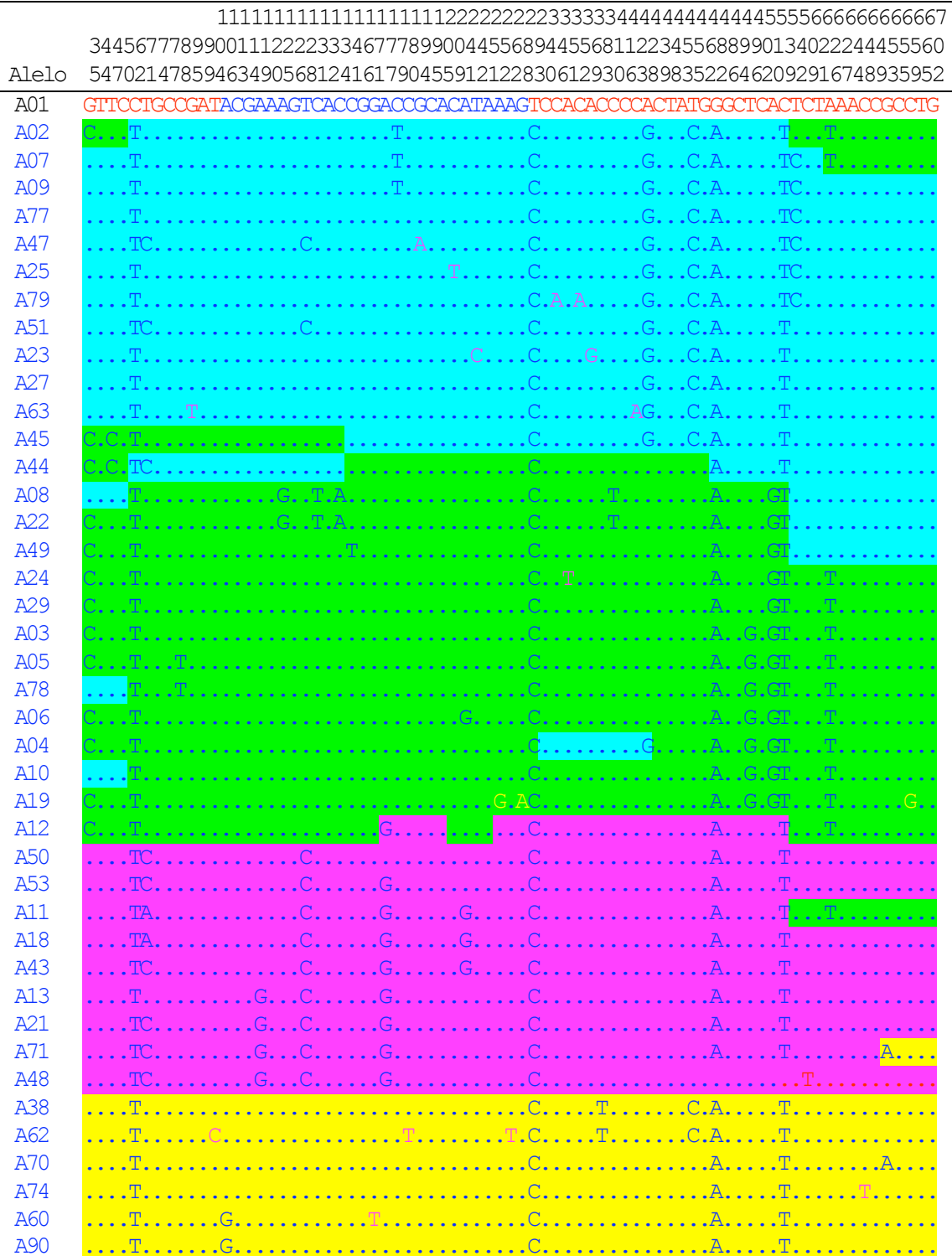


Figura 2.11. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos no v́nicos de *S. cerevisiae* en la regi3n g3nica *CAT8*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucle3tido es id3ntico a la primera secuencia, el color del resaltado indica los diferentes alelos que componen cada grupo de alelos no v́nicos detectado. El color de la secuencia del alelo 1 indica cambios de alelo v́nico (rojo) y no v́nico (azul).

y 10 híbridos con alelos recombinantes vínicos con no vínicos en cepas de México, Europa, Japón y Perú.

La estructura poblacional de las cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica con la región génica *CAT8* se muestra en el árbol filogenético obtenido y los genotipos identificados (Figura 2.13) y se observa que es semejante a la observada en *EGT2*. Se detectaron dos grupos de cepas homocigotas, uno con alelos vínicos y el otro con alelos no vínicos. La población de homocigotos con alelos vínicos incluye las cepas 24MX, 175MX, 8Arg, 10Arg y L269, con los alelos 26 o 31, y la población de homocigotos con alelos no vínicos formada por un grupo de cepas de chicha y masato Perú con los alelos 3, 5, 6, 8, 19 y 22, y las cepas ARS_MX, CHA_MX, RG1_MX, SOM_MX, 20MX y 15MX de México con los alelos 23, 24, 29, 43.

Las poblaciones de heterocigotos se clasificaron en intrahíbridos, si presentan cepas con 2 alelos vínicos o 2 no vínicos distintos; interhíbridos si presentan un alelo vínico y uno no vínico, de las que se muestran ejemplos en la Figura 2.13. La población de heterocigotos con alelos vínicos se observa en cepas de Argentina y Chile. Algunas cepas son la Arg19 y la Arg25 con los alelos 30 y 31; y las cepas 22CL y 354CL, con los alelos 31 y 86, y 33 y 88. Las poblaciones de heterocigotos con alelos no vínicos son de Perú y México, algunas cepas que se muestran en la Figura 2.13 son la 35PE, 93PE con los alelos 3 y 9; y la 102MX con los alelos 21 y 27. Otras cepas son la 1PE, 2PE, 15PE, 18PE, 21PE, 23PE, 46PE, 31PE, 54PE, 84PE y 103MX, con los alelos 2, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 21, 24, 29, 44, 45. Una población de heterocigotos interhíbridos, denominado así por que las cepas presentan un alelo vínico y el otro no vínico, incluye las siguientes cepas de Perú: 58PE y 90PE con los alelos 3 y 14; 56PE, con los alelos 14 y 16; 59PE, con los alelos 3 y 17; y la 61PE, con los alelos 14 y 18. De México, las cepas 112MX, 113MX, 122MX y 192MX de México con los alelos 33 y 47. Por ultimo, se detectó una población de cepas heterocigotas híbridas con alelos recombinantes, es decir, cepas con un alelo recombinante y el otro alelo vínico o no vínico. En esta población se incluyen las cepas 183MX, GU4MX, MG_MX, 169MX y 69PE. Como ejemplo, la cepa 69PE con los alelos 3 y 20.

Cepa	Alelo	Posición nucleotídica
S288c	A01	GTTCTGCCGATACGAAAGTCACCGGACCGCACATAAAGTCCACACCCCACTATGGGCTCACTCTAAACCGCCTG
24MX	A26T.....T.....
	A26T.....T.....
175MX	A31T.....T.....
8Arg	A31T.....T.....
ARSMX	A24	C...T.....C...T.....A...GT...T.....
CHAMX	A24	C...T.....C...T.....A...GT...T.....
Perú	A03	C...T.....C.....A...G.GT...T.....
	A03	C...T.....C.....A...G.GT...T.....
Arg19	A31T.....T.....
Arg25	A30T.....A.....
22CL	A31T.....T.....
	A86T.....G.....
354CL	A33T.....T.....
	A88T.....A.....
35PE	A03	C...T.....C.....A...G.GT...T.....
93PE	A09	...T.....T.....C.....G...C.A...TC.....
102MX	A21	...TC.....G...C...G.....C.....A...T.....
	A27	...T.....C.....G...C.A...T.....
58PE	A03	C...T.....C.....A...G.GT...T.....
90PE	A14T.....T.C.....T.....
112MX	A33T.....T.....
192MX	A47	...TC.....C.....A.....C.....G...C.A...TC.....
69PE	A03	C...T.....C.....A...G.GT...T.....
	A20	...T.....T.....T.C.....T.....

Figura 2.13. Ejemplos de combinaciones alélicas de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica *CAT8*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color del número de alelo en rojo indica que es vínico, el azul indica que es no vínico y en verde con recombinación.

De acuerdo al análisis filogenético y a las estimas de diversidad genética analizadas con las secuencias de los alelos de la región génica *CAT8*, se detectó la misma estructura observada para la región génica *EGT2*, es decir, las cepas vínicas conforman una población muy homogénea con menor variación genética que las cepas no vínicas.

2.4 Análisis de secuencias de *BRE5* en *S. cerevisiae*.

Siguiendo la misma metodología descrita para los genes anteriores y utilizando los cebadores BRE5-5 y BRE5-3 (Tabla M4, Materiales y Métodos) se obtuvo la secuencia de la región génica *BRE5* de 243 cepas de *S. cerevisiae* de diferente origen geográfico y substrato (Tabla M1, Materiales y Métodos). El alineamiento de las secuencias mostró una longitud de 681 pb (675 pb después de excluir los sitios con gaps) y se utilizó para obtener la red filogenética por el método de NeighborNet implementado en el programa Splits Tree (Huson and Bryant, 2006). Este método permite el análisis filogenético intraespecífico sin perder información de eventos tales como son la recombinación y la conversión génica (Figura 2.14). En la red se observa la distribución de los 90 alelos detectados, de los cuales 35 corresponden a alelos de cepas vínicas y se muestran con un círculo rojo (Figura 2.14a) y 67 de cepas no vínicas señalados con un círculo azul (Figura 2.14b). Once alelos, el 2, 3, 4, 6, 11, 12, 13, 17, 19, 28 y 29 están presentes en cepas vínicas y no vínicas.

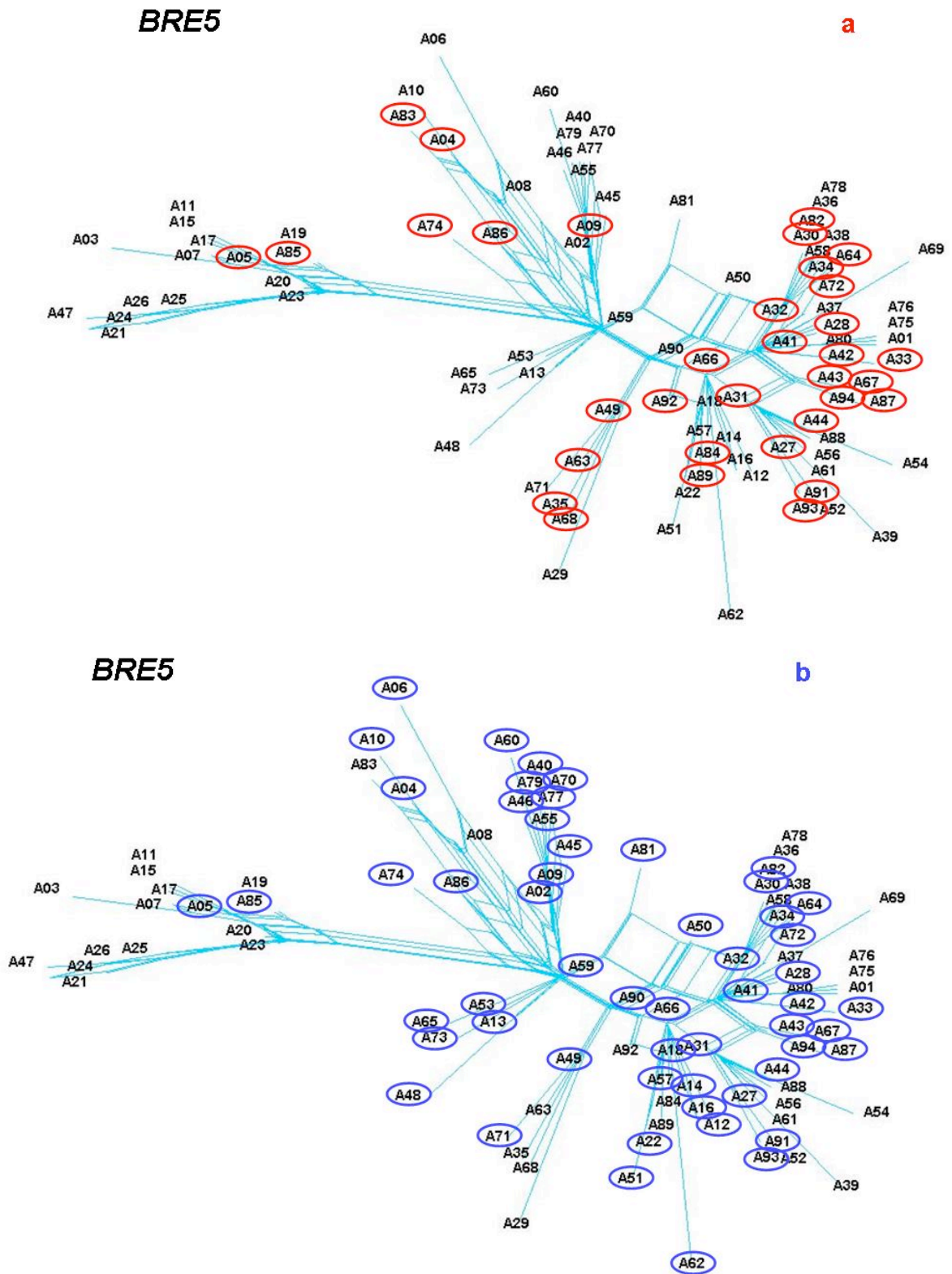


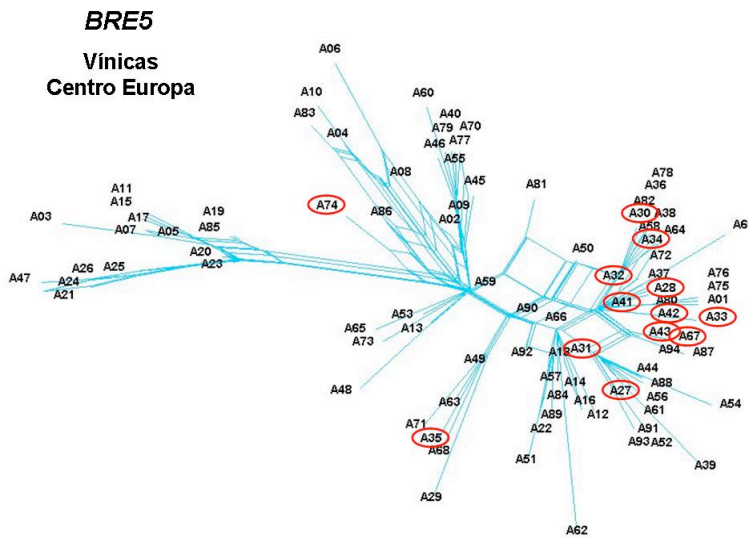
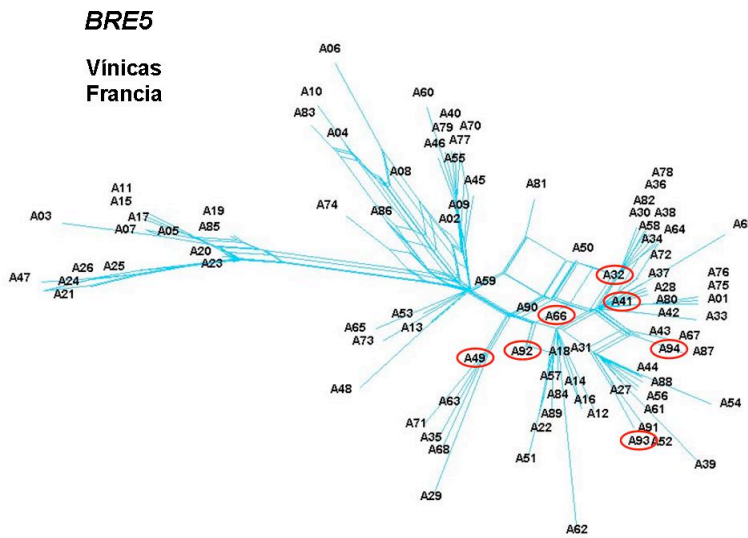
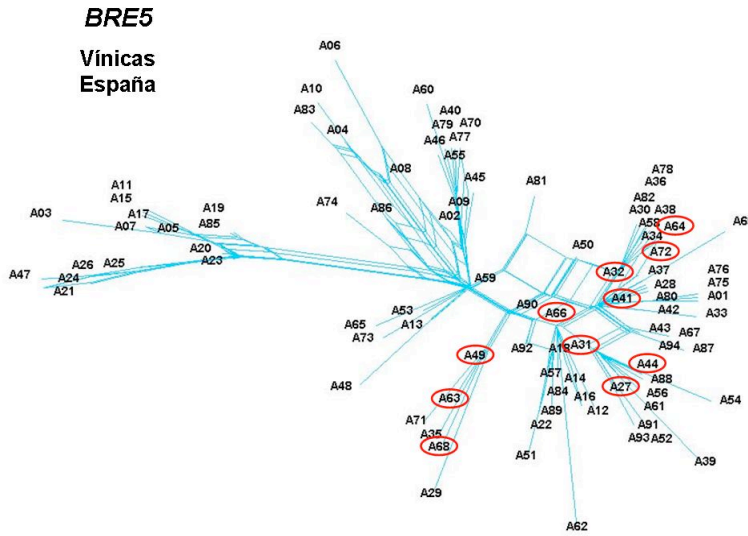
Figura 2.14. Red filogenética de la región nuclear *BRE5* con los alelos detectados entre los alelos de cepas vínicas (a) y de las aisladas de ambientes no vínicos (b) de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos detectados en cepas vínicas se indica en un círculo rojo (a) y los de cepas no vínicas en círculo azul (b).

Los alelos de las cepas vónicas forman un grupo monofilético en las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*, mientras que los alelos de las cepas no vónicas se distribuyen tanto en el grupo vónico como en el resto de la red filogenética, aun cuando se dividen en poblaciones según su origen geográfico y fuente de aislamiento. Por ello, se analizó la distribución de alelos de la región génica *BRE5* considerando tanto el origen geográfico como la fuente de aislamiento de las cepas de *S. cerevisiae*, y se muestra en las Figuras 2.14c y 2.14d. Tal como se ha descrito en las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*, los alelos de las cepas vónicas forman un grupo homogéneo.

Los 7 alelos de las cepas de Argentina y 5 de los 6 alelos detectados en las cepas de Chile se agruparon con los alelos vónicos. Solo el alelo 9 presente en dos cepas heterocigotas se agrupó con los alelos no vónicos. Los 12 alelos de las cepas vónicas de Sudáfrica se agruparon de la siguiente forma: 7 en el grupo de alelos vónicos y 5 en el grupo no vónico. Los alelos no vónicos están presentes en 3 cepas heterocigotas, que presentan 2 de los 5 alelos no vónicos. Los alelos de las cepas vónicas de Europa de tres orígenes geográficos distintos presentan la misma distribución. Los alelos de España en 11 alelos, de Francia en 7 alelos y las del centro de Europa en 13 alelos, forman un grupo. Solo el alelo 74 presente en la cepa CBS2897 de Suiza, no se agrupa con los alelos vónicos (Figura 2.14c).

Es importante señalar que, en esta región génica son probables los fenómenos de recombinación que se observan en varios alelos de diferentes poblaciones de cepas vónicas. Algunos alelos con posibilidades de ser recombinantes son: el 45, 63, 35 y 68 presentes en cepas vónicas de Argentina, Chile, Sudáfrica y de Europa.

Continuación Figura 2.14c



La distribución de alelos de las poblaciones de cepas no vínicas se presenta en la Figura 2.14d. De forma semejante a lo observado en las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*, los alelos de las cepas no vínicas se agrupan tanto en alelos vínicos, como no vínicos. Las cepas de Brasil de destilerías, presentan 4 alelos y la de agua de río 2 alelos. Todos los alelos de las cepas de destilerías, y uno de la cepa de agua de río se agruparon con los alelos vínicos. Solo el alelo 81, de la cepa de río, está cerca del grupo de los alelos no vínicos, pero presenta evidencias de posibles sucesos de recombinación. Las cepas de sake y de otras fermentaciones de Japón presentan 8 alelos distintos, y las de otras fermentaciones de Asia 5. En ambos casos, los alelos están distribuidos tanto en el grupo de alelos vínicos como en el de no vínicos.

Los 8 alelos de las cepas de masato de Perú se agruparon con los alelos no vínicos. Por otro lado, los 13 alelos de las cepas de chicha de jora, fermentación tradicional también de Perú, están distribuidos de la siguiente manera: 9 en el grupo no vínico y 4 en el vínico. Los 4 alelos vínicos son alelos de cepas heterocigotas que presentan el otro alelo del grupo no vínico. Los alelos de las cepas de agave, así como las de otras fermentaciones tradicionales de México, muestran una distribución semejante a las cepas de chicha de jora de Perú, es decir, se distribuyen tanto en el grupo vínico, como en el grupo no vínico. Además, se observa que los alelos 49 y 50 detectados en dos cepas aisladas de tejuino presentan posibles fenómenos de recombinación. También, los 8 alelos de las cepas no vínicas de África muestran una distribución en el grupo vínico como no vínico.

La distribución de alelos de cepas no vínicas europeas se muestra en la Figura 2.14d. Las cepas cerveceras presentan 9 alelos y las de sidra 4 alelos, tanto en el grupo de cepas vínicas como en el de no vínicas. Los alelos de las cepas de ambientes naturales presentan 4 alelos vínicos y 2 no vínicos. En cambio los alelos de las cepas de alpechín y olivas se agruparon con los alelos vínicos.

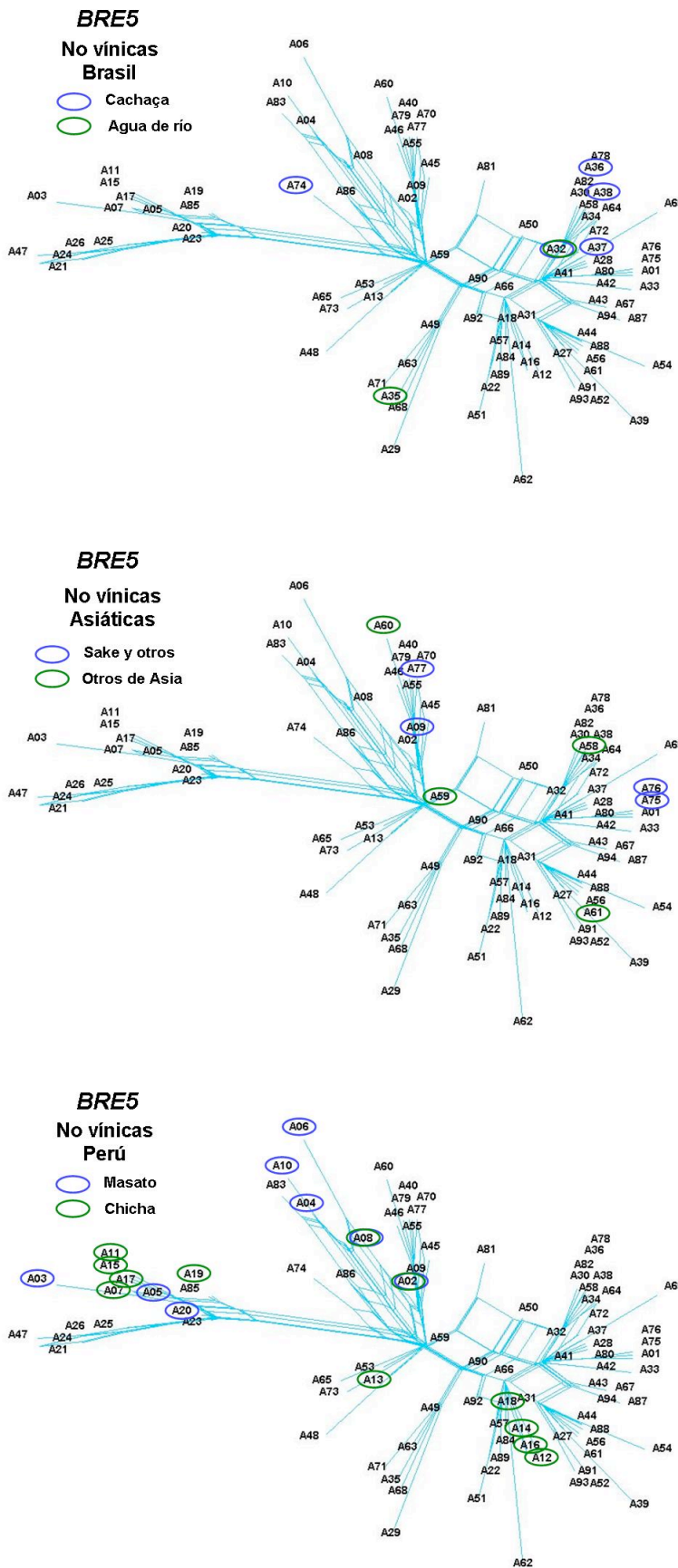
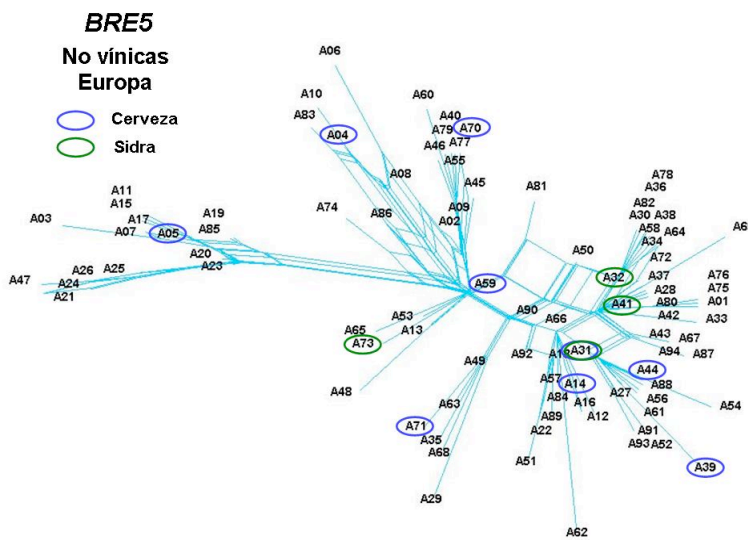
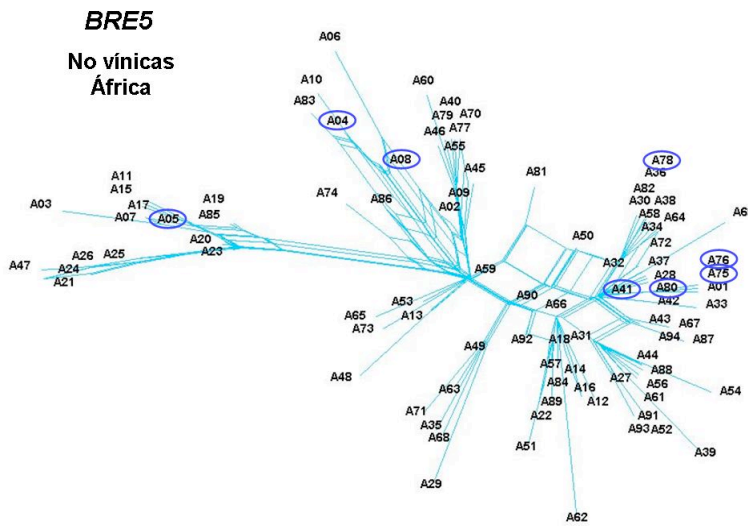
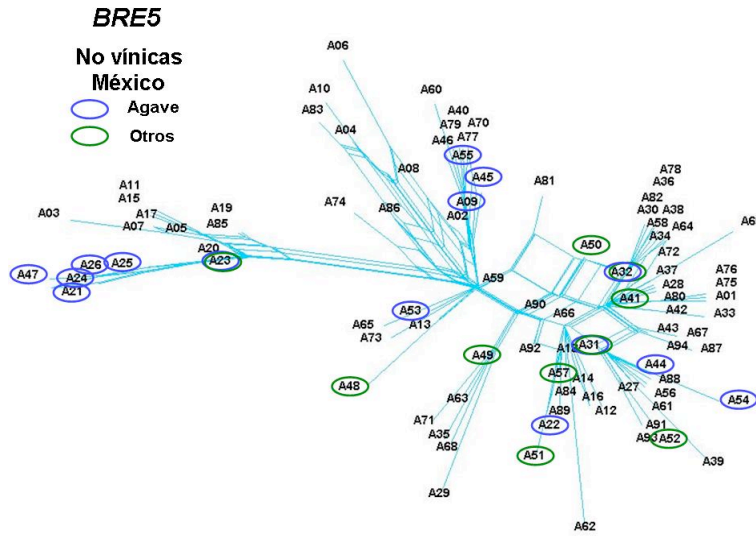
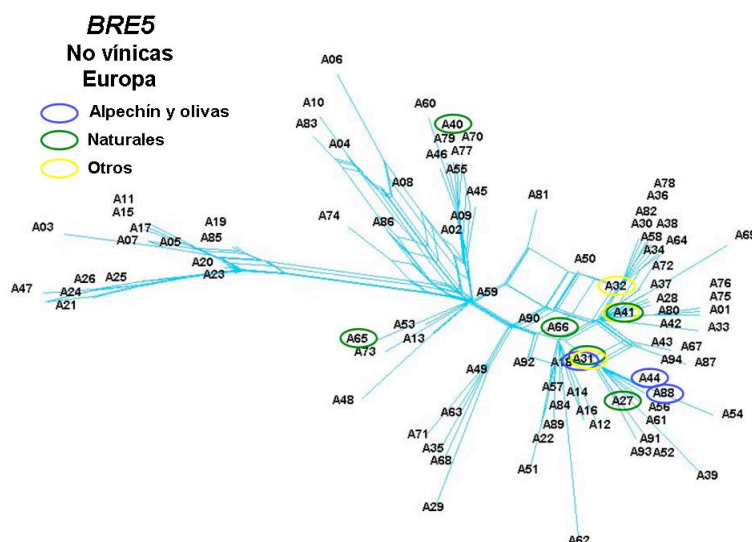


Figura 2.14d. Red filogenética de la región nuclear *BRE5* con los alelos detectados en las poblaciones no vînicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones no vînicas se indica con un círculo azul, verde o amarillo.



Continuación Figura 2.14d



La distribución de alelos de la región *BRE5*, considerando las diferentes poblaciones geográficas y las fuentes de aislamiento de las cepas de *S. cerevisiae*, es semejante a la de las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*. De nuevo, se observa que las cepas vñicas forman un grupo homogéneo, aun cuando se analizan las diferentes poblaciones o cuando se incluyen todas las cepas aisladas de ambientes vñicos. En algunas poblaciones, como son la de Sudáfrica, Chile y centro de Europa, se detectan alelos que se agruparon con los no vñicos (5 de Sudáfrica, 1 de Chile y 1 de Suiza). En cambio, las cepas aisladas de ambientes no vñicos, como son las de sake, chicha, agave, otras fermentaciones de México y de África, así como de cerveza y sidra, presentan una distribución tanto en el grupo de alelos vñicos como en el de no vñicos.

Para comparar la diversidad genética de las cepas vñicas con las no vñicas se obtuvieron las estimas de diversidad genética mediante el uso del programa DNAsp (Tabla 2.5). Se utilizaron los 486 alelos de 243 cepas de *S. cerevisiae*, 250 provienen de cepas vñicas y 236 de cepas no vñicas en las cuales se detectaron 37 y 67 sitios polimórficos con 35 y 66 alelos, respectivamente. La diversidad de alelos es de 0,811182 para los alelos de cepas vñicas, y de 0,93603 para las cepas no vñicas. La diversidad nucleotídica por sitio, π , se estimó en 0,00343 y 0,00992 para cepas vñicas y no vñicas; y el estimador de θ de Watterson de 0,00899 y 0,01644,

respectivamente. Estos resultados muestran que la diversidad genética de las cepas vónicas es menor que las de las no vónicas y confirman lo observado en el análisis filogenético.

Tabla 2.5. Diversidad genética de las cepas vónicas y no vónicas de *S. cerevisiae* para la región génica *BRE5*. n, número de secuencias; S, Sitios segregantes o polimórficos; π , Diversidad nucleotídica (Tajima, 1983); θ , Diversidad nucleotídicas (Watterson, 1975); Hd, Diversidad alélica (Nei, 1987).

	Alelos de cepas		Total
	vónicas	no vónicas	
n	250	236	486
S	37	67	79
No. alelos	35	66	90
Hd	0,81118	0,93603	0,91395
π	0,00343	0,00992	0,00765
θ	0,00899	0,01644	0,01731

Otra forma de evaluar la diversidad genética es mediante el análisis de la frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias, en este caso de alelos de cepas vónicas y los de cepas no vónicas para la región génica *BRE5* (Figura 2.15). Se observa que los alelos de las cepas vónicas presentan pocas diferencias nucleotídicas en comparación con los alelos de las cepas no vónicas. El 77% de las comparaciones de los alelos de las cepas vónicas presentan menos de cuatro diferencias; con la siguiente distribución de frecuencias: el 26% de las comparaciones presentan una diferencia, el 18% con ninguna diferencia, el 17% con dos diferencias y el 16% con tres diferencias (Figura 2.15a). En cambio, las comparaciones de alelos de las cepas no vónicas muestran una distribución diferente a la de las cepas vónicas. El 44% de las comparaciones presentan de 7 a 10 diferencias, el 10% de las comparaciones presentan de 11 a 13 diferencias, el 20% con menos de cuatro diferencias y solo el 6% sin diferencias (Figura 2.15b).

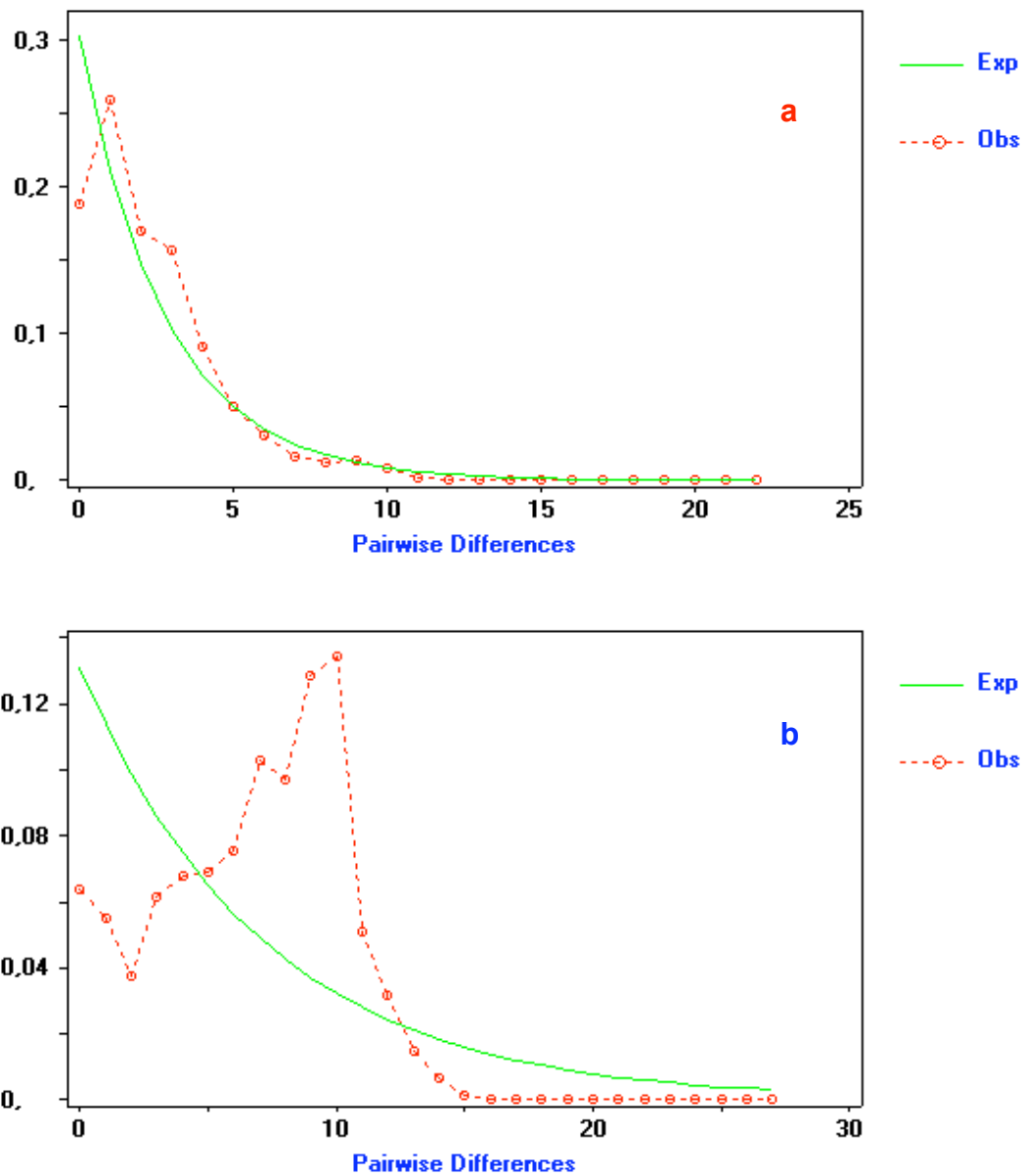


Figura 2.15. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de *BRE5* de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de *S. cerevisiae* (Obs) y bajo una población estable de tamaño constante y sin recombinación (Exp).

Los datos obtenidos del análisis filogenético y de las estimas de diversidad genética de *BRE5* coinciden con los de otras regiones génicas analizadas. Las cepas vínicas presentan pocas diferencias nucleotídicas entre ellas, lo que hace que la población sea muy homogénea con pocos alelos y éstos con menor diversidad nucleotídica que las cepas aisladas de ambientes no vínicos.

Capítulo 2

Para determinar las relaciones filogenéticas entre los alelos de cepas vínicas y no vínicas, se procedió a la detección de fenómenos de recombinación y/o conversión génica mediante el programa DNAsp, para evitar errores en el análisis. Este efecto se puede observar también en la red filogenética mostrada en la Figura 2.14 donde se muestran alelos con más de una línea que une a otros alelos formando las redes, lo que indica una alta probabilidad de fenómenos de recombinación. El mínimo número de sucesos de recombinación detectados con el programa DNAsp para la región génica *BRE5* es de 9 entre los sitios: (58,145), (162,186), (186,213), (213,293), (409,420), (440,464), (464,497), (497,562) y (568,634). Después de comprobar visualmente los fenómenos de recombinación, se detectaron 26 alelos recombinantes y 64 sin recombinación.

Como se ha realizado para otras regiones génicas estudiadas y debido a que se ha observado que las cepas vínicas forman una población homogénea con poca variabilidad genética, esto permite denominar alelo vínico al que proviene de una cepa vínica, y alelo no vínico si proviene de cepas de otros procesos de fermentación o de ambientes naturales, grupo donde se encuentran todas las cepas con distinto origen de aislamiento. Así los alelos se agruparon en vínicos y no vínicos, y los que se detectaron con recombinación se incluyeron en el grupo de alelos no vínicos para identificar la presencia de conversión génica entre los dos grupos, con el programa DNAsp. Después de formar los dos grupos de alelos, la distribución fue de la siguiente manera: el grupo vínico está compuesto por los 34 alelos vínicos, y el grupo de los no vínicos por 56 alelos, 30 no vínicos y los 26 con recombinación. Al realizar el análisis de conversión génica entre los grupos no se detectaron zonas de conversión génica entre los grupos.

En total se detectaron 26 alelos con recombinación que no se incluyen en el análisis filogenético, por lo que se utilizaron 64 alelos para la obtención del árbol filogenético mediante parsimonia con el programa TCS21 (Figura 2.16). A diferencia de las secuencias de las regiones *EGT2* y *CAT8*, donde se identificaron dos grupos de alelos, vínicos y no vínicos, con varios cambios nucleotídicos asociados a cada grupo de alelos, en ésta región génica las diferencias nucleotídicas entre cepas vínicas y no vínicas son muy pocas. A

pesar de esto, las cepas vínicas se agrupan juntas y el resto de cepas no vínicas en varios grupos. Así la única diferencia entre los alelos vínicos y no vínicos es un cambio en la posición nucleotídica 592, los alelos vínicos presentan el cambio nucleotídico **A** y los no vínicos con una **G**. Sin embargo, se detectaron 10 clados diferentes en total, seis con alelos vínicos denominados clado 1 hasta el 6 y cuatro no vínicos, clados 7 al 10. Aún cuando no se observan grandes diferencias nucleotídicas entre alelos vínicos y no vínicos, son mayores las diferencias nucleotídicas dentro de cada clado.

En total se identificaron 90 alelos de los cuales 36 son vínicos y presentan una **A** y 30 alelos no vínicos con una **G**, en la posición nucleotídica 592. Además se identificaron 27 alelos con recombinación con cambios característicos de alelos previamente identificados como vínicos y no vínicos que se eliminaron para el análisis filogenético. El árbol filogenético obtenido muestra que existen pocos cambios entre alelos vínicos y no vínicos pero una gran diversidad dentro de los 10 clados identificados (Figura 2.16).

La distribución de alelos en los seis clados vínicos con los cinco cambios nucleotídicos en las posiciones 240, 404, 420, 443, 550 y 591, se muestra en el árbol filogenético (Figura 2.16) con las posiciones variables de las cepas vínicas (Figura 2.17), y es la siguiente: el clado 1 con los cambios nucleotídicos **GATAGA**, está compuesto por los alelos 1, 75 y 76, presente en una cepa de Estados Unidos aislada de un higo y alelos en cepas de Japón, Ghana, Burkina Faso, de sake y cerveza de sorgo. El clado 2 que presenta los cambios nucleotídicos **TATTGA**, con los alelos 62, 57, 66, 84 y 14, está presente en cepas vínicas de Europa, Sudáfrica y granos keffyr de Japón con alelos en bebidas tradicionales de Perú y México, cepas vínicas de Chile, de cerveza de Bélgica y de agua de mar de Suecia. El clado 3 con los cambios **TTTTGG**, está formado por los alelos 49, 68, 63, 71 y 35 que se encuentran en cepas vínicas de Sudáfrica, Argentina y alelos de cepas de tejuino de México, vínicas de España, Sudáfrica, Argentina y Francia. El clado 4 con los cambios **GATTAA**, incluye los alelos 32, 36, 82, 72, 64, 30, 34 y 58 de cepas vínicas de Europa, Argentina y Sudáfrica con alelos en Brasil, Chile, México y Argentina. En el clado 5 con los cambios **TACTGA**, están los alelos 72, 32, 30, 82, 34, 36, 58 y 64 con cepas vínicas de Europa, Sudáfrica, Argentina y Chile, de destilerías de

Capítulo 2

Brasil, fruta fermentada en Indonesia, tuba de México y alelos en cepas de tejuino y agave de México. En el clado 6 que presentan los cambios **GATTGA**, se incluye a los alelos 41, 37, 94, 33, 28, 80, 42, 78 y 69 con cepas vínicas de Europa, Sudáfrica, Chile, Argentina, sidra de Irlanda, sake de Japón y vino de palma de Nigeria, con alelos en cepas de tepache de México, vino de España, Chile y Argentina, destilerías de Brasil y de agua marina de Suecia.

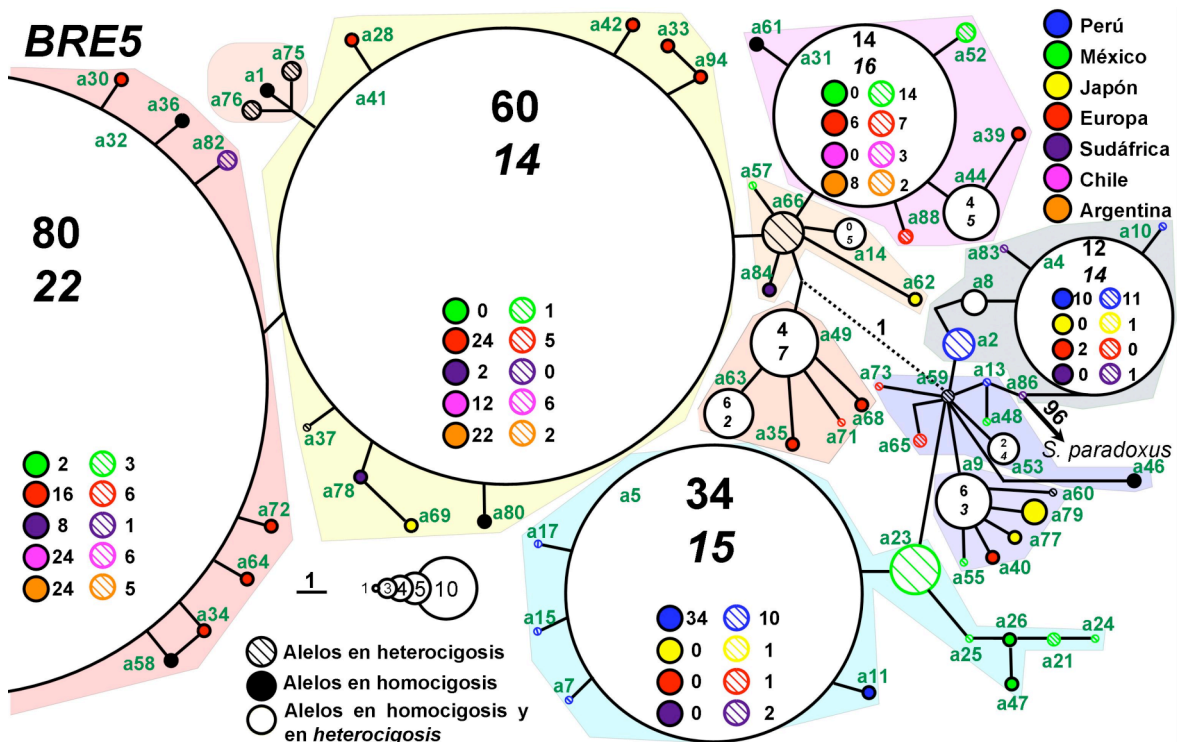


Figura 2.16. Árbol obtenido con parsimonia estadística, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas (longitud de las ramas) necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica *BRE5*. Las cepas que presentan el mismo alelo están incluidas dentro del círculo que es proporcional a su frecuencia. La raíz del árbol está indicada por una flecha, y se utilizó como outgroup la secuencia de la región génica *BRE5* de *S. paradoxus*. El color de fondo indica cada uno de los grupos detectados en el análisis filogenético.

Capítulo 2

cepas de bebidas tradicionales de Perú y México, y alelos de Perú, México, cerveza de Bélgica, sake de Japón y cerveza de sorgo de Burkina Faso. El clado 9 con los cambios nucleotídicos **AAATAGCCCGG** contiene los alelos 77, 9, 79, 40, 55 y 60, en cepas de brandy de sorgo, y sake de Japón y cerveza de Hungría con alelos en bebidas tradicionales de México, Perú, vónicas de Chile y de cacao fermentado en Indonesia. En el clado 10 con los cambios nucleotídicos **AAATGTCCCGG**, están los alelos 48, 13, 73, 53, 59, 65 y 46, en cepas de vino de palma de Pakistán y uvas de Rusia, con alelos de cacao fermentado de Indonesia, bebidas tradicionales de Perú y México, flor de España, salmón de Suecia y cerveza y sidra de Irlanda.

Los 28 alelos en homocigosis incluidos en los seis clados vínicos son el 1, 62, 66, 84, 35, 49, 63, 68, 31, 39, 44, 61 30, 32, 64, 58, 34, 36, 72, 82, 28, 41, 80, 78, 69, 94, 33 y 42 con cepas homocigotas vínicas de Europa, Sudáfrica, Argentina y/o Chile, así como de otros substratos tales como destilerías de Brasil, vino de palma de Nigeria, cerveza kaffyr de Sudáfrica, vino de Japón, flor de *Lychee* de China y cerveza de Inglaterra, entre otras. Los 14 alelos en homocigosis de los cuatro clados no vínicos son el 4, 8, 5, 11, 23, 26, 47, 9, 40, 77, 79, 46 y 53, que incluyen cepas de bebidas tradicionales de Perú y México, vino de palma de Costa de Marfil, vino "bili" del oeste de África, sake de Japón, cerveza de Bélgica, y vino de palma de Pakistán, entre otras.

La distribución de cepas heterocigotas para la región génica *BRE5* se muestra en la Figura 2.16. En ella se observa que se identificaron 88 cepas heterocigotas de las cuales 22 son de Europa, 16 de bebidas tradicionales de México, 14 de masato y 8 de chicha de Perú, 9 de Chile, 6 de Argentina y 5 de Sudáfrica. En Brasil, Japón y Burkina Faso se encontraron 2 cepas heterocigotas, y en Indonesia y Ghana se encontró una cepa heterocigota.

Como se observa con los resultados de distribución de cepas con la región génica *BRE5*, la estructura poblacional de las cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica es muy compleja y se muestra en el árbol filogenético (Figura 2.16) y los genotipos identificados (Figura 2.20). La población homocigota vínica está representada por los alelos 31, 32 y 41 con las cepas Arg17, Arg18; 169MX y Arg8; y Arg7 y Arg10, en los clados 4, 5 y 6, respectivamente. Algunas cepas de la población homocigota no vínica de Perú son la 12PE y 15PE en el alelo 4, y las cepas 7PE y 20PE del alelo 5, agrupadas en el clado 7 y 8, respectivamente. Además se encontraron cepas heterocigotas con alelos del mismo o de dos clados diferentes identificados en el árbol filogenético (Figura 2.16). Algunos ejemplos de heterocigotos con alelos del mismo clado son las cepas 107MX, 109MX, 47PEM, 30PEC, GU4_MX y por otro lado, las cepas heterocigotas con alelos de diferente clado son la 61PEC, L757, L846, 68PEC, 24MX, Arg13, Arg14, L531, L494, 192MX, 94MX, 183MX y 175MX.

Capítulo 2

Como se ha demostrado con las otras regiones génicas analizadas, con *BRE5* es posible detectar la estructura compleja de la población de cepas no vínicas y una alta variabilidad genética. Por otro lado, se observa que la población de cepas vínicas muestra menos variabilidad genética que la no vínica.

Cepa	Alelo	Posición nucleotídica	
		11111111111122222222333333334444444444445555555555556666666666666666	33566667722234446688001244899124446790011244466899003334456677990001223344566677 1687849814590305825692516473201236314589544908003734267361265602859123492154734724647
S288c	A01	CACATACATAAATAGCTTGAAGCAAAAAGGATAGCACCTCGATTGTCAAGCAGCACCGAGTGCGAAAAGAGCAGAGCACCATC	
Arg17	A31C.....T.....C.T.....	
Arg18	A31C.....T.....C.T.....	
169MX	A32C.....T.....A.....	
Arg8	A32C.....T.....A.....	
Arg7	A41C.....T.....	
Arg10	A41C.....T.....	
12PE	A04C.....G.....G.T.....T.T.T.....GG.....	
15PE	A04C.....G.....G.T.....T.T.T.....GG.....	
7PE	A05C.....T..T..C.....TT.....TA..GG.....A.....	
20PE	A05C.....T..T..C.....TT.....TA..GG.....A.....	
107MX	A31C.....T.....C.T.....	
109MX	A52T.C.....T.....C.T.....	
47PEM	A04C.....G.....G.T.....T.T.T.....GG.....	
	A10C.....G.....G.T.....T.....T.T.T.....GG.....	
30PEC	A05C.....T..T..C.....TT.....TA..GG.....A.....	
	A07C.....T.....T..T..C.....TT.....TA..GG.....A.....	
GUAMX	A23C.....T..T..C.....TT.....A..GG.....A.....	
	A24C.....T.....T..TT.C.....TT.....A.....A..GG.....A.....	
61PEC	A08C.....G.....G.T.....T.T.....GG.....	
	A14C.....C.....T.....T.....	

Figura 2.20. Combinaciones alélicas de *S. cerevisiae* de vino y de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica *BRE5*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color del número de alelo en rojo indica que es vínico, el azul indica que es no vínico.

2.5 Análisis de secuencias de *GAL4* en *S. cerevisiae*.

Con la metodología descrita para las otras regiones génicas y utilizando los cebadores GAL4-5 y GAL4-3 (Tabla M4) se obtuvo la secuencia de la región génica *GAL4* de 244 cepas de *S. cerevisiae*, de diferente origen geográfico y substrato (Tabla M1). El alineamiento de las secuencias de la región génica *GAL4*, de longitud 658 pb (642 sin gaps), se utilizó para obtener una red filogenética por el método de NeighborNet del programa Splits Tree (Huson and Bryant, 2006). Este método permite el análisis filogenético intraespecífico sin perder información de eventos tales como la recombinación y conversión génica (Figura 2.21). Se identificaron un total de 82 alelos distintos de los que 21 se encuentran en cepas vínicas, identificados con un círculo rojo en la red filogenética (Figura 2.21a) y 65 en las cepas no vínicas, señalados con un círculo en azul (Figura 2.21b). Además se observa que los alelos 1, 3, 27 y 58 se encuentran tanto en cepas vínicas (Figura 2.21a) como no vínicas (Figura 2.21b).

Según la red filogenética del gen *GAL4* se observa que las cepas vínicas, con poca variabilidad genética, forman un grupo homogéneo, excepto los alelos 3, 9, 71, 72 78. En cambio, los alelos no vínicos, con mayor variabilidad genética, están distribuidos en distintos grupos, y es notoria, la presencia de sucesos de recombinación.

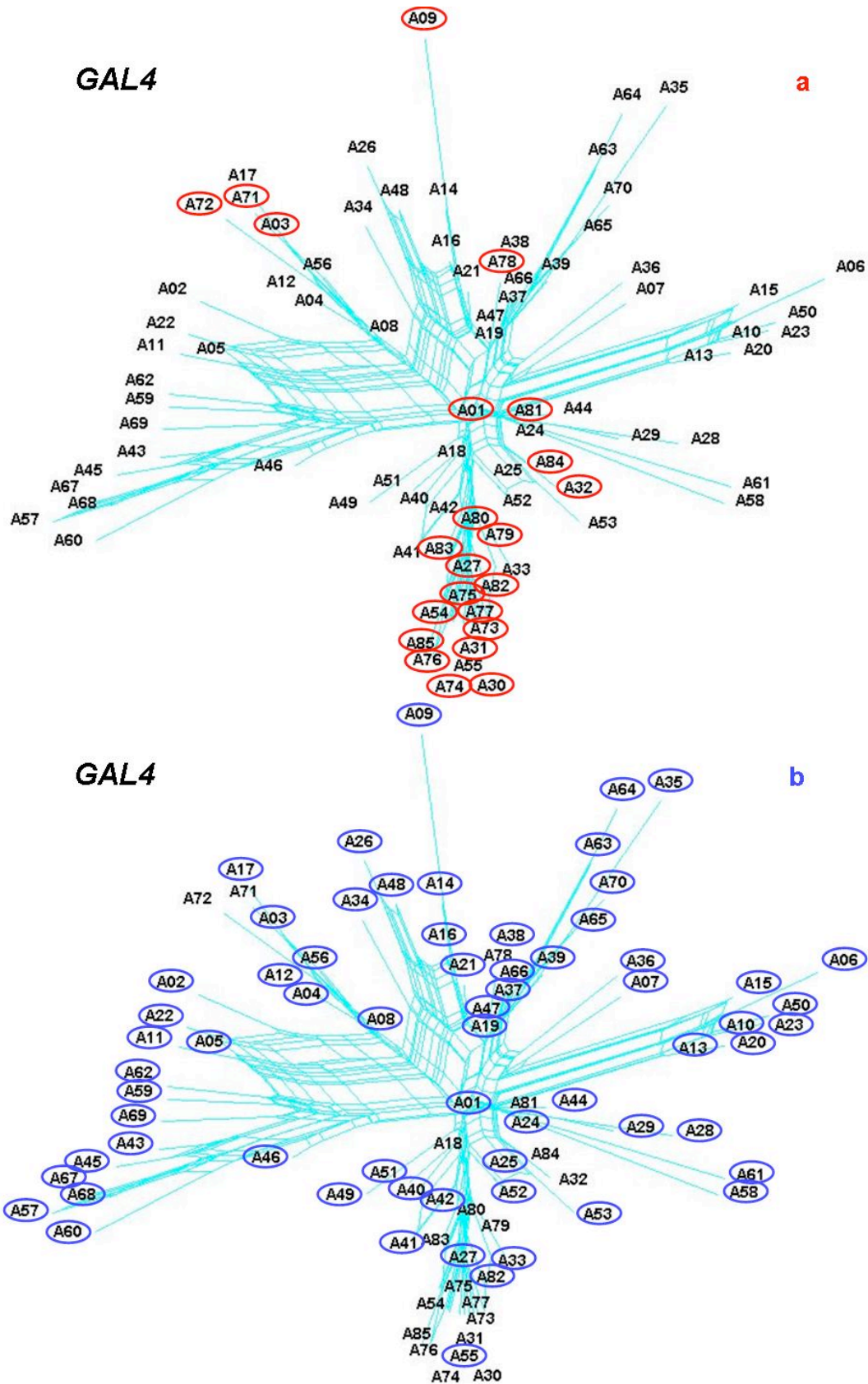


Figura 2.21. Red filogenética de la región nuclear *GAL4* con los alelos detectados entre los alelos de cepas vnicas (a) y de las aisladas de ambientes no vnicos (b) de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos detectados en cepas vnicas se indica en un círculo rojo (a) y los de cepas no vnicas en círculo azul (b).

Como se ha descrito para las otras 3 regiones génicas estudiadas, los alelos de las cepas vínicas forman un grupo homogéneo, en cambio, las no vínicas se distribuyen tanto en el grupo de las cepas vínicas como en el resto de la red filogenética. Para determinar si ocurre algo semejante en la región génica *GAL4*, se analizó la distribución de alelos de las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* considerando tanto el origen geográfico como la fuente de aislamiento de las cepas.

La distribución de alelos de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* de la región génica *GAL4*, considerando el origen geográfico y la fuente de aislamiento, se muestra en las Figuras 2.21c y 2.21d. Los 11 alelos de las cepas de Argentina forman un grupo, excepto el alelo 78, que se presenta en una cepa en homocigosis. Los 6 alelos de las cepas de Chile también forman un grupo, así como los 5 alelos de las cepas de Sudáfrica, excepto los alelos 3 y 72. Los alelos de las cepas vínicas europeas, 4 de España, 2 de Francia y 7 de centro de Europa, forman un solo grupo, aun cuando las cepas provienen de tres orígenes geográficos diferentes. Solo el alelo 3 que esta presente en la cepa CBS2897 de Suiza, no se agrupa con los alelos vínicos.

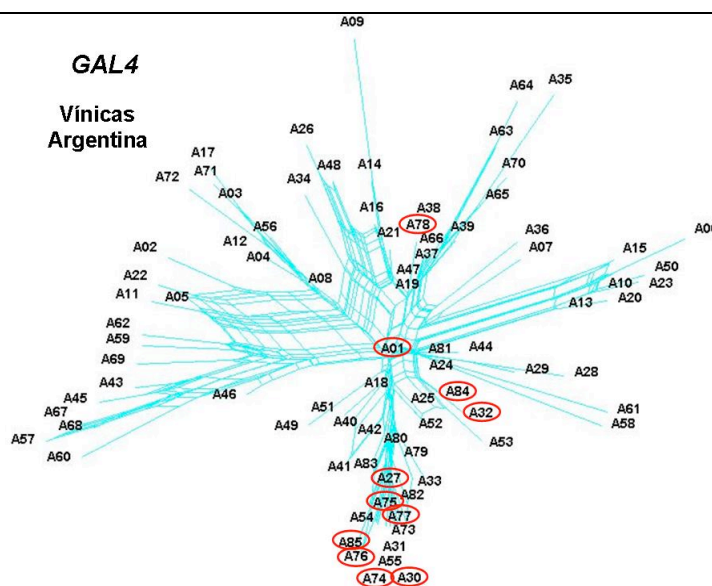
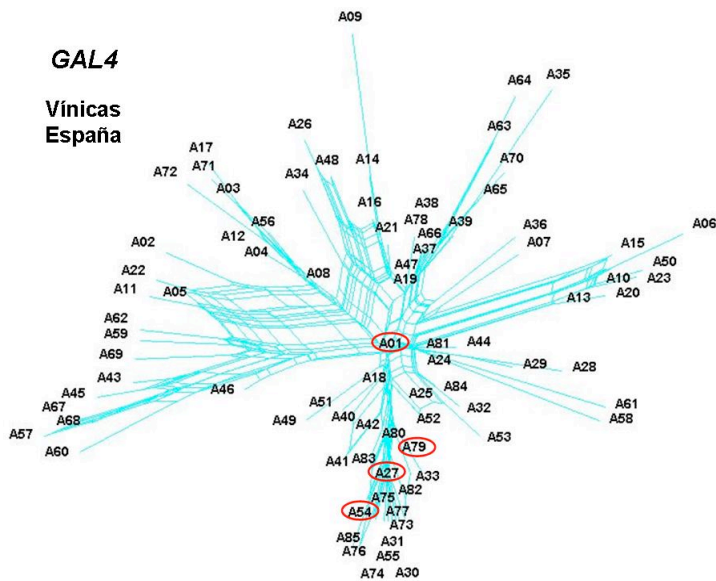
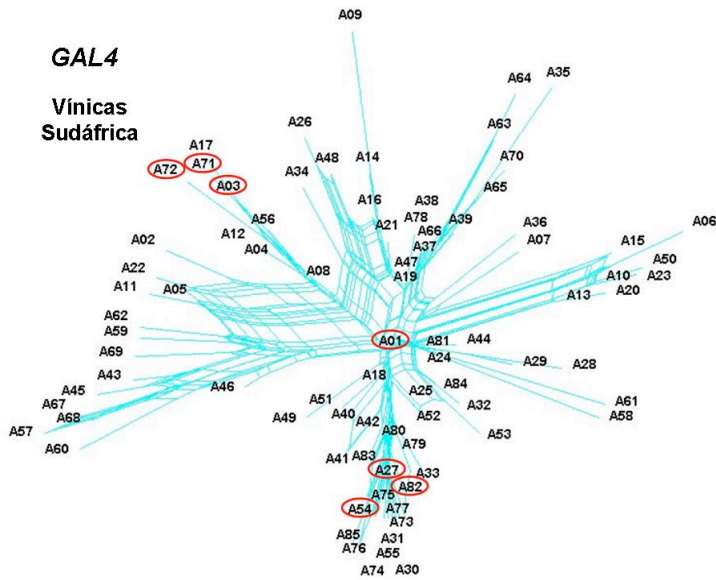
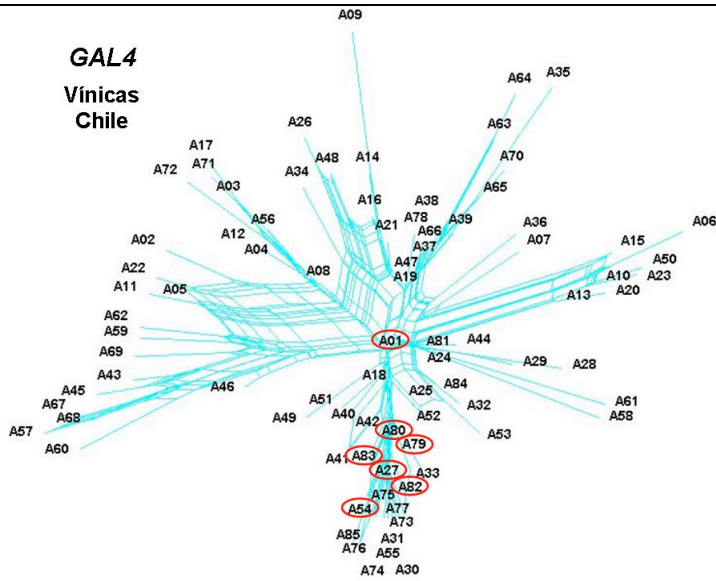
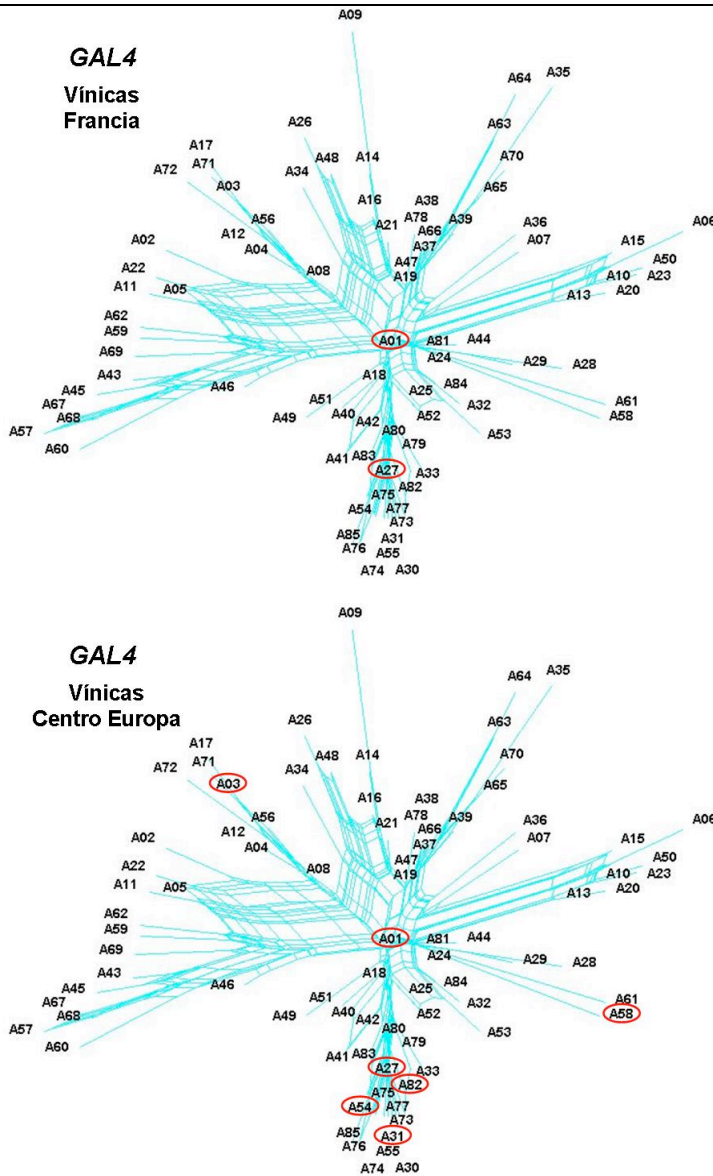


Figura 2.21.c. Red filogenética de la región nuclear *GAL4* con los alelos detectados en las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones vínicas se indica con un círculo rojo.



Continuación Figura 2.21.c.



La distribución de alelos de las cepas no vónicas para la región GAL4 se muestra en la Figura 2.21d. Los 3 alelos de cachaça y el de la cepa de agua de río de Brasil se agruparon con los alelos vónicos; los 10 alelos de las cepas de sake de Japón, están distribuidos por toda la red filogenética, y los 3 de otras fermentaciones de Japón, se distribuyen tanto en el grupo de alelos vónicos como no vónicos. Los alelos de las cepas de fermentaciones africanas están distribuidos en la red con 6 alelos.

Los alelos de las cepas de masato están distribuidos en la red filogenética con 13 alelos. Los 14 alelos detectados en las cepas de chicha de jora, se

agruparon tanto en el grupo de alelos de cepas vónicas como no vónicas. Los 11 alelos de las cepas de agave y los 13 de otras fermentaciones de México, están distribuidos en toda la red filogenética, es decir, tanto en el grupo de alelos vónicos como el de no vónicos. Asimismo, los 6 alelos de las cepas de cerveza y los 3 de las de sidra, se distribuyen tanto entre los alelos vónicos como entre los no vónicos. Por último, las cepas no vónicas europeas de ambientes naturales presentan 4 alelos, las cepas de alpechín y de olivas uno y 2 las de otros ambientes. Los alelos de cepas de ambientes naturales y otros se agruparon con los alelos vónicos y no vónicos, mientras que las de alpechín y olivas con los alelos vónicos.

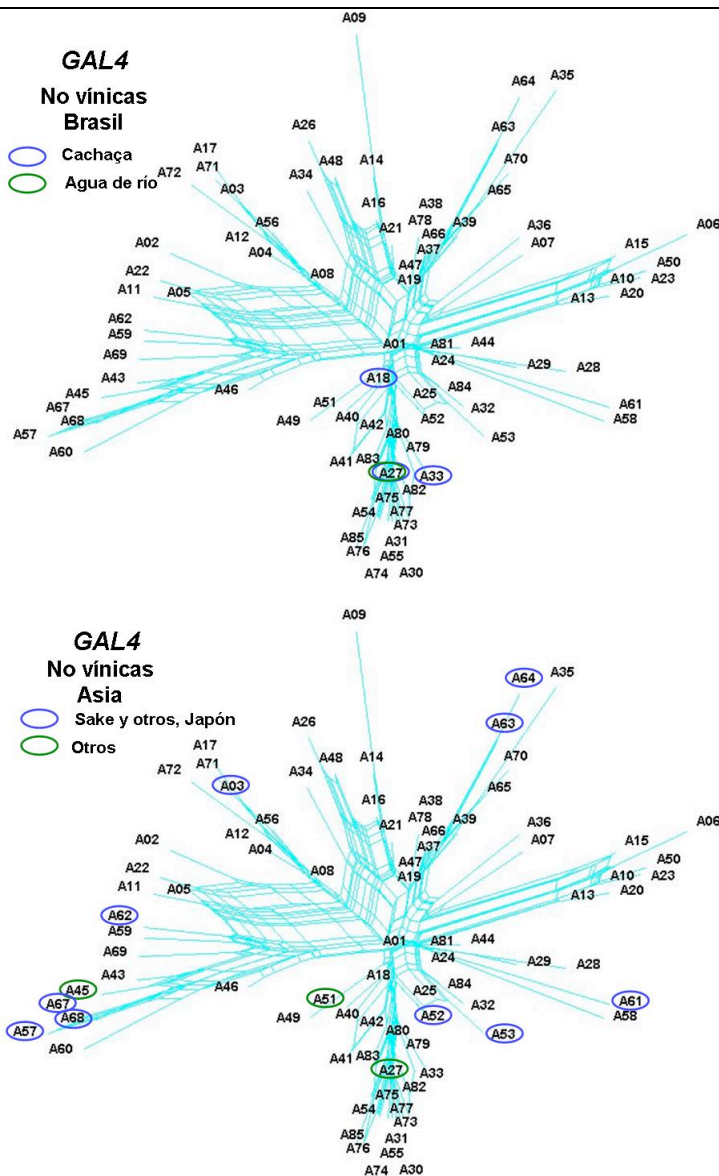
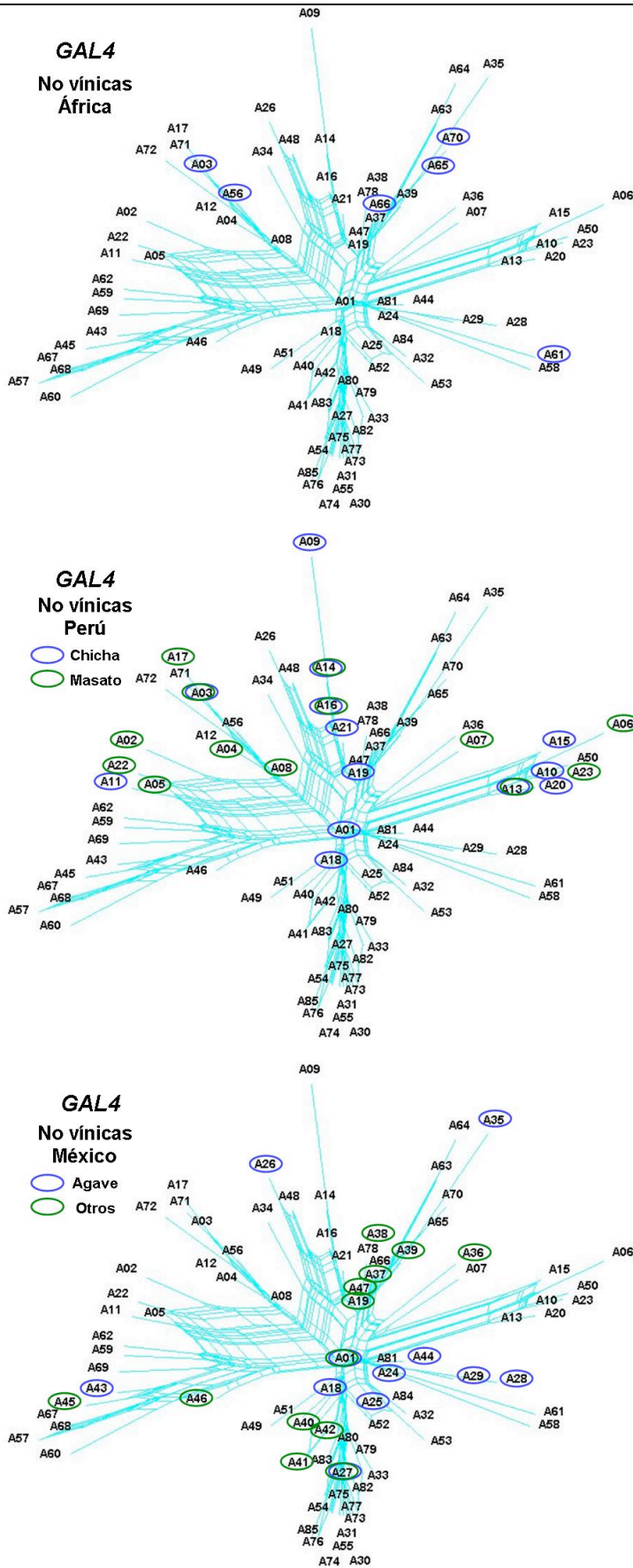
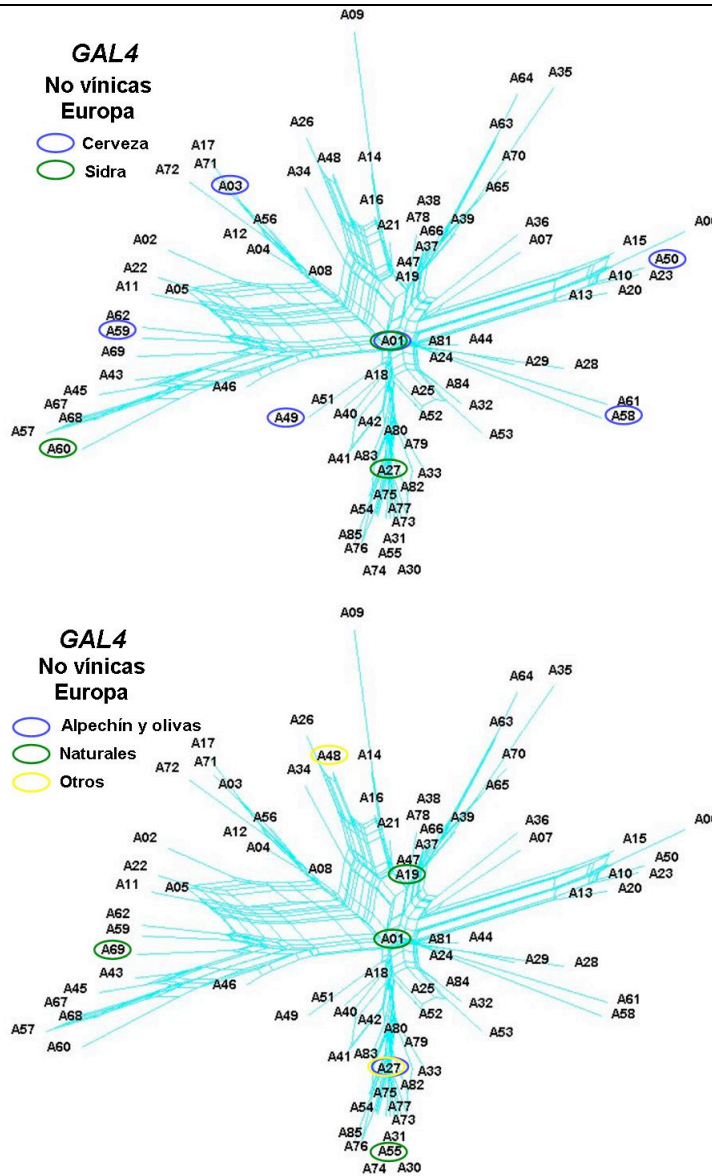


Figura 2.21d. Red filogenética de la región nuclear *GAL4* con los alelos detectados en las poblaciones no vónicas de *S. cerevisiae*. La distribución de los alelos en las cepas de poblaciones no vónicas se indica con un círculo azul, verde o amarillo.

Continuación Figura 2.21d.



Continuación Figura 2.21d.



La distribución de alelos en la región *GAL4*, considerando las diferentes poblaciones geográficas y la fuente de aislamiento de las cepas de *S. cerevisiae*, es semejante a la de las regiones génicas *EGT2*, *CAT8* y *BRE5*, ya que se observa que las cepas vñicas forman un grupo, aun cuando se analizan las diferentes poblaciones o cuando se incluyen todas las cepas aisladas de ambientes vñicos. En algunas poblaciones, como son la de Sudáfrica, Argentina, y centro de Europa, se detectan algunos pocos alelos que se agruparon con los no vñicos (3 de Sudáfrica, 1 de Argentina y 1 de Suiza). En cambio, las cepas aisladas de ambientes no vñicos, como son las de sake, chicha, agave, otras fermentaciones de México y de África, así como de

cerveza y sidra, presentan una distribución tanto en el grupo de alelos vínicos como en el de no vínicos.

Para comparar la variabilidad genética de las cepas vínicas con las no vínicas se determinó las estimas de diversidad genética mediante el uso del programa DNAsp (Tabla 2.6). Con 490 alelos de cepas de *S. cerevisiae*, 256 de cepas vínicas y 234 de cepas no vínicas, se detectaron 23 y 59 sitios polimórficos con 22 y 64 alelos. Se estimó una diversidad de alelos de 0,5730 para las cepas vínicas y de 0,9420 para las no vínicas. Las estimas de diversidad nucleotídica por sitio, π , es de 0,00254 y 0,00895 para cepas vínicas y no vínicas; y de θ de Watterson de 0,00585 y 0,01524, respectivamente. Como se ha observado en las otras regiones génicas analizadas, las cepas vínicas presentan menor diversidad genética que las cepas no vínicas.

Tabla 2.6. Diversidad genética de cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* para la región génica *GAL4*. n, número de secuencias; S, Sitios segregantes o polimórficos; π , Diversidad nucleotídica (Tajima, 1983); θ , Diversidad nucleotídicas (Watterson, 1975); Hd, Diversidad alélica (Nei, 1987).

	Alelos de cepas		Total
	vínicas	no vínicas	
n	256	234	490
S	23	59	65
No. alelos	22	64	82
Hd	0,5730	0,9420	0,8180
π	0,00254	0,00895	0,00649
θ	0,00585	0,01524	0,01495

Además se evaluó la diversidad genética mediante la estima de la frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias, en este caso de alelos de cepas vínicas (Figura 2.22a) y los de cepas no vínicas (Figura 2.22b) para la región génica *GAL4*. Se observa que los alelos de las cepas vínicas presentan pocas diferencias nucleotídicas en comparación con los alelos de las cepas no vínicas. El 86% de las comparaciones de los alelos de las cepas vínicas presentan dos o menos

diferencias; con la siguiente distribución de frecuencias: el 50% de las comparaciones sin diferencias y el 36% con una diferencia. En cambio, las comparaciones de alelos de las cepas no vínicas muestran una distribución diferente a la de las cepas vínicas. El 53% de las comparaciones presentan de 2 a 6 diferencias, el 12% de las comparaciones presentan 6 diferencias, el 9% con cinco diferencias, el 16% con cuatro diferencias, el 17% con tres diferencias y el 11 con dos diferencias. Con estos resultados se observa que las cepas vínicas presentan menos de tres diferencias, en cambio las cepas vínicas, con más variabilidad genética, presentan de cuatro a siete diferencias.

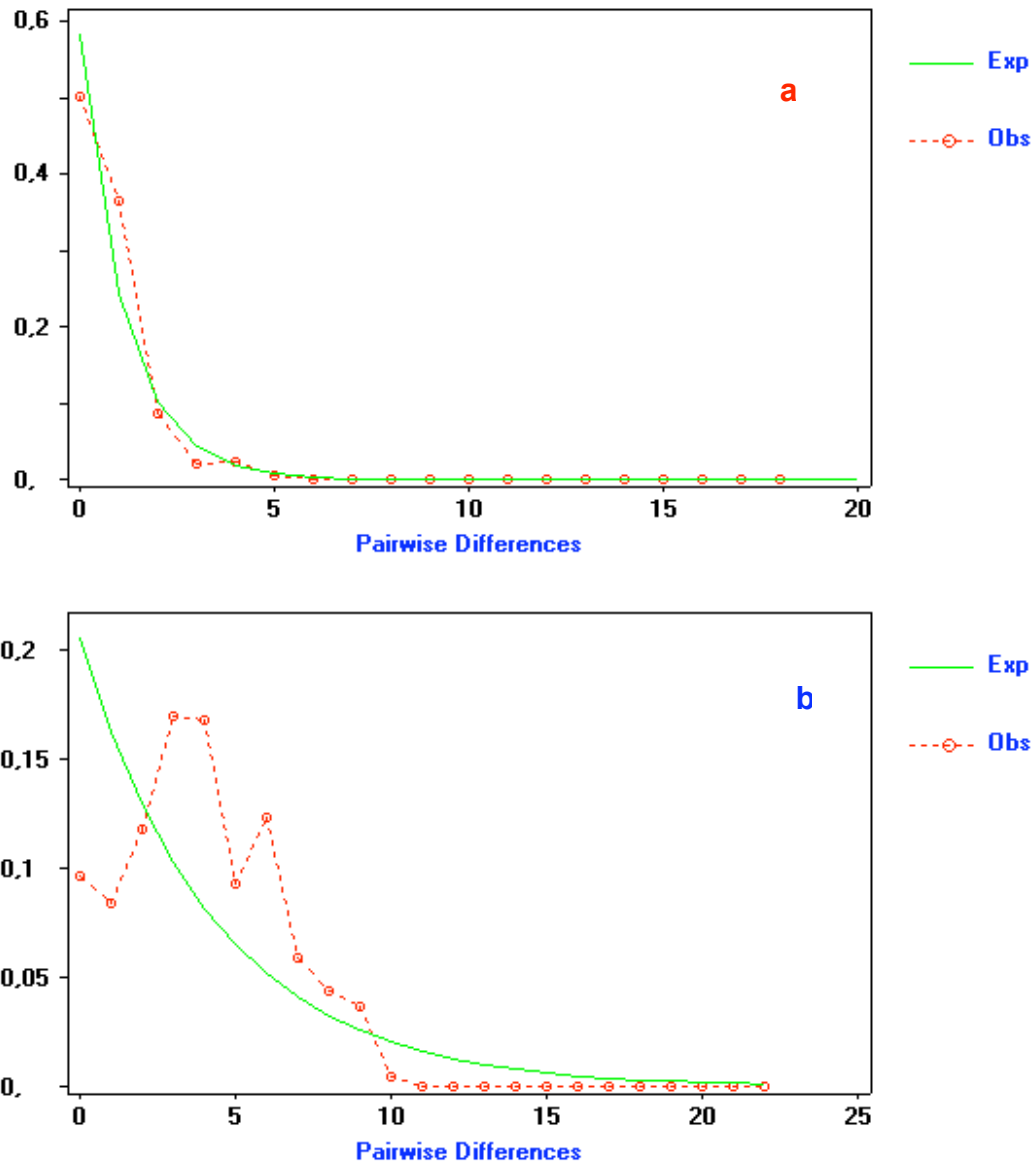


Figura 2.22. Frecuencia del número de diferencias nucleotídicas entre comparaciones de pares de secuencias de los alelos de *GAL4* de cepas vínicas (a) y de cepas no vínicas (b) de *S. cerevisiae* (Obs) y bajo una población estable de tamaño constante y sin recombinación (Exp).

En el árbol filogenético de los alelos de cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* de la Figura 2.21 muestra redes, lo que indica una alta probabilidad de fenómenos de recombinación y/o conversión génicas, por lo que se procedió a su detección mediante el programa DNAsp, para evitar errores en el análisis filogenético. El mínimo número de sucesos de recombinación detectados con el

programa DNAsp para la región génica *GAL4* es de 8 entre los sitios: (13,67), (70,174), (174,249), (249,310), (321,365), (388,488), (488,647) y (647,656). Con base en estos datos y después de comprobar visualmente los fenómenos de recombinación, se detectaron 29 alelos recombinantes y 52 sin recombinación.

Como se ha observado que las cepas vónicas es una población muy homogénea y con poca variación genética, se denominó alelo vónico al que proviene de una cepa vónica, y alelo no vónico si proviene de cepas de otros procesos de fermentación o de ambientes naturales. Los alelos se agruparon en vónicos y no vónicos, y los 29 alelos con recombinación se incluyeron junto con los no vónicos para identificar la presencia de conversión génica. El análisis mediante el programa DNAsp, permitió identificar dos alelos el 54 y 75 con una zona de conversión entre los sitios 35-70 y una distancia nucleotídica de 36 pb.

Con base a los resultados obtenidos, se detectaron 29 alelos con recombinación y dos de ellos con conversión génica. Por tanto 52 alelos se incluyeron en el análisis filogenético, por medio de parsimonia con el programa TCS21 (Figura 2.23). Al contrario de las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*, donde se detectó un grupo de alelos con cepas vónicas y otro de cepas no vónica, con varios cambios nucleotídicos asociados a cada grupo de alelos, en *GAL4* no se logró esta separación de alelos en vónicos y no vónicos con cambio nucleotídicos asociados a cada uno de ellos. Sin embargo, con el análisis filogenético se identificaron cinco clados, uno con alelos vónicos, tres con alelos no vónicos y uno con alelos de cepas vónicas y no vónicas, que resulta ser menos diferenciado (Figura 2.23).

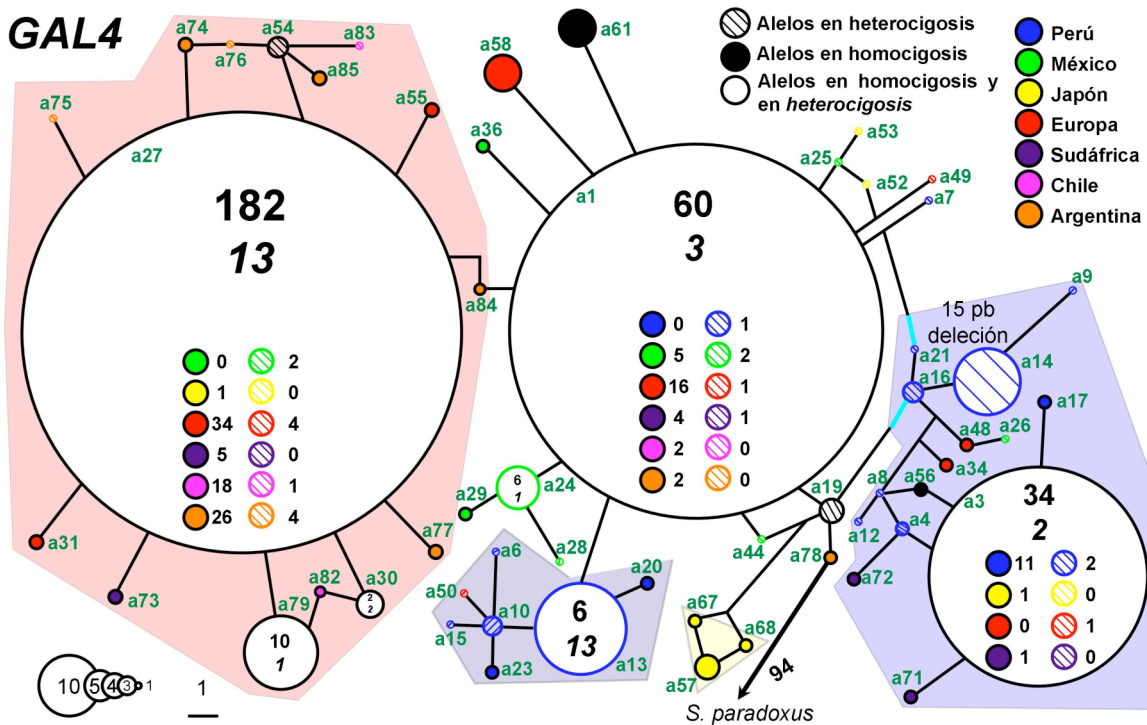


Figura 2.23. Árbol obtenido con máxima parsimonia, que minimiza el número de sustituciones nucleotídicas (longitud de las ramas) necesarias para conectar las diferentes secuencias alélicas de la región génica *GAL4*. Las cepas que presentan el mismo alelo están incluidas dentro del círculo que es proporcional a su frecuencia. La raíz del árbol está indicada por una flecha, y se utilizó como outgroup la secuencia de la región génica *GAL4* de *S. paradoxus*. El color de fondo indica cada uno de los grupos detectados en el análisis filogenético.

La distribución de cepas y alelos en los cinco clados se muestra en la Figura 2.23. El primer clado está formado por cepas vónicas, aunque se incluye a otros alelos no vónicos. Los tres clados con alelos no vónicos (2, 3 y 4) se describen a continuación: el primero con cepas de bebidas tradicionales de Perú, el segundo con cepas de bebidas de Japón y el tercer clado incluye cepas y alelos de bebidas tradicionales de Perú, entre otras. En el quinto clado comprende los alelos vónicos y no vónicos que no se agrupan en los otros cuatro, y provienen de cepas de diversos procesos fermentativos, vónicos y no vónicos, así como de ambientes naturales, por lo que este clado no está muy claro.

Se identificaron las posiciones variables con los cambios nucleotídicos de los 52 alelos de *S. cerevisiae* que se muestran en la Figura 2.24. Se tomó en cuenta que las cepas vínicas son poco variables y después de la identificación de los cambios característicos de los alelos de las cepas vínicas se observó que las posibles diferencias nucleotídicas entre los alelos vínicos y no vínicos son los cambios en las posiciones nucleotídicas 35, 70 y 174; los vínicos presentan los cambios nucleotídicos **TAC** y los no vínicos **CGG** (Figura 2.24).

La distribución de cepa y alelos en los cinco clados se muestra en la Figura 2.23. El clado 1 incluye los alelos 27, 31, 32, 55, 73, 74, 77, 85, 30, 54, 75, 76, 82 y 79, con los cambios nucleotídicos **TAC**, aunque este último está presente en otro clado, por lo que no es distintivo de las cepas vínicas. Este clado está formado por las cepas vínicas de Argentina, Eslovenia, Austria, España, Hungría, Italia, Francia, Suiza, Sudáfrica y Chile. Sin embargo, se incluye cepas no vínicas, tales como, de destilerías de Brasil, de bebidas tradicionales de México, de fruta fermentada de Indonesia, de flor de *Lychee* en China, de sake de Japón, de sidra de Irlanda, aceitunas en conserva de España y alelos en México, Brasil, Chile, Europa y Argentina.

Los tres clados considerados como no vínicos presentan los cambios **CGG** en las posiciones nucleotídicas 35, 70 y 174, y se describen a continuación. El primero de ellos con los cambios **TCT**, en las posiciones nucleotídicas 280, 321 y 388, está formado por los alelos 13, 20, 23, 10, 50, 6 y 15, con cepas de bebidas tradicionales de Perú y alelos en una cepa de cerveza de Bélgica. El segundo clado de alelos no vínicos presenta los cambios **CGGGTT**, en las posiciones nucleotídicas 13, 67, 176, 352, 485 y 551, y se encuentra en los alelos 57, 67 y 68 de Japón. El tercer clado presenta una **T** en la posición 249 y una **delección** de 15 pares de bases que inicia en la posición 217, en los alelos 3, 4, 8, 9, 12, 14, 16, 17, 21, 26, 34, 48, 56, 71 y 72, mayoritariamente en cepas y alelos de bebidas tradicionales de Perú. No obstante, se encontraron en una cepa aislada de mermelada en España, de melocotón de Hungría, de cerveza de Bélgica, cerveza de sorgo de Burkina Faso, sake de Japón, tequila de México, vino de palma de Costa de Marfil y vínicas de Suiza y Sudáfrica (Figura 2.24).

En el quinto clado de alelos se agrupan los que no presentan los cambios nucleotídicos de los otros clados, pero incluye cepas de diversos procesos fermentativos, vínicos y no vínicos, así como de ambientes naturales, por lo que este clado no está muy claro. Los alelos incluidos en este clado son 1, 7, 49, 52, 25, 53, 58, 61, 36, 84, 44, 24, 28, 29, 19 y 78, con cepas de bebidas tradicionales de México, aislada de higo de Estados Unidos, agua de mar de Suecia, uva de Rusia, sake de Japón, sidra de Irlanda, cerveza de Inglaterra e Irlanda, cerveza de sorgo de Burkina Faso y Ghana y cepas vínicas de Austria, España, Sudáfrica, Francia, Suiza, Argentina y Hungría con alelos en bebidas de Perú, México, en cerveza de Bélgica y granos keffyr de Japón (Figura 2.24).

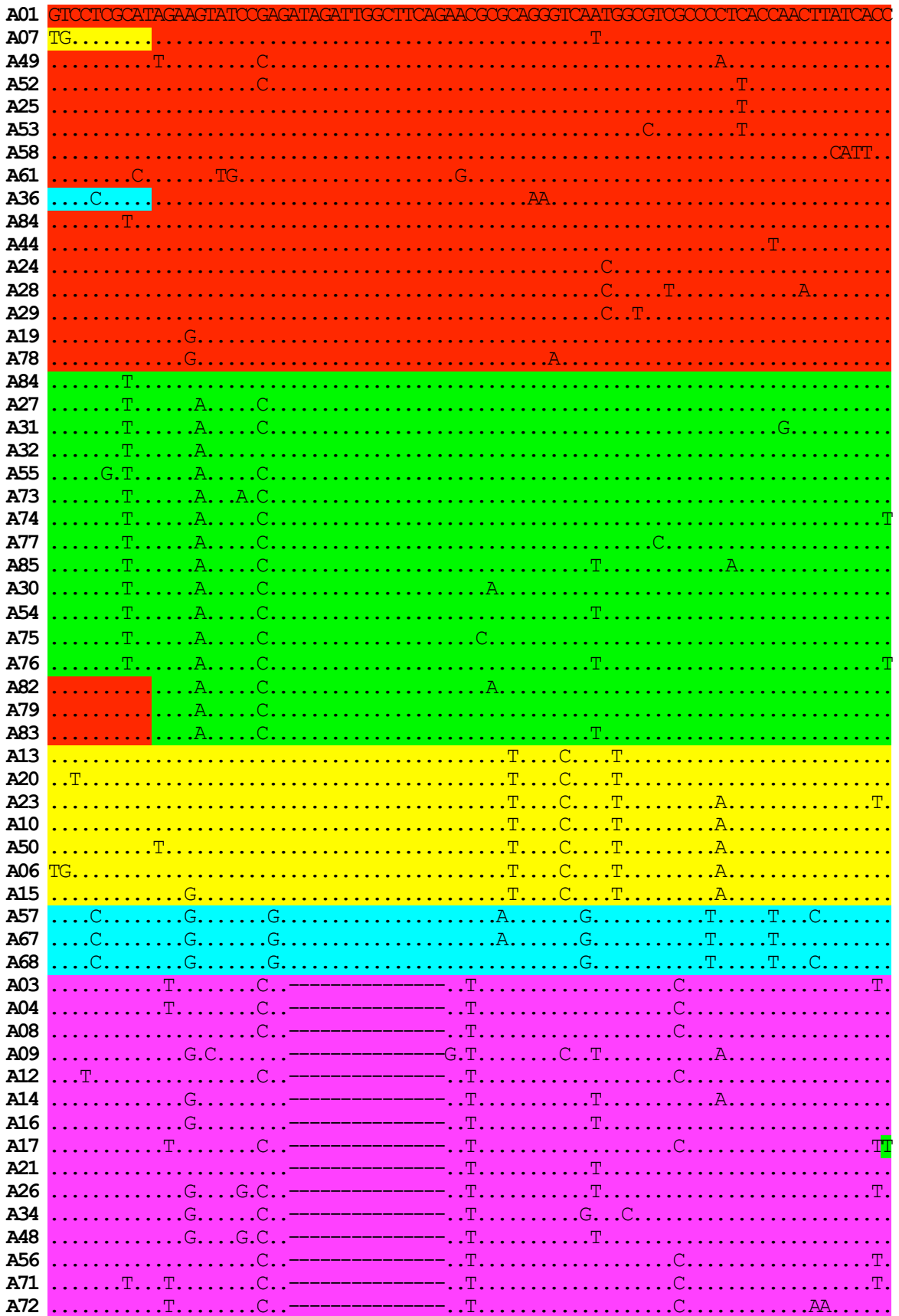


Figura 2.24. Posiciones nucleotídicas polimórficas de los alelos véricos y no véricos de *S. cerevisiae* en la región génica *GAL4*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia, el color del resaltado indica los diferentes alelos que componen cada grupo de alelos no véricos detectado.

total se detectaron 42 alelos en homocigosis, 11 en el clado denominado como vínico, 23 en los cuatro clados no vínicos y 8 en alelos con recombinación.

La distribución de alelos en homocigosis y heterocigosis de los cinco clados detectados para la región *GAL4* se presenta en la Figura 2.23. En el clado con alelos vínicos en homocigosis incluye el grupo de cepas vínicas de Europa, Sudáfrica, Argentina y Chile en los alelos 27, 31, 32, 73, 74, 77, 85, 30, 82 y 79. Sin embargo, el alelo 27 incluye la mayoría de las cepas vínicas homocigotas, pero también a la aislada de flor en España y de destilerías de Brasil, entre otras cepas no vínicas. Cabe mencionar que este clado incluye el alelo 55 presente en una cepa de un arbusto aislada en España.

El segundo clado incluye cepas homocigotas de chicha de Perú, de tequila, agumiel y tejuino en México, cepas vínicas de Europa, Argentina y Chile, la cepa CBS11838 aislada de uvas en Rusia, la CBS435 de sake en Japón y la CBS8855 y CBS8858 de cerveza de sorgo en Ghana y Burkina Faso. En el tercer clado las cepas homocigotas son las de sake de Japón. El cuarto clado está formado por cepas homocigotas de chicha y masato de Perú, la 24MX de agave de México, la 10691IC y 7903NG de vino de palma de Costa de Marfil y Nigeria, las cepas ZA4 y ZA20 de vino de Sudáfrica, la CBS4454 de cerveza kaffir de Sudáfrica, la 925 de Hungría aislada de pulpa de melocotón, la MRM aislada de mermelada de melocotón en España y la 1591ID de cacao fermentado de Indonesia. En el último y quinto clado están agrupadas algunas cepas de México, vínicas de Europa, Sudáfrica y Argentina, y CBS8291 y CBS8292 aisladas de agua marina de Suecia, en el alelo 01. Además, se agrupan las cepas 63PE y 68PE con el alelo 18, la 11838 de uvas de Rusia con el alelo 19, la 36Arg vínica de Argentina con el alelo 78. Las cepas CHA_MX, SOM_MX, 20MX, RG1_MX y la 94MX de bebidas tradicionales de México y que presentan los alelos 24, 29 y 36. Las cepas cerveceras 1384IE y 1387UK de Irlanda e Inglaterra, y la vínica 1479 de Hungría portan el alelo 58.

Algunos genotipos de las cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica se muestran en la Figura 2.26. De los 5 clados definidos solo se encontraron cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica homocigotas en los clados 1,

4 y 5. En el clado 1 se agrupan varias cepas vínicas de Argentina y Chile con los alelos 84, 27, 74, 77, 85, 82 y 79. En el clado 4 se agrupan los alelos que presentan una delección de 15 pares de bases, como los alelos 3,17 y 35 de cepas de Perú y una de México. En el clado 5 están varias cepas de Perú, México y Argentina con los alelos 1, 18, 78, 24, 29 y 36.

De aproximadamente 250 cepas de *S. cerevisiae* estudiadas, 56 de ellas resultaron heterocigotas para *GAL4*. La mayoría de cepas heterocigotas se encontraron en bebidas tradicionales de Latinoamérica. Así ocurre con 26 cepas de chicha y masato de Perú, 11 de diversas bebidas fermentadas de México, y 7 vínicas, 4 de Argentina y 3 de Chile. En cambio en Europa solo se encontraron como heterocigotas dos cepas vínicas, una de Austria y la otra de España, dos de sidra de Irlanda, una de Suecia de agua marina, y otra de cerveza de Bélgica. Por ultimo, se encontraron dos cepas de Japón, Brasil y de Sudáfrica. Algunos de los diferentes genotipos encontrados en las cepas latinoamericanas se muestran en la Figura 2.26.

Cepa	Alelo	Polimorfismos
Sc288c	A01	GTCCTCGCATAGAAGTATCCGAGATAGATTGGCTTCAGAACGCGCAGGGTCAATGGCGTGC CCCCTCACCAACTTATCACC
Grupo 3	A27T.....A.....C.....
	A27T.....A.....C.....
42PE	A17T.....C.....T.....C.....TT
	A17T.....C.....T.....C.....TT
63PE	A18C.....
68PE	A18C.....
RG1MX	A29C.....T.....
	A29C.....T.....
Grupo 1	A01
	A01
69PE	A20	..T.....T.....C.....T.....
	A20	..T.....T.....C.....T.....
10711JP	A57	...C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....C.....
1199JP	A57	...C.....G.....G.....A.....G.....T.....T.....C.....
Grupo 2	A03T.....C.....T.....C.....T.....
	A03T.....C.....T.....C.....T.....
ARSMX	A01
	A24C.....
Arg19	A27T.....A.....C.....
Arg25	A30T.....A.....C.....A.....
Arg23	A27T.....A.....C.....
	A75T.....A.....C.....C.....
56PE	A01
	A16G.....T.....T.....

Figura 2.26. Combinaciones alélicas de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales de Latinoamérica en la región génica *GAL4*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia.

1PE	A02C.....C.....T.....G.....T.....T.....
	A03T.....C.....T.....C.....C.....T.....
93PE	A22T.....C.....T.....G.....T.....C.....
	A03T.....C.....T.....C.....C.....T.....
2PE	A05C.....T.....G.....T.....C.....
31PE	A04T.....C.....T.....C.....C.....
7PE	A06	TG.....T.....C.....T.....A.....
	A07	TG.....T.....T.....
77PE	A10T.....C.....T.....A.....
	A21T.....T.....
175MX	A19G.....
	A47G.....
GU4	A25T.....
	A26G.....G.C.....T.....T.....T.....T.....
OX3	A27T.....A.....C.....
	A28C.....T.....A.....
102MX	A37C.....G.....C.....
	A38C.....G.....C.....
103MX	A39C.....G.....T.....
	A38C.....G.....C.....

Continuación Figura 2.26.

Los datos obtenidos del análisis filogenético y de las estimas de diversidad genética de *GAL4* coinciden con los de las otras regiones génicas analizadas. Las cepas vínicas constituyen una población muy homogénea con pocos alelos con menor diversidad nucleotídica que las cepas aisladas de ambientes no vínicos.

2.6 Análisis de los genotipos de las cepas estudiadas.

Para conocer la variabilidad genética de las cepas vínicas y no vínicas, se determinó el genotipo considerando las cuatro regiones génicas analizadas. En las 246 cepas de *S. cerevisiae* que se estudiaron en el presente trabajo y se obtuvo la secuencia de al menos tres de las cuatro regiones génicas, se identificaron 217 genotipos diferentes (Anexo 2), ya que solo 45 cepas comparten algún genotipo, tal como se muestra en la Tabla 2.7. Las restantes 201 cepas presentan un genotipo único. Los genotipos que se detectaron compartidos, están presentes tanto en la misma población, como en poblaciones diferentes. Las poblaciones vínicas de Argentina, Suiza, España, Sudáfrica y Chile, presentan 2 cepas con el mismo genotipo, y en el caso de Argentina se detectaron otras 4 cepas con el mismo genotipo. Asimismo las poblaciones no vínicas, chicha de Perú y sake de Japón, presentan 2 cepas con el mismo genotipo cada una.

Los genotipos compartidos en poblaciones diferentes, comprenden cepas vínicas con diferente origen geográfico, o bien de diferente fuente de aislamiento y origen geográfico. Se detectaron cinco genotipos compartidos en poblaciones vínicas con diferente origen geográfico. Como ejemplo, el genotipo 29 que esta presente en tres cepas vínicas, de Argentina, Chile y Suiza; el genotipo 36 que esta en tres cepas vínicas de Argentina, Chile y Sudáfrica; el genotipo 144 que esta compartido por 2 cepas vínicas, una de Argentina y la otra de Austria. El genotipo 47, es el más frecuente, ya que se detectó en 7 cepas vínicas con diferente origen geográfico, 3 de Argentina y una de Austria, de Chile, de Francia y de Sudáfrica. El genotipo 48, también es uno de los más frecuentes con 6 cepas vínicas, 4 de Argentina, 1 de Francia y otra de Italia. Es interesante mencionar que se detectaron 2 genotipos compartidos en cepas

con diferente origen geográfico y fuente de aislamiento. El genotipo 45 que está presente en la cepa 14Arg, vínica de Argentina, y la 678HU, no vínica de Hungría; y el genotipo 117, que se detectó en la cepa 94PE de masato de Perú y la CBS8857 de cerveza de sorgo de Burkina Faso. Cabe hacer notar que dos cepas, la NCAIM Y770 de Hungría y la CECT11001 de Bélgica, comparten el genotipo de los genes nucleares; sin embargo, el gen mitocondrial COX2 (que se discute en el Capítulo 3) corresponde a *S. bayanus*, por lo que se consideraron como híbridos *S. cerevisiae* x *S. bayanus* y no se incluyeron en posteriores estudios. Es interesante remarcar que la cepa CECT11001 mostró también alelos “*cerevisiae*”, en el análisis de restricción de otras 5 regiones génicas (González et al., 2006)

Se identificaron las cepas homocigotas con el análisis de las secuencias de las cuatro regiones nucleares. De las 246 cepas, 129 presentan alelos en heterocigosis en al menos una de las regiones génicas, y 117 cepas se detectaron como homocigotas para los cuatro genes analizados. Las cepas homocigotas son: 26 vínicas de Argentina, 8 de Austria, 12 de Chile, 4 de Eslovenia, 13 de España (9 vínicas y 4 no vínicas), y 10 de Sudáfrica. Entre las cepas no vínicas se identificaron en homocigosis a 6 cepas de Japón (1 vínica y 5 no vínicas), 4 de México, 8 de Perú, 2 de Bélgica, y 14 de diferente origen geográfico cada una (Tabla 2.7).

Figura 2.7. Genotipos compartidos entre las cepas de *S. cerevisiae*.

Cepa	País	Fuente de aislamiento		EGT2	CAT8	GAL4	BRE5				
55	Perú	Chicha	9	3	3	3	3	13	13	5	5
91	Perú	Chicha	9	3	3	3	3	13	13	5	5
20	Perú	Chicha	16	3	3	8	8	3	3	5	5
40	Perú	Masato	16	3	3	8	8	3	3	5	5
8857	Burkina Faso	Cerveza sorgo	117	3	11	5	5	3	3	4	5
94	Perú	Masato	117	3	11	5	5	3	3	4	5
10711	Japón	Sake	153	11	11	21	21	57	57	9	9
1199	Japón	Sake	153	11	11	21	21	57	57	9	9
678	Hungría	Fermento	45	3	3	33	33	27	27	31	32
14Arg	Argentina	Vino	45	3	3	33	33	27	27	31	32
33Arg	Argentina	Vino	27	3	3	31	31	27	27	31	31
35Arg	Argentina	Vino	27	3	3	31	31	27	27	31	31
16Arg	Argentina	Vino	28	3	3	31	31	27	27	32	32
L1005	Argentina	Vino	28	3	3	31	31	27	27	32	32
L1343	Argentina	Vino	28	3	3	31	31	27	27	32	32
8Arg	Argentina	Vino	28	3	3	31	31	27	27	32	32
10Arg	Argentina	Vino	29	3	3	31	31	27	27	41	41
L1374	Chile	Vino	29	3	3	31	31	27	27	41	41
1399	Suiza	Vino	29	3	3	31	31	27	27	41	41
423	Suiza	Vino	35	3	3	32	32	1	1	32	67
11833	Suiza	Vino	35	3	3	32	32	1	1	32	67
L981	Argentina	Vino	36	3	3	32	32	27	27	32	32
L165	Chile	Vino	36	3	3	32	32	27	27	32	32
ZA23	Sudáfrica	Vino	36	3	3	32	32	27	27	32	32
11Arg	Argentina	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
15Arg	Argentina	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
28Arg	Argentina	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
1923	Austria	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
L246	Chile	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
L1324	Francia	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
ZA9	Sudáfrica	Vino	47	3	3	33	33	27	27	32	32
20Arg	Argentina	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
21Arg	Argentina	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
26Arg	Argentina	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
22Arg	Argentina	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
L1334	Francia	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
11032	Italia	Vino	48	3	3	33	33	27	27	41	41
1882	España	Vino	90	3	3	57	57	1	1	63	63
11757	España	Vino	90	3	3	57	57	1	1	63	63
ZA18	Sudáfrica	Vino	95	3	3	77	77	1	1	49	49
ZA19	Sudáfrica	Vino	95	3	3	77	77	1	1	49	49
L757	Chile	Vino	110	8	8	33	33	27	27	9	32
L846	Chile	Vino	110	8	8	33	33	27	27	9	32
L962	Argentina	Vino	144	8	8	32	32	27	27	43	43
1917	Austria	Vino	144	8	8	32	32	27	27	43	43

Las cepas se agruparon en poblaciones según la fuente de aislamiento y el origen geográfico. Los genotipos se clasificaron por gen, según los alelos fueran del grupo vínico o no vínico, considerando el análisis filogenético, o recombinantes, de acuerdo al análisis de recombinación. Las categorías fueron 3 tipos de homocigotos, mismo alelo vínico, no vínico o recombinante, y 4 tipos de heterocigotos con dos alelos vínicos, con dos no vínicos, o con uno vínico y el otro no vínico (híbridos), o con uno recombinante y otro no recombinante (recombinante o con conversión génica). Los resultados se muestran en la Tabla 2.8.

En general, entre las cepas vínicas predominan los homocigotos (117, 100, 94 y 107 cepas en *EGT2*, *CAT8*, *BRE5*, *GAL4*) y en menor grado los heterocigotos (5, 15, 25 y 14 cepas en *EGT2*, *CAT8*, *BRE5*, *GAL4*). En algunos casos se detectaron cepas con alelos no vínicos, híbridas o con recombinación, por ejemplo: cepas de Suiza y Sudáfrica con alelos no vínicos en *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*. Se detectaron cepas híbridas de Chile con alelos vínicos y no vínicos para *EGT2*, *BRE5*, y *GAL4* y dos cepas de Sudáfrica resultaron híbridas pero solo para *EGT2* y como recombinante se identificó una cepa de Sudáfrica para *EGT2*.

Por el contrario, las cepas no vínicas aparecen entre las seis categorías utilizadas, y no se concentran en una sola, como es el caso de las cepas vínicas. La distribución de cepas entre las categorías utilizadas se describe a continuación. En el caso de alelos vínicos, se observaron 44, 24, 24 y 37 cepas homocigotas y 1, 15, 18 y 5 cepas heterocigotas en *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*. En cuanto a los alelos no vínicos, se detectaron 37, 55, 43, y 41 en homocigosis, y 9, 2, 22 y 25 en heterocigosis para *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*. Algo característico de las cepas no vínicas es la presencia de alelos vínicos y no vínicos en una región génica que se denominaron cepas híbridas, haciendo referencia a híbridos intraespecíficos. Se detectaron 21, 6, 11 y 12 cepas híbridas en *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*. Es interesante mencionar que se observan cepas híbridas entre los aislados de Irlanda, México, Suecia y Chicha de Perú, en al menos tres de las regiones génicas estudiadas. Por último, se detectaron 15, 7, 9 y 7 heterocigotos con recombinación en *EGT2*, *CAT8*,

BRE5, *GAL4* entre las cepas de México y Chicha de Perú, en al menos tres de las cuatro regiones génicas estudiadas. También se encontraron cepas homocigotas con alelos recombinantes. Así una cepa de chicha de Perú presentaba alelos en *EGT2* recombinantes en homocigosis. También la cepa S288c, primera cepa en ser secuenciado su genoma es recombinante para *CAT8*, y en el caso de *GAL4* se detectaron dos cepas homocigotas recombinantes, una de México y otra de ambiente marino de Suecia. Es interesante señalar que no se detectaron cepas homocigotas recombinantes para la región *BRE5*.

Tabla 2.8. Distribución de genotipos de las cepas de *S. cerevisiae* en relación a las cuatro regiones génicas estudiadas. 1: Vínico homocigoto, 2: Vínico heterocigoto, 3: No vínico homocigoto, 4: No vínico heterocigoto, 5: Heterocigoto vínico-No vínico, 6: Heterocigoto recombinante; *Homocigoto recombinante.

Población	Cepas	Substrato	EGT2						CAT8						BRE5						GAL4										
			1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6					
Argentina	37	Vino	37						32	5						29	6									33	4				
Chile	27	Vino	22	4			1		18	4						18	7			2						18	7				2
Austria	1	Vino	1						9	1						1										9	1				
Eslovenia	5	Vino	5						4	1						4	1									5					
España	14	Vino	14						13	1						1	4									13	1				
Francia	11	Vino	1	1					11							9	2									11					
Suiza	5	Vino	4				1		3	1	1					2	2	1								4			1		
Hungría	1	Vino	1						1									1								1					
Italia	1	Vino	1						1							1										1					
Sudáfrica	15	Vino	12				2	1	7	2	6					1	2			3						11	1	3			
Japón	1	Vino	1						1							1										1					
	127	Vínicas	117	5			4	1	100	15	7					94	25	1	3	2						107	14	4		2	
Bélgica	3	Cerveza	2		1				1		2					1		1		1								2		1	
Inglaterra	2	Cerveza			1		1		2							1	1									2					
Irlanda	5	Sidra, cerveza	2		1		2		4	1						2	1		1	1						3				2	
Hungría	3	Plantas, barro	1		2				2					1	1	1	1								2		1				
África	8	Kaffyr, cerveza sorgo, Vino palma y bili			5	2	1		3	1	3			1	3	2	2	1							2		5	1			
Brasil	6	Destilería, agua de río	4				2		1	3	1	1			4	1				1					4	1				1	
España	7	Plantas, oliva, alpechín	5		2				1	1	4			1	4	2				1					6		1				
Japón	9	Sake, sorgo, kefir			7	1	1				7	2			1	1	6	1									7	2			
México	22	Agave y derivados	1		7	2	3		5	6	6	4		1	1	5	5	3	4	4					9	4	1	1	2	5*	
Perú	22	Masato	1				8	4			14	8					1	12							12	9	1				
Perú	23	Chicha	6	1	2	2	1	11*			13	4	5	1			14	2	3	4					2		5	11	5		
Suecia	3	Agua mar, salmón	2				1		1	1				1		2				1					1					2*	
Asia-no Japón	5	Flor Lychee, vino palma y Otras fermentaciones	2		2				1	1	1	1			2		1	1							2		2				
EU	1	Higo			1									1*	1										1						
Rusia	1	Uva			1						1						1								1						
	128	No vínicas	44	1	37	9	21	15	24	15	55	2	6	7	24	18	43	22	11	9					37	5	41	25	12	7	

Los resultados obtenidos con el análisis de secuencias muestran que la población de cepas vínicas es muy homogénea con poca variabilidad genética, en comparación con las poblaciones de cepas no vínicas. Por ello se estudió la estructura poblacional de cepas vínicas y no vínicas al comparar la diversidad génica, que es el equivalente a la heterocigosidad esperada cuando se utilizan datos en fase diploide. La estima de la heterocigosidad se obtuvo, mediante el programa Arlequín (Excoffier, 2005) para los principales grupos de cepas con un número representativo de cepas (≥ 9), que corresponden a cuatro poblaciones con cepas vínicas y seis poblaciones de cepas no vínicas.

En el grupo de cepas vínicas se formaron las poblaciones vínicas de Argentina (38 cepas), Chile (27), Sudáfrica (15) y Europa (47); mientras que entre las poblaciones no vínicas se incluyeron a las cepas de diversas bebidas tradicionales de México (22); dos poblaciones de Perú, una con las cepas aisladas de Masato (22) y otra con cepas de Chicha (23); y una de bebidas tradicionales de Japón (9).

La estima de la heterocigosidad en las diferentes poblaciones vínicas y no vínicas se presenta en la Tabla 2.9, en donde se muestra que las poblaciones vínicas muestran valores de heterocigosidad desde 0,04167 hasta 0,35135 en *GAL4* para la población europea y Argentina, respectivamente. Al obtener un promedio con las cuatro regiones génicas analizadas por población se observa que la heterocigosidad va desde 0,09375 en la población Europea hasta 0,25 en la de Argentina. Entre las poblaciones de cepas no vínicas, se observa una heterocigosidad de 0,12 para *CAT8* y *GAL4* en la población con cepas de Japón. Al considerar el promedio de las cuatro regiones génicas, la heterocigosidad varía desde 0,1875 en la población de Japón, hasta 0,53261 para la población de chicha del Perú (Tabla 2.9).

Para determinar si los genotipos observados son el producto de la conjugación al azar de gametos se determinó si se cumple el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W), es decir, si la heterocigosidad observada es estadísticamente igual a la esperada, a partir de las frecuencias alélicas y asumiendo el equilibrio Hardy-Weinberg, mediante la prueba de Fisher con una Tabla de contingencia

de 2x2 (Guo and Thompson, 1992) implementada en el programa Arlequín (Excoffier, 2005). En la Tabla 2.9 se muestra la heterocigosidad observada y la esperada para las poblaciones vínicas y no vínicas respectivamente, así como la probabilidad de que se cumpla el equilibrio H-W. El bajo número de cepas heterocigotas observadas para todas las poblaciones muestra que existe un exceso de homocigotos al compararlas con los valores esperados bajo el equilibrio H-W, por lo tanto existe una alta frecuencia de homocigosis entre las cepas, lo que indica que no están en equilibrio H-W. En el caso de las poblaciones vínicas, solo la argentina para la región génica *GAL4* la diferencia entre la heterocigosidad observada y la esperada no es significativa, por lo que se cumple el equilibrio H-W; mientras que entre las poblaciones no vínicas, la de Japón, y las dos de Perú están cerca del equilibrio H-W para la región génica *EGT2*, y además la población de masato en *BRE5*, pero no para las otras regiones (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Diversidad alélica en poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*.

Locus	Heterocigosidad observada	Heterocigosidad Esperada	Valor de P	Desviación Estándar
Argentina				
<i>EGT2</i>	0,18919	0,34210	0,00062	0,00002
<i>CAT8</i>	0,16216	0,64791	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,29730	0,72492	0,00000	0,00000
<i>GAL4</i>	0,35135	0,38097	0,13091	0,00021
Chile				
<i>EGT2</i>	0,17241	0,43436	0,00006	0,00001
<i>CAT8</i>	0,13793	0,85057	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,34483	0,65820	0,00026	0,00002
<i>GAL4</i>	0,10345	0,33938	0,00003	0,00001
Sudáfrica				
<i>EGT2</i>	0,20000	0,36092	0,01956	0,00013
<i>CAT8</i>	0,13333	0,85517	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,33333	0,87816	0,00000	0,00000
<i>GAL4</i>	0,06667	0,75172	0,00000	0,00000
Europa				
<i>EGT2</i>	0,04167	0,31579	0,00000	0,00000
<i>CAT8</i>	0,08333	0,85351	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,20833	0,90461	0,00000	0,00000
<i>GAL4</i>	0,04167	0,54759	0,00000	0,00000
México				
<i>EGT2</i>	0,22727	0,80761	0,00000	0,00000
<i>CAT8</i>	0,50000	0,93235	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,72727	0,94292	0,00012	0,00001
<i>GAL4</i>	0,40909	0,87949	0,00000	0,00000
Japón				
<i>EGT2</i>	0,25000	0,35000	0,20387	0,00036
<i>CAT8</i>	0,12500	0,74167	0,00014	0,00001
<i>BRE5</i>	0,25000	0,81667	0,00006	0,00001
<i>GAL4</i>	0,12500	0,90833	0,00000	0,00000
Masato				
<i>EGT2</i>	0,54545	0,64693	0,14956	0,00025
<i>CAT8</i>	0,36364	0,79493	0,00000	0,00000
<i>BRE5</i>	0,59091	0,68182	0,31643	0,00035
<i>GAL4</i>	0,45455	0,60677	0,00000	0,00000
Chicha				
<i>EGT2</i>	0,60870	0,73043	0,33946	0,00016
<i>CAT8</i>	0,43478	0,56812	0,04210	0,00013
<i>BRE5</i>	0,39130	0,60097	0,00597	0,00003
<i>GAL4</i>	0,69565	0,81256	0,00005	0,00001

Para evaluar si existe una asociación entre pares de loci, se determinó el desequilibrio de ligamiento entre todas las combinaciones posibles con los cuatro loci en estudio, mediante el programa Arlequín (Excoffier, 2005). Las secuencias obtenidas provienen de cepas de *S. cerevisiae* con polimorfismos donde no se conoce la fase haploide, por lo que, el desequilibrio de ligamiento se determinó mediante una prueba de relaciones de verosimilitud, que compara la máxima verosimilitud bajo la hipótesis de un equilibrio de ligamiento, con la máxima verosimilitud con pares de loci asociados, con una distribución empírica obtenida por permutaciones (Slatkin, 1996). La significación de la tasa de la máxima verosimilitud observada se obtiene al calcular la distribución nula de esta tasa bajo la hipótesis de un desequilibrio de ligamiento, con un procedimiento de permutaciones, mediante una prueba de X^2 .

Las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae* muestran un desequilibrio de ligamiento entre los cuatro loci evaluados, excepto para las comparaciones entre *EGT2-CAT8* y *EGT2-BRE5* en la población de Argentina y 4 de las 6 comparaciones con cepas vínicas de Chile (Anexo 3a). Las poblaciones no vínicas de *S. cerevisiae* también mostraron un desequilibrio de ligamiento entre los cuatro loci evaluados, excepto *CAT8-BRE5* para la población de chicha y *EGT2-BRE5* y *CAT8-BRE5* para la población de masato (Anexo 3b). La significación estadística en la prueba de desequilibrio de ligamiento para las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* se muestra en la Tabla 2.10, en donde se muestra que la mayoría de las comparaciones son significativas (+).

Tabla 2.10. Significación de la prueba de desequilibrio de ligamiento en las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* (nivel de significación $p = 0.05$). +, desequilibrio de ligamiento significativo; -, desequilibrio de ligamiento no significativo.

Poblaciones vínicas

Argentina				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	-	-	+
<i>CAT8</i>	-	*	+	+
<i>BRE5</i>	-	+	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

Chile				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	-	+	+
<i>CAT8</i>	-	*	-	-
<i>BRE5</i>	+	-	*	-
<i>GAL4</i>	+	-	-	*

Sudáfrica				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	+	+
<i>CAT8</i>	+	*	+	+
<i>BRE5</i>	+	+	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

Europa				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	+	+
<i>CAT8</i>	+	*	+	+
<i>BRE5</i>	+	+	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

Poblaciones no vínicas

Japón				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	+	+
<i>CAT8</i>	+	*	+	+
<i>BRE5</i>	+	+	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

México				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	+	+
<i>CAT8</i>	+	*	+	+
<i>BRE5</i>	+	+	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

Masato				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	+	+
<i>CAT8</i>	+	*	-	+
<i>BRE5</i>	+	-	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

Chicha				
	<i>EGT2</i>	<i>CAT8</i>	<i>BRE5</i>	<i>GAL4</i>
<i>EGT2</i>	*	+	-	+
<i>CAT8</i>	+	*	-	+
<i>BRE5</i>	-	-	*	+
<i>GAL4</i>	+	+	+	*

2.7 Análisis de la recombinación en las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*.

La recombinación es un mecanismo de importancia evolutiva ya que genera nuevas combinaciones de mutaciones, y ésta es una de las causas por las que se reduce el desequilibrio de ligamiento. Por tal razón se determinó la tasa de recombinación de cada locus en las ocho poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* para observar si existe un efecto de la recombinación sobre el desequilibrio de ligamiento y con ello sobre la variabilidad nucleotídica en *S. cerevisiae*. Se estimó el parámetro $R=4Nr$, donde N es el tamaño poblacional y r es la tasa de recombinación por secuencia o entre sitios adyacentes (Hudson, 1987) implementado en el programa DNAsp (Rozas et al., 2003). Además se estimó el número mínimo de sucesos de recombinación mediante la prueba de los cuatro gametos (Hudson and Kaplan, 1985) efectuado en el programa DNAsp (Rozas et al., 2003).

La tasa de recombinación así como el número mínimo de sucesos de recombinación para cada una de las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* se muestra en la Tabla.2.11. La tasa de recombinación es menor en las cepas vínicas que en las no vínicas. En las poblaciones vínicas varió desde 0,0000 en la región génica *EGT2* en tres de las cuatro poblaciones vínicas hasta 0,0313 en *BRE5* para la población europea. Sin embargo, se observa que en *CAT8*, la población de Chile presenta una tasa de recombinación mayor, de hasta 0,1140. En las poblaciones no vínicas, la tasa de recombinación se estimó en 0,0000 para *EGT2*, *CAT8*, ó *BRE5* en alguna de las tres poblaciones no vínicas (excepto la de México), hasta 0,0367 para *CAT8* en la población de México.

Al agrupar las cepas en solo dos grandes poblaciones, vínica y no vínica, se estimó una tasa de recombinación menor en las cepas vínicas que en las no vínicas. En la población de cepas vínicas no se detectó recombinación en *EGT2* y *CAT8*, y fue de 0,0029 para *GAL4* y 0,0042 para *BRE5*. Por el contrario, en la población de cepas no vínicas se detectó recombinación para las cuatro regiones génicas estudiadas, en las cuales fue menor en las

regiones *EGT2* y *CAT8* con 0,0095 y 0,0348, respectivamente. La mayor tasa de recombinación fue para *GAL4* y *BRE5* con 0,0421 y 0,0412, respectivamente. El número mínimo de sucesos de recombinación estimado también fue menor en las cepas vínicas que en las no vínicas. En total se estimaron 11 sucesos de recombinación para las cepas vínicas y de 26 en la población con cepas no vínicas (Tabla 2.11).

Con estos resultados es posible explicar la topología de las redes obtenidas con el análisis filogenético, es decir, que en las regiones génicas *EGT2* y *CAT8*, hay menores tasas de recombinación que en *BRE5* y *GAL4*, lo que permite la identificación de los dos grupos de alelos, vínicos y no vínicos en *EGT2* y *CAT8*, pero no es tan claro en *BRE5* y *GAL4* debido a las mayores tasas de recombinación.

Tabla 2.11. Tasa de recombinación y el número mínimo de sucesos de recombinación para cada una de las población vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*.

Población de <i>S. cerevisiae</i>										
locus	Vínicas					No vínicas				
	Argentina	Chile	Sudáfrica	Europa	Total vínicas	México	Masato	Chicha	Japón	Total no vínicas
Recombinación										
<i>EGT2</i>	0,0107	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0072	0,0000	0,0122	0,0000	0,0095
<i>CAT8</i>	0,0172	0,1140	0,0072	0,0015	0,0000	0,0367	0,0003	0,0000	0,0007	0,0348
<i>BRE5</i>	0,0157	0,0000	0,0138	0,0313	0,0042	0,0228	0,0013	0,0000	0,0076	0,0412
<i>GAL4</i>	0,0143	0,0000	0,0154	0,0027	0,0029	0,0101	0,0031	0,0217	0,0281	0,0421
Número de sucesos										
<i>EGT2</i>	0	0	0	1	1	1	4	5	0	7
<i>CAT8</i>	1	0	0	1	6	2	3	3	0	6
<i>BRE5</i>	1	1	2	3	4	5	4	3	0	8
<i>GAL4</i>	0	0	0	0	0	3	2	4	1	5

2.8 Análisis de divergencia entre poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*.

Para confirmar la estructura poblacional observada con el análisis filogenético, se determinó la divergencia entre las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*, por medio del índice de disimilitud entre pares de poblaciones (F_{ST}), que utiliza la distancia genética basada en frecuencias alélicas, para calcular la diferenciación genética entre poblaciones. Primero se agruparon las cepas en dos poblaciones, de acuerdo al substrato de aislamiento, una población de cepas vínicas y la otra de cepas no vínicas. Tal como se ha observado con el análisis filogenético se detecta una diferenciación genética entre poblaciones, de acuerdo al valor alto y significativo del análisis estadístico ($F_{ST}=0,27892$, $P<0,0001$). A continuación se realizó un análisis de la diferenciación genética entre las diferentes poblaciones, y se encontró que todas las comparaciones entre las poblaciones de cepas vínicas y las no vínicas fueron significativas; sólo en la comparación entre la población vínica de Argentina y la europea no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que estas cepas se introdujeron en Argentina a partir de Europa (Tabla 2.12).

En general, la divergencia es mayor si se compara una población vínica con otra no vínica que cuando se comparan dos vínicas o dos no vínicas entre sí. Así, los valores de F_{ST} van desde 0,0965 al comparar la población vínica de Sudáfrica con la no vínica de México, hasta 0,7405 al comparar la población vínica de Argentina con la no vínica de Japón. La divergencia entre las poblaciones vínicas muestra valores menores que van desde 0,0180, al comparar la población de Europa con la de Argentina; hasta 0,2142 cuando se compara la población de Sudáfrica con la de Argentina. Por otro lado, se observa una mayor divergencia genética entre poblaciones de cepas no vínicas, que van desde 0,1736 cuando se compara la población de México con la de chicha de Perú, hasta 0,4844 en la comparación entre la población de Japón y de masato de Perú (Tabla 2.12). Los resultados obtenidos con el análisis de divergencia corroboran lo observado en el análisis filogenético, es decir, que las poblaciones vínicas son más homogéneas que las no vínicas.

Tabla 2.12. Divergencia genética (F_{ST}) entre poblaciones vónicas y no vónicas de *S. cerevisiae*. Los valores de F_{ST} están debajo de la diagonal, los valores de p y su desviación estandar están sobre la diagonal.

Población de <i>S. cerevisiae</i>								
	No vónicas				Vónicas			
	Chicha	Masato	México	Japón	Europa	Sudáfrica	Chile	Arg
Chicha		0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00
Masato	0,225		0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00
México	0,173	0,370		0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00
Japón	0,349	0,484	0,195		0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00	0,000 0,00
Europa	0,546	0,678	0,317	0,655		0,000 0,00	0,000 0,00	0,108 0,02
Sudáfrica	0,265	0,394	0,096	0,370	0,145		0,000 0,00	0,000 0,00
Chile	0,540	0,678	0,313	0,697	0,035	0,144		0,009 0,01
Argentina	0,588	0,719	0,364	0,740	0,018	0,214	0,039	

Los índices F_{ST} de las comparaciones entre poblaciones vónicas y no vónicas de *S. cerevisiae* se utilizaron para la construcción de un cladograma UPGMA que se muestra en la Figura 2.28, en donde se observa que las poblaciones vónicas de Chile, Europa y Argentina forman un grupo, pero la población vónica de Sudáfrica se agrupa junto con las poblaciones no vónicas de México, Chicha, Japón y Masato.

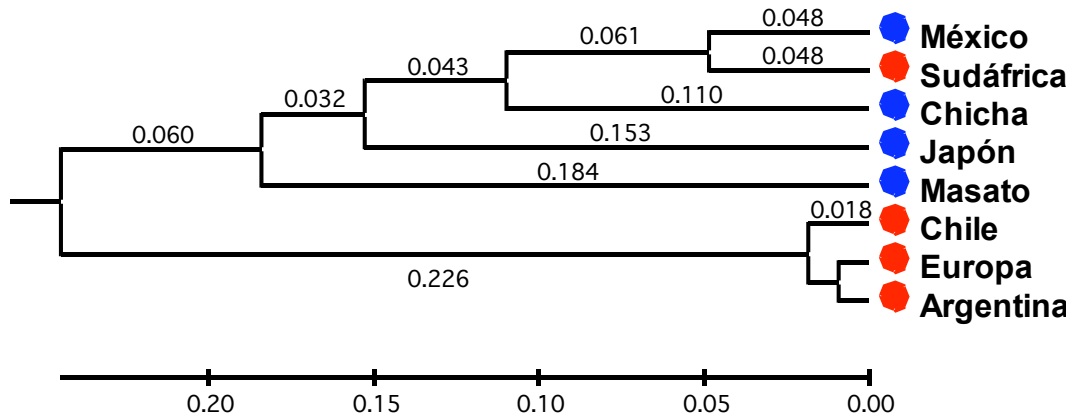


Figura 2.27. Cladograma UPGMA con los valores de F_{ST} de las poblaciones vnicas y no vnicas de *S. cerevisiae*.

2.9 Pruebas de selección.

Los cambios evolutivos en el genoma se pueden fijar por selección o por deriva genética. La selección positiva opera cuando hay diferencias en la eficacia (probabilidad de reproducción y supervivencia) que confiere una variante genética respecto a otra, por lo que esa variante se fijará. En el caso de la deriva genética, una mutación se dispersa en la población por medio del azar. La combinación de la selección positiva y la deriva genética, junto con la selección negativa o purificadora, que elimina las mutaciones deletéreas, puede analizarse para determinar el efecto de la selección sobre el genoma y detectar las posiciones nucleotídicas o codones que estén bajo diferentes presiones.

Existen varias metodologías que se usan para evaluar la presión selectiva sobre los genes que codifican proteínas. La más utilizada es la relación de sustituciones que cambian el aminoácido (sustituciones no sinónimas, K_a) respecto a las que no lo cambian (sustituciones sinónimas, K_s). La relación K_a/K_s también se conoce como dN/dS o ω y da una medida cuantitativa de la acción de la selección. Un cambio en el aminoácido es neutro si este se fija en la misma tasa que una mutación sinónima, y se obtiene una dN/dS de $\omega=1$. Si el cambio de aminoácido es deletéreo, la selección purificadora reduce la tasa de fijación, y se obtiene una $\omega<1$. Solo cuando el cambio de aminoácido da una ventaja selectiva, se puede fijar a una tasa mayor que la de una mutación

sinónima debida a deriva, y por tanto, $\omega > 1$. Una evidencia convincente de selección positiva se detecta cuando $\omega > 1$ y estadísticamente es significativa. Otras pruebas más sofisticadas son las estimas de D de Tajima y la prueba de McDonald-Kreitman, que compara la relación Ka/Ks a nivel interespecífico e intraespecífico.

Para evaluar el origen de la variación nucleotídica observada en *S. cerevisiae*, se estudió si la selección ha moldeado el genoma de *S. cerevisiae* mediante las estimas de selección implementadas en el programa DNAsp, con la secuencia de las cuatro regiones nucleares y una mitocondrial de las 250 cepas analizadas. Se formaron dos grupos de alelos, uno con los considerados como vńnicos y otro con los no vńnicos. Los alelos que se identificaron como recombinantes para una regi3n g3nica se eliminaron del an3lisis de esa regi3n g3nica, pero se incluyeron los de las otras regiones si estos se consideraron como alelos vńnicos o no vńnicos.

2.9.1 Estimaciones de neutralidad basada en el polimorfismo intraespecífico.

Para estudiar el efecto de la selecci3n sobre la variabilidad gen3tica de las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial de *S. cerevisiae*, se calcul3 el estadístico D de Tajima (1989), que evalúa la hip3tesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura M., 1983) y se basa en que la estima de la diversidad nucleotídica a partir de los sitios segregantes (θ_s), posiciones variables, y la obtenida a partir de las diferencias nucleotídicas (π) que deberían ser iguales bajo un modelo estrictamente neutral de alelos infinitos.

Los valores de la D de Tajima en las cuatro regiones nucleares estudiadas *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*, son de -1,32227, 0,53640, -0,74264 y -0,96983, y ninguno present3 diferencias significativas de cero, por lo que no se puede rechazar la hip3tesis de evoluci3n neutral. En cambio, para la regi3n mitocondrial *COX2*, la D de Tajima mostr3 un valor estadísticamente significativo de 3,30081, lo que indica que 3sta regi3n puede estar bajo selecci3n (Tabla 2.13).

Otras pruebas de neutralidad son las estimas D^* y F^* de Fu y Li (1993), que evalúan la hipótesis de que todas las mutaciones son neutras, comparando la diversidad nucleotídica basada en sitios segregantes (θ_s) y la basada en el número de mutaciones (η_T) pero en base al número de singletes o mutaciones que aparecen una vez entre todas las secuencias y el número total de mutaciones (D^*) o el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (F^*). La variación intraespecífica se evalúa respecto a la de una secuencia de referencia o outgroup.

Se analizó el polimorfismo de *S. cerevisiae* de cuatro regiones nucleares y una mitocondrial mediante las estimas D^* y F^* de Fu y Li (Fu and Li, 1993), con *S. paradoxus* como outgroup para determinar si la selección ha actuado en el genoma de *S. cerevisiae*. En general, no se encontraron diferencias estadísticas respecto a la hipótesis neutra, y solo en *CAT8* y *COX2* con la estimas D^* de Fu y Li en las dos regiones génicas y la F^* de Fu y Li para *COX2* se detectaron diferencias significativas.

Tabla 2.13. D de Tajima, D^* y F^* de Fu y Li para las cuatro regiones nucleares y el gen mitocondrial *COX2* de *S. cerevisiae*. ^a Estima en base al número total de sitios segregantes, ^b Estima en base a los singletes y el número total de mutaciones, ^c Estima en base a los singletes y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias.

Región génica	D Tajima ^a	Fu y Li ^a	
		D^{*b}	F^{*c}
<i>EGT2</i>	-1,06230 NS P > 0,10	-1,08754 NS P > 0.10	-1,32227 NS P > 0.10
<i>CAT8</i>	-1,30756 NS P > 0.10	2,26048 ** P < 0.02	0,53640 NS P > 0.10
<i>BRE5</i>	-1,60176 NS 0.10 > P > 0.05	0,47337 NS P > 0.10	-0,74264 NS P > 0.10
<i>GAL4</i>	-1,61117 NS 0.10 > P > 0.05	0,12944 NS P > 0.10	-0,96983 NS P > 0.10
<i>COX2</i>	3,30081 ** P < 0.01	-5,53187 ** P < 0.02	-3,51883 ** P < 0.02

Al considerar el signo del valor obtenido, es posible inferir información sobre las fuerzas evolutivas y demográficas que una población ha experimentado. Un signo positivo (+), indica que hay un exceso de alelos con frecuencia intermedia, y que hubo selección equilibradora, un cuello de botella o que el tamaño poblacional ha disminuido. Un signo negativo (-), refleja un exceso en los polimorfismos raros en la población, un incremento en el tamaño poblacional, un arrastre selectivo o selección de fondo.

En las regiones nucleares analizadas se determinó que el valor de D de Tajima es negativo, lo que significa la presencia de polimorfismos raros en la población, una selección de fondo o arrastre selectivo. Sin embargo, en la región mitocondrial, este valor es positivo, lo que indica bien un cuello de botella o selección equilibradora. Es notorio que en las pruebas de neutralidad se detectaron valores negativos para la región génica *EGT2* pero no para el resto de regiones génicas analizadas. En el caso del gen mitocondrial se observa valores significativos positivos y negativos, lo que puede reflejar una presión selectiva sobre una única población; por ejemplo, adaptación local, diferentes historias demográficas (proviene de diferentes ambientes) o una combinación.

En principio, se puede distinguir entre selección y demografía, ya que la demografía afecta todo el genoma y en cambio la selección solo afecta a loci específicos. Sin embargo, es necesario el uso de un gran número de loci dispersos en todo el genoma para poder evaluar la hipótesis nula sobre selección (Kreitman, 2000).

2.9.2 Estimaciones de neutralidad con polimorfismos intraespecíficos y divergencia. Prueba de neutralidad de McDonald-Kreitman (McDK).

Otra prueba que evalúa la hipótesis de evolución neutra es la propuesta por McDonald-Kreitman (McDonald and Kreitman, 1991) que compara la variación de sustituciones sinónimas y no sinónimas (o de reemplazamiento) dentro de especies y entre especies. Parte de la predicción neutralista es que la proporción de sustituciones sinónimas o no sinónimas fijadas entre especies

debe ser la misma que la obtenida dentro de especie (sustituciones polimórficas).

Para este análisis se utilizan dos grupos de secuencias de especies diferentes y se determina el número de polimorfismos o sustituciones sinónimas y de reemplazamiento polimórficas dentro de la especie y el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas que están fijadas entre especies, y se evalúa si la relación se mantiene según el modelo neutral de evolución. Un sitio nucleotídico fijado entre especies es un sitio en el cual todas las secuencias de una especie contienen la misma variante que no está en la otra especie.

Se utilizó la prueba McDK para evaluar la hipótesis neutra al comparar los polimorfismos dentro de *S. cerevisiae* respecto a la divergencia en *S. paradoxus*. Se ha mencionado que *S. paradoxus* es una especie con tres subpoblaciones genéticamente diferentes, una de América, otra de Europa y otra de Siberia Oriental (Rusia) y Japón (Far East) (Liti et al., 2006), y por ello la prueba se realizó considerando el número de sustituciones sinónimas y no sinónimas fijadas y polimórficas de las cuatro regiones nucleares *EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4* de *S. cerevisiae* respecto a cada una de las tres poblaciones de *S. paradoxus* (Anexo 4). La relación dN/dS obtenida para los alelos de las cuatro regiones de *S. cerevisiae* respecto a las tres subpoblaciones de *S. paradoxus* es $\omega > 1$, con diferencias estadísticamente significativas, excepto para *GAL4* con *S. paradoxus* de América que no se encontraron diferencias significativas (Tabla 2.14) y en *EGT2* con respecto a *S. paradoxus* de Europa, donde no es posible calcular la divergencia porque no hay cambios nucleotídicos entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, como se describe en el Capítulo 3.

Al observar que en las secuencias de cada región génica hay más sustituciones no sinónimas que sinónimas, sugiere que hay selección positiva; y al obtener la relación $\omega > 1$ en los sitios polimórficos de *S. cerevisiae* con las tres subpoblaciones de *S. paradoxus* indica que hay sustituciones no neutras con ventajas selectivas para *S. cerevisiae*. Esto es debido a que la prueba de

McDK se estimó con los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* con respecto a *S. paradoxus*. Sin embargo, se ha mencionado que las cepas vínicas han sufrido un proceso de domesticación en el que pudo actuar la selección (Fay and Benavides, 2005a) por lo que es interesante identificar si los alelos de cepas no vínicas han sufrido también un proceso de selección.

Para determinar si ha actuado la selección sobre los alelos vínicos, se formaron dos grupos de alelos, los vínicos y los no vínicos y se realizó la prueba McD-K con respecto a *S. paradoxus*. La relación dN/dS (ω) obtenida para cada región génica analizada con los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* en comparación con las tres poblaciones de *S. paradoxus*, y también al comparar entre alelos vínicos y no vínicos se muestra en el Anexo 4. En general, la relación dN/dS para los cambios polimórficos de los alelos vínicos es $\omega > 1$ y para los fijados es de $\omega < 1$, y solo para *EGT2* y *GAL4* la relación de sustituciones fijadas es de $\omega < 1$ ó $\omega = 1$. Con los alelos no vínicos, la relación para cambios polimórficos es $\omega > 1$ para *BRE5* y *GAL4*, $\omega < 1$ para *EGT2* y $\omega = 1$ para *CAT8*. La relación dN/dS de los sitios polimórficos entre alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* es de $\omega > 1$, y solo con *EGT2* es $\omega > 1$ ó $\omega = 1$. Con las sustituciones fijadas en *BRE5* y *GAL4* es $\omega > 1$, en *EGT2* es $\omega = 1$ y en *CAT8* es $\omega < 1$ (Tabla 2.14).

Con la prueba de Fisher se analizó estadísticamente la relación ω , y se observa que con los alelos vínicos de *S. cerevisiae* donde se obtuvo una $\omega > 1$, presenta diferencias significativas para las cuatro regiones analizadas, lo que indica que los alelos vínicos presentan ventajas adaptativas mediante un proceso de selección positiva o bien por la acumulación de sustituciones no sinónimas ligeramente deletéreas por efecto de un cuello de botella (deriva). Con los alelos no vínicos la relación es $\omega < 1$, pero no se encontraron diferencias significativas con la prueba de Fisher, por lo que se puede concluir que los alelos no vínicos no están bajo alguna presión de selección y se ajustan a la teoría neutral, excepto las regiones génicas *BRE5* y *GAL4*, donde se detectaron diferencias significativas y una relación de $\omega > 1$.

Tabla 2.14. Relación dNS/dS (ω) de sustituciones polimórficas y fijadas en alelos vínicos y no vínicos de cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* y entre la población vínica y no vínica. *, Diferencias estadísticamente significativas.

Región Génica	Sustitución	<i>S. paradoxus</i>		No vínicas
		Vínicas	No vínicas	Vínicas
<i>EGT2</i>	Polimórfica	$\omega > 1$ *	$\omega < 1$	$\omega > 1$ ó $\omega = 1$
	Fijada	$\omega < 1$ ó $\omega = 1$	$\omega < 1$	$\omega = 1$
<i>CAT8</i>	Polimórfica	$\omega > 1$ ***	$\omega = 1$	$\omega > 1$
	Fijada	$\omega < 1$	$\omega < 1$	$\omega < 1$
<i>BRE5</i>	Polimórfica	$\omega > 1$ ***	$\omega > 1$	$\omega > 1$ *
	Fijada	$\omega < 1$	$\omega < 1$	$\omega > 1$
<i>GAL4</i>	Polimórfica	$\omega > 1$	$\omega > 1$	$\omega > 1$ *
	Fijada	$\omega < 1$ ó $\omega = 1$	$\omega < 1$ ó $\omega = 1$	$\omega > 1$ *

2.9.3 Prueba de neutralidad de Hudson, Kreitman y Aguadé (HKA).

La prueba de Hudson, Kreitman y Aguadé (HKA) (Hudson et al., 1987) se basa en la predicción neutral de que los niveles de polimorfismo intraespecífico deben estar correlacionados con los niveles de divergencia interespecífica, si las restricciones funcionales del gen analizado no han cambiado. Para ello la prueba utiliza secuencias de dos regiones del genoma y realiza una comparación de la relación entre divergencia nucleotídica interespecífica y la diversidad nucleotídica intraespecífica entre ellas. Con esta prueba se determina si la cantidad de variación nucleotídica dentro y entre especies es compatible con un modelo neutral. Las sustituciones consideradas pueden ser solo: sinónimas, no sinónimas o el total de sustituciones.

Para evaluar la hipótesis neutra con la prueba HKA, se comparó la relación entre el polimorfismo intraespecífico para las 4 regiones génicas de *S. cerevisiae* y la divergencia respecto a *S. paradoxus*. Se evaluaron 18 posibles comparaciones entre las cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* (*EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*) y las tres subpoblaciones de *S. paradoxus* (América,

Europa y Far East) (Tabla 2.15). No se encontraron diferencias significativas en 15 de las 18 comparaciones ($P > 0.2$), lo que indica que los polimorfismos en las regiones génicas analizadas de *S. cerevisiae* son compatibles con el modelo neutral. No obstante, en tres comparaciones *EGT2* y las otras tres regiones génicas, con respecto a la subpoblación de Europa de *S. paradoxus* mostraron valores estadísticamente significativos ($P < 0.013$), lo que sugiere, que los polimorfismos encontrados en *EGT2* no están correlacionados con la divergencia de la subpoblación de *S. paradoxus* de Europa y muestra un patrón de evolución diferente al resto de regiones génicas analizadas. Esto se explica porque la secuencia nucleotídica de *EGT2* para la subpoblación de Europa es idéntica a *S. cerevisiae*, como veremos en el Capítulo 3.

Tabla 2.15. Prueba de HKA con las sustituciones totales de las cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* respecto a las tres subpoblaciones de *S. paradoxus*.

* $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS: No significativo.

Polimorfismo	Divergencia	X ²	P value
<i>EGT2 CAT8</i>	América	0,141	0,7076 NS
<i>EGT2 CAT8</i>	Europa	9,712	0,0018 **
<i>EGT2 CAT8</i>	FE	0,007	0,9320 NS
<i>EGT2 BRE5</i>	América	0,041	0,8403 NS
<i>EGT2 BRE5</i>	Europa	6,242	0,0125 *
<i>EGT2 BRE5</i>	FE	0,008	0,9302 NS
<i>EGT2 GAL4</i>	América	0,686	0,4076 NS
<i>EGT2 GAL4</i>	Europa	16,303	0,0001 ***
<i>EGT2 GAL4</i>	FE	0,734	0,3916 NS
<i>CAT8 BRE5</i>	América	0,086	0,7689 NS
<i>CAT8 BRE5</i>	Europa	0,013	0,9093 NS
<i>CAT8 BRE5</i>	FE	0,006	0,9406 NS
<i>CAT8 GAL4</i>	América	1,616	0,2037 NS
<i>CAT8 GAL4</i>	Europa	1,073	0,3002 NS
<i>CAT8 GAL4</i>	FE	1,040	0,3078 NS
<i>BRE5 GAL4</i>	América	1,218	0,2698 NS
<i>BRE5 GAL4</i>	Europa	1,113	0,2915 NS
<i>BRE5 GAL4</i>	FE	1,133	0,2871 NS

Para determinar si hay selección en los alelos v́nicos o no v́nicos de *S. cerevisiae*, se realiz3 la prueba de HKA en las cuatro regiones nucleares respecto a las tres subpoblaciones de *S. paradoxus* con base a las sustituciones sin3nimas, no sin3nimas y totales (Anexo 5). Al comparar la diversidad intraespecífica de los alelos v́nicos con respecto a los no v́nicos de *S. cerevisiae* no se observan diferencias significativas en 14 de las 18 comparaciones (Tabla 2.16). Solo entre las regiones *EGT2* y *CAT8* y entre *BRE5* y *GAL4* se encontraron diferencias significativas en cuatro de las comparaciones con las sustituciones totales. Al considerar la diversidad intraespecífica de los alelos no v́nicos con respecto a los v́nicos de *S. cerevisiae* se encontraron diferencias significativas en 5 de las 18 posibles comparaciones, 3 con sustituciones totales y 2 con no sin3nimas. Con las sustituciones totales se observan diferencias significativas en las comparaciones de *BRE5* con las otras tres regiones g3nicas, y con las sustituciones no sin3nimas en las comparaciones de *GAL4* con *BRE5* y *CAT8*.

Estos resultados sugieren que los alelos v́nicos de las regiones g3nicas *EGT2* y *CAT8* presentan un patr3n de evoluci3n diferente a los de los alelos *BRE5* y *GAL4*, ya que los alelos presentan cambios nucleot3dicos característicos de alelos v́nicos y no v́nicos en *EGT2* y *CAT8* pero no en las otras regiones, probablemente por efecto de cuello de botella, o por los fen3menos de recombinaci3n, que se han descrito previamente. En cambio para los alelos no v́nicos *BRE5* presenta un patr3n de evoluci3n diferente al resto de regiones g3nicas analizadas.

Tabla 2.16. Prueba de HKA con las cuatro regiones nucleares de los alelos vínicos de *S. cerevisiae* respecto a los no vínicos. NS, no significativo, *, P<0.05.

Comparación	Polimorfismo vínicos			Polimorfismo no vínicos		
	Divergencia no vínicos			Divergencia vínicos		
	d Total	dS	dNS	d Total	dS	dNS
<i>EGT2 CAT8</i>	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>GAL4 BRE5</i>	NS	NS	NS	*	NS	*
<i>EGT2 BRE5</i>	*	NS	NS	*	NS	NS
<i>CAT8 BRE5</i>	*	NS	NS	*	NS	NS
<i>EGT2 GAL4</i>	*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>CAT8 GAL4</i>	*	NS	NS	NS	NS	*

2.10 Discusión.

En las bebidas fermentadas de forma industrial para la obtención de vino, pan, cerveza; así como en una gran cantidad de productos fermentados en forma tradicional, es común encontrar levaduras del género *Saccharomyces*. Dentro de este género la especie *S. cerevisiae* es la más importante en biotecnología y como organismo modelo. Además es el organismo eucariota más estudiado, con el primer genoma eucariota secuenciado. Sin embargo, el origen de *S. cerevisiae* es controvertido. Se ha propuesto que es una especie domesticada (Martini, 1993) con un origen a partir de la especie más cercana *S. paradoxus*, y que está continuamente evolucionando con adaptaciones asociadas a la producción de bebidas alcohólicas. Sin embargo, es muy raro encontrarla en la naturaleza (Sniegowski et al., 2002), pero se han descrito varios eventos de domesticación (Fay and Benavides, 2005a; Legras et al., 2007). Algunos autores proponen que es una especie natural que se encuentra presente en frutas de plantas (Mortimer and Polsinelli, 1999; Sniegowski et al., 2002).

Aunque el origen de *S. cerevisiae* es controvertido, el genoma original de esta especie ha estado bajo presión selectiva desde que se empezó a utilizar en los procesos naturales de fermentación, y este fenómeno está relacionado con el origen de *S. cerevisiae* en las fermentaciones del vino y las

adaptaciones a estos ambientes (Querol et al., 2003). Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la diversidad genética y los mecanismos moleculares que han moldeado el genoma de esta especie para lograr su adaptación a un ambiente fermentativo. Por ello, es importante conocer los mecanismos moleculares ocurridos en las poblaciones vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* que las han adaptado a ambientes fermentativos. En el presente trabajo se analizó la diversidad genética de poblaciones naturales de *S. cerevisiae* aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica y se comparó con la presente en cepas aisladas de vino y de otros ambientes fermentativos y no fermentativos de diferentes regiones geográficas para evaluar el impacto de la introducción de cepas europeas sobre las fermentaciones de Latinoamérica.

En un estudio preliminar, se identificó las regiones génicas con mayor variabilidad genética, para ello se obtuvo la secuencia de al menos cuatro cepas de *S. cerevisiae* de dos regiones génicas situados en cada uno de los 16 cromosomas de *S. cerevisiae*, y en ocasiones uno central hasta un total de 36. Se eligieron las cuatro regiones nucleares (*EGT2*, *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*) que mostraron la mayor diversidad nucleotídica, el tamaño del amplificado era adecuado (≤ 900 pb, que está cerca del límite de la longitud de secuencia legible en una reacción de secuenciación típica), y en el caso de *GAL4* porque presenta en algunas cepas una delección de 15 pb que consideramos podría ser interesante. Con el estudio de las secuencias de estas regiones génicas se evaluó la diversidad genética de 253 cepas de *S. cerevisiae*, 128 aisladas de ambientes vínicos y 118 de fermentaciones no vínicas o ambientes naturales.

Las regiones génicas utilizadas para el análisis de diversidad genética mostraron una diversidad nucleotídica promedio de 0.81% (0,26% y 1,03% para las cepas vínicas y no vínicas), que es semejante a la obtenida de regiones no codificantes mencionadas como hipervariables (aproximadamente 0,80%) estimada de cinco regiones génicas de 81 cepas (Fay and Benavides, 2005b), y ligeramente menor (aproximadamente 1,36%), a la obtenida en zonas codificantes y no codificantes de cuatro regiones génicas de 27 cepas de *S. cerevisiae* (Aa et al., 2006).

Con el análisis filogenético de las secuencias de las cepas de *S. cerevisiae* en las cuatro regiones génicas se identificaron dos grupos de alelos, uno donde se encuentra la gran mayoría de alelos presentes en cepas de ambientes vínicos y otro de alelos exclusivos de ambientes no vínicos. Se ha propuesto que las cepas vínicas muestran estructura genética a partir de datos moleculares tales como son los AFLPS (Azumi and Goto-Yamamoto, 2001), microsatélites (Hennequin et al., 2001), análisis de secuencias (Ayoub et al., 2006; Fay and Benavides, 2005a) o SNPs (Ben Ari et al., 2005). De acuerdo a nuestros resultados se observa que la población de cepas vínicas es muy poco variable con pocos cambios nucleotídicos entre los diferentes alelos detectados, coincidiendo con lo descrito previamente con los otros marcadores (Ayoub et al., 2006; Fay and Benavides, 2005a; Mortimer et al., 1994). Cabe mencionar que con las regiones *EGT2* y *CAT8*, se detecta una clara separación entre alelos vínicos y no vínicos, en cambio con *GAL4* y *BRE5* la separación de los dos grupos no está muy clara, ya que la diferencia entre un grupo y otro es un único cambio nucleotídico.

En la secuencia de las cuatro regiones génicas analizadas de las cepas de *S. cerevisiae* se detectaron 254 sitios polimórficos, que permitieron determinar la estructura genética de *S. cerevisiae*. Por un lado las cepas aisladas de ambientes vínicos y por otro las cepas aisladas de ambientes no vínicos. La mayoría de las cepas vínicas estudiadas resultaron ser homocigotas (65%), en comparación con las cepas de ambientes no vínicos que son predominantemente heterocigotas (72%) para alguna de las regiones génicas analizadas. Aunque se han encontrado valores menores de homocigosidad, desde 28% hasta 35% en las cepas vínicas de California (Mortimer et al., 1994; Mortimer, 2000), los resultados obtenidos concuerdan con lo observado con cepas vínicas del Líbano en donde se mencionan altos porcentajes (70%) de homocigosidad (Ayoub et al., 2006). Algunas teorías como la denominada renovación genómica tratan de explicar la evolución y adaptación de las cepas vínicas.

Para que la renovación genómica ocurra, las cepas haploides de *S. cerevisiae* deben ser homotáticas y con capacidad de cambiar de sexo para

conjugar las células provenientes de una misma espora. Así, se produce un diploide homocigoto para todos los genes, a excepción del locus *MAT*. Con una propagación asexual continua en los viñedos o durante la producción de vino, las cepas de *S. cerevisiae* acumulan mutaciones recesivas en heterocigosis, pero pueden cambiar a diploides completamente homocigotos mediante la capacidad de esporulación y el cambio de sexo de las esporas haploides. Esto hace que la selección pueda actuar sobre la fase diploide eliminando genes deletéreos recesivos y fijando los alelos recesivos beneficiosos o ventajosos, promoviendo una adaptación de las levaduras a las condiciones ambientales. El resultado es cepas homocigotas con mejores características que las cepas parentales heterocigotas, lo que daría origen a la alta homocigosidad encontrada entre las cepas vínicas (Mortimer et al., 1994).

Con el análisis de secuencias de las cuatro regiones génicas estudiadas se ha observado que las poblaciones de cepas aisladas de bebidas tradicionales de Perú y México son muy heterogéneas con una estructura genética compleja. Esto se comprueba porque se han detectado homocigotos, heterocigotos, y, de acuerdo a los alelos identificados como vínicos y no vínicos para cada una de las regiones génicas, varias combinaciones entre ellos, es decir, homocigotos con alelos vínicos, homocigotos no vínicos, y combinaciones entre alelos vínicos, no vínicos y recombinantes entre ellos. Por el contrario, la población de cepas vínicas de Chile y Argentina presenta altos índices de homocigosidad, igual que las cepas vínicas de Europa y Sudáfrica. Además esta estructura compleja de las poblaciones de cepas latinoamericanas se observa en los diferentes árboles filogenéticos presentados en las Figuras 2.3, 2.9, 2.16 y 2.23, así como los niveles de homocigosidad o heterocigosidad de las poblaciones de cepas vínicas y no vínicas. Esta estructura poblacional se confirmó con el análisis de diferenciación genética entre poblaciones en donde se ve una clara separación entre las poblaciones vínicas y no vínicas. Al comparar la divergencia entre las poblaciones vínicas se observa poca divergencia entre las poblaciones de Argentina y Chile respecto a la población de Europa, lo que puede deberse a la dispersión de cepas a través de la producción de vino desde Europa a América (Pretorius, 2000).

En el estudio se incluyó la secuencia de la cepa de laboratorio haploide de s288c que se encuentra en la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (<http://www.yeastgenome.org/>) y se encontró que es una cepa recombinante, ya que para *EGT2* presentaba alelo no vínico, lo que está de acuerdo con el substrato de aislamiento de esta cepa (un higo en el estado de California, Estados Unidos) (Mortimer and Johnston, 1986). Sin embargo, sus alelos *BRE5* y *GAL4* se agrupan con los alelos vínicos, y en el caso de *CAT8* presenta un alelo recombinante. La naturaleza recombinante de esta cepa es de esperarse, ya que se le obtuvo mediante cruzamientos de varias cepas y la aislada de higo en descomposición que contribuyó un 88% del genoma de la cepa S288c (Mortimer and Johnston, 1986).

Con base a las regiones génicas analizadas se obtuvo el genotipo para cada cepa y se observó que 45 comparten alguno de los 16 genotipos. La mayoría de las cepas son aisladas de ambientes vínicos, y en algunos casos de diferente continente, por ejemplo, cepas de Argentina presentan un genotipo idéntico a cepas de Austria, Francia y Suiza o con Sudáfrica y una cepa de masato de Perú es idéntica a otra de cerveza de sorgo de Burkina Faso; lo que sugiere que las cepas pueden haberse introducido por el hombre a través de la distribución de la vid o el vino (Pretorius, 2000).

De los cuatro loci estudiados *EGT2* resultó el más variable, con 35 sitios polimórficos en 49 alelos detectados y una diversidad nucleotídica de 0,99%. Resulta interesante que este locus y *CAT8* son los más claros en la diferenciación de alelos vínicos y no vínicos entre las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas. Sin embargo, con los loci *GAL4* y *BRE5* no es posible una separación tan clara entre los alelos de las cepas vínicas de las no vínicas. Para *BRE5*, no se logra una separación muy clara entre alelos de cepas vínicas y no vínicas aunque es posible la identificación de 10 grupos de alelos, seis de ellos incluyen alelos vínicos. En *GAL4* ocurre algo semejante, se logra una separación de la mayoría de las cepas vínicas en el grupo 1, pero no se obtiene una topología muy definida con el resto de alelos y solo es posible una agrupación de alelos de cepas de Japón, y dos grupos de alelos de cepas de Latinoamérica con otros alelos de diversas cepas. Estos resultados pueden

deberse a la mayor tasa de recombinación estimada en las regiones génicas *BRE5* y *GAL4*, en comparación con *EGT2* y *CAT8*.

Con el desequilibrio de ligamiento detectado entre las poblaciones de cepas vínicas, se deduce, como se esperaba, que estas poblaciones muestran una reproducción clonal, tal como se ha mencionado para otras cepas vínicas de *S. cerevisiae* con microsatélites (Jubany et al., 2008; Legras et al., 2007) o bien que muestran una clara estructura poblacional (Fay and Benavides, 2005a). Este desequilibrio de ligamiento no se puede explicar por la falta de recombinación, porque con la prueba de los cuatro gametos se obtiene evidencias de recombinación (Hudson, 1987) aunque es menor entre las cepas vínicas que en las cepas no vínicas. Por lo que el desequilibrio de ligamiento probablemente este dado por la subdivisión poblacional, como se ha mencionado previamente para otras poblaciones de cepas vínicas (Fay and Benavides, 2005a). Con los resultados obtenidos se puede concluir que debido a la poca variabilidad genética que se ha observado en estas cuatro regiones génicas, las poblaciones vínicas, en algunos casos con pocas diferencias entre ellas según el análisis de divergencia, presentan una estructura poblacional clonal, pero con bajas tasas de recombinación. Sin embargo, hay baja heterocigosidad, probablemente como resultado de episodios ocasionales de reproducción sexual homotálica o autodiplodización (haplo-selfing). Ello explicaría la alta homocigosidad detectada en estas poblaciones (Tsai et al., 2008a).

Por otro lado, las poblaciones no vínicas además de presentar una gran diversidad genética, presentan desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, la detección de cepas homocigotas y heterocigotas con diferentes combinaciones de alelos identificados como vínicos o no vínicos, muestra una estructura poblacional compleja. Además con la prueba de los cuatro gametos, se obtienen indicios de una mayor tasa de recombinación, por lo que las poblaciones de cepas no vínicas muestran una estructura poblacional compleja y diferente entre ellas, lo que se comprueba también con el análisis de divergencia poblacional. Estos datos concuerdan con las poblaciones vínicas estudiadas y mencionadas previamente (Fay and Benavides, 2005a; Legras et

al., 2007), por lo que, el desequilibrio de ligamiento esta dado por la fuerte estructura poblacional, que no se elimina después de las altas tasas de recombinación detectadas en la población no vínica y su mayor heterocigosidad. En conclusión, la alta diversidad genética detectada entre las poblaciones de cepas no vínicas muestra una estructura poblacional compleja, con indicios de reproducción sexual, por los altos niveles de recombinación detectados, pero con cierta estructura poblacional clonal.

Se estudió si la selección ha participado en la generación de la variabilidad de las regiones génicas analizadas de *S. cerevisiae*. Primero se analizó con pruebas que utilizan los polimorfismos intraespecíficos, tales como la D de Tajima (Tajima, 1989) y la D^* y F^* de Fu y Li (Fu and Li, 1993); y no se detectó selección, a excepción de *CAT8* con la prueba de D de Fu y Li. Al considerar el signo del valor de la D de Tajima, se puede deducir que la población está bajo selección purificadora ($D < 0$), y que existe un exceso de alelos deletéreos, los cuales generalmente se mantienen a baja frecuencias. Esto se comprueba con la frecuencia observada de los alelos detectados en las regiones génicas en donde se cuenta con alelos con una sola cepa.

Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron otras dos pruebas que detectan selección pero que consideran los polimorfismos intraespecíficos y la divergencia (en este estudio se utilizo la divergencia respecto a *S. paradoxus*). Una de ellas es la prueba de McDK (McDonald and Kreitman, 1991) con la cual se comparó la variación de sustituciones sinónimas y de reemplazamiento de *S. cerevisiae* con respecto a las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Se detectó selección lo que puede deberse a que las cepas vínicas han sufrido un proceso de domesticación (Fay and Benavides, 2005a) en que se han seleccionado cepas con características importantes para la fermentación alcohólica, o bien que durante el proceso de domesticación se han visto sometidas a fuertes cuellos de botella que han provocado la fijación de sustituciones ligeramente deletéreas por deriva. Por lo anterior, se realizó la prueba de McDK considerando alelos vínicos y no vínicos por separado para ver si las cepas no vínicas han sufrido un proceso de selección.

Como se ha observado con los alelos de *S. cerevisiae* (alelos v́nicos y no v́nicos) se detectó que hay selecci3n positiva, en 10 de 12 pruebas realizadas (tres poblaciones de *S. paradoxus* con las cuatro regiones g3nicas). Sin embargo, cuando se aplica la prueba de McDK a los alelos de cepas no v́nicas no se detecta selecci3n en 7 de las 12 pruebas realizadas y s3lo en la regi3n g3nica *BRE5* se detecta selecci3n con las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Una explicaci3n de la selecci3n en esta regi3n g3nica es el reciente papel descrito de *BRE5* sobre el procesamiento de DNA durante la meiosis, es decir que con la delec3n de este gen no se obtienen niveles adecuados de conversi3n g3nica durante la meiosis (Jordan et al., 2007).

Otra de las pruebas utilizadas para detectar selecci3n es la HKA (Hudson et al., 1987) que predice que hay una correlaci3n entre la diversidad intraespecífica y la divergencia entre especies. No se detecta selecci3n, con excepci3n de la regi3n *EGT2* en comparaci3n con las otras tres regiones analizadas para la poblaci3n de Europa de *S. paradoxus*. Lo anterior se puede explicar con los resultados obtenidos en el capitulo 3, en donde se observ3 que la poblaci3n europea de *S. paradoxus* ha sufrido una introgresi3n de *S. cerevisiae* en el cromosoma XIV que incluye esta regi3n g3nica (Liti et al., 2006).

Otro punto interesante es si existen diferencias selectivas entre los alelos v́nicos y no v́nicos de *S. cerevisiae*. Como se observa en la Tabla 2.18, la prueba de HKA no rechaza la hip3tesis de variaci3n selectivamente neutra cuando se compara el polimorfismo de los alelos v́nicos con la divergencia de los alelos no v́nicos entre las regiones *EGT2-CAT8* y *GAL4-BRE5*, pero si encuentra selecci3n entre las otras comparaciones (*EGT2-BRE5*, *CAT8-BRE5*, *EGT2-GAL4* y *CAT8-GAL4*), esto hace suponer que las regiones g3nicas *EGT2* y *CAT8* muestren un patr3n de evoluci3n diferente a *BRE5* y *GAL4*. Al considerar los polimorfismos de los alelos no v́nicos y la divergencia de los alelos v́nicos se detecta que hay selecci3n en las comparaciones de la regi3n g3nica *BRE5* y las otras tres, considerando las sustituciones totales; y entre *GAL4-BRE5* y *GAL4-CAT8* con las sustituciones no sin3nimas.

Otro aspecto interesante que se observó es que las cepas vínicas muestran una tasa de recombinación menor con un número menor de eventos de recombinación en comparación con las cepas no vínicas. Dado que se observó un mayor número de heterocigotos en las cepas no vínicas, hace suponer que las cepas de Latinoamérica y en general las cepas aisladas de ambientes no vínicos, presenten una mayor tasa de reproducción sexual, lo que se comprobó mediante la obtención de las esporas de las cepas de chicha y masato, que resultaron ser viables. Además, los valores de desequilibrio de ligamiento encontrados suponen una reproducción clonal pero con algunos eventos de recombinación.

Debido a que la tasa de recombinación no es constante entre las diferentes regiones del genoma de cada organismo, la adaptación a nivel molecular puede estar fuertemente afectada por el ambiente de recombinación de cada gen. Así los genes menos adaptados muestran menores tasas de recombinación en comparación con los mejor adaptados que presentan mayores tasas de recombinación (Connallon and Knowles, 2007). De acuerdo a lo anterior se puede concluir que las regiones génicas *CAT8* y *EGT2* con una tasa de recombinación baja están menos adaptadas, que las regiones génicas *GAL4* y *BRE5* en donde se detectan mayores tasas de recombinación y se evita la dispersión de mutaciones deletéreas.

Las levaduras del genero *Saccharomyces* presentan varias alternativas en el modo de reproducción. Cuando las condiciones son adecuadas para el crecimiento, el principal modo de reproducción asexual es mediante la producción de yemas vegetativas a partir de células diploides. La falta de nutrientes induce la reproducción sexual y con ello la meiosis. Así, cada célula diploide produce en cada asca una tétrada de células haploides, esporas, con dos tipos sexuales diferentes. Cuando las condiciones son adecuadas, las ascosporas germinan y se pueden cruzar para recuperar la fase diploide, la cual puede ser en una de las tres formas posibles. La primera es que se realice el cruzamiento con una espora de la misma tétrada (intra-tétrada); la segunda, es que se libere la espora y se cruce con otra espora de otra tétrada que puede ser o no del mismo clon (inter-tétrada); y la tercera, es cuando la espora no se

puede cruzar inmediatamente, sufre una mitosis y cambio en el tipo sexual, de modo que se aparea la célula hija y la madre dando lugar a cigotos diploides homocigotos para todos los genes excepto para el *MAT* (autodiploidización) (Herskowitz, 1988).

Se ha deducido a partir de los patrones de variación genética, que en *S. paradoxus* la frecuencia de reproducción asexual es del 99.9% y la sexual en 0.1% (Johnson et al., 2004). El cálculo de cada forma para recuperar la fase diploide después de sufrir meiosis es la siguiente: el cruzamiento intra-tétradas con un 94% (Johnson et al., 2004; Tsai et al., 2008b), inter-tétradas un 1% (Johnson et al., 2004) y autodiploidización con 5% (Johnson et al., 2004; Tsai et al., 2008b).

Nuestros resultados, apuntan a que la principal forma de reproducción en las poblaciones vínicas es la asexual, o bien, si han pasado por reproducción sexual, la fase diploide se recuperó mediante la autodiploidización, ya que se detecta una gran cantidad de homocigotos y bajas tasas de recombinación. Además de que las poblaciones no están en equilibrio Hardy-Weinberg y los pocos heterocigotos que se observan presentan alelos muy semejantes con pocos cambios entre ellos. Por último, se detecta fuerte desequilibrio de ligamiento que no se puede romper debido a la baja tasa de recombinación.

En el caso de las poblaciones no vínicas, se deduce que la reproducción es principalmente clonal, porque no hay equilibrio H-W, y se detecta desequilibrio de ligamiento, quizás por la estructura poblacional, y no por la falta de recombinación. Sin embargo, se detecta que la reproducción sexual (anfimixis) intertétrica debe ocurrir con cierta frecuencia, porque las cepas presentan mayor heterocigosidad, los alelos son muy diferentes (vínicos, no vínicos o recombinantes entre ellos) y por los mayores índices de recombinación observados y la gran capacidad de esporulación observada en cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica.

En conclusión, se observa que la población vínica está compuesta principalmente por cepas homocigotas, en donde la recombinación es muy rara

y por ello la heterocigosidad baja, ya que la forma de reproducción principal es clonal con ciclos de diploidización. La menor diversidad genética es debido al reciente proceso de domesticación (Fay and Benavides, 2005a) y dispersión con el vino. Por otro lado, la población de cepas no vnicas presenta una estructura compleja con mayores tasas de recombinación, altos valores de heterocigosidad y con indicios de reproducción tanto sexual (anfimixis) como clonal.

Como se ha observado, las cepas vnicas presentan una baja heterocigosidad y baja diversidad nucleotídica, la tasa de recombinación es nula o muy baja y se detectó desequilibrio de ligamiento. Además, los genotipos son muy parecidos entre ellos, es decir, los alelos presentan diferencias de 1 sola sustitución nucleotídica, la presencia de alelos no vnicos es esporádica. Esto nos da indicios de que el fenómeno de domesticación que dió origen a las cepas vnicas, y que ocurrió en Oriente Medio (Legras et al., 2007) es reciente. Posteriormente, con la dispersión del vino hacia el Mediterráneo y Centro Europa, y luego a América y Sudáfrica, se difundió la tecnología de la producción de vino y con ello la dispersión de las cepas vnicas, lo que explica la alta similitud detectada entre las cepas vnicas de distintos orígenes geográficos. Otro aspecto, que era de esperarse, es que el tipo de reproducción mayoritario es clonal, ya que los alelos de las cepas vnicas presentan pequeñas diferencias nucleotídicas entre ellos, que se pueden explicar por acumulación de mutaciones. Por último, la alta homocigosis detectada en las cepas vnicas puede ser producto de una recombinación o conversión génica (Puig et al., 2000), o bien por ciertos ciclos de reproducción sexual por autodiploidización (haploselfing).

Por otro lado, las cepas no vnicas presentan una mayor heterocigosidad, mayor diversidad nucleotídica entre alelos, los genotipos son muy diferentes, en su mayoría únicos y con desequilibrio de ligamiento entre los loci. Esto puede explicarse mediante dos posibles escenarios diferentes no incompatibles. En primer lugar, suponemos que las poblaciones originales silvestres son heterogéneas, con presencia de alelos vnicos y no vnicos. Posteriormente, los alelos vnicos se fijaron en las cepas vnicas durante la

domesticación. La segunda propuesta, es que las poblaciones no vínicas presentan alelos diferentes a los de las vínicas y los alelos vínicos se fijaron en las cepas vínicas durante la domesticación en Oriente Próximo. La posterior dispersión de estas cepas con el vino les llevó a estar en contacto con poblaciones no vínicas, donde se produjo intercambio genético por reproducción sexual, con la formación de heterocigotos vínicos y no vínicos, y la aparición de alelos vínicos en cepas de fermentaciones no vínicas.

No hay indicios claros de selección durante la domesticación, los valores de $w > 1$ observados en las cepas vínicas para todos los genes pueden ser debidas a la acumulación de sustituciones ligeramente deletéreas, por deriva, durante los cuellos de botella sufridos a lo largo del proceso de domesticación. Esto último se ha observado en plantas y animales domesticos (Doebley et al., 2006; Palaisa et al., 2004).

CAPITULO 3. Estudio genético de *S. paradoxus*.

Los organismos de una población compiten e intercambian genes unos con otros, y comparten los procesos de deriva génica y adaptación, hasta que las poblaciones se separan. Cuando se interrumpe el flujo genético entre las poblaciones la acción de las fuerzas evolutivas puede ser diferente en cada una de ellas y con ello las poblaciones divergen. La evolución secuencial puede producir divergencia genética, y esto ocasiona el aislamiento reproductivo entre las poblaciones, lo que es utilizado para la definición de especie según el concepto biológico.

S. cerevisiae es un organismo modelo bien conocido que está asociado a la actividad humana por medio de la fermentación para la producción de pan y bebidas alcohólicas. En cambio *S. paradoxus*, la especie más cercana a *S. cerevisiae*, no se ha encontrado asociada a alguna actividad humana con la excepción de un estudio donde se ha descrito a *S. paradoxus* como la especie de levadura predominante en viñedos croatas (Redzepovic et al., 2002). Esta especie se encuentra asociada a exudados de árboles, suelo e insectos. El genoma de *S. paradoxus* es colineal con el de *S. cerevisiae*, es decir, no muestran reordenaciones cromosómicas entre las dos especies (Fischer et al., 2000; Kellis et al., 2003) y la divergencia nucleotídica promedio entre ambos genomas es del 15%, aproximadamente, la menor entre las especies del género (Cliften et al., 2001; Liti et al., 2006).

Entre las diferentes especies del género *Saccharomyces*, es posible la formación de híbridos viables en el laboratorio, aunque estériles (de Barros Lopes et al., 2002; Greig et al., 2002b; Sebastiani et al., 2002). Además se han detectado híbridos naturales (Casaregola et al., 2001; de Barros Lopes et al., 2002; González et al., 2006; Groth et al., 1999; Lopandic et al., 2007; Masneuf et al., 1998), lo que indica que no existen barreras precigóticas responsables del aislamiento reproductivo, por lo que es posible el apareamiento y la formación de híbridos interespecíficos en la naturaleza. Sin embargo, estos híbridos son estériles, ya que la viabilidad de sus esporas es muy baja ($\leq 1\%$)

(Naumov et al., 1991), lo que indica la existencia de aislamiento postcigótico. Recientemente, estudios de elección de apareamiento indican la posibilidad de cierto aislamiento reproductivo precigótico entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, como respuesta adaptativa para evitar el coste selectivo del apareamiento interespecífico y la formación de híbridos estériles (Macleán and Greig, 2008).

Estudios moleculares y genéticos han demostrado la existencia de al menos tres poblaciones naturales geográficamente divergentes de *S. paradoxus*: Europa (Naumov et al., 1997), Asia (Naumov et al., 1993; Naumov et al., 1997), y Norteamérica (Naumov et al., 1996; Naumov et al., 1998; Sniegowski et al., 2002). Mediante análisis filogenético se ha comprobado que las secuencias de *S. paradoxus* se agrupan en tres clados, que se correlacionan con la distribución geográfica a nivel continental (Liti et al., 2006).

La frecuente hibridación natural entre especies de *Saccharomyces* (de Barros Lopes et al., 2002), la transferencia horizontal de elementos transponibles entre *S. cerevisiae* y *S. mikatae* (Liti et al., 2005), o la introgresión de secuencias subteloméricas entre *S. cerevisiae* a *S. paradoxus* (Liti et al., 2006), sugiere que la delimitación entre especies es incierta y que cierto nivel de intercambio genético es posible.

El disponer de un amplio muestreo de la variabilidad genética en *S. cerevisiae* permite abordar el análisis de la diferenciación genética entre las dos especies más próximas del género *Saccharomyces*. Este tipo de estudios puede ser interesante también para delimitar las relaciones entre *S. cerevisiae* y su especie hermana, dado que algunos autores (Naumov, 1996) propusieron que *S. cerevisiae* pudiera tratarse de una especie surgida de la domesticación, es decir, asociación a ambientes antrópicos, de poblaciones de *S. paradoxus*.

Aunque en los resultados del capítulo anterior, así como los de otros autores (Fay and Benavides, 2005a) indican la existencia de poblaciones silvestres de *S. cerevisiae*, en el presente capítulo realizaremos un análisis de las delimitaciones genéticas de ambas especies. Para ello, se determinó la variación nucleotídica entre las poblaciones de *S. paradoxus*, la divergencia

entre ellas, así como entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, y por último se analizó filogenéticamente las tres poblaciones de *S. paradoxus*, americana, europea y asiática con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*.

3.1 Polimorfismo y diversidad nucleotídica de *S. paradoxus*.

El análisis de la diversidad genética de *S. paradoxus* incluye el estudio de las mismas cinco regiones génicas, cuatro nucleares que fueron analizadas en *S. cerevisiae* y una mitocondrial. En total suman 2816 pb, a partir de 17 cepas de *S. paradoxus* y de 22 en el caso de la región mitocondrial. La Figura 3.1, muestra las posiciones nucleotídicas variables con los polimorfismos detectados en las cinco regiones génicas analizadas en las cepas de *S. paradoxus*, en donde se muestran los 180 sitios polimórficos identificados. Ninguna de las cepas resultó heterocigota para cualquiera de las regiones génicas analizadas y el genotipo identificado para cada una de las cepas estudiadas es diferente (Figura 3.1). En todas las regiones analizadas se detectan cambios nucleotídicos característicos para cada una de las tres poblaciones de *S. paradoxus*, la de Europa, la de Asia y la de América.

Se calculó la diversidad nucleotídica (π) de las cinco regiones génicas estudiadas para las cepas de *S. paradoxus*, que se muestra en la Tabla 3.1. La menor diversidad nucleotídica estimada fue de 0,0133 para *CAT8*, le siguieron las regiones génicas *BRE5*, *GAL4* y *COX2* con $\sim 0,0250$. Resulta interesante destacar que la mayor diversidad nucleotídica se observó de nuevo con el gen *EGT2*, (0,0781) (Tabla 3.1). Con el gen *CAT8* se ha observado poca variabilidad genética debido a que las cepas europeas son idénticas (un único alelo), esto mismo sucede con la población asiática y tan sólo en la americana se detectaron tres alelos de un total de cinco (Anexo 6). El resto de las regiones nucleares analizadas *GAL4*, *BRE5* y *EGT2*, presentan más variabilidad con 9, 11 y 12 alelos identificados.

Cepa	Región génica	
	CAT8	BRE5
	1111344455555666 27712330012033446113 13456180913148132580	111112222333333446666666666666 33789336790368013478949001112334556 1904497357070734083424867261683194166
1939	GCGCACTGACCGGCCAGT	CATAATTGTGCCCCCTCCCTCACCTTGATATCGCACA
10175G
11144G
406C.....
10308G
11157	A.....
11422C.GT.....G.C	..C.G.A.A.T.....TAT..G
11424C.GT.....G.C	..C.G.A.A.T.....TA..G
11426C.GT.....G.C	..C.G.A.A.T.....TA..G
11152C.GT.....G.C	..C.G.A.A.T.....TA..G
11158	AC.AT.TCA..AATAGTGA.GC.CAAT.TTTCTTTCTGTTCCAG.CCTC.GT.
5313	A.TATCTCA..AATAGTGA.	...CGC..AATTTT..TT.C.GTTCCAGCCCTC.GT.
120M	A.TATCTCA..AATAGTGA.GC..AATTTT..TT.C.GTTCCAG.CCTC.GT.
115M	A.TATCTCA..AATAGTGA.GC..AATTTT..TT.C.GTTCCAG.CCTC.GT.
79-65	AA.AT.TCA..AATAGTGA.GC..AAT.TTTCTTTCTGTTCCAG.CCTC.GT.
79-140	AA.AT.TCA..AATAGTGA.	A...GC..AAT.TTTCTTTCTGTTCCAG.CCTC.GT.
79-128	AA.AT.TCA..AATAGTGA.GC..AAT.TTTCTTTCTGTTCCAG.CCTC.GT.

Figura 3.1. Posiciones nucleotídicas polimórficas de las tres poblaciones de *S. paradoxus* en las cuatro regiones nucleares *CAT8*, *BRE5*, *GAL4* y *EGT2* y la mitocondrial *COX2*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia. Los alelos de las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia).

Cepa	Región génica	
	<i>GAL4</i>	<i>EGT2</i>
	1111111111111222222223344444555	111111111111111112222222222222233333
	688902233344456780013346800068899345	2444555566777889011223334566677890124446777789900023
	9345678936734855920961554368165789432	35972581568032585862172725843259043853867870478954723646
1939	GCTAAACTAGTTGCAGGAACATACGATGCACGTTGTG	TTATAATTAATACACCCTTGACAGGCCTAGCCATCCCCAAGTAACTTTTACCTT
10175C.....A.....A.....G.....T.....A.....C
11144C.....A.....A.....G.....T.....A.....C
406TC.....A.....G.....T.....A.....C
10308C.....A.....A.....G..G.G.....T.....A.....C
11157C.....A.....A.....	.C.....G.....T.....A.....
11422	..CG..TC.TC.....TAG.....	..C.GTGCG.AG.GT.GTACAGTCAATTTCG.TT.A..ATG..CTGGACCCC.TTC.
11424	..CG..TC..C.....TAG.....	..C.GTGCG.AG.GT.GTACAGTCAATTTCG.TT.A..ATG..CTGGACCCC.TTC.
11426	..CG..TC..C.....TAG.....	..T.GTGCG.AG.GT.GTACAGTCAATTTCG.TT.A..ATG..CTGGACCCC.TTC.
11152	..CG..TC..C.....TAG.....	..T.GTGCG.AG.GT.GTACAGTCAATTTCG.TT.A..ATG..CTGGACCCC.TTCC
11158	ATC.TT..G.CCTTGA..CTCC..A.CATGGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC.G.CAATTCGATTGGAAATGGACTGGACCCCTT.CC
5313	ATC.TT..G.CCTTGA.GCT.CG.A.CA.GGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC...CAATTCG.TTGG.AATGGACTGGACCCC.T.C.
120M	ATC.TT..G.CCTTGA.GCT.CG.A.CA.GGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC...CAATTCG.TTGG.AATGGACTGGACCCC.T.C.
115M	ATC.TT..G.CCTTGA.GCT.CG.A.CA.GGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC...CAATTCG.TTGG.AATGGACTGGACCCC.T.C.
79-65	ATC.TT..G.CCTTGA..CT.C..A.CATGGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC.G.CAATTCG.TTGG.AATGGACTGGACCCCTT.CC
79-140	ATC.TT..G.CCTTGA..CT.C..A.CATGGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC.G.CAATTCGATTGG.AATGGACTGGACCCCTT.CC
79-128	ATC.TT..G.CCTTGA..CT.C..A.CATGGA.AC.C	C.CCGTGCG..GTGTTGTAC.G.CAATTCGATTGG.AATGGACTGGACCCCTT.C.

Continuación Figura 3.1.

3.2 Análisis filogenético de *S. paradoxus*.

Para las 17 cepas estudiadas de *S. paradoxus* se obtuvieron las secuencias de las cuatro regiones nucleares *BRE5*, *CAT8*, *GAL4* y *EGT2* y la mitocondrial *COX2*. Se incluyeron las secuencias de alelos considerados como v́nicos y no v́nicos de *S. cerevisiae*, para determinar las relaciones filogenéticas con las tres poblaciones de *S. paradoxus*. También se utilizaron las secuencias de cepas de referencia de las restantes especies del género, *S. cariocanus*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii* y *S. bayanus* de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>).

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* coexisten en el mismo hábitat (Sampaio and Gonçalves, 2008; Sniegowski et al., 2002) y pueden formar híbridos estériles en el laboratorio (de Barros Lopes et al., 2002). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito ningún híbrido natural, ya que el único que se propuso como tal (Liti et al., 2005), es la cepa CBS 406 (NL406), que en este trabajo se indica que no es así, y resultados de la caracterización con 36 genes no mostrados.

Con ello intentamos resolver tres cuestiones, a) ¿Cuál es la diferenciación genética de estas especies?, b) ¿Las poblaciones de *S. paradoxus* muestran suficiente divergencia entre ellas para considerarse como especies diferentes o solo poblaciones distintas? y c) ¿Las cepas v́nicas de *S. cerevisiae* provienen de *S. paradoxus* o de *S. cerevisiae* no v́nicas? Para contestar estas preguntas se obtuvieron árboles filogenéticos de las regiones génicas *BRE5*, *CAT8*, *GAL4*, *EGT2* y *COX2* con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias de los alelos de 17 cepas de *S. paradoxus* y de alelos v́nicos y no v́nicos de *S. cerevisiae* (Capítulo 2) para establecer las relaciones filogenéticas entre ellas. La fiabilidad del árbol se determinó con la prueba de remuestreo con reemplazamiento ('bootstrap') no paramétrico, realizando 2000 réplicas.

Los árboles filogenéticos de las regiones génicas *CAT8*, *GAL4* y *BRE5* (longitud de 665, 555 y 681) muestran una topología filogenética similar, es decir, todas las cepas de *S. paradoxus* forman un solo grupo con valores de

bootstrap muy altos de 99% y 100% lo que indica que *S. paradoxus* es una especie diferente a *S. cerevisiae* (Figura 3.2 y 3.3). En cambio con *EGT2* (longitud de 336) la población europea de *S. paradoxus* se agrupó entre los alelos de las cepas de *S. cerevisiae*, y en el caso de la región mitocondrial *COX2* las secuencias de la especie de *S. paradoxus* se agruparon entre los alelos de las cepas de *S. cerevisiae*. Esto contradice el resultado obtenido en las otras regiones nucleares, por lo que es interesante un análisis de las secuencias de estas regiones génicas en más profundidad, tal como se muestra a continuación.

En todos los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de regiones nucleares se observan los tres grupos de cepas que corresponden a las tres poblaciones de *S. paradoxus* estudiadas con valores de bootstrap muy altos de 97 a 100%. El árbol con la región mitocondrial muestra las tres poblaciones diferentes de *S. paradoxus*, sin embargo, el valor de bootstrap es de 73% para la población americana, 78% para la europea y 92% para la asiática. Es importante mencionar que las secuencias de las cepas de *S. paradoxus* de la misma población siempre se mantienen agrupadas en todos los árboles, es decir, en la población de Europa se agrupan las seis cepas de Europa y la de Sudáfrica. En la americana están agrupadas las tres cepas de Canadá, las tres de México y la de Estados Unidos. En la población asiática se agruparon las tres cepas de Siberia oriental rusa y la de Japón. Como se puede observar, el análisis filogenético corrobora los resultados observados con los polimorfismos, es decir, las cepas siempre forman tres grupos significativos que corresponden a cada una de las tres poblaciones diferenciadas de *S. paradoxus*.

En el árbol filogenético de la región mitocondrial *COX2* (Figura 3.3) se observan 5 grupos de cepas de *S. cerevisiae*; 2 con cepas no vínicas y 3 con cepas vínicas y no vínicas. Además se observan las tres poblaciones de *S. paradoxus*: la asiática, la europea y la americana. Es importante mencionar que la cepa CECT11152 de *S. paradoxus* de Japón no se agrupa con las otras asiáticas, sino en uno de los grupos de *S. cerevisiae*.

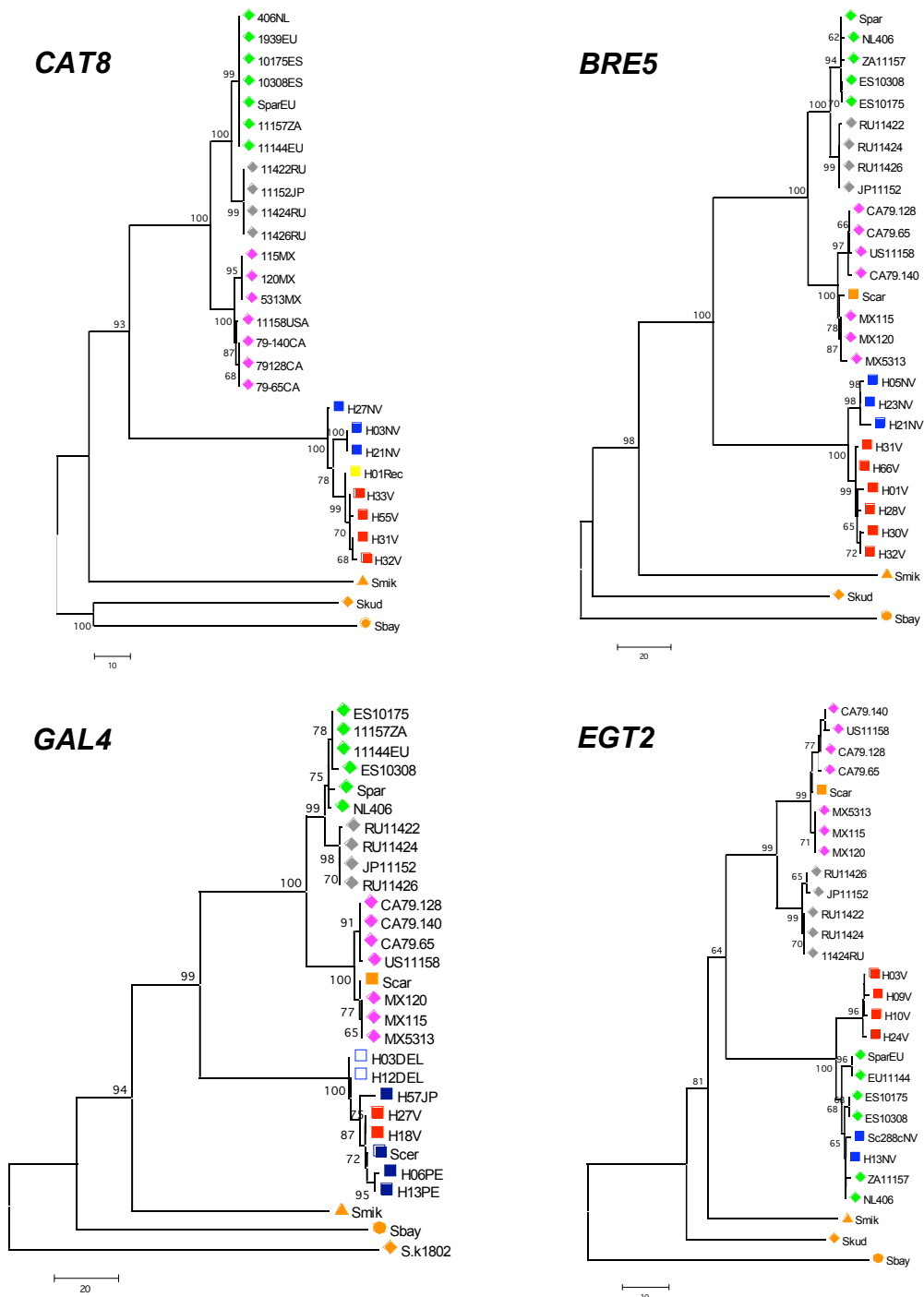


Figura 3.2. Árboles filogenéticos de *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* de las regiones génicas nucleares *BRE5*, *CAT8*, *GAL4* y *EGT2* con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. Los números de los nodos corresponden a los valores de bootstrap (valores superiores al 60%). La escala esta dada en número de diferencias. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia) y los alelos de *S. cerevisiae* con un recuadro en rojo para las cepas vínicas, azul no vínicas y amarillo recombinantes (*EGT2*). Las secuencias de referencias están indicadas en color naranja y cada especie con una figura geométrica diferente: *S. mikatae* (triángulo), *S. cariocanus* (cuadro), *S. bayanus* (circulo) y *S. kudriavzevii* (rombo).

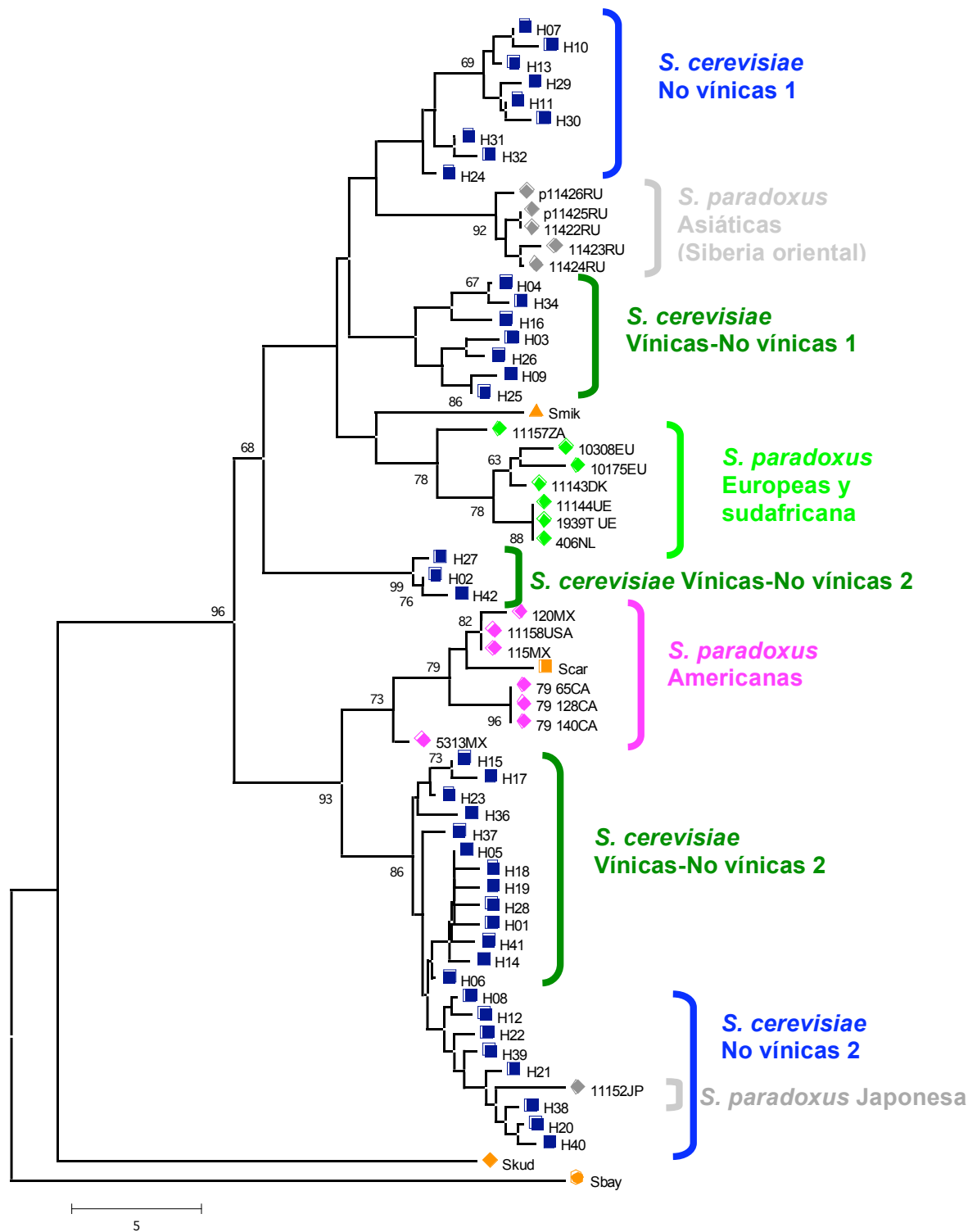


Figura 3.3 Árbol filogenético de *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* de la región génica mitocondrial COX2 con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias. Los números de los nodos corresponden a los valores de bootstrap (valores superiores al 60%). La escala esta dada en número de diferencias. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia) y los alelos de *S. cerevisiae* con un recuadro en rojo para las cepas vnicas y azul no vnicas. Las secuencias de referencias están indicadas en color naranja y cada especie con una figura geométrica diferente: *S. mikatae* (triángulo), *S. cariocanus* (cuadro), *S. bayanus* (circulo) y *S. kudriavzevii* (rombo).

3.3 Origen de los alelos vínicos de *S. cerevisiae*.

Para determinar el origen de los alelos vínicos de *S. cerevisiae*, se realizó un análisis filogenético con las secuencias de los alelos representantes de cada grupo de alelos detectados anteriormente en el capítulo 2, para cada una de las cuatro regiones nucleares con la secuencia de las tres poblaciones de *S. paradoxus*, la especie más cercana a *S. cerevisiae*. Como outgroup se utilizó la secuencia de las especies *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. cariocanus* y *S. bayanus*.

En la Figura 3.2 se muestran los árboles filogenéticos obtenidos con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias de las cuatro regiones génicas de las cepas de *S. paradoxus* y los de *S. cerevisiae*. Los alelos vínicos se agruparon con los alelos no vínicos de *S. cerevisiae* en los árboles filogenéticos de las regiones génicas *BRE5*, *CAT8* y *GAL4* con valores de bootstrap altos (100%). El árbol filogenético de la región génica *EGT2* muestra a la población europea de *S. paradoxus* que se agrupa con los alelos no vínicos de *S. cerevisiae* (valor de bootstrap 100%), pero no con los alelos vínicos de *S. cerevisiae* (valor de bootstrap 96%) (Figura 3.2). Los resultados obtenidos sugieren que los alelos vínicos se originaron a partir de los alelos no vínicos de *S. cerevisiae* y no a partir de *S. paradoxus*, la especie más cercana a *S. cerevisiae*.

3.4 Divergencia nucleotídica entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*.

Como se ha observado con los polimorfismos (Figura 3.1) y con la topología de los árboles filogenéticos (Figura 3.2 y 3.3), es posible diferenciar las tres poblaciones de *S. paradoxus*; pero en algunos casos (*EGT2* y *COX2*) no se logra la separación de las secuencias de las dos especies en dos grupos bien definidos. Por ello, se decidió analizar las divergencias nucleotídicas entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* de las cinco regiones génicas estudiadas para comparar si los niveles de divergencias entre las secuencias de las dos especies son suficientemente grandes para considerar a *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* como especies diferentes.

La Tabla 3.2 muestra los valores de divergencia nucleotídica neta expresada en sustituciones nucleotídicas por sitio entre los alelos de *S. cerevisiae* y los de *S. paradoxus* para las cinco regiones génicas estudiadas. El promedio de la divergencia intrapoblacional de las cinco regiones génicas analizadas en *S. cerevisiae* es menor (1%) en comparación con *S. paradoxus* (3%). Es importante mencionar que la diversidad nucleotídica para *EGT2* en *S. cerevisiae* es muy baja, con 0,9% en comparación con 7,8% de *S. paradoxus*; y para la región mitocondrial *COX2* se estimó una divergencia semejante para las dos especies (2%). Por esto, se determinó el promedio de divergencia nucleotídica sin considerar una o las dos regiones génicas. Los valores de divergencia intrapoblacional disminuyen de 1% a 0,7% en *S. cerevisiae* y de 3,3% a 2,1% en *S. paradoxus*. Al comparar la divergencia nucleotídica interpoblacional entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* se observa que el intervalo va desde 0,4% para *COX2* hasta 16,7% en *GAL4*, con promedio de 10,7% en todas las regiones génicas estudiadas. Sin embargo, cuando no se consideran las regiones *EGT2* y *COX2* se incrementa hasta 14,2%.

Se han descrito tres poblaciones de *S. paradoxus* con distinta distribución geográfica continental, en las cuales los híbridos formados entre cepas de las tres poblaciones muestran entre 30-40% de esporas viables. Este aislamiento genético parcial plantea la cuestión de que estas poblaciones son variedades, subespecies o semiespecies (Liti et al., 2006; Naumov et al., 1997) o especies diferentes (Kuehne et al., 2007). El análisis filogenético de las cinco regiones génicas estudiadas en el presente trabajo muestran una topología formada por tres clados que corresponden con las secuencias de las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Por lo anterior, resulta interesante el análisis de las divergencias entre las tres poblaciones de *S. paradoxus*, en comparación con las de *S. cerevisiae* y determinar si son suficientemente grandes para considerarlas como especies diferentes o poblaciones en proceso de especiación (Naumov et al., 1997).

Tabla 3.2. Divergencia nucleotídica de las cinco regiones génicas entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, expresada en sustituciones nucleotídicas por sitio. a, el promedio se calculó con las cinco regiones génicas, cuatro nucleares y una mitocondrial; b, el promedio se calculó con las cuatro regiones nucleares; c, el promedio se calculó con tres regiones nucleares (sin *EGT2*).

Región génica	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. cerevisiae</i> frente a <i>S. paradoxus</i>
CAT8	0,0087	0,0135	0,1229
BRE5	0,0083	0,0236	0,1362
GAL4	0,0043	0,0277	0,1673
EGT2	0,0094	0,0781	0,1057
COX2	0,0212	0,0234	0,0043
	0,0104 ^a	0,0333	0,1073
Promedio	0,0077 ^b	0,0357	0,1330
	0,0071 ^c	0,0216	0,1421

En un primer análisis se comparó la divergencia nucleotídica de las cinco regiones génicas estudiadas, expresada en sustituciones nucleotídicas por sitio, entre *S. cerevisiae* y las tres poblaciones de *S. paradoxus* que se muestra en la Tabla 3.3. Los valores de divergencia variaron desde 0,9% hasta 17%; sin embargo, los valores más bajos se detectaron en la región mitocondrial *COX2* con valores menores de 1,2% y en *EGT2*, pero solo en la población europea de *S. paradoxus*. Por el contrario, los valores más altos se detectaron en la región génica *GAL4*. Al obtener el promedio de las divergencias de las cinco regiones génicas analizadas por población de *S. paradoxus*, se observan valores desde 9% para la europea hasta 12% en la americana.

Como se ha mostrado anteriormente la divergencia entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* en *EGT2* y *COX2* es baja para tratarse de dos especies diferentes (Tabla 3.2). Por lo que se obtuvo el promedio de las divergencias sin considerar estas regiones génicas. En la Tabla 3.3 se observa que cuando no se incluyen las regiones génicas *EGT2* y *COX2* la divergencia de las tres poblaciones de *S. paradoxus* se incrementa hasta valores cercanos a 15%.

Tabla 3.3. Divergencia nucleotídica entre *S. cerevisiae* y las poblaciones de *S. paradoxus* y entre las poblaciones de *S. paradoxus* en las cinco regiones génicas, expresada en sustituciones nucleotídicas por sitio. a, el promedio se calculó con las cinco regiones génicas, cuatro nucleares y una mitocondrial; b, el promedio se calculó con las cuatro regiones nucleares; c, el promedio se calculó con tres regiones nucleares (sin *EGT2*). El color del número indica si el valor es menor (verde) o mayor (rojo) para cada comparación (columna) o entre los valores promedio de todas las comparaciones.

Región génica	<i>S. cerevisiae</i> frente a			Interpoblacional		
	América	Europa	Asia	América Europa	América Asia	Europa Asia
CAT8	0,1271	0,1297	0,1313	0,0219	0,0234	0,0075
BRE5	0,1504	0,1423	0,1436	0,0364	0,0348	0,0110
GAL4	0,1707	0,1578	0,1607	0,0373	0,0439	0,0119
EGT2	0,1400	0,0164	0,1275	0,1323	0,0412	0,0184
COX2	0,0117	0,0107	0,0089	0,0199	0,0229	0,0145
	0,1200 ^a	0,0914	0,1144	0,0495	0,0332	0,0127
Media	0,1470 ^b	0,1116	0,1408	0,0570	0,0358	0,0122
	0,1494 ^c	0,1433	0,1452	0,0319	0,0340	0,0101

Otro punto importante a estudiar es la divergencia entre las tres poblaciones de *S. paradoxus*, ya que como se ha observado con los polimorfismos descritos anteriormente y los árboles filogenéticos, es posible diferenciar las tres poblaciones de *S. paradoxus*, como se ha mencionado en estudios previos, pero queda la duda sobre la situación taxonómica de las poblaciones, es decir, son especies diferentes o no. Por ello, se decidió analizar las divergencias nucleotídicas entre las tres poblaciones de *S. paradoxus* de las cinco regiones génicas estudiadas para comparar si los niveles de divergencias entre ellas son suficientemente grandes para considerar alguna población como especie diferente.

En general, la divergencia entre las tres poblaciones de *S. paradoxus* para las cinco regiones génicas es menor al 5%, y solo entre la población americana y europea muestra valores desde 1,9% hasta 13,2%, para *COX2* y *EGT2*, respectivamente. La menor divergencia se observó entre las poblaciones de

Europa y Asia con valores desde 0,7% hasta 1,8% en *CAT8* y *EGT2*. Al obtener el promedio de la divergencia, sin considerar las cinco regiones, se observan valores de 1% y 3% entre la población asiática y la europea y americana. Sin embargo, si se consideran solo las cuatro regiones nucleares o sin incluir *EGT2* y la mitocondrial *COX2*, la divergencia entre la población americana y la europea disminuye de 5,7% hasta 3,1%.

Al comparar la divergencia nucleotídica entre los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* con *S. paradoxus* y las tres poblaciones, se observan valores de 12% (población de América y Asia) en *EGT2* hasta 17% para la región génica *GAL4* (Anexo 6).

3.5 Introgresion de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*.

La comparación del genoma de *S. cerevisiae* con *S. paradoxus* muestra una identidad del 85% (Kellis et al., 2003; Liti et al., 2006). Sin embargo, se ha demostrado que no ocurre en todos los cromosomas, pues una región subtelomérica del brazo izquierdo del cromosoma XIV con una longitud de 23 kb muestra una identidad alta con *S. cerevisiae*. Como se ha observado, en el estudio genético de *S. paradoxus* con las cinco regiones génicas estudiadas se demuestra que la mayor diversidad nucleotídica estimada es en *EGT2* con 0,07805 (Tabla 3.1) y una divergencia nucleotídica baja de 10,6% con respecto a *S. cerevisiae* (Tabla 3.2)

Por lo anterior, se estudio la región génica *EGT2* que se encuentra dentro de la región subtelomérica mencionada (Liti et al., 2006); y que se ha observado como una de las regiones mas informativas en cuanto a diversidad genética en *S. cerevisiae* (Capitulo 2). Por ello, se utilizó para identificar el fenómeno de introgresión entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*.

En la Figura 3.4 se muestra el árbol filogenético obtenido con las secuencias de la región *EGT2* entre las tres poblaciones de *S. paradoxus*, indicadas con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia) y todos los alelos de *S. cerevisiae* (indicados con un

recuadro) identificados entre las cepas vínicas (rojo) y no vínicas (azul). En el árbol se pueden diferenciar dos grupos mayoritarios, en un grupo están las poblaciones americanas y asiáticas de *S. paradoxus* pero separadas una de la otra con altos valores de bootstrap (99%). Dentro del grupo en donde se encuentran las cepas de *S. cerevisiae* está la población europea de *S. paradoxus*, tal como se ha observado anteriormente (Liti et al., 2006). Al considerar el tipo de alelo de *S. cerevisiae*, es decir, vínico o no vínico, la población europea se agrupó junto con los alelos considerados como no vínicos de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que la introgresión ocurrió entre la población de *S. paradoxus* europeas y las cepas consideradas como no vínicas de *S. cerevisiae*.

Al comparar las posiciones nucleotídicas entre la población europea y las cepas no vínicas se observan pocos o ningún cambio nucleotídico (Figura 3.5); es decir, las secuencias son idénticas entre los dos grupos con algunos cambios nucleotídicos que se pueden explicar como mutaciones, lo que muestra evidencias sobre la introgresión antes mencionada (Liti et al., 2006).

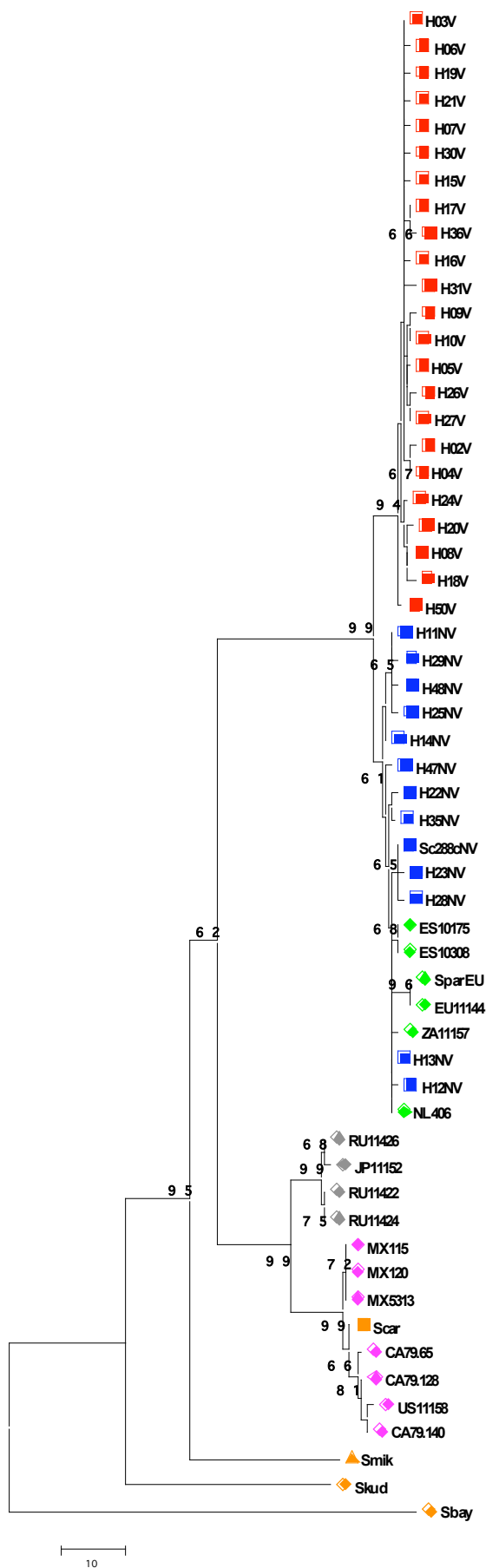


Figura 3.4. Árbol filogenético de las tres poblaciones de *S. paradoxus* y los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* de la región génica *EGT2* con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.

Los números de los nodos corresponden a los valores de bootstrap (valores superiores al 60%). La escala está dada en número de diferencias. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia) y los alelos de *S. cerevisiae* con un recuadro en rojo para las cepas vínicas y azul no vínicas. Las secuencias de referencias están indicadas en color naranja y cada especie con una figura geométrica diferente: *S. mikatae* (triángulo), *S. cariocanus* (cuadro), *S. bayanus* (círculo) y *S. kudriavzevii* (círculo morado).

El alineamiento de las secuencias de la región mitocondrial *COX2* de las 238 cepas de *S. cerevisiae* y 22 de la especie *S. paradoxus* presenta una longitud de 585 pb. Las cepas de *S. cerevisiae* están distribuidas en 40 haplotipos, mientras que para las cepas de *S. paradoxus* se identificaron 15 haplotipos. Con los haplotipos se obtuvieron las relaciones filogenéticas aplicando el método de NeighborNet utilizando el programa Splits Tree (Huson and Bryant, 2006) que se muestra en la Figura 3.6, donde se puede observar que las cepas de *S. cerevisiae* forman cuatro grupos (indicadas con una elipse de color negro). El grupo 1 está formado por alelos de cepas no vínicas y los grupos 2, 3 y 4 están formados por alelos de cepas vínicas y no vínicas. Los alelos de las cepas vínicas (grupos 2, 3 y 4) de *S. cerevisiae* están distribuidos en 17 haplotipos (Figura 3.6a) y los de las cepas no vínicas (grupo 1, 2, 3 y 4) en 30 haplotipos (Figura 3.6b). Nueve de los haplotipos, el 2, 4, 5, 6, 13, 15, 23, 25 y 26, están presentes tanto en cepas vínicas como no vínicas. Al comparar la distribución de alelos para el gen mitocondrial *COX2* se confirmó lo que se ha obtenido con las cuatro regiones nucleares, es decir, que la población de cepas vínicas es más homogénea y con menor variabilidad genética que las cepas de ambientes no vínicos.

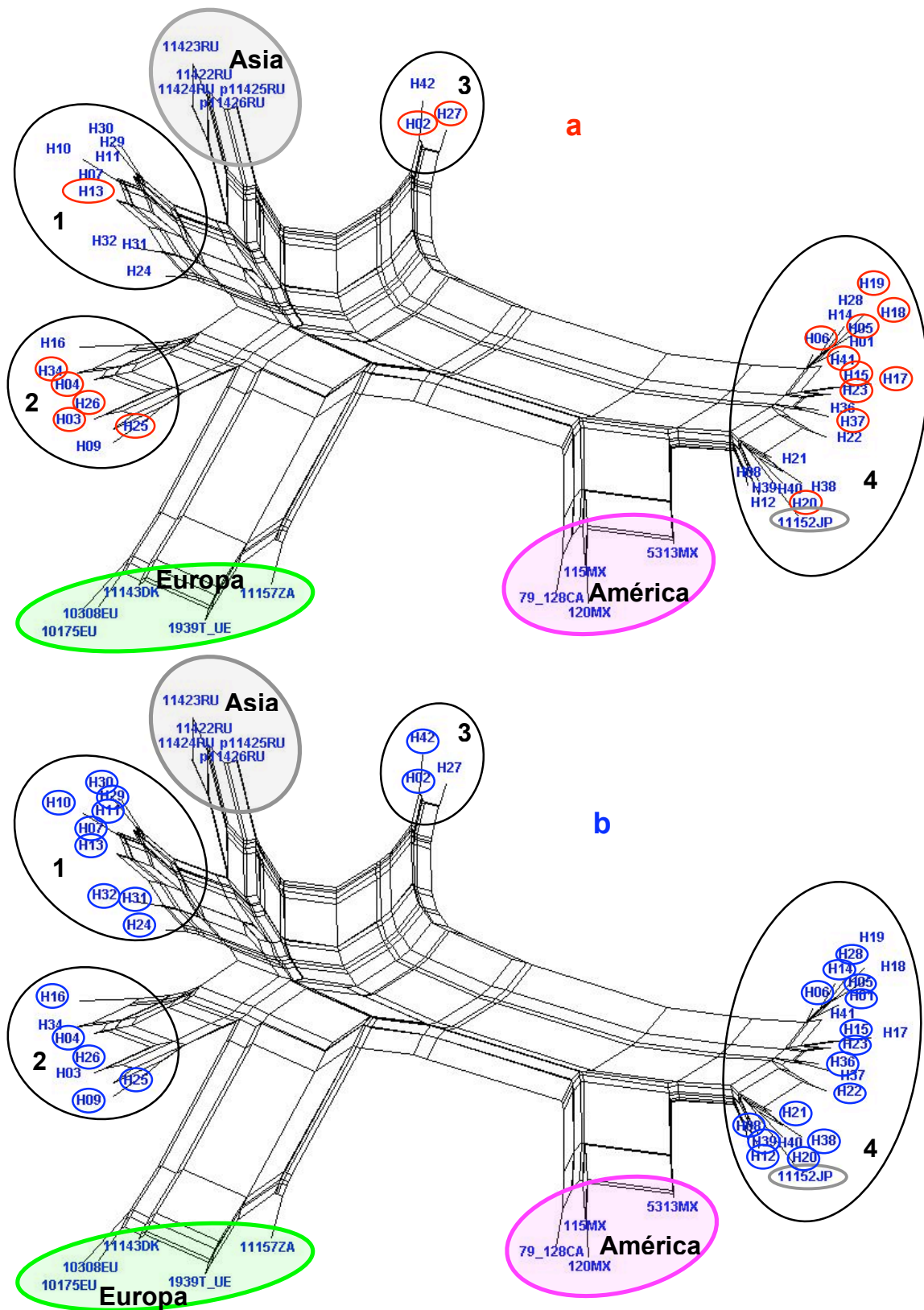


Figura 3.6. Red filogenética de la región mitocondrial COX2 de los alelos de cepas vnicas (a) y de los alelos de cepas no vnicas (b) de *S. cerevisiae* y las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con elipses y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde) y americana (fucsia). Los grupos de haplotipos de *S. cerevisiae* están marcados con un número en negro.

Los 15 haplotipos identificados en COX2 para las cepas de *S. paradoxus* se agrupan en tres grupos que incluyen respectivamente a cinco cepas de Europa, seis de Asia y cuatro de América. El análisis filogenético de la región mitocondrial mostró (Figura 3.3) que las cepas de las tres poblaciones de *S. paradoxus* se distribuyen en tres subgrupos con valores de bootstrap de 73% para las americanas, 78% para las europeas y de 92% para las asiáticas. La cepa CECT11152 de Japón no se agrupó con el resto de cepas asiáticas y se encuentra en el grupo 4 de *S. cerevisiae* que está formado por cepas no vínicas y el haplotipo vínico 40 (Figura 3.3 y 3.6).

Como se observa en el análisis filogenético, las secuencias de las cepas de *S. cerevisiae* no forman un grupo separado de las tres poblaciones de *S. paradoxus*, por el contrario se intercalan unas con otras, e incluso la cepa CECT11152 de *S. paradoxus* se agrupa con *S. cerevisiae*. No se detecta un patrón que permita explicar la distribución de las cepas en el árbol, es decir, por la fuente de aislamiento o el origen geográfico, ya que en una misma rama se agrupan cepas de origen vínico y no vínico aisladas tanto de América como de Europa o Asia. Por otro lado, el análisis de divergencia nucleotídica que se presenta en la Tabla 3.2 muestra una divergencia muy pequeña entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* de solo 0,4% y cuando se analiza por población es menor de 0,12%.

Para entender la distribución de haplotipos y la posición de la cepa CECT11152 observada en el análisis filogenético, se analizaron las posiciones variables de los haplotipos identificados. En la Figura 3.7 se muestran las posiciones variables de las secuencias de los 55 haplotipos identificados en las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae* y de las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Con el análisis de los 45 sitios polimórficos, se identificaron los cuatro grupos de cepas de *S. cerevisiae* y los tres de *S. paradoxus*.

Como se puede observar, los haplotipos dentro de un grupo de *S. cerevisiae* presentan el extremo 3' idéntico o con pocos cambios nucleotídicos y un extremo 5' diferente. Por ejemplo, el haplotipo 16 que está dentro del grupo 2, muestra el extremo 5' idéntico al haplotipo 40 del grupo 4, pero el

extremo 3' (a partir de la posición 537) es idéntico a los haplotipos del grupo dos. El haplotipo 5, que presenta un extremo 5' del grupo 3 pero el extremo 3' del grupo 4 de *S. cerevisiae*. El haplotipo 4 del grupo 2 que presenta un extremo 5' idéntico a algunos haplotipos del grupo 1 (haplotipos 24, 31 y 32) y el extremo 3' corresponde a los haplotipos del grupo 2. Esto indica que se trata de fenómenos de recombinación entre los diferentes haplotipos.

Sin embargo, la recombinación no sólo se detecta entre los haplotipos de *S. cerevisiae*, sino también entre *S. cerevisiae* y las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Los haplotipos de la población europea de *S. paradoxus* muestran el extremo 5' idéntico pero con diferentes extremos 3' por las diferentes zonas de recombinación detectadas. Así se tiene que el haplotipo 43 con el extremo 3' característico de las cepas europeas de *S. paradoxus*, y semejante al grupo 2 de *S. cerevisiae*, presenta los cambios **GGC** en los sitios nucleotídicos 534, 535 y 536 del grupo 4 de *S. cerevisiae*. Algo semejante ocurre con el haplotipo 44 pero solo presenta una G en la posición nucleotídica 534 del grupo 4 de *S. cerevisiae*. El haplotipo 45 se parece al haplotipo 43 y solo se diferencia con los cambios **CTCAGGC** entre las posiciones nucleotídicas 538 a 552, que se observan también en los haplotipos 13 y 31 del grupo 1 de *S. cerevisiae*

La cepa CECT11152 de la población asiática de *S. paradoxus* con el haplotipo 46, presenta un extremo 5' idéntico a los haplotipos 49, 53 y 54 de las cepas asiáticas de *S. paradoxus*, pero el extremo 3' es idéntico a los haplotipos 15, 17, 20, 21, 23, 36, 40 y 41 del grupo 4 de *S. cerevisiae*, indicando que se trata de haplotipos recombinantes. Las cepas americanas de *S. paradoxus* también muestran zonas de recombinación. Todas muestran el extremo 5' idéntico a los haplotipos 8, 9, 25 de *S. cerevisiae*, pero el extremo 3' es diferente entre ellas. El haplotipo 55 muestra una zona con recombinación entre los sitios 540 al 543 con los cambios nucleotídicos **CAGT**, de la población europea, y el haplotipo 56 con los cambios **GGC** en los sitios nucleotídicos 534, 535 y 536 del grupo 4 de *S. cerevisiae*. Por último, el extremo 3' es idéntico o muy semejante entre los haplotipos de las tres poblaciones de *S. paradoxus* y de los de las cepas de *S. cerevisiae*. La población europea presenta el extremo 3' semejante al grupo 2, la asiática al grupo 1, y la americana al grupo 4 de *S.*

cerevisiae. Por lo anterior, se ha demostrado que la recombinación entre las diferentes cepas y especies de levaduras ha ocurrido en varias zonas y no en un solo sitio, tentativamente a partir de la posición nucleotídica 534.

En la Figura 3.7 se muestran los cambios de aminoácidos en los haplotipos de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. En total se observaron 10 cambios de aminoácidos, cuatro en el extremo 5' y seis en el extremo 3' para las cepas de *S. cerevisiae*. En las cepas de *S. paradoxus* sólo se observan cambios de aminoácidos en el extremo 3'. En general, los haplotipos mostraron el extremo 5' de la secuencia de aminoácidos con los aminoácidos CDEQ, que es prácticamente idéntica para todos los haplotipos observándose sólo pequeños cambios en algunos haplotipos. En la posición aminoacídica 66 se observa el cambio de cisteína (C) a tirosina (T) en el haplotipo 30; en la posición 67 cambia el ácido aspártico (D) al ácido glutámico (E) en el haplotipo 17; en la posición 68 hay un cambio de ácido glutámico (E) a lisina (K) y se observa en el haplotipo 10; y, en la posición 165 se observa el cambio de glutamina (Q) a lisina (K) en el haplotipo 42.

En el extremo 3' de la secuencia de aminoácidos los haplotipos presentan la secuencia QTNMII, y todos muestran un cambio de aminoácido y solo en dos haplotipos, el 28 de *S. cerevisiae* y el 52 de *S. paradoxus* de la población europea, se detectan dos cambios. En la posición aminoacídica 179 se observa el cambio de glutamina (Q) a alanina (A). Es notorio que todo el grupo 4 de *S. cerevisiae* presenta A, en cambio el resto de cepas de *S. cerevisiae* presenta Q, con excepción del haplotipo 16 y cuatro haplotipos de *S. paradoxus* (haplotipos 43, 45, 46 y 56). Otros cambios que se observaron son los siguientes: en la posición 186 se observa el cambio de treonina (T) a alanina (A) en el haplotipo 28; en la posición 190 de asparagina (N) a treonina (T) en el haplotipo 9; en la posición 191 de metionina (M) a treonina (T) en el haplotipo 51; en la posición 193, cambia de isoleucina (I) a metionina (M) en el haplotipo 52; y en la 195 cambia de isoleucina (I) a metionina (M) en los haplotipos 27 y 52 (Figura 3.7).

Figura 3.7. Posiciones nucleotídicas de los polimorfismos en los haplotipos detectados en el gen mitocondrial *COX2* para las cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Un punto (.) en la secuencia indica que el nucleótido es idéntico a la primera secuencia. Hap= Haplotipo. El color del resaltado muestra las diferentes zonas que comparten los diferentes grupos de haplotipos.

Como se ha demostrado con los árboles filogenéticos (Figura 3.3 y 3.6) y las posiciones nucleotídicas (Figura 3.7) existen alelos para el gen mitocondrial *COX2* con recombinación. El sitio de recombinación no es el mismo para todas las cepas y se observa que es dependiente de la cepa. La recombinación afecta al análisis filogenético (Anisimova et al., 2003), por lo que es necesario eliminar las secuencias con recombinación, como se ha realizado en el caso de las regiones nucleares en *S. cerevisiae* del Capítulo 2. Sin embargo, en el caso de la región mitocondrial *COX2*, se ha observado que la mayoría de los haplotipos presentan recombinación a partir de la posición nucleotídica 534, por lo que se decidió dividir la secuencia en dos regiones para analizar: la primera que incluye las secuencias desde la posición 1 hasta la 525, y la segunda de la 526 hasta la 585, para comprobar el fenómeno de recombinación detectado y así el análisis filogenético no se vea afectado por la recombinación.

En la primera parte de la secuencia se detectaron menos sitios polimórficos que en la segunda con 18 y 27 sitios respectivamente, lo que indica que la segunda parte es más variable que la primera y que influye más sobre la topología del árbol filogenético. El análisis filogenético de las dos partes de la secuencia se muestra en la Figura 3.8. Al comparar los árboles filogenéticos se observa el cambio de posición de las cepas por el efecto de la recombinación. Al considerar la primera parte de la secuencia, la población americana de *S. paradoxus* se grupa con los haplotipos 8, 9 y 25 de *S. cerevisiae* (Figura 3.8a); pero con la segunda parte forman un sólo grupo con la cepa de *S. bayanus* y *S. cariocanus* y un poco alejada la cepa 5313MX (México). La población europea se mantiene en un sólo grupo si se considera una o la otra parte de la secuencia. Sin embargo, la población asiática muestra uno de los haplotipos más claros con recombinación. El árbol con la primera y segunda parte de la

secuencia de la población asiática permite la formación de un solo grupo, la diferencia es que la cepa 11152JP en la segunda parte no se agrupa con la población de asiática de *S. paradoxus* y se agrupa con un grupo de cepas de *S. cerevisiae*.

Al considerar la primera parte de la secuencia es posible detectar dos grandes grupos de cepas de *S. cerevisiae*, en uno de ellos se agrupan las poblaciones europeas y americana de *S. paradoxus* y en el segundo la población asiática (bootstrap 81%) (Figura 3.8a). En cambio, con la segunda parte de la secuencia se forman cuatro grupos, en donde, la población asiática se agrupa con un grupo de cepas de *S. cerevisiae* y la europea con otro grupo de cepas de *S. cerevisiae* (bootstrap 83%) (Figura 3.8b). La población americana forma un solo grupo con la cepa de *S. cariocanus* y *S. bayanus*, que se utilizaron como outgroup. El cuarto grupo está formado por otro grupo de cepas de *S. cerevisiae*. Es importante mencionar que en uno de los otros dos grupos de cepas de *S. cerevisiae* se incluye la cepa 11152JP de *S. paradoxus* asiática (bootstrap 96%) y un poco alejado de la población americana de *S. paradoxus*, se agrupa la 5313MX con un grupo de *S. cerevisiae*.

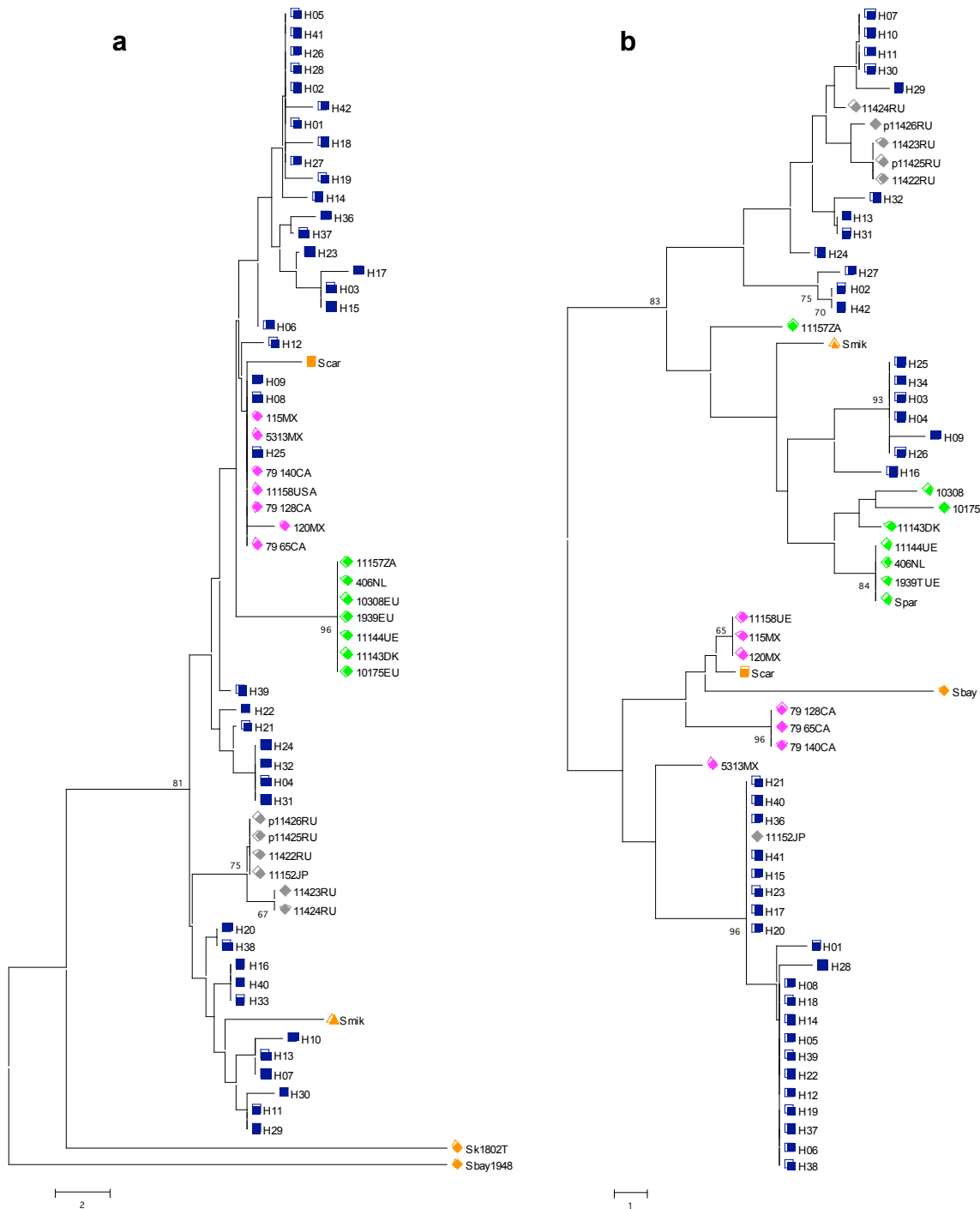


Figura 3.8. Árbol filogenético de *S. paradoxus* y *S. cerevisiae* de la posición 1 a la 525 (a) y de la 526 a la 585 (b) de la región mitocondrial COX2 con el método de Neighbor-Joining a partir de las diferencias nucleotídicas entre secuencias.

Los números de los nodos corresponden a los valores de bootstrap (valores superiores al 60%). La escala está dada en número de diferencias. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* están indicadas con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia) y los haplotipos de *S. cerevisiae* con un recuadro en azul. Las secuencias de referencias están indicadas en color naranja y cada especie con una figura geométrica diferente: *S. mikatae* (triángulo), *S. cariocanus* (cuadro), *S. bayanus* (círculo) y *S. kudriavzevii* (rombo).

3.7 Diversidad nucleotídica en la región génica COX2.

A partir de un total de 273 secuencias, de 22 cepas de *S. paradoxus* y 251 de *S. cerevisiae*, se estimó la diversidad nucleotídica de las tres poblaciones de *S. paradoxus* y de las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*. Las estimas expresada en π , y definida como la proporción promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre todos las posibles combinaciones de secuencias; y en θ , definida como la proporción de polimorfismos nucleotídicos observados en la muestra dividido entre el tamaño de la muestra se obtuvieron con el programa DNAsp y se muestra en la Tabla 3.4. El análisis de las secuencias permitió identificar 31 y 34 sitios polimórficos, 15 y 40 haplotipos en *S. paradoxus* y *S. cerevisiae*. Las estimas de diversidad nucleotídica por sitio, π , resultó de 2,3% para *S. paradoxus* y de 2,1% para *S. cerevisiae*, y el estimador de θ de Watterson de 0,01456 y 0,00953, respectivamente.

Tabla 3.4. Estimaciones de diversidad nucleotídica para la región génica COX2 de *S. paradoxus* y cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*. n, número de secuencias; θ_w , diversidad nucleotídica (Watterson, 1975); π , diversidad nucleotídica (Tajima, 1983).

Espece / Población	n	Sitios polimórficos	No. Haplotipos	θ_w	π
<i>S. paradoxus</i>					
Europa	10	27	7	0,01631	0,01408
Asia	6	16	5	0,01200	0,01031
América	7	7	4	0,00488	0,00492
Total	22	31	15	0,01456	0,02341
<i>S. cerevisiae</i>					
Vínicas	131	30	18	0,00941	0,01801
No vínicas	120	31	32	0,00989	0,02023
Total	251	34	40	0,00953	0,02071

Entre las poblaciones de *S. paradoxus*, se observa que la europea muestra la mayor diversidad nucleotídica con 1,4%, le sigue la asiática con 1,0% y la americana con 0,5%, y el estimador de θ varió de 0,5% en la americana hasta

1,6% en la europea. Al comparar la diversidad genética entre las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*, se observó una mayor variabilidad en las cepas no vínicas con una diversidad nucleotídica de 2,0%, mientras que en las vínicas fue de 1,8%. Aun cuando se detectaron aproximadamente 30 haplotipos en cada grupo el número de haplotipos es mayor en las cepas no vínicas que vínicas. Todo esto comprueba lo que se ha observado en las regiones nucleares analizadas previamente en el Capítulo 2; es decir, que las cepas vínicas es una población muy homogénea y con poca variabilidad genética, tanto a nivel cromosómico como mitocondrial.

3.8 Discusión.

Los estudios sobre la viabilidad de las ascosporas en cepas híbridas interespecíficas artificiales sugieren que el género *Saccharomyces* está formado por al menos seis especies, delimitadas por su aislamiento postcigótico: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii* y *S. mikatae* (Naumov, 1996; Naumov et al., 2000a). Las especies de este género están asociadas principalmente con las fermentaciones industriales, pero *S. paradoxus* se ha aislado regularmente de ambientes naturales (Glushakova et al., 2007), e incluso de ambientes vínicos (Redzepovic et al., 2002); *S. kudriavzevii* en bosques de encino en Portugal (Sampaio and Gonçalves, 2008); y las especies *S. cariocanus* y *S. mikatae* se han descrito solo de ambientes naturales a partir de unas pocas cepas (Naumov et al., 1995; Naumov et al., 2000a).

S. cerevisiae es la especie principal de levadura asociada a la actividad humana por medio de los procesos de fermentación para la obtención de diversos alimentos y bebidas, y por eso es la especie de levadura más utilizada en las fermentaciones industriales para la obtención de cerveza, vino, pan y destilados, entre otros procesos de fermentación. Sin embargo, también se han aislado cepas de *S. cerevisiae* tanto de ambientes naturales (Naumov et al., 1998; Sampaio and Gonçalves, 2008; Sniegowski et al., 2002) como de viñedos (Mortimer and Polsinelli, 1999; Mortimer, 2000; Redzepovic et al., 2002) e incluso se ha demostrado que *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* coexisten

en el mismo tipo de microhábitat, es decir, en exudados de roble, corteza de roble y suelos asociados a robles en Estados Unidos (Naumov et al., 1998; Sniegowski et al., 2002) y a encinas en Portugal (Sampaio and Gonçalves, 2008).

En general, las cepas de *Saccharomyces* con capacidad de llevar a cabo una fermentación son organismos especializados que han evolucionado para utilizar todo su potencial en los diferentes ambientes o nichos ecológicos que han sido habilitados como consecuencia de la actividad humana (Mortimer, 2000). Este proceso de selección puede ser descrito como una “domesticación” y podría ser el responsable de las características genéticas especiales que poseen las levaduras industriales.

S. cerevisiae y la especie más cercana *S. paradoxus*, son indiferenciables según los procedimientos taxonómicos clásicos, que utiliza criterios fenotípicos, tales como la morfología de la célula, de la espora y de las ascas, así como otras características de importancia ecológica, tales como, los perfiles de asimilación y fermentación de compuestos orgánicos (Vaughan-Martini and Martini, 1998). Como se ha mencionado, estas dos especies presentan aislamiento reproductivo postcigótico y un nivel de divergencia genómico $\approx 15\%$ (Cliften et al., 2001). La capacidad de intercambiar material genético (aislamiento postzigótico) que permite la introgresión, la alta variabilidad, y la complejidad en la evolución en las levaduras del género *Saccharomyces* ocasionan un problema a la hora de aplicar el concepto de especie biológica (Rainieri et al., 2003). Se ha demostrado la existencia de al menos tres poblaciones naturales geográficamente divergentes de *S. paradoxus*: Europa (Naumov et al., 1997), Asia (Naumov et al., 1993; Naumov et al., 1997), y Norteamérica (Naumov et al., 1996; Naumov et al., 1998). Por último, se sugiere que estas poblaciones están en los inicios del proceso de especiación (Naumov et al., 1997) o se puede tratar de diferentes especies (Kuehne et al., 2007).

El origen de la especie *S. cerevisiae* está sujeto a debate, ya que como siempre se ha aislado de fermentaciones alcohólicas (Fernández-Espinar et al.,

2003; Mortimer and Polsinelli, 1999), y la gran mayoría de las cepas están asociadas o adaptadas a ambientes tan específicos como es la producción de vino, de cerveza y de pan, llevo a considerar *S. cerevisiae* como una especie domesticada (Naumov et al., 1996), surgida a partir de un ancestro silvestre, probablemente *S. paradoxus*, que está en continua adaptación a los procesos de fermentación alcohólica. Esta visión parecía estar respaldada por el hecho de que *S. cerevisiae* es muy rara en la uva o el suelo de viñedos, y que es poco probable encontrarla en la naturaleza (Martini y Vaughan-Martini, 1990). Por ello, se plantea que el origen de *S. cerevisiae* es a partir de su especie más cercana *S. paradoxus*, especie con amplia distribución en la naturaleza (Sniegowski et al., 2002; Vaughan-Martini and Martini, 1995) que está asociada a insectos, exudados de árboles y fermentaciones de extractos de plantas (Naumov et al., 1996). Recientemente, estudios genéticos de secuenciación multilocus indican un efecto complejo de domesticación (Aa et al., 2006; Fay and Benavides, 2005a).

En contra de esta hipótesis, otros autores (Mortimer and Polsinelli, 1999) propusieron que *S. cerevisiae* está presente principalmente en fermentaciones y que es muy rara en la naturaleza. Sin embargo, mencionan que entre los individuos de esta especie existen dos poblaciones diferentes, entre las cuales ocurre flujo genético mediante la acción de insectos. En una tercera hipótesis *S. cerevisiae* se encuentra principalmente en fermentaciones, y es muy raro encontrarla en ambientes naturales. Aunque, es posible diferenciar dos poblaciones, una de ambientes vínicos que proviene de su domesticación, y la otra silvestre; son muy diferentes que el flujo genético entre los individuos de ambas poblaciones es mínimo o ausente (Vaughan-Martini and Martini, 1995).

En el presente trabajo se realizó un estudio genético de cuatro regiones nucleares y una mitocondrial de 21 cepas de tres poblaciones de *S. paradoxus* (americana, europea y asiática), para determinar la diversidad nucleotídica entre las poblaciones, en comparación con alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* con la finalidad de determinar el origen de los alelos vínicos de *S. cerevisiae* y cuales son los mecanismos moleculares que han moldeado al genoma de *S. paradoxus*.

Al considerar el número de sitios polimórficos, la población europea presentó el mayor número con 41, mientras que la americana 28 y la asiática sólo 20, lo que indica que estas regiones génicas son más variables que las involucradas en el reconocimiento para el apareamiento (Johnson et al., 2004), en donde se han encontrado solo 24 sitios polimórficos en la secuencia de cerca de 7000 pb de nueve aislados de Inglaterra (Johnson et al., 2004), y 16 sitios variables en la secuencia de 6 regiones génicas con aproximadamente 4000 pb en cepas aisladas en árboles de Inglaterra, que se incrementa a 43 sitios cuando se incluye otras cepas de Europa, Canadá, Asia y Rusia, entre otras (Koufopanou et al., 2006).

Con el análisis de la variabilidad genética se muestra que todas las cepas de *S. paradoxus* estudiadas son diferentes y no muestran un genotipo idéntico entre ellas, a diferencia de las descritas en cepas silvestres de Inglaterra aisladas de un mismo árbol (Johnson et al., 2004; Koufopanou et al., 2006), o bien las aisladas de diferente regiones geográfica, tal es el caso de dos cepas de España que muestran el mismo genotipo, y dos cepas de Letonia que son idénticas a una de Rusia (Koufopanou et al., 2006).

Todas las regiones analizadas en este trabajo presentan estimas de diversidad nucleotídica mayores que las descritas en el estudio de los polimorfismos en regiones no codificantes en *S. cerevisiae* (Fay and Benavides, 2005b). Una explicación es que se utilizaron las tres poblaciones de *S. paradoxus* y que probablemente estén en proceso de especiación (Naumov et al., 1997). Al comparar las estimas de diversidad nucleotídica por población, se observan estimas más bajas, esto puede deberse al número muy bajo de cepas por población, ya que se utilizaron seis cepas de Europa, cuatro de Asia y siete de América, por lo que sería interesante incluir un número mayor de cepas con otros orígenes, y comparar la diversidad nucleotídica de estas regiones génicas con las no codificantes descritas para *S. cerevisiae* (Fay and Benavides, 2005b) para comprobar la factibilidad de usar estas regiones como marcadores moleculares en la diversidad genética de *S. paradoxus*.

Poco se conoce sobre el ciclo de vida de las levaduras en la naturaleza, y lo más probable es que la mayoría de los cruzamientos ocurran inmediatamente después de la germinación, entre las esporas de una misma tétrada, sin que ocurra alguna división celular haploide (Knop, 2006). En todo el grupo de secuencias analizadas para las tres poblaciones de *S. paradoxus*, no se encontró algún sitio heterocigótico, lo que indica que todas las cepas son homocigotas ya sea por altos índices de cruzamiento entre cepas de una misma asca, o bien por un escaso entrecruzamiento entre poblaciones (Koufopanou et al., 2006) debido a la naturaleza homotálica de las cepas silvestres. El apareamiento suele ocurrir en el asca o bien entre la célula madre e hija, mediante autodiploidización, siendo los apareamientos entre esporas de distintos individuos y población muy raros (Johnson et al., 2004). El nivel de alelos en homocigosis encontrado en las tres poblaciones de *S. paradoxus*, (también es alto en otras cepas americanas) (Sniegowski et al., 2002), es mayor que al observado en cepas vínicas (Mortimer, 2000), y mucho mayor al que hemos observado en cepas de bebidas tradicionales de Latinoamérica (Capítulo 2).

Los árboles filogenéticos de las cuatro regiones génicas nucleares estudiadas mostraron la misma topología, y en todos se observan los tres grupos dentro de *S. paradoxus* con valores de bootstrap altos (bootstrap 99-100%) que corresponden a las tres poblaciones descritas anteriormente (Naumov et al., 1993; Naumov et al., 1996; Naumov et al., 1997; Naumov et al., 1998). Por lo que, el análisis filogenético permite la identificación de las tres poblaciones, la americana, la europea y la asiática, tal como se ha mencionado para otras regiones génicas (Liti et al., 2006). Solo con *EGT2*, se observa que la población europea de *S. paradoxus* se agrupa con las cepas de *S. cerevisiae*, y en el caso de la región mitocondrial se encuentran los tres grupos intercalados entre las cepas de *S. cerevisiae*.

El concepto biológico de especie define una especie como un grupo de individuos que se cruzan entre ellos pero están aislados de otros grupos por mecanismos reproductivos. Estos mecanismos reproductivos pueden ser precigóticos, en donde se evita la formación de cigotos híbridos entre especies,

o postcigóticos cuando se obtienen híbridos pero estos resultan inviables o estériles. Entre las especies del género *Saccharomyces* existe aislamiento postcigótico (Naumov et al., 2000a) con la producción de pocas esporas viables ($\leq 1\%$) (Naumov et al., 2000a), y recientemente se ha postulado por primera vez un cierto nivel de aislamiento prezigótico (Maclean and Greig, 2008).

Algunos mecanismos que se han propuesto para la formación de nuevas especies en *Saccharomyces* son: la especiación cromosómica, que implica reordenaciones cromosómicas que reducen la fertilidad y viabilidad de los híbridos y la divergencia genómica (Scannell et al., 2007), que ocasionan divergencia genética y pueden reducir o evitar el entrecruzamiento. Se ha propuesto que la baja viabilidad de los híbridos entre especies de *Saccharomyces* se produce por la traslocación de cromosomas, y por la falta de recombinación se forman esporas aneuploides de baja viabilidad. Sin embargo, parece ser que la evolución cromosómica tiene poco impacto sobre la especiación en *Saccharomyces* (Delneri et al., 2003; Fischer et al., 2000), siendo el único caso en el que pudiera darse la especiación de *S. cariocanus* respecto a *S. paradoxus* americana, que no presentan divergencia nucleotídica pero si 4 traslocaciones recíprocas entre su genoma (Liti et al., 2006). Sin embargo, parece que la divergencia a nivel de secuencia nucleotídica que actúa sobre los sistemas de reconocimiento y reparación de errores es suficiente para explicar el aislamiento reproductivo postzigótico entre las diferentes especies del género *Saccharomyces* (Greig et al., 2003; Liti et al., 2006).

La divergencia dentro de *S. cerevisiae* es menor que la estimada en *S. paradoxus*, esto es debido a la divergencia que existe entre las tres poblaciones de *S. paradoxus* (Liti et al., 2006). Además, la divergencia entre las dos especies concuerda con lo estimado anteriormente (Cliften et al., 2001; Kellis et al., 2003). Al considerar las regiones nucleares *CAT8*, *BRE5* y *GAL4*, se obtiene un promedio en la estima de divergencia de aproximadamente 14%, que concuerda con lo estimado entre especies de *Saccharomyces* (Cliften et al., 2001; Kellis et al., 2003). Se detectó diferente grado de especiación entre las tres poblaciones de *S. paradoxus*, ya que los valores de divergencia entre

poblaciones varió desde 1,0% (entre la población europea y asiática, con solo tres regiones nucleares) hasta 5,7% (entre poblaciones americana y europea, con los cuatro genes nucleares), lo que apoya la diferenciación entre las tres poblaciones y que están en diferente etapa del proceso de especiación.

S. cariocanus es una especie natural que se aisló de *Drosophila* en Brasil, que presenta cuatro traslocaciones recíprocas con respecto *S. paradoxus* (Fischer et al., 2000) y muestra aislamiento poscigótico con las otras especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (Naumov et al., 2000a). Con el análisis filogenético realizado en este estudio, que involucra las cinco regiones, cuatro nucleares y la mitocondrial muestra a *S. cariocanus* dentro de la población americana. Esto concuerda con lo recientemente descrito en estudios genéticos moleculares y de apareamiento entre *S. cariocanus* y *S. paradoxus*, donde se menciona que a nivel secuencia nucleotídica, *S. cariocanus* es un miembro más de *S. paradoxus* y específicamente de la población americana (Liti et al., 2006) con la única diferencia de que presenta cuatro translocaciones (Fischer et al., 2000), responsables del aislamiento reproductivo que muestran.

Las estimas de divergencia genética entre *S. cerevisiae* y la población europea de *S. paradoxus* variaron de acuerdo a las regiones génicas analizadas, pero se alcanzan valores a los descritos entre especies cuando *EGT2* no se incluye en el análisis (Kellis et al., 2003). Sin embargo, con el análisis filogenético y el de los polimorfismos, se observa que la secuencia de la región génica *EGT2*, que se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma XIV, es idéntica o con pocos cambios respecto a la de *S. cerevisiae*, lo que sugiere un fenómeno de introgresión previamente identificado, que sucedió después de la separación de las poblaciones europea y asiática (Liti et al., 2006). La transferencia horizontal es muy rara en levaduras (Dujon, 2005; Liti and Louis, 2005) por lo que resulta más probable que la introgresión ocurriera mediante hibridación, pues las dos especies coexisten en el mismo hábitat (Sniegowski et al., 2002).

Con los resultados obtenidos de la región mitocondrial *COX2* es posible identificar las tres poblaciones de *S. paradoxus*. Entre las poblaciones, se

detectaron alelos con la secuencia idéntica en el extremo 5', pero son diferencias en el extremo 3', lo que indica que se trata de secuencias con recombinación. Los alelos con recombinación se detectaron tanto entre los diferentes grupos de *S. cerevisiae* como dentro de las poblaciones de *S. paradoxus*, y entre las dos especies. El ejemplo más claro es el haplotipo 46, que corresponde a la cepa CECT11152 de Japón, con el extremo 5' de *S. paradoxus* asiática y el extremo 3' de *S. cerevisiae*. En *S. cerevisiae* se detectaron alelos recombinantes entre los haplotipos, pero el punto de recombinación no se encuentra en una sola posición nucleotídica, como se observa en los haplotipos 16 y 34 del grupo 2 de *S. cerevisiae*, en donde el punto de recombinación es en la posición 525 en el haplotipo 34 y 536 en el haplotipo 16. En el caso de *S. paradoxus* también se observó que el sitio de precombinación no es el mismo entre las cepas estudiadas.

Para confirmar la naturaleza recombinante de la región mitocondrial COX2, la secuencia nucleotídica se dividió en dos partes y como se observa en los árboles filogenéticos obtenidos, la posición de las cepas no es la misma en cada uno de ellos y cambia de acuerdo a las posiciones nucleotídicas utilizadas. La recombinación entre el DNA mitocondrial se ha demostrado entre cepas de *S. cerevisiae* (Berger and Yaffe, 2000). Durante el proceso de hibridación, en el cigoto, se puede dar una fusión de mitocondrias de los dos parentales seguida de un proceso de recombinación del mtDNA. Una vez formado el híbrido, y según el polo del cigoto en el que se produzca la gemación, las mitocondrias pertenecerán a uno u otro parental, pero si la gemación ocurre en la región ecuatorial del cigoto, el genoma será recombinante.

La recombinación entre cepas de la misma especie, es conocida como recombinación intramitocondrial, pero cuando intervienen dos especies diferentes se conoce de recombinación interespecífica (Dowton and Campbell, 2001). De acuerdo a los resultados observados, la recombinación detectada es intramitocondrial, dentro de las cepas de la especie de *S. cerevisiae* y de las de la especie *S. paradoxus*, pero también intermitocondrial ya que se detectaron alelos recombinantes entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Esto se explica

porque en la naturaleza coexisten ambas especies en el mismo hábitat (Sniegowski et al., 2002), y a la posibilidad de formación de híbridos entre las especies de *Saccharomyces* (de Barros Lopes et al., 2002).

Además se ha mencionado la presencia de genes "homing" de endonucleasas en eucariotas, que son elementos genéticos móviles que codifican endonucleasas de DNA o maturasas de RNA que facilitan el "splicing" del RNA. Generalmente estos elementos están asociados a genes que codifican intrones o inteínas y se han identificado en mitocondrias, cloroplastos y genoma nuclear, tanto en regiones intergénicas o bien entre regiones que codifican intrones o inteínas (Gimble, 2000). Un ejemplo, de la ventaja evolutiva de adquirir este tipo de elementos móviles, es la endonucleasa HO en *S. cerevisiae* que inicia el intercambio en el tipo de apareamiento de las células haploides a ó α , y que producen células del otro tipo de apareamiento. Después pueden conjugarse para formar un diploide MAT α /MATa, el cual tendría una ventaja evolutiva sobre la célula haploide en ciertas condiciones ambientales. Otro ejemplo de endonucleasa, pero que se ha encontrado en la mitocondria de *S. cerevisiae* es la ω (omega, también conocida como *I-SceI*), la cual reconoce y se inserta en una secuencia de 18 pb del gen de la subunidad grande del rRNA (Moure et al., 2003). Tomando en consideración esto, es posible que en la región mitocondrial COX2 se haya favorecido el intercambio entre cepas de la misma especie o bien entre las dos especies, por la presencia de un ORF que codifica una maturasa y se transcribe en una misma unidad de transcripción (Bordonné et al., 1988), lo que provocaría que la región génica muestre zonas de la especie *S. cerevisiae* y otras de *S. paradoxus*. Si esta maturasa estuviera duplicada en el inicio de la recombinación explicaría que la recombinación no solo se presente en el mismo punto para todas las cepas estudiadas o que hayan sido varios eventos de recombinación diferentes en donde se incluya la endonucleasa.

El hecho de que se trata de un punto caliente de recombinación, es que también hemos encontrado genes COX2 recombinantes entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, en los híbridos naturales entre estas especies (ver capítulo 4), y

en híbridos naturales *S. bayanus* x *S. uvarum* (Pérez-Través *et al.*, manuscrito en preparación).

En el presente trabajo se realizó un análisis filogenético con la secuencia de cuatro regiones nucleares y una mitocondrial para determinar si el origen de los alelos vínicos de *S. cerevisiae* está en alguna de las tres poblaciones de la especie *S. paradoxus*. De acuerdo a los árboles filogenéticos obtenidos se observa que los alelos vínicos no provienen de alguna población de *S. paradoxus*, sino de los alelos no vínicos de *S. cerevisiae*, que por medio de la domesticación han sufrido adaptaciones a los diferentes ambientes fermentativos, lo que concuerda con lo expuesto por otros autores (Fay and Benavides, 2005a; Legras *et al.*, 2007).

En conclusión, el estudio de la secuencia de las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial, permitieron diferenciar a las tres poblaciones de *S. paradoxus* en estudio, la americana, la asiática y a la europea que están en proceso de especiación al mostrar divergencias de hasta 0,0570 entre las poblaciones de América y Europa con las cuatro regiones nucleares. Algunos de los mecanismos evolutivos que han modelado el genoma de *S. paradoxus* y que se detectaron en estas regiones génicas son debidos a introgresión como es el caso de la región génica *EGT2* y de la recombinación intramitocondrial (entre cepas de la misma especie) e interespecífica (entre cepas de diferente especie). Por último, se propone que el origen de los alelos vínicos de *S. cerevisiae* es a partir de poblaciones silvestres y no vínicas, y se rechaza la hipótesis de que *S. cerevisiae* es una especie surgida por domesticación a partir de *S. paradoxus*.

CAPITULO 4. Origen de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Uno de los mecanismos que las levaduras han utilizado para adaptarse a los nuevos procesos fermentativos o nuevos ambientes es la formación de híbridos. Algunos ejemplos en el género *Saccharomyces* son los híbridos entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, entre otros. El híbrido mejor descrito es la levadura de cerveza lager *S. pastorianus* (sin. *S. carlsbergensis*), que es un híbrido entre una cepa panadera de la especie *S. cerevisiae* y una cepa desconocida relacionada genéticamente con *S. bayanus* (Casaregola et al., 2001; Hansen and Kielland-Brandt, 1994; Nguyen et al., 2000).

Recientemente en nuestro grupo ha descrito varias cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* entre cepas vínicas de Suiza (González et al., 2006), Austria (Lopandic et al., 2007) y entre cepas cerveceras de Alemania, Inglaterra y Bélgica (González et al., 2008). Pero no solo se han encontrado en procesos de fermentación alcohólica, también se ha descrito la presencia de estos híbridos en productos nutricionales elaborados con levadura seca (Llopis et al., en preparación) y en aislados clínicos de pacientes con diversas infecciones fúngicas (de Llanos, 2007). Teniendo en cuenta, en primer lugar, que estos híbridos han sido descritos recientemente, y por tanto, no han sido tan estudiados como los híbridos *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, aislados de ambientes muy distintos, como lo son las cepas de *S. pastorianus* asociadas a la elaboración de cerveza lager, resulta interesante conocer el origen de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, lo que nos permitirá conocer el proceso de hibridación entre las especies del género *Saccharomyces* al ser uno de los mecanismos que pueden tener un papel importante en la adaptación de las levaduras a procesos industriales.

Una de las propuestas para el origen de los híbridos, es mediante apareamientos raros o “rare mating” (de Barros Lopes et al., 2002); sin embargo, ello implica tamaños poblacionales altos para que surjan los diploides recombinantes MATa/MATa y MAT^α/MAT^α. Estos tamaños poblacionales sólo

se pueden dar en ambientes fermentativos. Otros autores proponen que la hibridación espóra-espóra es posible en el tracto intestinal de insectos, por tanto, la formación de híbridos sería en la naturaleza (Pulvirenti et al., 2002). Sin embargo, el parental *S. kudriavzevii* solo se ha encontrado en la naturaleza, pero el parental *S. cerevisiae* pudo ser una cepa vínica llegada a Centro Europa con la expansión de la vid y la producción del vino, o pudo ser una cepa no vínica (silvestre o asociada a otra fermentación no vínica). Con la finalidad de determinar el origen del parental o de los parentales *S. cerevisiae* que dieron lugar a los híbridos, y dado que disponemos de una amplia muestra de cepas de *S. cerevisiae* secuenciada, de diferente origen y fuente de aislamiento, decidimos secuenciar los alelos *cerevisiae* de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Para abordar este estudio se obtuvieron las secuencias de las regiones génicas *EGT2*, *CAT8*, *GAL4* y *BRE5*, y la correspondiente al gen mitocondrial *COX2*, de 21 cepas previamente identificadas como híbridas entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Tabla M3, Materiales y Métodos). Los genes que se utilizan en el presente trabajo se han seleccionado porque presentan la mayor diversidad nucleotídica, tal como se ha demostrado en el Capítulo 2. Por tal motivo se utilizaron para determinar si el alelo “*cerevisiae*” de los híbridos proviene de cepas vínicas o no vínicas.

4.1 Análisis de secuencias de *EGT2*.

Para amplificar la región génica *EGT2* de las 21 cepas híbridas analizadas, se utilizaron los cebadores *EGT2-3* y *EGT2-5* (Tabla M4, de Materiales y Métodos) tal y como se ha descrito en el Capítulo 2. La longitud completa de las secuencias obtenidas fue de 336 pb. El árbol Neighbor-Joining construido siguiendo el modelo Hasegawa-Kishino-Yano ($\alpha = 0.57967$) con las secuencias de las cepas de referencia de las especies del género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* S288c, *S. kudriavzevii* IFO 1802, *S. mikatae*, *S. bayanus*, *S. castellii* y *S. kluyveromyces* (tomadas de la base de datos SGD <http://www.yeastgenome.org/>) y *S. paradoxus* de México (CBS 5313), de los alelos vínicos mayoritarios (3, 9, 10 y 24) y no vínicos (1 y 13) y la de los alelos

de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* para la región génica *EGT2* se muestra en la Figura 4.1.

Dentro de las secuencias de *S. cerevisiae* y para determinar el origen y la relación de los alelos procedentes de la especie de *S. cerevisiae* de los híbridos a estudiar, se incluyeron como referencia cepas vínicas con el alelo típico de vinos como son los alelos 3 y 24 (ver Figura 4 del Capítulo 2) y que se indica en color rojo en la Figura 4.1, igual que todas las cepas híbridas que presentaron el alelo vínico; también se han incluido como referencia cepas con alelos no vínicos como son la cepa S288c y el alelo 13 (ver Figura 4 del capítulo 2) y que se indican en la Figura 4.1 en azul. En el árbol se observa un grupo con los alelos de *S. cerevisiae* compuesto por dos subgrupos, uno con los alelos vínicos (alelos 3 y 24) y otro con los no vínicos (cepa S288c y alelo 13). Como se puede observar en la Figura 4.1, los alelos de *S. cerevisiae* de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se distribuyen en los dos grupos, indicando posiblemente dos orígenes distintos para alelo de *S. cerevisiae*; los alelos 9, 10 y 63 dentro del subgrupo de los alelos vínicos y el alelo 62 en el subgrupo de alelos no vínicos o con recombinación.

Es interesante mencionar que las cepas presentan secuencias con pocos cambios entre ellas, aun cuando se trate de híbridos de vino, cerveza, clínica o suplemento dietético, y solo la cepa aislada de cerveza lager de Alemania (CECT1990), muestra dos alelos *cerevisias* diferentes. Separada del grupo de *S. cerevisiae* y en una posición intermedia en el árbol, se encuentra la cepa perteneciente a la especie *S. paradoxus* (CBS 5313). Por último, se puede observar otro grupo mayoritario formado por cuatro cepas (circulo morado) que se divide a su vez en dos subgrupos, uno en el cual se encuentra la cepa tipo de *S. kudriavzevii* (IFO1802), y el otro grupo con el alelo proveniente de *S. kudriavzevii* de las cepas híbridas, indicando así que el alelo *kudriavzevii* de los híbridos se originaron a partir de una población de *S. kudriavzevii* distinto a la japonesa (cepa tipo). El alelo *kudriavzevii* de las cepas híbridas mayoritario corresponde al alelo denominado 1841kAT que agrupa el total de las cepas estudiadas, con la excepción de W46kCH y 172k.

Cabe destacar que la mayoría de los alelos de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* provenientes del parental *S. cerevisiae* se agrupan con el alelo 10 de *S. cerevisiae*, que se encuentra en la cepa vínica ZIM2171 de Eslovenia, y la aislada de olivas de España Sc2ES, y que se diferencia del alelo 3 (Capítulo 2) en un solo cambio nucleotídico. El alelo 3, previamente denominado como vínico, es el más frecuente e incluye la mayoría de las cepas vínicas de Europa, Argentina, Chile, Sudáfrica, además de los alelos vínicos de cepas aisladas de Perú y México entre otras. En el alelo 9 se agruparon las dos cepas vínicas HA1842 de Austria y MR25 de España también con un solo cambio nucleotídico respecto al alelo 3, descrito previamente. Todas las cepas híbridas resultaron homocigotas excepto la 1990, en la cual se detectaron dos alelos, el 62, con cuatro cambios respecto al alelo no vínico número 13, y el 63, que presenta tres cambios respecto al alelo vínico número 3 (Tabla 4.1).

En la Figura 4.1 y Tabla 4.1 se muestra que cuando las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* presentan dos alelos para el gen *EGT2*, uno siempre se agrupa con la cepa referencia de *S. kudriavzevii* (IFO1802) y el otro con la cepa tipo de *S. cerevisiae* (Sc288c); en este caso el alelo del parental de *S. cerevisiae* tiene su origen en las cepas vínicas, pues todos los alelos se agrupan dentro del subgrupo de los alelos vínicos identificados previamente.

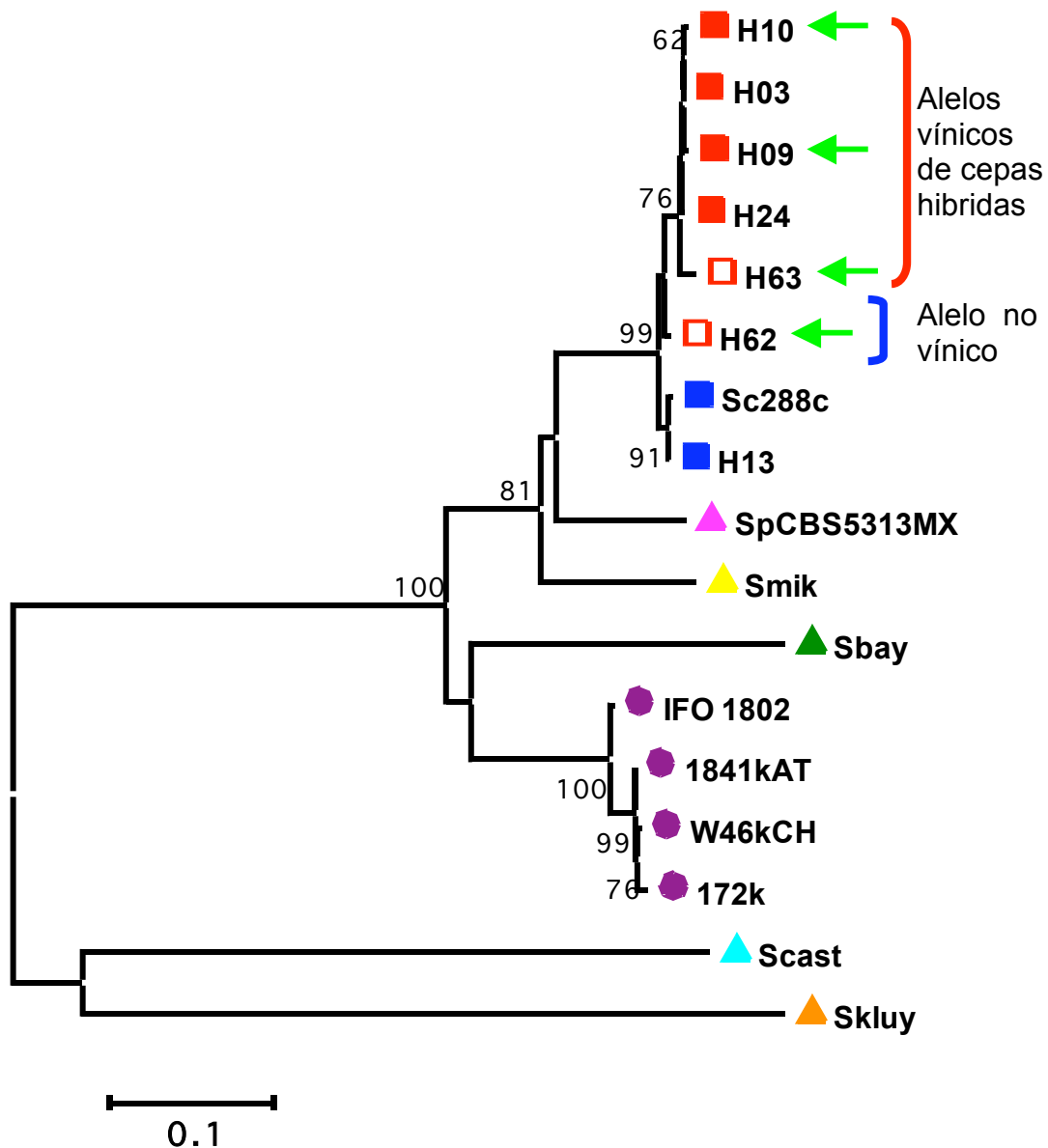


Figura 4.1. Árbol filogenético de *EGT2* con los alelos de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*. Los números en los nodos corresponden al valor de bootstrap basados en 2000seudoréplicas. La escala esta dada en sustituciones nucleotídicas por sitio. Las dos poblaciones de *S. cerevisiae* están indicadas con un recuadro lleno y cada población de un color: vínica (rojo); no vínica (azul). El recuadro rojo vacío indica recombinación. Los alelos de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* están indicados con una flecha. Los alelos de *S. kudriavzevii* están indicados con un círculo morado. El triángulo indica secuencia de referencia: SpCBS5313MX de *S. paradoxus* (fucsia); Smik, *S. mikatae* (amarillo); Sbay, *S. bayanus* (verde); Scast, *S. castelli* (azul claro), Skloy, *S. kluyveromyces* (naranja).

Tabla 4.1. Posiciones nucleotídicas variables en *EGT2* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*.

Alelo	Cambios nucleotídicas	Tipo	Híbridos
S288c	ATTTAGCAAGCCCTATGGGCGCTTTATTAGT	No vínico	
A13	.C.....	No vínico	
A24	.C.A.A....T.T..C...T....A.....	Vínico	
A10	.C.A.AT...T.T..C...T....A.....C	Vínico	G1
A09	...A.AT...T.T..C...T....A.....	Vínico	HA1842 MR25
A03	.C.A.AT...T.T..C...T....A.....	Vínico	
A63	.C.A.AT...T.TC..A..T.....	Recombinante	1990
A62	.C.....C...T....A.....	Recombinante	1990

G1: 16-91, 126, IF6, CECT11011, W27, W46, 441, 172, 14-91, CECT11002, CECT11003, CECT11004, HA1835 y HA1841

4.2 Análisis de secuencias de *BRE5*.

Para amplificar la región génica *BRE5* de las 21 cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* analizadas, se utilizaron los cebadores BRE3 y BRE5 (Tabla M4, de Materiales y Métodos) tal y como se ha descrito en el Capítulo 2. La longitud completa de las secuencias obtenidas fue de 675 pb.

La Figura 4.2 corresponde al árbol Neighbor-Joining construido con el modelo Tamura y Nei ($\alpha = 1.36665$) con las secuencias del gen nuclear *BRE5*, correspondientes a las cepas de referencia de las especies del género *Saccharomyces* de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) (*S. cerevisiae* S288c, *S. kudriavzevii* IFO1802, *S. bayanus*, *S. mikatae* y *S. paradoxus* europea CECT1939), de los alelos vínicos (28, 30, 31, 35, 66 y la cepa tipo de *S. cerevisiae* S288c) y no vínicos (5, 21 y 23) descritos en el Capítulo 2 y la de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Tal como se observó en *EGT2* se forman tres grupos, uno con la cepa de referencia de *S. cerevisiae* (S288c) y todas las cepas híbridas que presentan un alelo proveniente de esta especie. En el segundo grupo está la cepa tipo de *S. kudriavzevii* (IFO 1802) y las cepas híbridas que han mostrado un alelo de esta

especie. Por último, se encuentra la cepa tipo de la especie *S. paradoxus* (CECT1939). En el grupo donde se encuentran los alelos de la especie *S. cerevisiae* se puede dividir a su vez en dos subgrupos, uno con los alelos vínicos indicados en rojo y otro con los alelos no vínicos, indicados en azul.

Como era de esperarse, las secuencias de los alelos de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* en el árbol filogenético se agrupan unas con la cepa de referencia de *S. cerevisiae* (S288c) y otras con la cepa de referencia de *S. kudriavzevii* (IFO1802) (Figura 4.2). Los 10 alelos de las cepas híbridas que se agrupan con el alelo *S. cerevisiae*, están de nuevo en el subgrupo de alelos vínicos de *S. cerevisiae*. En el segundo grupo, y muy próximos a la cepa tipo de *S. kudriavzevii* (IFO1802), se encuentran los dos alelos de *kudriavzevii* detectados en las cepas híbridas.

Los 10 alelos detectados en las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se distribuyen de la siguiente manera: cuatro detectados entre las cepas de *S. cerevisiae* denominados como vínicos en el capítulo 2; los alelos 28, 30, 35 y 66 presentes en poblaciones de Eslovenia, Austria, Francia, España, Chile y Suecia, con cinco o menos cambios nucleotídicos respecto a la cepa tipo de *S. cerevisiae*. Los seis alelos restantes no se detectaron anteriormente en las cepas de *S. cerevisiae* y corresponden a los alelos de la especie *S. cerevisiae* de las cepas CECT1990, CECT11011, W27, CECT11002, IF6 y el alelo MR25a, con uno o dos cambios nucleotídicos respecto a uno de los alelos vínicos, y solo la cepa CECT11011 presenta siete cambios nucleotídicos con respecto al alelo vínico 31 y 8 cambios respecto al alelo no vínico 23 (Tabla 4.2). Por otro lado el alelo MR25b presenta cinco cambios respecto al alelo no vínico 23, por lo que es difícil la asignación del tipo de alelo en el alelo MR25b y la cepa 11011.

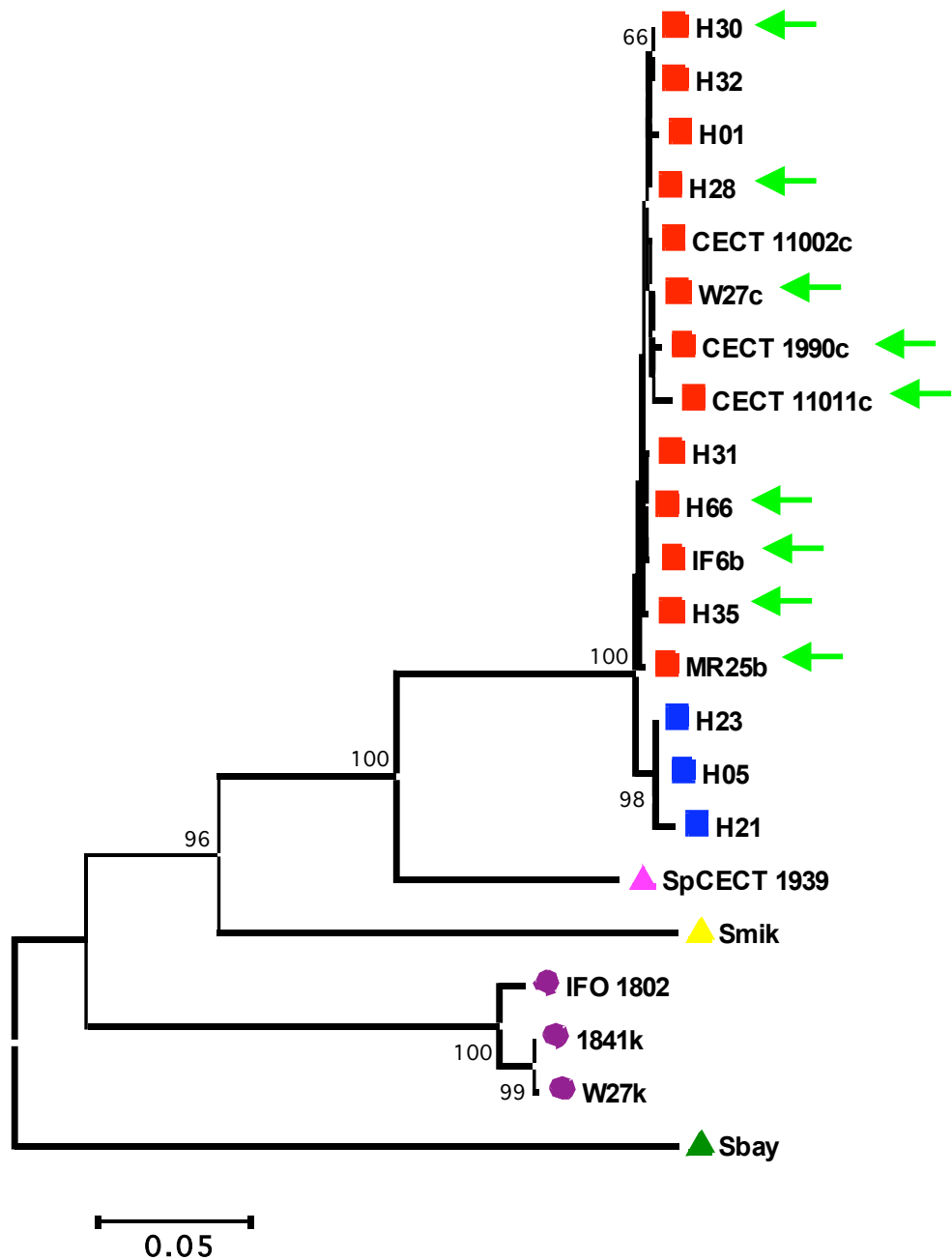


Figura 4.2. Árbol filogenético de *BRE5* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*. Los números en los nodos corresponden al valor de bootstrap basados en 2000seudoréplicas. La escala esta dada en sustituciones nucleotídicas por sitio. Las dos poblaciones de *S. cerevisiae* están indicadas con un recuadro lleno y cada población de un color: vínica (rojo); no vínica (azul). Los alelos de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* están indicados con una flecha. Los alelos de *S. kudriavzevii* están indicados con un círculo morado. El triángulo indica secuencia de referencia: SpCECT1939, *S. paradoxus* (fucsia); Smik, *S. mikatae* (amarillo); Sbay, *S. bayanus* (verde).

El alelo más frecuente es el de la cepa W27, con las cepas vónicas de Suiza y la CECT1388 aislada de cerveza en Inglaterra. El otro alelo más frecuente es el vónico 30, identificado en Eslovenia, y que esta presente en las cuatro cepas vónicas de Austria. El resto de alelos están representados por una sola cepa, con excepción de la cepa CECT11002 que incluye a la CECT11003 ambas aisladas de cerveza de Bélgica.

Tabla 4.2. Posiciones nucleotídicas variables en *BRE5* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vónicos y no vónicos de *S. cerevisiae*

Alelo	Cambios nucleotídicos	Tipo	Híbridos
S288c	TATAGAGGTC ATTCAAGGCG AA	Vónico	
H28	..C..... ..T..... ..	Vónico	MR25a
H30	..C..... ..T..A.. ..	Vónico	G1
H66	..C...T... ..T..... ..	Vónico	IF6a
IF6b	..C...T..G ..T..... ..	Vónico	
H31	..C...T... ..C.T..... ..	vónico	
H32	..C..... ..T..A.. ..	Vónico	
H35	..C...T... T...T..... G.	Vónico	AMH
W27c	C.CC..... ..T..... ..	Vónico	G2
CECT11002	C.C..... ..T..... ..	Vónico	CECT11003
CECT1990	C.CC..T... ..C.T..... ..	Vónico	
MR25b	..C..... ..T..... GG	Vónico ?	
CECT11011	C.CC..T... .G..TG.... GG	Vónico ?	
H05	..C..TT.C. ...TT...TA GG	No vónico	
H23	..C..TT.C. ...TT....A GG	No vónico	
H21	.GC.TTTTC. ...TT.A..A GG	No vónico	

G1: HA1841, HA1835, HA1837 y HA1842.

G2: W27, W46, CECT1388, 319, 441, 172, 205, 278, 126.

El análisis filogenético de *EGT2* y *BRE5* de las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* permite confirmar la naturaleza híbrida, ya que cuando presentan dos alelos uno de ellos se agrupa con la cepa tipo de *S. kudriavzevii* y el otro alelo con la cepa tipo de *S. cerevisiae*. Esto concuerda con el análisis por RFLPs de 6 regiones génicas y la secuenciación de la región

nuclear *MET6* y la mitocondrial *COX2* de las cepas vínicas de Suiza (González et al., 2006) y cerveceras (González et al., 2008) donde se identificó como híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Cabe mencionar que en el caso de *EGT2*, la cepa tipo europea de *S. paradoxus* está incluida en el grupo de *S. cerevisiae*, y esto es debido a una introgresión de *S. cerevisiae* en las cepas europeas de *S. paradoxus* que incluye a *EGT2*, región génica que está incluida en un segmento subtelomérico del brazo izquierdo del cromosoma XIV, con una longitud de 23 kb, donde se detectó una zona idéntica entre *S. cerevisiae* S288C y *S. paradoxus* CBS432 (Liti et al., 2006). Por lo anterior y para evitar errores en la asignación de especie en el caso de esta región génica, se comprobó la naturaleza híbrida de las cepas mediante la utilización de una cepa de *S. paradoxus* aislada de pulque en México.

Como se observa en el análisis filogenético con *EGT2* y *BRE5* los alelos de la especie de *S. cerevisiae* en las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* son más variables, obteniendo cuatro alelos en *EGT2* y 12 en *BRE5*, sin embargo tan sólo hemos encontrado tres y dos alelos respectivamente en los alelos de la especie *S. kudriavzevii*. Por esto, se continuó con el análisis filogenético con otras dos regiones nucleares *CAT8* y *GAL4* que han mostrado mayor variabilidad genética en *S. cerevisiae* (Tabla 2.1) y la mitocondrial *COX2* para confirmar el origen vínico del alelo de la especie *S. cerevisiae*.

4.3 Análisis de secuencias de *CAT8*.

Para amplificar la región génica *CAT8* de las 21 cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* analizadas, se utilizaron los cebadores CAT8-5 y CAT8-3 (Tabla M4, de Materiales y Métodos) tal y como se ha descrito en el Capítulo 2. La longitud completa de las secuencias obtenidas fue de 714 pb. El árbol Neighbor-Joining representado en la Figura 4.3 construido con el modelo Tamura y Nei ($\alpha = 0.86101$) se realizó con las secuencias de los híbridos correspondientes al gen nuclear *CAT8*, al igual que en los apartados anteriores, se incluyeron cepas de referencia de las especies del género *Saccharomyces*

tomadas de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) (*S. cerevisiae* S288c, *S. kudriavzevii* IFO 1802 y *S. paradoxus* europea CECT 1939, *S. mikatae* y *S. bayanus*) y la de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Además se incluye secuencias representantes de alelos vínicos más frecuentes (31, 32 y 33) y no vínicos (3, 21 y 27) datos descritos en el Capítulo 2. En el árbol se observa que todos los alelos de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se agruparon con la cepa tipo de *S. cerevisiae* y que el grupo de la especie *S. cerevisiae* se divide en dos subgrupos, uno con los alelos de las cepas vínicas y el otro con los no vínicos. Las secuencias de los alelos de la especie *S. cerevisiae* de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se agruparon en los alelos vínicos 33 y 55 y aparecen dos nuevos alelos que sólo se detectaron entre las cepas híbridas CECT11002 y HA1841.

En el alelo 33 que es el alelo más frecuente entre las cepas de *S. cerevisiae* analizadas en el Capítulo 2, se encuentran las cepas híbridas homocigotas vínicas de Suiza, las cerveceras CECT11003 y CECT11004 de Bélgica, la CECT1388 de Inglaterra, la CECT11011 de Nueva Zelanda, la IF6 aislada del suplemento dietético y el aislado clínico MR25 de España. La secuencia de este alelo presenta un cambio respecto a la cepa tipo S288c (Tabla 4.3). En el alelo 55, presente en cepas de *S. cerevisiae* de España, Francia, Sudáfrica, Hungría, Argentina y Chile, con un cambio respecto al alelo 33, se encuentra uno de las cepas híbridas vínicas de Austria 1835, 1837 y 1842 y el otro alelo se agrupó con la cepa 1841 en el alelo 91; este alelo muestra un cambio nucleotídico respecto al 55. Por último, la cepa cervecera de Bélgica CECT11002 que muestra un patrón único se diferencia del 33 en un cambio nucleotídico. Se ha detectado que en esta región génica, cuatro cepas híbridas aisladas de vino de Austria presentan alelos vínicos en heterocigosis (HA1835, HA1837, HA1841 y HA1842) mientras que el resto de cepas híbridas son homocigotas. Por último, es importante destacar que en el subgrupo de alelos no vínicos de *S. cerevisiae* solo se encuentra los haplotipos 3, 21 y 27 de las cepas de *S. cerevisiae*, pero ningún alelo de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* analizadas en el presente capítulo, por lo que es de esperarse que el alelo *cerevisiae* de las cepas híbridas tuvo su origen en los alelos vínicos de *S. cerevisiae*.

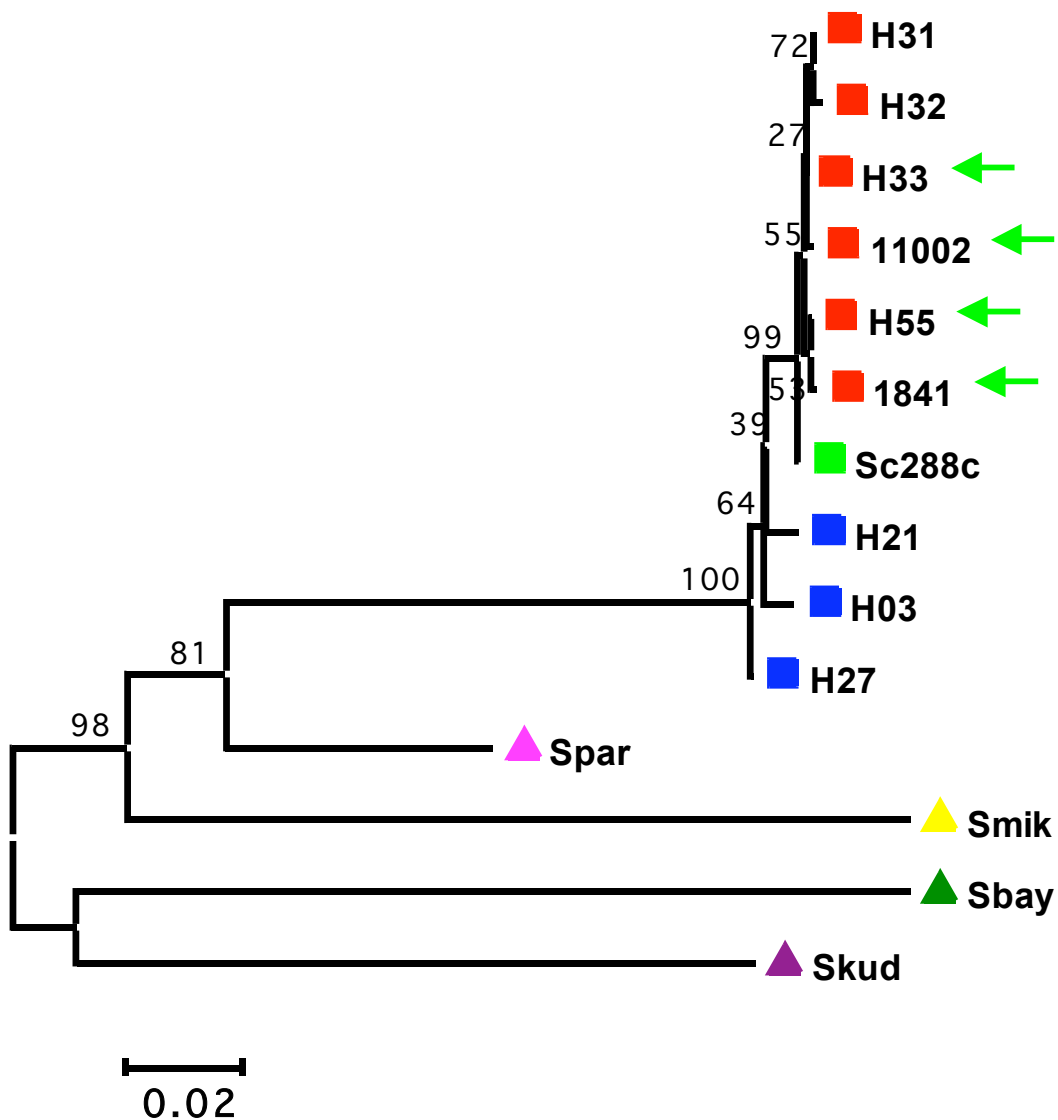


Figura 4.3. Árbol filogenético de *CAT8* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*. Los números en los nodos corresponden al valor de bootstrap basados en 2000seudoréplicas. La escala esta dada en sustituciones nucleotídicas por sitio. Las dos poblaciones de *S. cerevisiae* están indicadas con un recuadro y cada población de un color: vínica (rojo); no vínica (azul). Los alelos de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* están indicados con una flecha. El triángulo indica secuencia de referencia. Spar, *S. paradoxus* (fucsia); Smik, *S. mikatae* (amarillo); Sbay, *S. bayanus* (verde); Skud, *S. kudriavzevii* (morado).

El análisis filogenético de *CAT8* permite determinar que el alelo de la especie *S. cerevisiae* en las cepas híbridas tiene su origen de nuevo en las cepas vínicas, pues la secuencia es idéntica a los alelos vínicos 33 y 55 y que se agrupan dentro de los alelos vínicos de *S. cerevisiae*. Los alelos, 1841 y

11002, detectados en las cepas híbridas, pero no en las cepas de *S. cerevisiae*, también se agruparon en el subgrupo de alelos vánicos, lo que indica que todos los alelos *S. cerevisiae* de las cepas híbridas tienen su origen en cepas vánicas. Las cepas híbridas de cerveza presentan también el alelo 33 que tiene un cambio nucleotídico respecto al alelo 55, y ambos identificados como vánicos (Capítulo 2). Solo la cepa CECT11002 presentó un alelo no detectado anteriormente entre los alelos de *S. cerevisiae* (Capítulo 2), el cual se diferencia con un cambio del alelo 33. Es notorio mencionar que las cepas vánicas de Austria son heterocigotas para este gen, y las cuatro cepas analizadas presentan el alelo vánico 55 de *S. cerevisiae* y un alelo que solo está presente en las cepas híbridas, indicado como 1841 en el árbol y que deriva del anterior (Figura 4.3).

Tabla 4.3. Posiciones nucleotídicas variables en la región génica *CAT8* de los alelos de cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Alelo	Cambios nucleotídicos	Tipo	Híbridos
Sc288c	GCTATCATAT TGGCTACCA	Recombinante	
H03	CT.....C... ..A.GGT.T	No vánico	
H21	.TCGC.GC... ..A...T..	No vánico	
H27	.T.....CG. C.A...T..	No vánico	
H31T..... ..T.	Vánico	
H32T..... .C.....T.	Vánico	
H33T..... ..T.	Vánico	G1
H55T...C ..T.	Vánico	G2
1841T...C ..A.....	Vánico	G2
11002T..... ..T.....	Vánico	CECT11002

G1: W27, W46, 126, 172, 319, 441, 278, 205, CECT1388, CECT11003, CECT11004 y CECT11011.; G2:HA1841, HA1835, HA1837 y HA1842

4.4 Análisis de secuencias de *GAL4*.

Para amplificar la región génica *GAL4* de las 21 cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* analizadas, se utilizaron los cebadores *GAL4-5* y *GAL4-3* (Tabla M4, de Materiales y Métodos) tal y como se ha descrito en el

Capítulo 2. La longitud completa de las secuencias obtenidas fue de 642 pb. El árbol Neighbor-Joining representado en la Figura 4.4 construido siguiendo el modelo Hasegawa-Kishino-Yano ($\alpha = 1.17094$) se obtuvo con las secuencias de los híbridos correspondientes al gen nuclear *GAL4* se realizó con las cepas de referencia de las especies del género *Saccharomyces* tomadas de la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>) (*S. cerevisiae* S288c, *S. bayanus*, *S. paradoxus* europea CECT1939, *S. mikatae* y *S. castellii*) y la de los 9 alelos de las 21 cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. En esta región génica, la diferencia entre alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* esta sustentada en pocos cambios (Capítulo 2), aun así se identificaron cinco grupos, uno de ellos como “vínico” pero con alelos de cepas no vínicas; se incluye al menos una secuencia de los cinco grupos en el presente apartado: el alelo 27 como alelo “vínico”; el 3 y 12 representantes de un grupo que mostró una deleción de 15pb; el 57 donde se agrupan las cepas de Japón y el 13 de Perú y la secuencia de la cepa tipo de *S. cerevisiae* S288c (representante del ultimo de los grupos).

En el árbol filogenético se observa que todos los alelos de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se agruparon con la cepa tipo de *S. cerevisiae* muy distante de la cepa tipo de *S. paradoxus*. En este grupo se detectaron los tres grupos de alelos identificados en las cepas de *S. cerevisiae* del Capítulo 2. Las secuencias de las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se presentan en 9 alelos, de los cuales tres se han determinado como “vínicos” en *S. cerevisiae*. Además se encontraron seis alelos únicos, no detectados en *S. cerevisiae*, que solo se presentan en las cepas híbridas (Figura 4.4). La cepa MR25 aislado clínico de España agrupada junto con el alelo 18 el cual muestra signos de recombinación.

Los alelos de la especie *S. cerevisiae* de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* más frecuentes son el alelo 27 y el 1, en donde están incluidas la mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* estudiadas (Capítulo 2). En el alelo 27 se agruparon 9 cepas: las 8 cepas vínicas de Suiza y la CECT1990 de cerveza de Alemania. La cepa tipo de *S. cerevisiae* S288c que corresponde al alelo 1 tiene tres cambios respecto al alelo 27 e incluye cuatro cepas de Austria

y una de Alemania y la cepa aislada del suplemento dietético IF6. El resto de cepas híbridas se agruparon en seis alelos nuevos que no se han detectado entre las cepas de *S. cerevisiae*, con una cepa o alelo en cada uno de ellos y con menos de cuatro cambios nucleotídicos respecto a la cepa S288c (Tabla 4.4). Todas las cepas son homocigotas excepto la CECT11011 que es un aislado de cerveza de Nueva Zelanda.

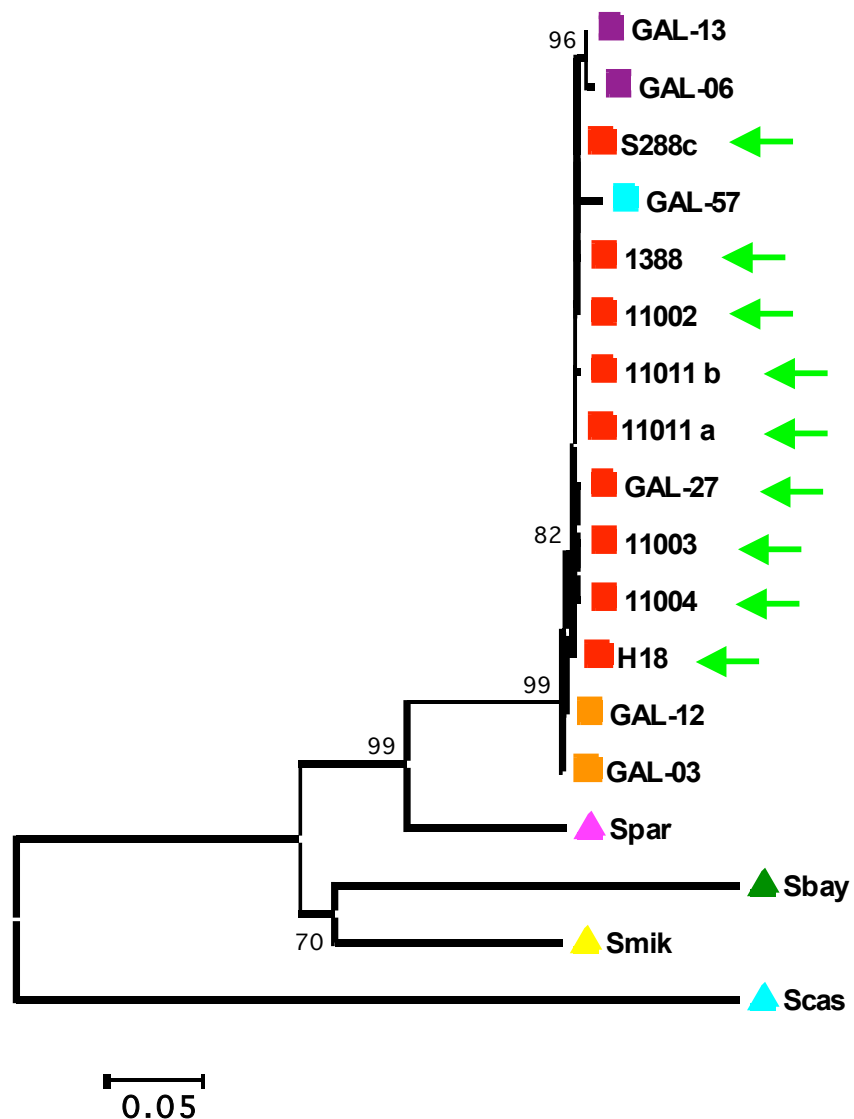


Figura 4.4. Árbol filogenético de *GAL4* de las cepas híbridas con respecto a los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae*. Los números en los nodos corresponden al valor de bootstrap basados en 2000 pseudoréplicas. La escala está dada en sustituciones nucleotídicas por sitio. Las dos poblaciones de *S. cerevisiae* están indicadas con un recuadro lleno y cada población de un color: vínica (rojo); no vínica (no rojo). Los alelos de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* están indicados con una flecha. El recuadro turquesa indica recombinação. El triángulo indica secuencia de referencia. Spar, *S. paradoxus* (fucsia); Smik, *S. mikatae* (amarillo); Sbay, *S. bayanus* (verde); Scas, *S. castelli* (azul claro).

El análisis de *GAL4*, permite detectar una mayor diversidad genética que las otras regiones analizadas, pues se detectaron 9 alelos. Sin embargo, la mayoría de las cepas presentan uno de los dos alelos detectados en cepas de *S. cerevisiae*. Las cepas vónicas de Austria, la AMH de Alemania y la IF6 de España presentan el alelo de la cepa tipo de *S. cerevisiae*, mientras que las cepas vónicas de Suiza y la cervecera de Alemania CECT1990 presentan el alelo 27. Solo dentro de las cerveceras de identificaron alelos no detectados antes en *S. cerevisiae*.

Tabla 4.4. Posiciones nucleotídicos variables en la región génica *GAL4* de los alelos de cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*.

Alelo	Cambios nucleotídicos	Tipo	Híbrido
S288c	GTCTCGAGGAATAGATTGGCTTCAGTCGCTAGGGCCCCGTC	¿?	G1
H27T..AC.....	Vínico	G2
H03T..C-----T.....C.....T	Delección	
H12	..T.....C-----T.....C.....	Delección	
H13TC.T.....	Perú	
H06	TG.....TC.T...A.....	Perú	
H57	...C..G..G.....A..G...T..T..C.	Japón	
H18C.....	Vínico	MR25
1388T.....	Vínico	CECT1388
11002G...	Vínico	CECT11002
11003AC.....A..	Vínico	CECT11003
11004AC.....A.....	Vínico	CECT11004
11011aC.....A...	Vínico	CECT11011
11011bA.....A...	Vínico	CECT11011

G1: HA1841, HA1835, HA1837, HA1842, IF6 y AMH;

G2:W27, W46, 126, 172, 319, 441, 278, 205, CECT1990

En este caso no es posible la identificación clara del origen vónico de todas las cepas, ya que, como se ha mencionado anteriormente en el Capítulo 2, en este gen no fue posible una clara clasificación de alelos vónicos y no vónicos. Aun así, es posible detectar que las cepas híbridas vónicas de Suiza tienen un origen vónico, ya que presentan una secuencia idéntica al alelo donde se

agrupan la mayoría de cepas vínicas y en el caso del resto de cepas híbridas, estas se separan de los otros tres grupos identificados en el Capítulo 2, es decir, de las cepas de Perú, de Japón y de los que presentan la delección de 15pb.

4.5 Análisis de secuencias de COX2.

Una cuestión interesante es el origen de la mitocondria en las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Por ello se secuenció el gen COX2, debido a que se ha demostrado que es una región útil para examinar las relaciones entre las especies de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Belloch et al., 2000; Kurtzman and Robnett, 2003). Con este gen se ha demostrado que las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* de vino en Suiza al igual que los híbridos cerveceros CECT 11003 y CECT 11004 muestran un genoma mitocondrial relacionado de forma muy cercana con la cepa IFO1802, cepa tipo de *S. kudriavzevii* y los otros híbridos cerveceros entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (CECT1388, CECT1990 y CECT11002) se agruparon con la cepa triple híbrido aislada de sidra CID1 (González et al., 2006).

En el presente trabajo además de los híbridos analizados en los trabajos de González et al., (2006; 2008), se incluye las cepas vínicas de Austria (HA1841, HA1835, HA1837 y HA1842), Alemania (AMH), Alsacia, Francia (Vin7) y de España (PB7), el aislado clínico (MR25), y un aislado de un producto nutricional en España (IF6), con el fin de determinar si el origen de la mitocondria en estas cepas es de *S. kudriavzevii* o *S. cerevisiae*. También se incluyeron secuencias de otras cepas de referencia pertenecientes a las restantes especies del género. Para amplificar el gen COX2 de las 21 cepas analizadas, se utilizaron los cebadores COX2-5 y COX2-3 (Tabla M4, Materiales y Métodos) tal y como se ha descrito en el apartado 6.5 de Materiales y Métodos. La longitud completa de las secuencias obtenidas fue de 585 pb.

El árbol Neighbor-Joining representado en la Figura 4.5 construido con el modelo Hasegawa-Kishino-Yano ($\alpha = 0.0400$) se obtuvo con las secuencias de las cepas de referencia de las especies del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* S288c, *S. kudriavzevii* IFO 1802 y *S. paradoxus* europea CECT 1939), los diferentes haplotipos detectados entre las secuencias de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, el triple híbrido de sidra CID1, y la de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. En el árbol se observan tres grupos, uno con las cepas tipo de *S. cerevisiae* (S288c), con el de *S. paradoxus* (p1939T) y las cepas analizadas de estas dos especies. Este grupo está compuesto por dos subgrupos, el primero con los haplotipos de las cepas americanas de *S. paradoxus* (p11158EU, p120MX, p79.65CA y p5313MX) y el segundo con las cepas tipo de *S. paradoxus* de Europa (p1939) y de *S. cerevisiae* (S288c). En el primer subgrupo se encuentra la cepa híbrida aislada del producto nutricional (IF6), mientras que en el segundo subgrupo está la vínica de Alemania (AMH) y que presenta la secuencia idéntica al haplotipo 5 de *S. cerevisiae*.

En el segundo grupo está el triple híbrido CID1 de sidra con dos haplotipos, uno incluye las cepas cerveceras (CECT1388, CECT1990, CECT11002 y CECT11011) y el otro la cepa vínica aislada de España (PB7). En el tercer y último grupo está la cepa tipo de *S. kudriavzevii* y tres haplotipos de las cepas vínicas, el 1841AT de Austria (cepas 1835, 1841, 1837, 1842 y VIN7) y en el haplotipo W27CH (cepas vínicas de Suizas W27, 441, 172, 319, 126, spg14, spg16; de cerveza CECT11002 y CECT11011 de Bélgica) y por último la cepa vínica de Suiza W46.

Tal como se ha mencionado (González et al., 2006) las cepas vínicas de Suiza se agrupan con la cepa tipo de *S. kudriavzevii* IFO 1802, así como las vínicas de Austria. En total se detectaron siete haplotipos entre las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* estudiadas, dos en el grupo de la cepa tipo de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* con cepas vínicas de Alemania y el producto nutricional, tres con la cepa tipo de *S. kudriavzevii* con las cepas vínicas de Suiza, y dos haplotipos con el triple híbrido con las cepas de cerveza y vínica de España (Figura 4.5).

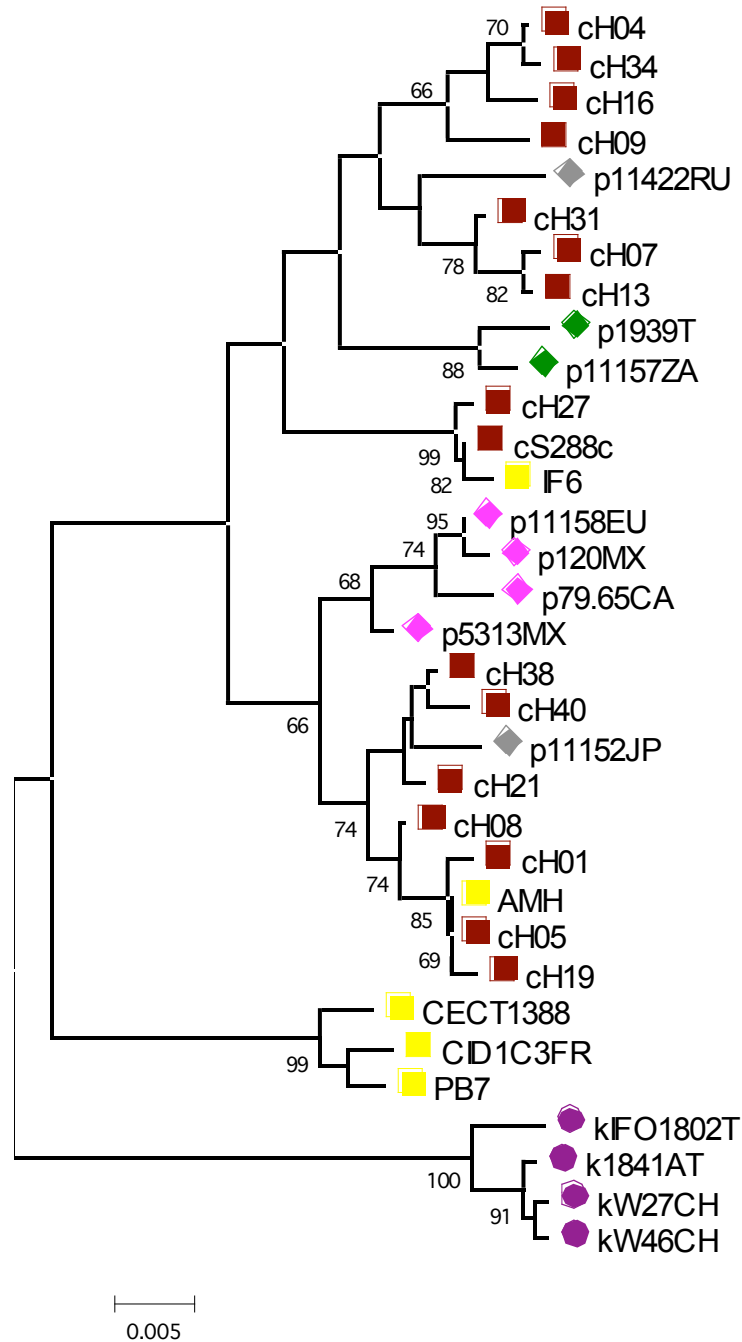


Figura 4.5. Árbol filogenético del gen mitocondrial COX2 de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y las cepas referencia de especies del género *Saccharomyces*. Los números en los nodos corresponden al valor de bootstrap basados en 2000 seudoréplicas. La escala está dada en sustituciones nucleotídicas por sitio. Las cepas de *S. cerevisiae* están indicadas con un recuadro marrón, y el alelo *cerevisiae* de las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* con un recuadro amarillo y en el haplotipo H05 de *S. cerevisiae*. Las tres poblaciones de *S. paradoxus* con rombos y cada población de un color: asiática (gris); europea (verde); americana (fucsia). El alelo *kudriavzevii* de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* en un círculo morado.

Como se ha observado en el árbol filogenético, algunas cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* presentan el gen mitocondrial de *S. cerevisiae*, mientras que otras de *S. kudriavzevii*. Sin embargo, se ha observado que en las secuencias de cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* hay recombinación intraespecífica e interespecífica (Capítulo 3). Por ello, es interesante determinar si dicha recombinación se observa en las cepas híbridas. Así, se compararon las posiciones variables de algunos de los haplotipos detectados en la región mitocondrial COX2 de las secuencias de referencia de las especies del género *Saccharomyces*, con las de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* para identificar la presencia de puntos de recombinación en las cepas híbridas.

En la Tabla 4.5 se muestra las posiciones nucleotídica de los diferentes haplotipos de las cepas tipo de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. kudriavzevii*, de otras cepas de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Se muestran los diferentes patrones encontrados entre las cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, pero en este apartado solo se expondrá los resultados observados con las cepas híbridas ya que el resto se describió en el Capítulo 3. Para facilitar el análisis del gen COX2 la secuencia se dividió en dos regiones: región 5' y región 3'. Al considerar la región 5' se encontró que los haplotipos de las cepas 1841, W27, W46, presentan tres cambios nucleotídicos respecto de la cepa tipo de *S. kudriavzevii*, la cepa AMH y la IF6 muestran un haplotipo característico de la especie *S. cerevisiae*, y la CECT1388 y PB7 se agrupó con la cepa triple híbrido CID1, con los cambios característicos de haplotipos de las especies *S. kudriavzevii* y de *S. paradoxus*.

El análisis de los cambios nucleotídicos de las dos partes de la región génica (región 3' y 5') permitió detectar que el haplotipo de la especie tipo de *S. kudriavzevii* es casi idéntico (con seis cambios) a los tres haplotipos de las cepas 1841, W27 y W46, y se observan pocos cambios (dos como máximo) entre ellos. Sin embargo, la cepa híbrida IF6, tiene una secuencia casi idéntica a *S. cerevisiae*; y la cepa AMH muestra una secuencia idéntica en la región 5' al haplotipo 2, 5 y 27 de *S. cerevisiae*, y una secuencia semejante en la región 3' a varios haplotipos de *S. paradoxus* de América y de Japón y de *S. cerevisiae* (8, 19 y 38). Las cepas del grupo con el triple híbrido CID1 presentan

el extremo 3' más variable. Por un lado, está la cepa CECT1388 que muestra la secuencia de *S. paradoxus* (11157ZA) y la PB7 de *S. cerevisiae* (haplotipo 31) y/o *S. paradoxus* (11157ZA).

Con estos datos se puede llegar a concluir que las cepas híbridas de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* presentan una región mitocondrial de uno de los dos parentales, pero además también hemos observado partes del gen con homología con otra especie del género *Saccharomyces*, en concreto con la especie *S. paradoxus*. Algunas cepas presentan mitocondrias de la especie *S. kudriavzevii*, por ejemplo, la 1841 de Austria y la W27 y W46 de Suiza; pero también de la especie *S. cerevisiae* en la cepa IF6. Sin embargo, algunas cepas presentan cambios nucleotídicos de más de una especie, tal es el caso de la cepa AMH con la región 5' de la especie *S. cerevisiae*, y en la región 3' de la especie *S. cerevisiae* o *S. paradoxus*. Otro ejemplo, es la cepa CECT1388 y la PB7 que presentan la región 5' de dos especies diferentes, de *S. kudriavzevii* y de *S. paradoxus*; y la región 3' de *S. paradoxus*, la primera, o de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*. Estos resultados dan indicios de varios fenómenos de recombinación del DNA mitocondrial entre las especies de *Saccharomyces*, lo que originó la aparición de mitocondrias híbridas con recombinación.

Tabla 4.5. Posiciones nucleotídicas variables en la región mitocondrial COX2 de las cepas tipo de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. kudriavzevii*, diversas cepas de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. **c**=*S. cerevisiae*, **p**=*S. paradoxus*, **k**=*S. kudriavzevii*.

Haplotipos	Posiciones variables del gen COX2	
	Región 5'	Región 3'
Especie	111111123334444444444555555555	555555555555555555555555555555
	4567894455779724801124457800112223	333344444445555566677788
	8735101713142015781401704014095781	45670123692567817903625
CH02	GATATATTATTTTATTTCTATTTATTTTACTCT	ACAATTCAAATACTAATACGAAT
CH27G
CH05	GGC...TGG.GAC.TA.T.GC
CH04C...A...C...A..T..	...AGT.GC...G.C...G..
CH09A...C.....	...AGT.GC...G.CC..G..
CH34C...A...C...CA..T..	...AGT.GC...G.C...G..
CH16C...A...C...CA..T..	GGC...AGT.GC...G.C...G..
cS288cTGC...TGG.GAC.TA.T..GC
CH19	..C.....	GGC...TGG.GAC.TA.T..GC
CH08A...C.....	GGC...TGG.GAC.TA.T..GC
CH38C...A...C...CA.....	GGC...TGG.GAC.TA.T..GC
CH21C...A...C...A.....	GGC...TGG.GAC.TA.T...C
CH40C...A...C...CA..T..	GGC...TGG.GAC.TA.T...C
CH07C...A...C...CAC.T..	...C...GC...G.C.....
CH13C...A...C...CAC.T..	...C...GGC...G.C.....
CH31C...A...C...A..T..	...C...GGC...G.C.....
p1939TCA.T...CC.....T..	GGC.CAGT.GCG..G.C..A...
p11157ZACA.T...CC.....T..	GGC...GGG.G..G.C..A...
p11422RU	A.....A.T...C...CA.....	...C...C...C.....
p11158EUA...C.....	T...C...GG.GACTTA.T.G.C
p79.65CAA...C.....	T...CAGTGG.GACTTA.T.G.C
p5313MxA...C.....	GGC.C...GG.GACTTA.T.G.C
p120MxA...G.C.....	T...C...GG.GACTTA.T.G.C
p11152Jp	A.....A.T...C...CA.....	GGC...TGG.GAC.TA.T...C
kIFO1802T	.TA.CTCAGACA.TC.A.AT..CT.AAA.G.ATC	TGCTCAGTGG.GAC.TA.T...C
kW27CH	.TA.CTCAGACA.T..A.AT..CTAAAA.G.AT.	TGCTCAGT.G.TAC.TA.T...C
kW46CH	.TA.CTCAGACA.T..A.AT..CTAAAA.G.AT.	TGCTCAGT.G.TAC.TC.T...C
k1841AT	.TA.CTCAGACA.T..A.AT..CTAAAA.G.AT.	TGCTCAGT.G..AC.TA.T...C
kCID1FR	.TA.CTCAGACA.TCA.T...CC.....T..	...C...GGGACT.C..A...
KPB7	.TA.CTCAGACA.TCA.T...CC.....T..	...C...GGG.G..G.C..A...
kCECT1388	.TA.CTCAGACA.T...T...CC.....T..	G...C...GGG.G..G.C..A...
KAMH	GGC...TGG.GAC.TA.T..GC
KIF6A.....

Combinando los datos de secuenciación del alelo “*cerevisiae*” de las cuatro regiones nucleares y el gen mitocondrial se determinó el genotipo de las cepas híbridas, y se muestra en la Tabla 4.6. Las cepas vínicas de Austria presentan el gen mitocondrial de la especie *S. kudriavzevii* y los genes nucleares que corresponden a la especie *S. cerevisiae*. En la región mitocondrial, las cepas vínicas de Austria presentan el alelo k2 de *S. kudriavzevii*, con 5 cambios respecto a la cepa tipo de *S. kudriavzevii*. En *EGT2* presentan el alelo c2 que se encuentra en la cepa vínica 2171SI de Eslovenia y la Sc2ES aislada de olivas de España. La cepa híbrida HA1842 de Austria presenta el alelo c1, el cual se encuentra sólo en cepas híbridas. Sin embargo, estos alelos muestran 1 o 2 cambios respecto al alelo 3, que es el más frecuente entre las cepas de *S. cerevisiae* (Capítulo 2). En la región génica *BRE5* presentan el alelo c7 que se observó en la cepa vínica 1914SI de Eslovenia, y en *CAT8* presentan los alelos c2-c3. El alelo c2 se presenta en las cepas vínicas de Sudáfrica, España, Hungría, Francia, Argentina y Chile, y el c3 en cepas híbridas de Austria. Para la región génica *GAL4* presentan el alelo c7 que es muy común entre las cepas vínicas y no vínicas de *S. cerevisiae*.

Las cepas vínicas de Suiza presentan el mismo genotipo entre ellas, con el gen mitocondrial de la especie *S. kudriavzevii* y los genes nucleares de la especie *S. cerevisiae*, pero diferentes al de las cepas de Austria. El alelo de *COX2* es igual para todas las cepas (k3), con un cambio respecto al k2 de las cepas híbridas de Austria, excepto la W46, con el alelo k4 con un cambio respecto al alelo k3, y este con 5 cambios respecto a la cepa tipo de *S. kudriavzevii*. En *EGT2* las cepas híbridas presentan el alelo c2, presente en 2171SI, cepa vínica de Eslovenia y de oliva de España, con un cambio respecto al alelo 3, el más frecuente entre las cepas de *S. cerevisiae*. El alelo k2 es el más frecuente entre las cepas híbridas de vinos de Suiza, y solo la W46, y la 172 muestran el alelo k3 y k4 con 1 y 2 cambios respecto al alelo k2. En la región génica *BRE5*, las cepas híbridas de Suiza presentan el alelo c1, con 3 cambios respecto a la cepa 1914SI de Eslovenia, y el alelo c7 de las cepas híbridas de Austria. El alelo *kudriavzevii* denominado como k3 es el más frecuente y solo la cepa W27 presenta el alelo k2 con un cambio respecto al k3. Todas las cepas híbridas de Suiza muestran el alelo c1 de *CAT8* y el c8 de

GAL4, los cuales son muy comunes entre las cepas vónicas, entre las que se encuentran las de Eslovenia, Austria y Suiza, como representantes de Centro Europa.

Las cepas de cerveza con diferente origen geográfico muestran un genotipo más diverso, ya que no comparten el genotipo. Además se puede apreciar alelos no detectado entre las cepas de *S. cerevisiae* excepto para *CAT8* y *EGT2*. En *COX2*, se encontraron dos alelos de la especie *S. kudriavzevii*, pero en uno de ellos se observan cambios nucleotídicos de la cepa tipo de *S. kudriavzevii* con zonas de las especies de *S. cerevisiae* o *S. paradoxus* (k1), lo que se puede explicar por la recombinación entre el *COX2* de *S. cerevisiae* y el de *S. paradoxus*. Solo las cepas CECT11003 y CECT11004 presentan el alelo k3 de *kudriavzevii* que se ha encontrado entre las cepas híbridas de Suiza. En la región génica *EGT2* se detectó el alelo c2 en todas las cepas, que se ha detectado en la cepa vónica 2171 de Eslovenia y una de oliva en España. Además la cepa CECT1990 de Alemania presenta los alelos recombinantes c3 con 5 cambios respecto al alelo c2, y el c4 con 3 cambios considerando la cepa S288c, por lo que es el único híbrido en que se han detectado alelos de *S. cerevisiae* con recombinación. En el caso de *BRE5*, los alelos se diferencian con uno o dos cambios del alelo c7 que se encuentra en la cepa vónica 1914SI de Eslovenia. El alelo k3 de *kudriavzevii*, es el más frecuente entre las cepas híbridas. En *CAT8*, el alelo detectado es el c1 que es muy frecuente entre las cepas vónicas, y con un cambio, el alelo c4 esta presente en la cepa CECT11002 de Bélgica. Para la región génica *GAL4* se encontraron alelos con 2, 3 o 4 cambios respecto al alelo c8, que se detectó en cepas vónicas. Al comparar los genotipos entre las cepas vónicas de Suiza y los de las cerveceras, se observa que los híbridos cerveceros CECT11003 y CECT11004 son muy parecidos a los vónicos, con 2 cambios en *GAL4* y 1 en *BRE5*.

El genotipo de la cepa aislada del suplemento nutricional, IF6, es muy semejante al detectado entre las cepas híbridas de vinos con alelos de cepas vónicas, solo que presenta el gen mitocondrial de *S. cerevisiae*. Se detectaron los alelos c9 y c2 en *BRE5*, con 2 o 3 cambios, en relación al alelo c7, que esta presente en la cepa vónica 1914SI de Eslovenia. El genotipo de la cepa clínica

MR25, también esta formado por alelos detectados en cepas vónicas o con alelos con pocos cambios respecto a los de cepas vónicas. Así se tienen que en *EGT2* presenta dos alelos uno de ellos detectado solo en cepas híbridas pero con dos cambios respecto a la cepa 2171SI de Eslovenia, y el otro esta presente en la cepa 1568SI de Eslovenia. En *CAT8*, esta presente el alelo c1 que es más común en cepas vónicas, y en *GAL4*, el alelo c9, detectado en cepas con alelos vónicos de Perú, México y Brasil. El genotipo de la cepa híbrida AMH de vino de Alemania, presenta todos los alelos *cerevisiae* de cepas vónicas y cabe mencionar que los alelos en *EGT2* y *BRE5* están presentes en cepas de Centro Europa, de Eslovenia y Austria, respectivamente.

Tabla 4.6. Genotipo de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* en base a cuatro regiones nucleares y una mitocondrial. Alelos detectados en las cepas híbridas: c=*S. cerevisiae*, k= *S. kudriavzevii*

Cepa	Fuente de aislamiento	Origen geográfico	Región génica				
			<i>COX2</i>	<i>EGT2</i>	<i>BRE5</i>	<i>CAT8</i>	<i>GAL4</i>
HA1841	Vino	Austria	k2	c2-k2	c7-k3	c2-c3	c7
HA1835			k2	c2-k2	c7	c2-c3	c7
HA1837			k2	c2-k2	c7	c2-c3	c7
HA1842			k2	c1-k2	c7	c2-c3	c7
W27			k3	c2-k2	c1-k2	c1	c8
W46	Vino	Suiza	k4	c2-k3	c1-k3	c1	c8
126			k3	c2-k2	c1-k3	c1	c8
172			k3	c2-k4	c1-k3	c1	c8
319			k3	c2-k2	c1-k3	c1	c8
441			k3	c2	c1-k3	c1	c8
spg 14-91			k3	c2-k2	c1-k3	c1	c8
spg 16-91			k3	c2-k2	c1-k3	c1	c8
CECT1388			Cerveza	Inglaterra	k1	c2	c1
CECT1990	Alemania	k1		c1-c2	c4	-	c8
CECT11002	Bélgica	k1		c2	c5	c4	c2
CECT11003	Bélgica	k3		c2	c5-k3	c1	c3
CECT11004	Bélgica	k3		c2-k2	c1-k3	c1	c4
CECT11011	N. Zelanda	k1		c2-k2	c6-k3	c1	c5-c6
IF6	Suplemento nutricional	España	c1	c2-k2	c9-c2	c1	c7
MR25	Clínica	España	-	c1-k2	c10-c3	c1	c9
AMH	Vino	Alemania	c2	c2	c8	c1	c7

4.6 Discusión.

La fermentación del vino es un proceso microbiano complejo que consiste en la transformación del mosto en vino y en el que participan diferentes géneros y especies de levaduras, aunque *Saccharomyces* predomina en estos procesos de fermentación alcohólica (Fleet and Heard, 1993). El género *Saccharomyces* (Kurtzman and Robnett, 2003), está compuesto por tres especies asociadas a procesos de fermentación alcohólica: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, y *S. pastorianus*; y cuatro especies aisladas de hábitats naturales: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*. Aunque *S. cerevisiae* y *S. bayanus* se encuentran asociadas a diversos procesos de fermentación industrial, se ha descrito a *S. paradoxus* como la especie de levadura predominante en viñedos para la producción de vinos croatas (Redzepovic et al., 2002).

La formación de híbridos en el laboratorio entre las diferentes especies del género *Saccharomyces* (de Barros Lopes et al., 2002; Marinoni et al., 1999; Naumov et al., 2000a) es una técnica utilizada para la delimitación de especies de acuerdo al concepto de especie biológica. Aunque la formación de híbridos artificiales entre varias especies de *Saccharomyces* es posible, éstos son estériles por el aislamiento reproductivo postcigótico, ya que si se llega a producir esporas estas pueden ser estériles, pero se mantienen viables por reproducción asexual.

Debido a que las diferentes especies del género *Saccharomyces* comparten el mismo nicho ecológico y la capacidad de formar híbridos estériles pero viables, permite suponer que la formación de híbridos es factible en ambientes naturales. La caracterización de cepas de cerveza mediante la hibridación de DNA-DNA permitió la identificación de híbridos naturales (Vaughan-Martini and Kurtzman, 1985). Posteriormente se ha demostrado la naturaleza híbrida de varias cepas de levaduras aisladas de cerveza (Casaregola et al., 2001), pero no solo de ambientes cervecero, sino de otros procesos industriales. En un ambiente vínico, la cepa S6U aislada en Italia que es híbrido *S. cerevisiae* x *S. bayanus* y la cepa CID1 aislada de sidra en Francia descrita como triple híbrido con dos copias del gen nuclear *MET2*, uno de *S. cerevisiae* y el otro de *S.*

bayanus (Masneuf et al., 1998), y el genoma mitocondrial de una especie diferente que corresponde a la especie *S. kudriavzevii* (Groth et al., 1999). Este es el primer estudio que involucra la descripción de cepas híbridas compuestas por *S. kudriavzevii*.

Hasta el momento sólo se han descrito dos cepas de *S. kudriavzevii* que han sido aisladas de exudados de árboles en Japón (Naumov et al., 2000a). No se han descrito más cepas debido a que esta especie es criofílica (Belloch et al., 2008), aunque recientemente se han aislado más cepas naturales de esta especie en bosques de encino en Portugal, por lo que los programas de aislamiento de esta especie deben enfocarse en aislar cepas en los bosques de encinos a bajas temperaturas (Sampaio and Gonçalves, 2008). En nuestro grupo se identificaron y caracterizaron híbridos naturales *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* de ambientes vínicos en Suiza con el análisis de RFLPs de 6 marcadores moleculares, y con el análisis filogenético de la región génica *MET6* se ha confirmado la naturaleza híbrida de estas cepas (González et al., 2006) y también de híbridos naturales aislados de cerveza (González et al., 2008). Con el estudio fisiológico de adaptación a distintos estreses fermentativos se ha propuesto que estas cepas híbridas crecen bien a bajas temperaturas (Belloch et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que los híbridos naturales vínicos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* están adaptados a ambientes fermentativos y producen una mayor cantidad de compuestos aromáticos que las especies parentales (González et al., 2007; Lopandic et al., 2007).

En el presente trabajo, se realizó un estudio genético multilocus que nos ha permitido realizar un análisis filogenético de las cepas híbridas *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y con ello determinar el origen del alelo de la especie *S. cerevisiae* en los híbridos (si tiene su origen en las cepas vínicas o en cepas aisladas de otros ambientes fermentativos, también en que área de Europa se pudieron originar y si son distintos orígenes). Además este estudio nos ha permitido determinar el origen de los alelos procedentes de la especie *S. kudriavzevii* para confirmar la naturaleza híbrida de las cepas y poder determinar si el origen de la parte procedente de *S. kudriavzevii* en las distintas

fermentaciones (vino, cerveza) tienen un origen común o no. Para ello se obtuvo la secuencia de cuatro genes nucleares de tres cromosomas diferentes (*EGT2*, *BRE5*, *CAT8* y *GAL4*) y de una región mitocondrial (*COX2*) de 21 cepas híbridas.

Con el análisis filogenético de las secuencias de los alelos *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* en las regiones génicas *BRE5* y *EGT2* de las 21 cepas estudiadas se confirmó la naturaleza híbrida de los aislados al presentar alelos similares a *S. cerevisiae* y otros similares a *S. kudriavzevii*. En el caso de las cepas vínicas de Suiza que se han descrito anteriormente como cepas híbridas por medio del análisis de RFLPs de 6 regiones nucleares y la secuenciación del gen mitocondrial *COX2* (González et al., 2006) y de cepas de cerveza (González et al., 2008), se confirmó por medio de la secuenciación de otras dos regiones diferentes en el cromosoma XIV.

Aún cuando los híbridos caracterizados *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* de este estudio provienen de diferentes países y hábitat, el alelo de la especie *S. kudriavzevii* muestra cambios nucleotídicos con respecto a la cepa tipo IFO 1802, lo que sugiere que esta cepa no participó en la formación de estos híbridos. Hasta el momento sólo se han descrito dos cepas de *S. kudriavzevii* que han sido aisladas en ambientes naturales de Japón (Naumov et al., 2000a) y no ha sido nunca descrita en alimentos fermentados o bebidas. Sin embargo, se han encontrado poblaciones de esta especie coexistiendo con *S. cerevisiae* o *S. paradoxus* en árboles de roble en Portugal (Sampaio and Gonçalves, 2008) de las que no se dispone secuencias, por lo que *S. kudriavzevii* no es endémica de Japón y resulta interesante buscar más cepas de *S. kudriavzevii* que ayude a encontrar el origen de las cepas híbridas.

S. kudriavzevii es una especie que se encuentra en ambientes naturales (Naumov et al., 2000a) poco adecuado para otras especies del género *Saccharomyces* y nunca se ha descrito en ambientes fermentativos. Sin embargo, se ha identificado y caracterizado por medio de marcadores genético a los híbridos *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* de ambientes vínicos (González et al., 2006), y mediante el estudio de las adaptaciones al estrés fermentativo de

híbridos vínicos y cerveceros se concluye que están mejor adaptados a las condiciones de estrés fermentativo (Belloch et al., 2008) ya que mantienen características importantes para una fermentación, tales como el crecimiento a altas concentraciones de etanol, carácter heredado del parental *S. cerevisiae* y la criotolerancia del parental *S. kudriavzevii*. Además se ha demostrado que los híbridos producen mayores cantidades de compuestos volátiles que las especies parentales (González et al., 2007).

Lo datos descritos anteriormente sugiere que los híbridos mantienen características importantes de ambos parentales lo que les permite coexistir en la naturaleza, en el mismo nicho ecológico en condiciones menos favorecedoras para las otras especies del género *Saccharomyces*, así como en ambientes fermentativos industriales. Hasta el momento las cepas híbridas naturales se han encontrado en ambientes vínicos, cerveceros, clínicos y en un suplemento nutricional, por lo que es importante el aislamiento de más poblaciones naturales de *S. kudriavzevii* que permitan identificar el origen de las cepas híbridas, y si es el caso la identificación de más híbridos en otros ambientes naturales y fermentativos.

Las levaduras del género *Saccharomyces* están presentes en los mismos hábitats, y pueden participar en la formación de híbridos naturales. Sin embargo, aún no se sabe si estos híbridos se originaron en ambientes naturales o en ambientes modificados por el hombre para la producción de productos fermentados. El análisis filogenético de las secuencias del alelo *S. cerevisiae* de las cepas híbridas, en comparación con los alelos vínicos y no vínicos de *S. cerevisiae* de las cuatro regiones nucleares, muestra que el alelo *S. cerevisiae* de las cepas híbridas se agrupa con los alelos vínicos, lo que indica el origen vínico de este alelo en las cepas híbridas. Sin embargo, no todas las cepas tienen el mismo origen, ya que muestran un genotipo diferente de acuerdo al substrato y el país donde se obtuvieron. Así se tiene que las cepas vínicas de Austria son diferentes de las de Suiza y a la de Alemania. En el caso de las cepas híbridas de cerveza, se observa que aunque presentan el mismo alelo en *CAT8* que las vínicas de Suiza, son diferentes en los otros

marcadores utilizados, lo que sugiere un origen a partir de alelos vínicos de *S. cerevisiae* pero diferente que las cepas vínicas.

Con base a los marcadores moleculares utilizados es posible pensar en al menos tres eventos de hibridación que dieron origen a las cepas híbridas aisladas de vinos; uno con las cepas de Austria, otro en las cepas de Suiza y el tercero en la cepa de Alemania. Para las cepas de cerveza, dado que todas son diferentes al comparar entre ellas, es un poco difícil determinar el número de eventos de hibridación, y probablemente se obtuvieron a partir de un solo evento y después sufrieron recombinación, ya que este fenómeno se detectó en algunos alelos en las cepas híbridas de cerveza para el gen *EGT2*.

Otro aspecto importante a mencionar es la heterocigosidad de los alelos de *S. cerevisiae* en las cepas híbridas, inferior a las encontradas en las cepas vínicas de *S. cerevisiae* estudiadas en este trabajo (Capítulo 2) y a los descritos en otras cepas vínicas comerciales (Bradbury et al., 2006; Mortimer, 2000). Las cepas híbridas estudiadas presentan del 19% de heterocigosidad para *CAT8*, 9,5% en *BRE5* y 4,7% para *GAL4* y *EGT2*, mientras que las cepas vínicas comerciales presentan desde 12% hasta 54% de heterocigosidad, según la región génica analizada (Bradbury et al., 2006). Se observa que las cepas híbridas de Austria son heterocigotas para *CAT8*, y dentro de las cerveceras, una es heterocigota para *GAL4* y otra para *EGT2*. En el caso de la cepa clínica y del suplemento nutricional se detectó la heterocigosidad en la región génica *BRE5*. Resulta interesante destacar, que al comparar la diversidad de alelos se detectaron más alelos en *BRE5* y *GAL4* con 10 y 9 respectivamente, que en *CAT8* y *EGT2* con 4 cada una. Sin embargo, estos valores son semejantes a lo observado con otras cepas vínicas comerciales, donde se detectaron desde 8 a 33 alelos diferentes, en un grupo de 50 cepas vínicas comerciales caracterizadas con microsatélites y minisatélites (Bradbury et al., 2006).

DISCUSION GENERAL

Las levaduras del género *Saccharomyces* son organismos muy especializados que se encuentran asociados a diversos procesos de fermentación, tanto industriales, como la producción de vino, pan, cerveza, o sidra, como en procesos de fermentación tradicionales de países en vías de desarrollo. El género *Saccharomyces* (Kurtzman and Robnett, 2003), comprende tres especies asociadas a procesos de fermentación industrial: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, y *S. pastorianus*; y cuatro especies aisladas de hábitats naturales: *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*. Recientemente se ha descrito una nueva especie de este género aislada de árboles denominada *S. arboricolus* (Wang and Bai, 2008), todavía poco caracterizada.

Las especies del género *Saccharomyces* presentan ciertas características únicas que no se encuentran en otros géneros (Vaughan-Martini and Martini, 1998). Una de estas características es la elevada capacidad para fermentar azúcares y producir etanol. Con la aparición de las angiospermas, plantas con savia y frutos ricos en azúcares, se introdujo un nuevo nicho ecológico y un nuevo patrón de selección, lo que impuso una nueva serie de demandas fisiológicas sobre el ancestro de *Saccharomyces* (Wolfe and Shields, 1997). Bajo estas condiciones, las adaptaciones evolutivas se dieron bajo un nuevo contexto ecológico, lo que favoreció la adquisición de las altas capacidades de fermentación de azúcares. Esto permitió a estas especies colonizar una gran cantidad de substratos ricos en azúcares, tales como la savia de plantas y sus frutos, y así competir con otras levaduras que no son tolerantes al alcohol.

Esta gran capacidad para fermentar azúcares ha sido utilizada inconscientemente por el hombre para la producción de alimentos y bebidas fermentadas lo que impuso una nueva presión selectiva sobre estas levaduras. Este proceso puede ser descrito como “domesticación”, y es responsable de las características genéticas particulares de las levaduras utilizadas en forma industrial.

Desde el inicio de la civilización humana, la relación entre el hombre y la actividad fermentativa de los microorganismos, ha sido importante para la obtención de diversos alimentos y bebidas. Uno de los principales substratos para la producción de los productos fermentados son los granos de cereales, y constituyen la principal fuente de nutrimentos; sin embargo, son deficientes en algunos componentes básicos como son los aminoácidos esenciales. Es por ello, que la fermentación es uno de los métodos más antiguos y económicos para la producción y conservación de alimentos, ya que no es necesario el conocimiento del papel de los microorganismos involucrados (Blandino et al., 2003). Así los microorganismos responsables de la fermentación son la microbiota indígena que está presente en el substrato o los cultivos puros si se añaden como iniciadores. Aunque las bacterias y los hongos filamentosos participan en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, en una fermentación alcohólica las levaduras son los microorganismos predominantes.

La levadura de la especie *S. cerevisiae* está asociada a diferentes procesos de fermentación industrial, entre ellos, la producción de pan, cerveza, y vino. Con el análisis de restricción de la región ribosomal 5,8-ITS y la secuenciación de los dominios D1/D2 del gen ribosómico 26S hemos identificado a *S. cerevisiae* como la especie predominante en las diferentes bebidas y alimentos fermentados de forma tradicional estudiadas de Perú y México, aunque también otras especies “no *Saccharomyces*” predominan en otras bebidas, como en el caso de las bebidas fermentadas en forma tradicional de África (Jespersen, 2003).

Como ejemplos de bebidas tradicionales de Latinoamérica en donde las levaduras “no *Saccharomyces*” son las predominantes cabe destacar el tepache, bebida elaborada con piña y azúcar donde la especie *Candida humilis* es la especie predominante, y en tuba, bebida fermentada a partir de la savia de palma siendo *Issatchenkia orientalis* la mayoritaria. La diversidad asociada a cada producto puede deberse a que cada uno de ellos se elabora con diferente substrato, las condiciones ambientales donde se realiza la fermentación, así como las características del producto final también son diferentes, lo que afecta la distribución de las especies de levaduras.

Otra especie detectada en fermentaciones alcohólicas es *S. paradoxus*, que es una especie natural con distribución mundial; sin embargo, tan solo se ha descrito como la especie predominante en viñedos para la producción de vinos croatas (Redzepovic et al., 2002), sin encontrarse asociada a otros procesos fermentativos. Con técnicas moleculares se confirmó la presencia de *S. paradoxus* junto con *S. cerevisiae* en la elaboración del pulque, bebida mexicana elaborada con jugo de agave (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b), por lo que estas dos especies coexisten en el mismo hábitat (Sniegowski et al., 2002), en este caso una bebida fermentada de forma tradicional en donde las dos especies contribuyen en la fermentación alcohólica para producción de etanol. También resulta interesante resaltar, al igual que ocurre en otros procesos fermentativos, una sucesión de levaduras (Coton et al., 2006; Morrissey et al., 2004).

En un principio predominan las levaduras “no *Saccharomyces*”, entre ellos los géneros *Hansenula*, *Candida* y *Pichia* entre otros, mientras que después de la producción de alcohol *Saccharomyces* se impone y predomina. Sin embargo, son necesarios más estudios que incluyan un número una mayor de cepas de levaduras.

Las especies del género *Saccharomyces* están presentes en una gran cantidad de bebidas además de la vinificación. Algunas de estas son: sidra, cerveza, sake, masato, chicha de jora, aguamiel, tepache, en las cuales fermentan los distintos azúcares presentes en diferentes substratos, para la producción de etanol. Cada grupo de cepas presentan adaptaciones fisiológicas específicas para cada tipo de bebida. Las adaptaciones fisiológicas de las cepas no vínicas de *S. cerevisiae* han permitido demostrar que también son capaces de llevar a cabo una fermentación vínica, donde las condiciones fisiológicas son muy estresantes para la levadura, a pesar de proceder de ambientes donde no se encuentran condiciones tan estresantes como es una fermentación vínica.

Las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae* comparadas con las cepas procedentes de otros substratos muestran una población genéticamente

diferenciada (Aa et al., 2006; Fay and Benavides, 2005a) y esto hace suponer que aparecieron durante el proceso de adaptación a la elaboración del vino, un proceso inconsciente de domesticación de *S. cerevisiae*. Además, los análisis genéticos poblacionales sugieren que se originó en el Oriente próximo y se dispersó con la expansión de la uva y la producción del vino (Legras et al., 2007).

De acuerdo con el análisis filogenético, *S. paradoxus*, es la especie más cercana a *S. cerevisiae* (Rokas et al., 2003). Es una especie que se encuentra en la naturaleza con una amplia distribución (Sniegowski et al., 2002; Vaughan-Martini and Martini, 1995), y aunque es raro encontrarla en fermentaciones industriales, se ha descrito en vinos croatas (Redzepovic et al., 2002). El cariotipo de *S. paradoxus* es colineal con *S. cerevisiae*, es decir, no muestran reordenaciones cromosómicas entre las dos especies (Fischer et al., 2000; Kellis et al., 2003) y la divergencia es de aproximadamente 15% (Cliften et al., 2001). *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* coexisten en el mismo microhabitat, es decir, exudados de roble, corteza de roble y suelos asociados a robles (Naumov et al., 1998; Sampaio and Gonçalves, 2008; Sniegowski et al., 2002). La formación de híbridos entre estas especies es posible; sin embargo, muestran aislamiento postzigótico, por lo que se producen cepas híbridas pero son estériles (Maclean and Greig, 2008). Además, las barreras ecológicas impiden la formación de híbridos entre estas especies, ya que *S. paradoxus* crece mejor que *S. cerevisiae* a bajas temperaturas (Giudici et al., 1998).

Las capacidades fermentativas de ambas especies son diferentes. Por un lado las cepas vínicas de *S. cerevisiae* producen entre 11 y 15% de alcohol (Cavaliere et al., 1998) mientras que *S. paradoxus* logra valores muy bajos de hasta 6-7% (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953b). Esto es de esperar pues *S. cerevisiae* ha sido seleccionada para fermentar rápidamente los azúcares de los diversos substratos para la producción de bebidas alcohólicas, entre ellas, el vino, mientras que *S. paradoxus* aparece sobre exudados de árboles y suelos de bosques de encino y no asociada a procesos fermentativos.

El origen de *S. cerevisiae* es controvertido, y se han propuesto 3 hipótesis que tratan de explicarlo. La primera hipótesis se basa en el hecho de que la gran mayoría de las cepas están asociadas o adaptadas a ambientes fermentativos. El substrato donde crece *S. paradoxus* es exudados de encinos, suelo e insectos (Naumov et al., 1996), y *S. cerevisiae* sobre substratos ricos en azúcares fermentables, muchas veces asociadas a la actividad humana, y por ello, se le ha denominado especie domesticada. Sin embargo, es probable que exista en la naturaleza como otras especies, antes de ser domesticada para la producción de alimentos y bebidas fermentadas. *S. cerevisiae* se ha aislado cerca de los viñedos (Mortimer and Polsinelli, 1999), pero también de ambientes no vínicos. Por ejemplo, de aguas del río Danubio (Slavikova and Vadkertiova, 1997), suelo asociado a árboles de encino en Estados Unidos donde coexiste con *S. paradoxus* (Sniegowski et al., 2002). Esto llevó a considerar a *S. cerevisiae* como una especie domesticada (Naumov et al., 1996), surgida a partir de un ancestro silvestre, probablemente *S. paradoxus* y el encontrar cepas de *S. cerevisiae* en la naturaleza, suceso muy raro, probablemente es debido a que provienen de ambientes fermentativos.

La segunda hipótesis propone que *S. cerevisiae* está presente principalmente en fermentaciones y que es muy rara en la naturaleza. Sin embargo, mencionan que entre los individuos de esta especie existen dos poblaciones diferentes, entre las cuales ocurre flujo genético mediante la acción de insectos (Mortimer and Polsinelli, 1999). La tercera hipótesis menciona que *S. cerevisiae* se encuentra principalmente en fermentaciones, y es muy raro encontrarla en ambientes naturales. Además, es posible diferenciar dos poblaciones muy diferentes, una de ambientes vínicos que proviene de su domesticación, y la otra silvestre, ya que el flujo genético entre los individuos de ambas poblaciones es mínimo o ausente (Vaughan-Martini and Martini, 1995).

Estudios filogenéticos recientes indican la existencia de al menos tres grupos de cepas de *S. cerevisiae*, un grupo de cepas silvestres, y dos grupos de cepas domesticadas, uno de vinos y otro de sake (Fay and Benavides, 2005a; Legras et al., 2007). A partir de la población de cepas silvestres se

produjo la selección de diferentes poblaciones industriales para la producción de vino, cerveza, pan. Cada una de estas poblaciones presenta una variabilidad genética que comparten; por ejemplo, muestran un cariotipo semejante entre ellas pero diferente al de otros procesos de fermentación. Por lo tanto, cada tipo de fermentación ha ocasionado que las cepas se adapten a estos ambientes por medio de diferentes mecanismos moleculares.

En el presente trabajo se detectaron dos poblaciones en *S. cerevisiae*, una con cepas vínicas y las otras con cepas de ambientes no vínicos, que, además mostraron una estructura genética muy diferente entre ellas. Por un lado, las cepas vínicas que generalmente son homotálicas y en donde las condiciones ambientales adecuadas (altas cantidades de azúcares y temperatura óptima) favorecen el crecimiento celular, y con ello se promueve principalmente la reproducción asexual. La reproducción sexual se da raramente, y cuando ocurre es por cruce entre esporas de una misma asca (autofertilización) o por cruce de células haploides provenientes de la primera mitosis de esporas germinadas (autodiploidización) ocasionando un alto grado de homocigosis. En cambio, las cepas de ambientes no vínicos, en donde las condiciones ambientales no son constantes y óptimas para un rápido crecimiento, como en una fermentación industrial, y favorece la esporulación sexual, para resistir las condiciones adversas, donde se producen fenómenos de recombinación y la formación de heterocigotos.

Las cepas aisladas de bebidas tradicionales de Latinoamérica, han estado aisladas del resto del mundo, hasta la llegada de los europeos a América, y presentan una gran diversidad genética con una estructura genética compleja en donde hemos detectado la presencia de híbridos intraespecíficos, es decir, cepas con alelos vínicos y no vínicos. Esta variabilidad genética se puede explicar de dos formas. En primer lugar, es probable que exista un acervo genético, si se considera que los microorganismos muestran una dispersión global, y en donde haya al menos dos procesos de domesticación distintos, uno en Latinoamérica asociados a la obtención de bebidas y alimentos fermentados por las poblaciones indígenas y otro en el Lejano Oriente, tal como se propone para otras procesos de fermentación (Fay and Benavides, 2005a; Legras et al.,

2007). La segunda opción es a partir de un proceso de domesticación inicial en el Lejano Oriente, (Fay and Benavides, 2005a), y que estas levaduras se dispersarán con la distribución de la uva y producción del vino, donde se pudieron introducir cepas vínicas de Europa a Latinoamérica, con la llegada de los españoles y portugueses. Esto dió origen a que las dos poblaciones, vínicas (introducidas) y no vínicas (salvajes), estuvieron en contacto y mediante reproducción sexual se hayan mezclado para que se encuentre una estructura tan compleja en las poblaciones de cepas no vínicas. Este mismo fenómeno de flujo genético, pudo haber ocurrido entre Europa y África ya que se ha encontrado cepas heterocigotas entre las cepas utilizadas para la producción de vino en Sudáfrica. Sin embargo, aunque existe flujo genético entre las cepas vínicas de Europa y no vínicas de Latinoamérica, las cepas no vínicas no se encuentran en las fermentaciones introducidas por los europeos. En cambio, las cepas vínicas son muy escasas en las bebidas tradicionales, pero predominan las cepas con alelos no vínicos o bien presentan un alelo no vínico.

La identificación de dos poblaciones de cepas de *S. cerevisiae*, una formada por cepas vínicas y la otra con cepas de ambientes no vínicos, junto con el análisis filogenético, ha demostrado que esta especie ha sufrido varios eventos de domesticación, donde se observa que las cepas utilizadas para la producción de vino, no se han originado a partir de *S. paradoxus*, sino a partir de las cepas de *S. cerevisiae* que aún se encuentran en la naturaleza (Fay and Benavides, 2005a; Legras et al., 2007).

Estudios recientes intentan describir los mecanismos moleculares que han sufrido las levaduras de importancia industrial del género *Saccharomyces*, y las adaptaciones evolutivas a procesos de fermentación industrial, que han moldeado su genoma a través de la selección durante billones de generaciones (Querol et al., 2003). Sin embargo, se han realizado pocos estudios sobre la diversidad genética así como sobre los mecanismos moleculares que han moldeado el genoma de estas especies para que se adapten a ambientes fermentativos.

Las levaduras del género *Saccharomyces* han sufrido diversos procesos adaptativos a lo largo de su evolución para ajustarse a los diferentes procesos de fermentación. La resistencia a las condiciones adversas (alta presión osmótica, bajo pH, temperatura, etc.) de una fermentación alcohólica promovió la selección inconsciente de levaduras con propiedades fisiológicas y genéticas que las distinguen de las cepas utilizadas de ambientes no fermentativos.

Las condiciones de fermentación para la producción del vino incluyen la utilización de un substrato rico en azúcares, con un pH muy ácido, pero al final de la fermentación la célula de levadura debe tolerar etanol y un bajo contenido de nitrógeno. Por eso, al inicio del proceso de fermentación las células están bajo un estrés osmótico y un pH muy bajo, pero al final de la fermentación alcohólica se presenta estrés por alcohol y bajo contenido en nitrógeno. En el caso de las fermentaciones tradicionales, las condiciones no son tan extremas, porque se utilizan menores concentraciones de azúcares y la producción de etanol es menor, aunque algunas cepas aisladas de ambientes no véricos son también capaces de tolerar las condiciones estresantes de una fermentación alcohólica, lo que hace suponer que esta sea una característica intrínseca de *S. cerevisiae*.

Uno de los mecanismos moleculares que han permitido la adaptación de las especies del género *Saccharomyces* a los procesos fermentativos es la formación de híbridos. La formación de híbridos interespecíficos artificiales es posible con cierta facilidad (Naumov, 1996), y aunque estériles, son viables y se pueden mantener por reproducción asexual. Las especies del género *Saccharomyces* se encuentran en el mismo nicho ecológico y por ello es posible la formación de híbridos naturales, pues las células haploides o las esporas son capaces de cruzarse y formar células híbridas viables aunque estériles.

La hibridación interespecífica no es rara en el género *Saccharomyces*, a pesar de que en la naturaleza es muy común encontrar cepas homotéticas y el asca donde se producen las esporas es persistente. Por ello, se han encontrado una gran diversidad de híbridos entre las diferentes especies de

Saccharomyces, con diferentes orígenes, y en diversos procesos de fermentación.

Las especies *S. bayanus* y *S. cerevisiae* coexisten durante la producción del vino, de la cerveza y de sidra, por lo que, se ha sugerido que los híbridos entre ellas pudieron originarse en estos ambientes por apareamientos raros (“*rare mating*”) entre cepas diploides (de Barros Lopes et al., 2002). Sin embargo, en el caso de los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, varias evidencias sugieren que los eventos de hibridación ocurrieron en la naturaleza y no en un ambiente fermentativo.

La primera evidencia es el hecho de que *S. kudriavzevii* no se ha encontrado en ambientes fermentativos y solo se ha descrito unas pocas cepas aisladas de suelo y hojas en descomposición en Japón (Naumov et al., 2000a), y recientemente en bosques de Portugal (Sampaio and Gonçalves, 2008). Aunque se han descrito diversos híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* en vinos (Bradbury et al., 2006; González et al., 2006) y en cerveza (González et al., 2008), todavía no se ha encontrado ninguna cepa de *S. kudriavzevii* no híbrida en procesos de fermentación.

La segunda evidencia son las propiedades fisiológicas muy peculiares de *S. kudriavzevii* (Naumov et al., 2000a), como son, la capacidad de fermentar polímeros vegetales, como la inulina, la utilización de galactitol, y la incapacidad de utilizar galactosa, y su temperatura óptima de crecimiento mucho menor que *S. cerevisiae* (Sampaio and Gonçalves, 2008). Todo ello concuerda con las adaptaciones a ambientes pobres en azúcares mono y oligosacáridos libres, que se encuentran en hojas y suelo. Esto representa una divergencia ecológica con respecto a las restantes especies de *Saccharomyces* (Hittinger et al., 2004), con lo que se supone que para *S. kudriavzevii* sería imposible colonizar procesos de fermentación manipulados por el hombre.

Estudios recientes sobre la caracterización enológica (González et al., 2007) y la tolerancia a estrés (Belloch et al., 2008) en cepas híbridas y sus

parentales no híbridos, muestran que *S. kudriavzevii* está menos adaptado a las condiciones de una fermentación vínicas.

Los híbridos naturales de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* se han encontrado asociados a procesos de fermentación en áreas templadas de Europa, regiones de clima continental en el límite Norte de la distribución de la uva, como puede ser Bélgica, Alemania, Britania y Alsacia francesa, Suiza, Austria, Hungría y Moldova. En estas áreas, de hecho, los híbridos son predominantes (González et al., 2006; Lopandic et al., 2007; Schütz and Gafner, 1994) debido a una mejor adaptación a bajas temperaturas en comparación con *S. cerevisiae* (González et al., 2007; Kishimoto, 1994; Sato et al., 2002).

La distribución de los híbridos y sus propiedades fisiológicas, junto con la estructura genético poblacional de *S. cerevisiae*, se puede utilizar para postular posibles escenarios para la hibridación. La domesticación de la uva (This et al., 2006) y la avena (Badr et al., 2000) ocurrieron en Oriente Medio, en donde se han encontrado evidencias arqueológicas de la producción de vino (McGovern et al., 1997) y en donde se descubrió la producción de cerveza (Michel et al., 1992). A partir de estas áreas de domesticación se dispersaron por todo el Mediterráneo por los griegos y fenicios, en el caso de la producción de vino. Posteriormente, los romanos llevaron la vid y la producción de vino a regiones templadas de Centro Europa, siguiendo el curso del Rin, Danubio y Ródan. Y al final del Imperio Romano, el cultivo de la uva era tan común en Europa, como lo es actualmente. Con la expansión de la producción del vino, las levaduras vínicas alcanzaron regiones de clima continental y oceánico donde la temperatura no era la óptima para su crecimiento (This et al., 2006).

En el caso de cepas de regiones geográficas situadas en los límites de distribución de la uva (zonas más frías), las cepas vínicas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* mejor adaptadas a crecer a altas temperaturas presentaron problemas para fermentar la uva. En tales condiciones climáticas, las especies criotolerantes compiten con *S. cerevisiae*, tales como *S. bayanus*, al igual que los híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus* o *S. kudriavzevii* que tienen claras ventajas sobre las parentales (Serra et al., 2005). Aunque los

híbridos no pueden competir con las especies parentales bajo condiciones específicas, donde *S. cerevisiae* está más adaptada, están mejor adaptados a condiciones fluctuantes o intermedias que se pueden presentar en algunas áreas geográficas. Esto es debido a la adquisición de propiedades fisiológicas de ambos parentales, los cuales proporcionan mecanismos de selección de híbridos (González et al., 2007; Greig et al., 2002b; Masneuf et al., 1998; Zambonelli et al., 1997). Como ejemplo, los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* adquirieron las propiedades fisiológicas de ambos parentales, tolerancia a alcohol y glucosa y una fermentación rápida de *S. cerevisiae*, y una mejor adaptación a temperaturas bajas y a intermedias, así como una alta producción de glicerol y compuestos aromáticos de *S. kudriavzevii*.

El éxito de la hibridación entre levaduras del género *Saccharomyces* está demostrado con los fenómenos de recombinación y de introgresión detectados en las cepas de *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y entre los híbridos *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*. Esto permite una mejor adaptación de las cepas a las diferentes condiciones ambientales donde se puede encontrar distribuido el género *Saccharomyces*. La recombinación entre el DNA mitocondrial se ha demostrado entre cepas de *S. cerevisiae* (Berger and Yaffe, 2000). Durante el proceso de hibridación, en el cigoto, se puede dar una fusión de mitocondrias de los dos parentales seguida de un proceso de recombinación del mtDNA. Una vez formado el híbrido, y según el polo del cigoto en el que se produzca la gemación, las mitocondrias pertenecerán a uno u otro parental, pero si la gemación ocurre en la región ecuatorial del cigoto, el genoma será recombinante.

La divergencia genética entre *S. cerevisiae* y la población europea de *S. paradoxus* variaron de acuerdo a las regiones génicas analizadas, pero se alcanzan valores a los descritos entre especies cuando *EGT2* no se incluye en el análisis (Kellis et al., 2003). Sin embargo, con el análisis filogenético y el de los polimorfismos, se observa que la secuencia de la región génica *EGT2*, que se encuentra en el brazo izquierdo del cromosoma XIV, es idéntica o con pocos cambios respecto a la de *S. cerevisiae*. Ello sugiere un fenómeno de introgresión previamente identificado, que sucedió antes de la separación de

Discusión General

las poblaciones europeas y asiáticas (Liti et al., 2006). La transferencia horizontal es muy raro en levaduras (Dujon, 2005; Liti and Louis, 2005) por lo que resulta más probable que la introgresión ocurriera mediante hibridación, pues las dos especies coexisten en el mismo hábitat (Sniegowski et al., 2002).

CONCLUSIONES

1. La aplicación de técnicas moleculares permitió identificar a *S. cerevisiae* como la especie predominante en chicha y masato, bebidas tradicionales de Perú, y de pulque, aguamiel y tejuino, de México. Sin embargo, se detectó que en algunos productos fermentados donde la glucosa no es el principal sustrato, las especies predominantes son *Clavispora lusitania* o *Candida ethanolica*.
2. Se ha demostrado mediante estudios fisiológicos, que las cepas de *S. cerevisiae* de bebidas tradicionales latinoamericanas presentan propiedades fisiológicas que potencialmente podrían tener aplicación en otros procesos fermentativos como la fermentación vínica. En particular, se ha observado buena tolerancia a diferentes estreses como el osmótico, a pH bajos, y capacidad de crecer a altas concentraciones de alcohol. Además de fermentar diferentes azúcares tales como maltosa, fructosa y glucosa y la producción de glicosidasas y α -amilasa..
3. De acuerdo al análisis filogenético y a las estimas de diversidad genética analizadas con las secuencias de los alelos de las regiones génicas analizadas, se detectó que las cepas vínicas conforman una población muy homogénea con menor variación genética que las cepas aisladas de otros procesos fermentativos.
4. Con el análisis de los niveles de recombinación, de homocigosidad o heterocigosidad, la diversidad genotípica y divergencia nucleotídicas, se determinó que *S. cerevisiae* está compuesta por dos poblaciones, una engloba cepas procedentes de ambientes vínicos y la otra de ambientes fermentativos no vínicos, muy diferentes entre ellas. Las poblaciones

Conclusiones

vínicas se caracterizan por ser un grupo muy homogéneo, con baja tasa de recombinación, alta frecuencia de homocigosis, con menor diversidad genotípica y menor divergencia nucleotídica. Esto indica una reciente domesticación, con reproducción clonal y sucesos de autodiploidización. En cambio, las poblaciones no vínicas están formadas por un grupo muy heterogéneo, con reproducción clonal donde la reproducción sexual más frecuente se da por anfimixis.

5. La detección de alelos vínicos y no vínicos entre las cepas de las poblaciones latinoamericanas indica que existe flujo genético entre las poblaciones vínicas y no vínicas. Sin embargo, la frecuencia de cepas no vínicas en las fermentaciones vínicas, es muy baja y la de cepas vínicas en fermentaciones no vínicas es muy rara, ya que predominan las cepas con alelos no vínicos o bien un alelo vínico y otro no vínico.
6. El análisis filogenético permite rechazar la hipótesis de que las cepas vínicas de *S. cerevisiae* se originaron a partir de la domesticación de *S. paradoxus*, ya que según nuestros datos éstas están relacionadas con las cepas no vínicas de *S. cerevisiae*.
7. Para explicar el origen de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son posibles dos hipótesis no incompatibles. Según la primera, la población de levaduras no vínicas sería ancestral y heterogénea con alelos diversos. A partir de ella, durante la reducción de la variabilidad genética debida al proceso de domesticación, se fijarían los alelos vínicos. Según la segunda, las poblaciones vínicas y no vínicas presentarían alelos distintos a la fijación selectiva de los alelos vínicos durante la domesticación en Oriente Próximo. La expansión del cultivo de la vid y de la producción del vino, llevaría las levaduras vínicas a entrar en contacto e hibridar con levaduras no vínicas. Estos híbridos persisten en las poblaciones no vínicas actuales y explicaría la mayor heterocigosis que presentan pero son raros entre las cepas vínicas.

8. El test HKA indica que los distintos genes presentan unas dinámicas evolutivas similares y el de McDK, que las cepas vínicas presentan una mayor tasa de sustitución no sinónima ($\omega > 1$) en todos los genes. Una posible interpretación sería que durante el proceso de domesticación la acción de la selección sobre ciertas variedades de genes implicados en la adaptación a la fermentación vínica hubiera favorecido la fijación de variedades neutras en los demás genes (arrastre o hitchhiking), dada la preponderancia de la reproducción clonal entre las cepas vínicas. Otra interpretación es que son el resultado de la fijación de cambios no sinónimos ligeramente deletéreos por efecto de la deriva, debido a las reducciones poblacionales (cuellos de botella) asociados al proceso de domesticación.

9. En base a los resultados obtenidos con los marcadores moleculares utilizados es posible pensar en al menos tres sucesos de hibridación entre las especies *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* que dieron origen a las cepas híbridas aisladas de vinos: uno con las cepas de *S. cerevisiae* de Austria, otro en las cepas de Suiza y el tercero con la cepa de Alemania. Para las cepas de cerveza (todas diferentes entre si), es un poco difícil determinar el número de sucesos de hibridación ya que probablemente se obtuvieron a partir de uno solo y después sufrieron recombinación, ya que este fenómeno se detectó en algunos alelos en las cepas híbridas de cerveza para el gen *EGT2*.

10. La detección de la introgresión en la región génica *EGT2* entre *S. cerevisiae* y la población europea de *S. paradoxus*, así como, la detección de recombinación en la región génica *COX2* entre *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, permite suponer que la hibridación entre estas especies puede ocurrir, pero los híbridos no son estables, ya que mantienen la fertilidad con sus parentales, lo que permite el apareamiento y la recuperación del genoma de alguno de los parentales, pero conservando ciertas regiones del otro parental.

ANEXOS

Anexo 1. Similitud de las secuencias de la región del 26S rRNA de los patrones de restricción no identificados de los aislados de bebidas tradicionales de Latinoamérica, mediante un Blast como método de comparación.

Patrón	Especie	Número de acceso D1/D2 del gen 26S rRNA	Longitud del producto de PCR (pb)	Similitud (%)	Cambios
Perú					
A	<i>Issatchenkia orientalis</i>	U76347.1	564	99-100	1-0
B	<i>Candida humilis</i>	U69878.1	570	100	0
	<i>Candida milleri</i>	U94923.1		99	1
	<i>Saccharomyces barnetti</i>	AY048164.1		97	11
C	<i>Rhodospodium diobovatum</i>	AF189914.1	584	99	1
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	AM160643.1		99	1
México					
A	<i>Clavispora lusitaniae</i>	AY497690.1	553	91	29
		AJ508571.1		94	30
B	<i>Issatchenkia orientalis</i>	EF550222.1	577	100	0
C	<i>Pichia guilliermondii</i>	AJ508589.1	572	100	0
D	<i>K. marxianus var drosophilum</i>	AY497689.1	593	99	1
E	<i>Pichia galeiformis</i>	EF550223.1	585	100	0
F	<i>Issatchenkia terricola</i>	EF550233.1	567	99	2
G	<i>Candida tropicalis</i>	AL439984	588	99	1
H	<i>Hanseniaspora vineae</i>	U84224	594	99	1
I	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AF070432	609	100	0
J	<i>Issatchenkia occidentalis</i>	EF550236.1	588	100	0
K	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	U84230.1	584	99	2

Anexo 2. Genotipo de las cepas de *S. cerevisiae* considerando las cuatro regiones nucleares y una mitocondrial. El número indica los alelos detectados en cada región génica, el color del número indica si el alelo es vínico, en rojo; o, no vínico, en azul. El mismo color de resaltado muestra que son alelos idénticos o con pocos cambios; el resaltado en negro indica recombinación.

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8		GAL4		EGT2		BRE5	
19Arg	Argentina	Vino	5	30	31	27	30	3	3	32	89
25Arg	Argentina	Vino	26	30	31	27	30	6	6	32	89
10Arg	Argentina	Vino	2	31	31	27	27	3	3	41	41
16Arg	Argentina	Vino	2	31	31	27	27	3	3	32	32
24Arg	Argentina	Vino	2	31	31	27	76	3	3	32	32
33Arg	Argentina	Vino	23	31	31	27	27	3	3	31	31
35Arg	Argentina	Vino	26	31	31	27	27	3	3	31	31
8Arg	Argentina	Vino	26	31	31	27	27	3	3	32	32
L1005	Argentina	Vino	2	31	31	27	27	3	3	32	32
L962	Argentina	Vino	19	32	32	27	27	8	8	43	43
L981	Argentina	Vino	2	32	32	27	27	3	3	32	32
11Arg	Argentina	Vino	2	33	33	27	27	3	3	32	32
13Arg	Argentina	Vino	23	33	33	74	74	3	3	31	32
14Arg	Argentina	Vino	23	33	33	27	27	3	3	31	32
15Arg	Argentina	Vino	2	33	33	27	27	3	3	32	32
17Arg	Argentina	Vino	23	33	33	27	27	3	3	31	31
18Arg	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	5	5	31	31
20Arg	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	3	3	41	41
21Arg	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	3	3	41	41
22Arg	Argentina	Vino	27	33	33	27	27	3	3	41	41
23Arg	Argentina	Vino	2	33	33	27	75	3	3	41	41
26Arg	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	3	3	41	41
28Arg	Argentina	Vino	?	33	33	27	27	3	3	32	32
32Arg	Argentina	Vino	27	33	33	77	77	7	7	32	32
36Arg	Argentina	Vino	27	33	33	78	78	3	3	41	41
7Arg	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	2	2	41	41
9Arg	Argentina	Vino	13	33	33	1	1	4	4	32	32
L1006	Argentina	Vino	34	33	33	85	85	3	3	41	41
L958	Argentina	Vino	34	33	33	84	84	3	3	32	49
L982	Argentina	Vino	26	33	33	27	27	18	18	41	41
L960	Argentina	Vino	34	33	55	1	1	3	3	41	90
12Arg	Argentina	Vino	34	33	80	27	27	3	3	41	41
27Arg	Argentina	Vino	?	33	81	27	27	3	3	41	41
30Arg	Argentina	Vino	2	56	56	27	27	3	3	32	41
29Arg	Argentina	Vino	5	82	82	27	27	3	3	41	41
31Arg	Argentina	Vino	27	83	83	27	27	3	3	32	32
34Arg	Argentina	Vino	23	84	84	27	27	3	3	32	32
L1374	Chile	Vino	5	31	31	27	27	3	3	41	41
L269	Chile	Vino	26	31	31	27	27	3	3	89	89
L263	Chile	Vino	26	31	32	79	79	3	3	41	41

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8	GAL4	EGT2	BRE5				
L22	Chile	Vino	26	31	86	27	27	3	8	32	41
L165	Chile	Vino	26	32	32	27	27	3	3	32	32
L169	Chile	Vino	5	32	32	27	27	17	17	41	41
L720	Chile	Vino	26	32	32	27	27	3	3	91	91
L1054	Chile	Vino	23	33	33	1	1	3	3	32	32
L1528	Chile	Vino	2	33	33	27	54	3	3	32	32
L246	Chile	Vino	26	33	33	27	27	3	3	32	32
L281	Chile	Vino	26	33	33	79	79	13	3	41	41
L283	Chile	Vino	41	33	33	80	1	3	3	41	41
L757	Chile	Vino	26	33	33	27	27	8	8	9	32
L846	Chile	Vino	26	33	33	27	27	8	8	9	32
L1333	Chile	Vino	34	33	55	27	27	3	3	32	32
L354	Chile	Vino	15	33	88	82	82	3	3	32	41
L494	Chile	Vino	2	52	52	27	27	3	16	31	41
L79	Chile	Vino	2	52	52	79	79	3	16	31	32
L80	Chile	Vino	2	52	52	27	27	3	16	41	66
L16	Chile	Vino	26	85	85	27	27	3	3	32	32
L21	Chile	Vino	27	86	86	27	27	3	3	32	32
L146	Chile	Vino	5	87	87	27	27	3	3	32	32
L20	Chile	Vino	2	33	33	27	27	3	3	32	32
L351	Chile	Vino	37	?	?	79	79	16	16	32	41
L531	Chile	Vino	2	?	?	?	?	3	3	31	41
L532	Chile	Vino	2	?	?	79	83	16	16	32	32
L7	Chile	Vino	26	?	?	?	?	3	3	32	32
ZA26	Sudáfrica	Vino	25	5	5	3	3	3	11	85	86
ZA4	Sudáfrica	Vino	25	5	5	71	71	3	49	4	5
ZA17	Sudáfrica	Vino	34	31	55	1	54	3	3	32	32
ZA23	Sudáfrica	Vino	2	32	32	27	27	3	3	32	32
ZA29	Sudáfrica	Vino	19	32	32	27	27	8	8	87	87
ZA8	Sudáfrica	Vino	2	32	33	27	27	3	3	32	82
ZA13	Sudáfrica	Vino	2	33	33	27	27	3	3	82	82
ZA14	Sudáfrica	Vino	40	33	33	1	1	3	3	27	27
ZA24	Sudáfrica	Vino	2	33	33	73	73	3	3	84	84
ZA9	Sudáfrica	Vino	2	33	33	27	27	3	3	32	32
10233	Sudáfrica	Vino	3	55	55	1	1	3	3	49	63
ZA18	Sudáfrica	Vino	13	77	77	1	1	3	3	49	49
ZA19	Sudáfrica	Vino	13	77	77	1	1	3	3	49	49
ZA20	Sudáfrica	Vino	25	78	78	72	72	11	50	5	83
ZA21	Sudáfrica	Vino	13	79	79	1	1	3	3	32	32
1917	Austria	Vino	19	32	32	27	27	8	8	43	43
1931	Austria	Vino	2	33	26	31	31	8	8	32	32
1780	Austria	Vino	5	33	33	27	32	3	3	41	41
1827	Austria	Vino	2	33	33	27	27	8	8	31	31
1923	Austria	Vino	15	33	33	27	27	3	3	32	32
1922	Austria	Vino	17	34	34	27	27	3	3	34	34
1930	Austria	Vino	23	35	35	27	27	3	3	32	32
1936	Austria	Vino		36	36	32	32	3	3	35	35
1856	Austria	Vino	18	41	41	1	1	3	3	42	42

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8	GAL4	EGT2	BRE5				
1870	Austria	Vino	26	42	42	27	27	8	8	41	41
1479	Hungría	Vino	2	55	55	58	58	3	3	49	63
1366	Eslovenia	Vino	2	30	30	27	27	3	3	27	27
1568	Eslovenia	Vino	15	31	31	27	27	3	3	28	28
2171	Eslovenia	Vino	2	31	31	27	27	10	10	33	33
2139	Eslovenia	Vino	2	31	33	30	30	3	3	31	32
1914	Eslovenia	Vino	15	32	32	27	27	3	3	30	30
2897	Suiza	Vino	25	5	5	3	3	11	15	74	74
1175	Suiza	Vino	23	26	67	27	27	3	3	41	41
1399	Suiza	Vino	23	31	31	27	27	3	3	41	41
423	Suiza	Vino	15	32	32	1	1	3	3	32	67
11833	Suiza	Vino	15	32	32	1	1	3	3	32	67
11032	Italia	Vino	23	33	33	27	27	3	3	41	41
Y9	Japón	Vino	15	33	33	27	27	3	3	69	69
L1343	Francia	Vino	2	31	31	27	27	3	3	32	32
L1325	Francia	Vino	5	52	52	27	27	3	3	41	41
ICV28	Francia	Vino	5	33	33	27	27	3	3	66	66
L1324	Francia	Vino	5	33	33	27	27	3	3	32	32
L1334	Francia	Vino	23	33	33	27	27	3	3	41	41
L1335	Francia	Vino	23	33	33	1	1	3	3	93	93
L1338	Francia	Vino	6	33	33	1	1	3	3	94	94
10692	Francia	Vino	2	55	55	1	1	3	3	66	66
L1330	Francia	Vino	2	55	55	1	1	3	3	41	41
L1332	Francia	Vino	2	55	55	27	27	3	8	41	92
L1323	Francia	Vino	5	89	89	27	27	3	3	32	32
L1321	Francia	Vino	33	?	?	1	1	3	3	41	49
1477	Francia	Vino	23	31	31	27	27	21	21	41	41
12688	España	Vino	2	33	33	27	27	20	20	41	41
12739	España	Vino	5	33	33	27	27	3	3	27	44
12744	España	Vino	5	33	33	27	27	3	3	31	44
1894	España	Vino	6	33	33	27	54	3	3	27	27
L1329	España	Vino	35	33	33	79	79	3	3	32	32
10095	España	Vino	34	33	57	1	1	3	3	32	49
12738	España	Vino		46	46	27	27	3	3	72	72
11827	España	Vino	5	52	52	27	27	3	3	41	66
1475	España	Vino		55	55	1	1	3	3	63	63
11834	España	Vino	3	55	55	1	1	3	3	68	68
1883	España	Vino	5	56	56	27	27	3	3	64	64
1882	España	Vino	2	57	57	1	1	3	3	63	63
11757	España	Vino	2	57	57	1	1	3	3	63	63
10557	España	Vino	26	61	61	27	27	3	3	32	32
7993	Brasil	Agua de río	29	10	10	27	27	1	3	32	81
1676	Brasil	Cachaça	16	27	38	27	33	3	3	37	38
2170	Brasil	Cachaça	7	32	33	18	27	3	3	32	32
1626	Brasil	Cachaça	7	33	37	27	27	3	14	36	36
2040	Brasil	Cachaça	2	33	37	27	27	3	3	32	32
2426	Brasil	Cachaça	2	39	39	27	27	3	3	32	32
7903	Nigeria	Vino palma	38	72	72	70	70	13	13	80	80

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8		GAL4		EGT2		BRE5	
8857	Burkina Faso	Cerveza sorgo	25	5	5	3	3	3	11	4	5
8858	Burkina Faso	Cerveza sorgo	11	33	76	61	61	12	13	75	76
10691	Costa Marfil	Vino palma	39	62	62	56	56	13	13	8	8
11837	África occidental	Vino Bili	39	62	62	3	3	13	13	8	8
8855	Ghana	Cerveza sorgo	11	33	75	61	61	12	13	75	76
4454	Sudáfrica	Cerveza Kaffir	38	72	72	65	65	13	13	78	78
4455	Sudáfrica	Cerveza Kaffir	38	73	73	65	66	13	13	41	41
CH2	Bélgica	Cerveza	11	10	10	49	50	3	3	5	14
G1	Bélgica	Cerveza	6	10	10	3	3	3	3	4	4
11001	Bélgica	Cerveza	BAY	33	33	59	59	11	11	44	44
1462	Inglaterra	Cerveza	6	54	54	1	1	48	48	44	44
1387	Inglaterra	Cerveza	36	33	33	58	58	3	11	31	71
1384	Irlanda	Cerveza	36	64	64	58	58	11	11	59	70
MERTY	Irlanda	Sidra	29	33	33	27	60	23	5	32	32
Sc97	Irlanda	Sidra	26	33	33	27	27	8	8	31	41
BAY1	Irlanda	Sidra	21	33	65	27	60	1	3	32	73
C 10	Irlanda	Sidra	2	66	66	1	1	3	3	41	41
11838	Rusia	Uva	13	63	63	19	19	47	47	46	46
8291	Suecia	Agua mar	21	21	31	1	1	3	11	31	66
8292	Suecia	Agua mar	21	31	31	1	69	3	3	27	41
7764	Suecia	Salmón	21	31	33	69	69	3	3	31	65
925	Hungría	Melocotón	4	27	40	34	34	1	1	40	40
678	Hungría	Pasa fermentada	5	33	33	27	27	3	3	31	32
770	Hungría	Cerveza	BAY	33	33	27	27	11	11	39	39
MRM	España	Mermelada	7	21	21	48	48	11	11	41	41
10131	España	Flor	21	21	59	27	27	11	11	27	65
10120	España	Arbusto	5	58	58	55	55	3	3	41	41
10392	España	Alpechín	5	60	60	27	27	19	19	31	31
Sc2	España	Oliva	42	60	60	27	27	10	10	31	31
Sc3	España	Oliva	42	60	60	27	27	3	3	44	88
Sc1	España	Oliva	2	60	90	27	27	3	3	44	88
2881c	USA	Laboratorio	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2992	Pakistán	Vino palma	24	50	50	45	45	22	22	53	53
2087	China	Flor <i>Lychee</i>	23	33	52	27	27	3	3	61	61
1460	Indonesia	Fermento	23	33	33	27	27	3	3	58	58
1591	Indonesia	Cacao	16	50	51	51	51	22	22	59	60
2421	Japón	Kefyr	28	53	53	52	53	11	11	62	62
1201	Japón	Sorgo	12	70	71	63	64	25	25	77	77
436	Japón	Sake	25	5	5	3	3	11	24	4	5
1198	Japón	Sake	31	21	21	62	62	11	11	9	9
1199	Japón	Sake	32	21	21	57	57	11	11	9	9
6412	Japón	Sake	11	21	21	67	67	11	11	79	79
10711	Japón	Sake	12	21	21	57	57	11	11	9	9

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8	GAL4	EGT2	BRE5
435	Japón	Sake	30		61 61	12 13	75 76
6414	Japón	Sake	11	74 74	68 68	11 11	79 79
102M	México	Tejuino	21	21 27	37 38	3 3	49 50
ARS	México	Tequila	14	23 23	1 24	1 26	21 22
CHA	México	Mezcal	15	24 24	24 24	27 27	23 23
RG1	México	Raicilla	15	24 24	29 29	27 27	26 26
OX3	México	Tequila	7	24 29	27 28	27 27	23 25
GU4	México	Tequila	16	25 26	25 26	11 11	23 24
24M	México	Agave	12	26 26	35 35	27 27	21 32
MG	México	Tequila	16	27 28	1 1	13 11	23 23
20M	México	Agave	15	29 29	24 24	27 27	47 47
SOM	México	Sotol	5	29 29	24 24	27 27	23 23
175M	México	Tepache	5	31 31	47 19	13 3	41 57
94M	México	Tejuino	20	33 33	36 36	11 11	32 48
112M	México	Aguamiel	20	33 47	1 43	13 13	9 31
113M	México	Aguamiel	20	33 47	18 44	13 13	53 54
122M	México	Aguamiel	20	33 47	1 1	13 13	53 55
192M	México	Pulque	20	33 47	1 1	13 28	31 53
183M	México	Tejuino	5	33 49	1 1	3 3	32 52
15M	México	Agave	5	43 43	1 1	29 29	44 45
103M	México	Tejuino	21	44 45	38 39	3 11	49 51
107M	México	Tejuino	5	46 46	40 41	3 3	31 52
109M	México	Tejuino	5	46 46	27 42	3 3	31 52
169M	México	Tuba	22	47 48	45 46	13 13	32 32
19	Perú	Chicha	7	3 3	9 10	3 3	5 5
20	Perú	Chicha	8	8 8	3 3	3 3	5 5
21	Perú	Chicha	13	9 10	11 12	3 45	2 4
22	Perú	Chicha	10	3 3	13 14	3 39	5 5
30	Perú	Chicha	12	3 3	13 13	13 13	5 7
56	Perú	Chicha	11	14 16	1 16	13 29	12 13
61	Perú	Chicha	11	14 18	16 19	13 29	8 14
63	Perú	Chicha	11	19 19	18 18	3 33	5 16
51	Perú	Chicha	7	3 3	13 14	3 43	11 11
55	Perú	Chicha	11	3 3	13 13	3 3	5 5
68	Perú	Chicha	11	3 3	18 18	33 33	14 17
73	Perú	Chicha	7	3 3	13 14	3 44	5 5
75	Perú	Chicha	7	3 3	13 14	3 41	5 5
77	Perú	Chicha	7	3 3	10 21	3 44	5 5
79	Perú	Chicha	7	3 3	13 14	3 3	5 5
91	Perú	Chicha	11	3 3	13 13	3 3	5 5
31	Perú	Chicha	11	3 12	15 16	3 40	5 5
54	Perú	Chicha	11	3 13	13 14	3 11	5 5
58	Perú	Chicha	11	3 14	13 18	13 32	5 5
90	Perú	Chicha	11	3 14	10 18	3 3	14 19
59	Perú	Chicha	11	3 17	13 18	13 13	14 15
69	Perú	Chicha	11	3 20	20 20	3 46	5 18
84	Perú	Chicha	11	3 21	13 14	3 31	5 5
1	Perú	Masato	13	2 3	2 3	36 34	2 3

Cepa	País	Fuente aislamiento	COX2	CAT8	GAL4	EGT2	BRE5
7	Perú	Masato	7	3 3	6 7	3 29	5 5
12	Perú	Masato	8	3 3	3 3	3 3	4 4
103	Perú	Masato	7	3 3	13 14	3 29	5 5
104	Perú	Masato	7	3 3	13 14	3 42	5 5
2	Perú	Masato	7	3 4	4 5	3 35	2 4
15	Perú	Masato	6	3 6	3 3	3 3	4 4
18	Perú	Masato	13	3 7	5 8	22 3	2 2
35	Perú	Masato	13	3 9	4 5	13 3	2 4
93	Perú	Masato	13	3 9	3 22	22 3	4 5
23	Perú	Masato	11	3 10	13 14	3 29	5 6
46	Perú	Masato	11	3 10	13 14	29 37	5 8
13	Perú	Masato	9	5 5	3 3	27 27	4 5
39	Perú	Masato	25	5 5	3 3	3 38	4 5
94	Perú	Masato	25	5 5	3 3	3 11	4 5
42	Perú	Masato	6	6 6	17 17	3 3	4 4
47	Perú	Masato	8	6 6	3 3	3 3	4 10
53	Perú	Masato	6	6 6	3 3	3 3	4 5
96	Perú	Masato	6	6 6	3 3	30 30	4 20
99	Perú	Masato	6	6 6	3 3	3 3	4 4
40	Perú	Masato	8	8 8	3 3	3 3	5 5
98	Perú	Masato	25	22 22	23 23	3 3	4 4

Anexo 3a. Desequilibrio de ligamiento entre las cuatro regiones génicas estudiadas en las poblaciones vínicas de *S. cerevisiae*. Ln LHood LD, máxima verosimilitud bajo desequilibrio de ligamiento; Ln LHood LE, máxima verosimilitud bajo equilibrio de ligamiento; P (\pm DE), valor de P (\pm desviación estándar).

Población Loci1-2	Ln LHood LD	Ln LHood LE	P \pm DE	X ²	Grados de libertad
Argentina					
<i>EGT2-CAT8</i>	-161,33648	-182,38615	0,44673 \pm 0,01440	42,09933 P=1,00000	90
<i>EGT2-BRE5</i>	-152,71149	-169,07664	0,41642 \pm 0,01732	32,73031 P=0,99996	70
<i>CAT8-BRE5</i>	-119,52205	-139,58167	0,04301 \pm 0,00558	40,11924 P=0,98911	63
<i>EGT2-GAL4</i>	-181,11664	-215,01400	0,00293 \pm 0,00164	67,79472 P=0,83284	80
<i>CAT8-GAL4</i>	-156,25213	-185,51904	0,00684 \pm 0,00231	58,53382 P=0,87378	72
<i>BRE5-GAL4</i>	-146,26923	-172,20953	0,00293 \pm 0,00164	51,88060 P=0,63148	56
Chile					
<i>EGT2-CAT8</i>	-156,53149	-182,20493	0,06647 \pm 0,00937	51,34689 P=0,85307	63
<i>EGT2-BRE5</i>	-140,17183	-159,63847	0,02151 \pm 0,00470	38,93328 P=0,33912	36
<i>CAT8-BRE5</i>	-104,52135	-117,07346	0,11535 \pm 0,00926	25,10422 P=0,62216	28
<i>EGT2-GAL4</i>	-155,53000	-180,13501	0,04399 \pm 0,00559	49,21002 P=0,65932	54
<i>CAT8-GAL4</i>	-129,22376	-137,57000	0,97654 \pm 0,00501	16,69247 P=0,99983	42
<i>BRE5-GAL4</i>	-101,72604	-115,00354	0,05767 \pm 0,00602	26,55500 P=0,32562	24
Sudáfrica					
<i>EGT2-CAT8</i>	-67,39647	-102,06353	0,00000 \pm 0,00000	69,33413 P=0,00500	42
<i>EGT2-BRE5</i>	-62,49943	-76,57924	0,00978 \pm 0,00294	28,15961 P=0,45601	28
<i>CAT8-BRE5</i>	-53,47836	-67,30550	0,00293 \pm 0,00164	27,65427 P=0,27489	24
<i>EGT2-GAL4</i>	-78,80872	-117,57560	0,00000 \pm 0,00000	77,53376 P=0,46151	77
<i>CAT8-GAL4</i>	-71,03210	-108,30186	0,00000 \pm 0,00000	74,53951 P=0,22038	66
<i>BRE5-GAL4</i>	-63,29325	-82,81756	0,00000 \pm 0,00000	39,04861 P=0,68339	44
Europa					
<i>EGT2-CAT8</i>	-280,35967	-342,00737	0,00000 \pm 0,00000	123,29540 P=0,95767	152
<i>EGT2-BRE5</i>	-261,41153	-293,94341	0,03421 \pm 0,00575	65,06376 P=0,99994	114
<i>CAT8-BRE5</i>	-160,70889	-182,61695	0,00196 \pm 0,00136	43,81613 P=0,64486	48
<i>EGT2-GAL4</i>	-327,41286	-471,49231	0,00000 \pm 0,00000	288,15889 P=1,00000	418
<i>CAT8-GAL4</i>	-291,74279	-360,16585	0,00000 \pm 0,00000	136,84612 P=0,98710	176
<i>BRE5-GAL4</i>	-273,72544	-312,10189	0,01075 \pm 0,00331	76,75289 P=0,99997	132

Anexo 3b. Desequilibrio de ligamiento entre las cuatro regiones génicas estudiadas en las poblaciones no vínicas de *S. cerevisiae*. Ln LHood LD, máxima verosimilitud bajo desequilibrio de ligamiento; Ln LHood LE, máxima verosimilitud bajo equilibrio de ligamiento; P (\pm DE), valor de P (\pm desviación estándar).

Población Locus1-2	Ln LHood LD	Ln LHood LE	P	X ²	Grados de libertad
Japón					
<i>EGT2-CAT8</i>	-38,16375	-66,62344	0,00000 \pm 0,00000	56,91938 P=0,17710	48
<i>EGT2-BRE5</i>	-29,84598	-45,06260	0,00098 \pm 0,00098	30,43323 P=0,17081	24
<i>CAT8-BRE5</i>	-38,85690	-53,38036	0,00098 \pm 0,00098	29,04693 P=0,61678	32
<i>EGT2-GAL4</i>	-34,34466	-60,72491	0,00000 \pm 0,00000	52,76049 P=0,12345	42
<i>CAT8-GAL4</i>	-38,85690	-69,04268	0,00000 \pm 0,00000	60,37156 P=0,32081	56
<i>BRE5-GAL4</i>	-31,57207	-47,48184	0,00000 \pm 0,00000	31,81952 P=0,28192	28
México					
<i>EGT2-CAT8</i>	-136,69902	-215,23860	0,00000 \pm 0,00000	157,07916 P=1,00000	336
<i>EGT2-BRE5</i>	-120,35197	-178,41077	0,00000 \pm 0,00000	116,11761 P=0,37591	112
<i>CAT8-BRE5</i>	-130,37792	-180,18818	0,00000 \pm 0,00000	99,62052 P=0,99901	147
<i>EGT2-GAL4</i>	-137,73196	-219,77983	0,00000 \pm 0,00000	164,09574 P=1,00000	336
<i>CAT8-GAL4</i>	-140,85790	-221,55724	0,00587 \pm 0,00219	161,39868 P=1,00000	441
<i>BRE5-GAL4</i>	-131,76421	-184,72942	0,00000 \pm 0,00000	105,93041 P=0,99565	147
Masato					
<i>EGT2-CAT8</i>	-105,92077	-148,33632	0,00000 \pm 0,00000	84,83111 P=0,96415	110
<i>EGT2-BRE5</i>	-101,11425	-139,08347	0,00293 \pm 0,00164	75,93843 P=0,99942	120
<i>CAT8-BRE5</i>	-102,13314	-136,79687	0,11339 \pm 0,01209	69,32747 P=1,00000	132
<i>EGT2-GAL4</i>	-100,79816	-128,88575	0,00489 \pm 0,00247	56,17519 P=0,88459	70
<i>CAT8-GAL4</i>	-96,93290	-126,59916	0,00196 \pm 0,00136	59,33252 P=0,93256	77
<i>BRE5-GAL4</i>	-90,33215	-117,34630	0,04203 \pm 0,00500	54,02829 P=0,99549	84
Chicha					
<i>EGT2-CAT8</i>	-105,43875	-151,01608	0,00000 \pm 0,00000	91,15465 P=0,99999	156
<i>EGT2-BRE5</i>	-101,91010	-137,82397	0,21408 \pm 0,01564	71,82773 P=1,00000	156
<i>CAT8-BRE5</i>	-120,96827	-162,40667	0,19062 \pm 0,01243	82,87680 P=1,00000	169
<i>EGT2-GAL4</i>	-93,03523	-128,51282	0,02444 \pm 0,00495	70,95517 P=1,00000	156
<i>CAT8-GAL4</i>	-114,23040	-153,09552	0,03030 \pm 0,00596	77,73023 P=1,00000	169
<i>BRE5-GAL4</i>	-103,53763	-139,90341	0,03421 \pm 0,00592	72,73156 P=1,00000	169

Anexo 4. Estimaciones de neutralidad con la prueba de McDK para las cuatro regiones génicas de *S. cerevisiae* en comparación con las tres poblaciones de *S. paradoxus*. * $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; Ns: No significativo.

Anexo 4a. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de América.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
<i>EGT2</i>	17	23	30	12	1,35	0,40	0,013544*
<i>CAT8</i>	33	49	56	22	1,48	0,39	0,000068***
<i>BRE5</i>	26	67	52	42	2,58	0,81	0,000196***
<i>GAL4</i>	18	36	43	42	2,0	0,98	0,054597 Ns

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4b. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de Europa.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
<i>EGT2</i>	16	24	0	0	1,5	ND	ND
<i>CAT8</i>	33	45	56	23	1,36	0,41	0,000382***
<i>BRE5</i>	26	62	50	40	2,38	0,80	0,000507***
<i>GAL4</i>	19	35	43	36	1,84	0,84	0,034417*

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4c. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de Far East.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	S	
<i>EGT2</i>	16	21	28	10	1,31	0,36	0,010079*
<i>CAT8</i>	33	45	58	23	1,36	0,40	0,000225***
<i>BRE5</i>	25	63	50	40	2,52	0,80	0,000275***
<i>GAL4</i>	17	33	42	39	1,94	0,93	0,049569*

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4d. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de los alelos vínicos respecto a no vínicos de *S. cerevisiae*.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	Víncicos		No vínicos		P	S	
	S	NS	S	NS			
EGT2	8	15	4	4	1,88	1,00	0,675719 Ns
CAT8	28	44	4	1	1,57	0,25	0,153931 Ns
BRE5	23	61	0	1	2,65	ND	ND
GAL4	17	30	0	0	1,76	ND	ND

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4e. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de América.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	8	14	33	15	1,75	0,45	0,017838*
CAT8	7	29	65	23	4,14	0,35	0,000000***
BRE5	12	38	54	46	3,17	0,85	0,000493***
GAL4	7	19	48	49	2,71	1,02	0,047143*

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4f. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de Europa.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	7	15	4	4	2,14	1,00	0,417235 Ns
CAT8	8	25	66	24	3,13	0,36	0,000002***
BRE5	12	33	51	45	2,75	0,88	0,003683**
GAL4	8	20	47	42	2,50	0,89	0,030545*

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4g. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* Far East.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	7	12	32	12	1,71	0,38	0,010867*
CAT8	8	25	67	24	3,13	0,36	0,000001***
BRE5	10	34	52	45	3,4	0,87	0,000871***
GAL4	6	16	46	45	2,67	0,98	0,058847 Ns

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4h. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos no vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de América.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	6	5	31	13	0,83	0,42	0,473411 Ns
CAT8	21	24	57	24	1,14	0,42	0,012532*
BRE5	15	37	54	43	2,47	0,80	0,001966**
GAL4	14	24	43	43	1,71	1,00	0,240850 Ns

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4i. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos no vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* de Europa.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	5	6	0	0	1,20	ND	ND
CAT8	22	20	58	25	0,91	0,43	0,075386 Ns
BRE5	15	31	52	41	2,07	0,79	0,011710*
GAL4	15	23	43	37	1,53	0,86	0,170846 Ns

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 4j. Estimaciones de neutralidad con la prueba McDK en las cuatro regiones nucleares de alelos no vínicos de *S. cerevisiae* respecto a *S. paradoxus* Far East.

Región génica	Polimorfismo		Divergencia		dNS/dS		Fisher
	S	NS	S	NS	P	F	
EGT2	5	3	29	12	0,6	0,41	0,686870 Ns
CAT8	22	20	60	25	0,91	0,42	0,050567 Ns
BRE5	14	32	52	41	2,29	0,79	0,006537**
GAL4	13	21	42	40	1,62	0,95	0,225803 Ns

S: sustitución sinónima, NS: sustitución no sinónima, Prueba de Fisher P-value (dos colas).

Anexo 5. Tablas de pruebas de neutralidad mediante el método de HKA para las cuatro regiones génicas de *S. cerevisiae* considerando sustituciones sinónimas, no sinónimas y totales y las tres poblaciones de *S. paradoxus*.

* $0.01 < P < 0.05$; ** $0.001 < P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS: No significativo.

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	1.14	0.28 NS		0.0	0.99 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	18	32	Sitios segregantes	18	32
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	85.6	99.8	No. diferencias promedio	50.3	93.2
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	26.17	0.00***		1.98	0.16 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	18	32	Sitios segregantes	18	32
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	45.4	95.5	No. diferencias promedio	93.9	94.6
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	2.59	0.17 NS		1.90	0.17 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8	Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	6	40	Sitios segregantes	6	40
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714
Tamaño de muestra	50	171	Tamaño de muestra	50	171
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	46.5	89.9	No. diferencias promedio	41.6	93.3
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	714

Sustituciones Totales	X ²	P
	8.90	0.00 **
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	6	40
Número total de sitios	336	714
Tamaño de muestra	50	171
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	1.6	92.4
Número total de sitios	336	714

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.01	0.91 NS		0.49	0.48 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	6	7	Sitios segregantes	6	7
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	162.2
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.3	5.8	No. diferencias promedio	34.5	66.0
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	162.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.80	0.37 NS		14.10	0.00 ***
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	6	7	Sitios segregantes	6	7
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	162.2
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	31.8	68.8	No. diferencias promedio	4.6	67.9
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	162.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.91	0.17 NS		1.7	0.24 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8	Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	3	21	Sitios segregantes	3	21
Número total de sitios	73.5	162.2	Número total de sitios	73.7	162.2
Tamaño de muestra	50	171	Tamaño de muestra	50	171
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	32.7	62.4	No. diferencias promedio	29.5	66.2
Número total de sitios	73.5	162.2	Número total de sitios	73.7	162.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	6.5	0.01 *
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	3	21
Número total de sitios	73.7	162.2
Tamaño de muestra	50	171
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	0.9	65.2
Número total de sitios	73.7	162.2

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.44	0.50 NS		0.16	0.69 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	12	25	Sitios segregantes	12	25
Número total de sitios	262.6	551.8	Número total de sitios	262.7	551.8
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.25206	4.14410	No. diferencias promedio	15.8	27.2
Número total de sitios	262.6	551.8	Número total de sitios	262.7	551.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	1.8	0.18 NS		0.02	0.87 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	CAT8	Intra: Vínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	12	25	Sitios segregantes	12	25
Número total de sitios	262.7	551.8	Número total de sitios	262.7	551.8
Tamaño de muestra	372	293	Tamaño de muestra	372	293
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	4.7	26.7	No. diferencias promedio	13.6	26.7
Número total de sitios	262.7	551.8	Número total de sitios	262.7	551.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	1.42	0.23 NS		0.02	0.87 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	CAT8	Intra: No V ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	3	20	Sitios segregantes	3	20
Número total de sitios	262.5	551.8	Número total de sitios	262.3	551.8
Tamaño de muestra	50	171	Tamaño de muestra	50	171
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	13.8	27.6	No. diferencias promedio	0.7	2.6
Número total de sitios	262.5	551.8	Número total de sitios	262.3	551.8

S. no sin ónimas	X ²	P
	1.64	0.21
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8
Sitios segregantes	6	40
Número total de sitios	262.6	551.8
Tamaño de muestra	50	171
Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	4.2	4.1
Número total de sitios	262.6	551.8

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	36.60	0.00***		0.03	0.86 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	18	40	Sitios segregantes	18	40
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675
Tamaño de muestra	372	327	Tamaño de muestra	372	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	85.6	8.2	No. diferencias promedio	50.3	106.0
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	9.71	0.00**		0.01	0.94 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	18	40	Sitios segregantes	18	40
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675
Tamaño de muestra	372	327	Tamaño de muestra	372	327
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	45.4	324.9	No. diferencias promedio	93.9	99.5
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	2.35	0.12 NS		2.10	0.15 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5	Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	6	44	Sitios segregantes	6	44
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675
Tamaño de muestra	50	150	Tamaño de muestra	50	150
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	46.5	106.8	No. diferencias promedio	41.6	100.4
Número total de sitios	336	675	Número total de sitios	336	675

Sustituciones Totales	X ²	P
	8.53	0.00**
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	6	44
Número total de sitios	336	675
Tamaño de muestra	50	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	1.6	99.9
Número total de sitios	336	675

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.47	0.22 NS		0.13	0.72 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	6	10	Sitios segregantes	6	10
Número total de sitios	73.4	153.9	Número total de sitios	73.4	154.2
Tamaño de muestra	372	150	Tamaño de muestra	372	150
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	4.3	1.9	No. diferencias promedio	34.5	53.1
Número total de sitios	73.4	153.9	Número total de sitios	73.4	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.48	0.22 NS		5.78	0.02*
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	6	10	Sitios segregantes	6	10
Número total de sitios	73.4	154.2	Número total de sitios	73.4	154.2
Tamaño de muestra	372	150	Tamaño de muestra	372	150
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	31.8	49.8	No. diferencias promedio	4.6	49.4
Número total de sitios	73.4	154.2	Número total de sitios	73.4	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.16	0.28 NS		1.06	0.30 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5	Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	14	Sitios segregantes	3	14
Número total de sitios	73.5	153.7	Número total de sitios	73.7	153.6
Tamaño de muestra	50	150	Tamaño de muestra	50	150
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	32.7	52.8	No. diferencias promedio	29.5	49.5
Número total de sitios	73.5	153.7	Número total de sitios	73.7	153.6

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	6.90	0.01**
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	14
Número total de sitios	73.7	153.6
Tamaño de muestra	50	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	0.9	49.1
Número total de sitios	73.7	153.6

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.35	0.55 NS		0.11	0.74 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	12	33	Sitios segregantes	12	33
Número total de sitios	262.6	521.0	Número total de sitios	262.7	520.8
Tamaño de muestra	372	327	Tamaño de muestra	372	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.2	6.2	No. diferencias promedio	15.9	52.9
Número total de sitios	262.6	521.0	Número total de sitios	262.7	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	4.21	0.04*		0.25	0.62 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	BRE5	Intra: Vínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	12	33	Sitios segregantes	12	33
Número total de sitios	262.7	520.8	Número total de sitios	262.7	520.8
Tamaño de muestra	372	327	Tamaño de muestra	372	327
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	4.7	50.1	No. diferencias promedio	13.6	50.2
Número total de sitios	262.7	520.8	Número total de sitios	262.7	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.93	0.33 NS		3.6	0.06 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	BRE5	Intra: No V ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	31	Sitios segregantes	3	31
Número total de sitios	262.5	521.4	Número total de sitios	262.3	521.4
Tamaño de muestra	50	150	Tamaño de muestra	50	150
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	13.8	54.0	No. diferencias promedio	0.7	54.0
Número total de sitios	262.5	521.4	Número total de sitios	262.3	521.4

S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.75	0.39 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	31
Número total de sitios	262.3	521.4
Tamaño de muestra	50	150
Inter: Asia		
No. diferencias promedio	12.1	50.9
Número total de sitios	262.3	521.4

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	35.36	0.00***		1.12	0.29 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	18	22	Sitios segregantes	18	22
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	336	555
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	85.6	3.4	No. diferencias promedio	50.3	100.8
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	336	555

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	1.23	0.27 NS		0.28	0.60 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	18	22	Sitios segregantes	18	22
Número total de sitios	336	555	Número total de sitios	336	555
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	45.4	93.4	No. diferencias promedio	93.9	92.9
Número total de sitios	336	555	Número total de sitios	336	555

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	1.54	0.21 NS		1.36	0.24 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4	Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	6	33	Sitios segregantes	6	33
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	336	540
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	50	154
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	46.5	95.2	No. diferencias promedio	41.6	88.9
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	336	540

Sustituciones Totales	X ²	P
	10.1	0.00**
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	6	33
Número total de sitios	336	540
Tamaño de muestra	50	154
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	1.6	88.3
Número total de sitios	336	540

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.55	0.46 NS		0.20	0.66 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	6	6	Sitios segregantes	6	6
Número total de sitios	73.4	121.5	Número total de sitios	73.4	126.5
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.3	1.8	No. diferencias promedio	34.5	47.6
Número total de sitios	73.4	121.5	Número total de sitios	73.4	126.5

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.25	0.62 NS		10.46	0.00**
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	6	6	Sitios segregantes	6	6
Número total de sitios	73.4	126.5	Número total de sitios	73.4	126.4
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	31.8	45.7	No. diferencias promedio	4.6	47.2
Número total de sitios	73.4	126.5	Número total de sitios	73.4	126.4

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.34	0.25 NS		1.13	0.29 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4	Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	3	13	Sitios segregantes	3	13
Número total de sitios	73.5	121.17	Número total de sitios	73.7	121.1
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	50	154
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	32.7	45.7	No. diferencias promedio	29.5	44.4
Número total de sitios	73.5	121.17	Número total de sitios	73.7	121.1

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	6.91	0.01**
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	3	13
Número total de sitios	73.7	121.0
Tamaño de muestra	50	154
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	0.9	45.9
Número total de sitios	73.7	121.02

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.81	0.37 NS		2.78	0.09 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	12	16	Sitios segregantes	12	16
Número total de sitios	262.6	415.5	Número total de sitios	262.7	428.5
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.2	1.5	No. diferencias promedio	15.9	53.2
Número total de sitios	262.6	415.5	Número total de sitios	262.7	428.5

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	9.36	0.00**		2.90	0.09 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	EGT2	GAL4	Intra: Vínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	12	16	Sitios segregantes	12	16
Número total de sitios	262.7	428.6	Número total de sitios	262.7	428.5
Tamaño de muestra	372	323	Tamaño de muestra	372	323
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	4.7	45.7	No. diferencias promedio	13.6	47.7
Número total de sitios	262.7	428.6	Número total de sitios	262.7	428.5

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.32	0.57 NS		4.14	0.04*
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	GAL4	Intra: No V ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	3	21	Sitios segregantes	3	21
Número total de sitios	262.5	415.8	Número total de sitios	262.3	415.9
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	50	154
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	13.8	49.4	No. diferencias promedio	0.7	42.2
Número total de sitios	262.5	415.8	Número total de sitios	262.3	415.9

S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.28	0.5965 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	GAL4
Sitios segregantes	3	21
Número total de sitios	262.3	415.9
Tamaño de muestra	50	154
Inter: Asia		
No. diferencias promedio	12.1	44.4
Número total de sitios	262.3	415.9

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	28.63	0.00***		0.04	0.84 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	32	40	Sitios segregantes	32	40
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675
Tamaño de muestra	293	327	Tamaño de muestra	293	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	99.8	8.2	No. diferencias promedio	93.2	106.0
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	8.74	0.00**		0.15	0.69 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	32	40	Sitios segregantes	32	40
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675
Tamaño de muestra	293	327	Tamaño de muestra	293	327
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	95.5	324.9	No. diferencias promedio	94.6	99.5
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.02	0.90 NS		0.01	0.91 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5	Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	40	44	Sitios segregantes	40	44
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675
Tamaño de muestra	171	150	Tamaño de muestra	171	150
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	89.9	106.8	No. diferencias promedio	93.3	100.4
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	714	675

Sustituciones Totales	X ²	P
	0.01	0.92 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	40	44
Número total de sitios	714	675
Tamaño de muestra	171	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	92.4	99.9
Número total de sitios	714	675

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.90	0.17 NS		1.31	0.25 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	7	10	Sitios segregantes	7	10
Número total de sitios	162.2	153.9	Número total de sitios	162.2	154.2
Tamaño de muestra	293	150	Tamaño de muestra	293	150
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	5.8	1.9	No. diferencias promedio	66.0	53.1
Número total de sitios	162.2	153.9	Número total de sitios	162.2	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.76	0.18 NS		1.73	0.19 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	7	10	Sitios segregantes	7	10
Número total de sitios	162.2	154.2	Número total de sitios	162.2	154.2
Tamaño de muestra	293	150	Tamaño de muestra	293	150
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	68.8	49.8	No. diferencias promedio	67.9	49.4
Número total de sitios	162.2	154.2	Número total de sitios	162.2	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.18	0.67 NS		0.03	0.85 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5	Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	21	14	Sitios segregantes	21	14
Número total de sitios	162.2	153.7	Número total de sitios	162.2	153.6
Tamaño de muestra	171	150	Tamaño de muestra	171	150
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	62.4	52.8	No. diferencias promedio	66.2	49.5
Número total de sitios	162.2	153.7	Número total de sitios	162.2	153.6

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.04	0.84 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	21	14
Número total de sitios	162.2	153.6
Tamaño de muestra	171	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	65.2	49.1
Número total de sitios	162.2	153.6

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.01	0.91 NS		0.73	0.39 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	25	33	Sitios segregantes	25	33
Número total de sitios	551.8	521.0	Número total de sitios	551.8	520.8
Tamaño de muestra	293	327	Tamaño de muestra	293	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.1	6.2	No. diferencias promedio	27.2	52.9
Número total de sitios	551.8	521.0	Número total de sitios	551.8	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.84	0.36 NS		0.59	0.44 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	BRE5	Intra: Vínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	25	33	Sitios segregantes	25	33
Número total de sitios	551.8	520.8	Número total de sitios	551.8	520.8
Tamaño de muestra	293	327	Tamaño de muestra	293	327
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	26.7	50.1	No. diferencias promedio	26.7	50.2
Número total de sitios	551.8	520.8	Número total de sitios	551.8	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.32	0.57 NS		12.03	0.00***
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	CAT8	BRE5	Intra: No V ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	20	31	Sitios segregantes	20	31
Número total de sitios	551.8	521.4	Número total de sitios	551.8	521.4
Tamaño de muestra	171	150	Tamaño de muestra	171	150
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	27.6	54.0	No. diferencias promedio	2.6	54.0
Número total de sitios	551.8	521.4	Número total de sitios	551.8	521.4

S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.11	0.74 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	CAT8	BRE5
Sitios segregantes	20	31
Número total de sitios	551.8	521.4
Tamaño de muestra	171	150
Inter: Asia		
No. diferencias promedio	27.1	50.9
Número total de sitios	551.8	521.4

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	26.7	0.00***		1.26	0.26 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	32	22	Sitios segregantes	32	22
Número total de sitios	714	540	Número total de sitios	714	555
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	99.8	3.35	No. diferencias promedio	93.2	100.9
Número total de sitios	714	540	Número total de sitios	714	555

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.77	0.38 NS		0.79	0.37 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	32	22	Sitios segregantes	32	22
Número total de sitios	714	555	Número total de sitios	714	555
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	95.5	93.4	No. diferencias promedio	94.6	92.3
Número total de sitios	714	555	Número total de sitios	714	555

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.31	0.58 NS		0.09	0.76 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4	Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	40	33	Sitios segregantes	40	33
Número total de sitios	714	540	Número total de sitios	714	540
Tamaño de muestra	171	154	Tamaño de muestra	171	154
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	89.9	95.2	No. diferencias promedio	93.3	88.8
Número total de sitios	714	540	Número total de sitios	714	540

Sustituciones Totales	X ²	P
	0.10	0.76 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	40	33
Número total de sitios	714	540
Tamaño de muestra	171	154
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	92.40	88.3
Número total de sitios	714	540

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.77	0.38 NS		0.06	0.81 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	7	6	Sitios segregantes	7	6
Número total de sitios	162.2	121.5	Número total de sitios	162.2	126.5
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: No v ínicas			Inter: América		
No. diferencias promedio	5.8	1.8	No. diferencias promedio	66.0	47.6
Número total de sitios	162.2	121.5	Número total de sitios	162.2	126.5

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.13	0.71 NS		0.09	0.77 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	7	6	Sitios segregantes	7	6
Número total de sitios	162.2	126.5	Número total de sitios	162.2	126.4
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	68.8	45.7	No. diferencias promedio	67.9	47.2
Número total de sitios	162.2	126.5	Número total de sitios	162.2	126.4

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.09	0.77 NS		0.01	0.90 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4	Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	21	13	Sitios segregantes	21	13
Número total de sitios	162.2	121.2	Número total de sitios	162.2	121.1
Tamaño de muestra	171	154	Tamaño de muestra	171	154
Inter: América			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	62.4	45.7	No. diferencias promedio	66.2	44.4
Número total de sitios	162.2	121.2	Número total de sitios	162.2	121.1

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.05	0.83 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	21	13
Número total de sitios	162.2	121.0
Tamaño de muestra	171	154
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	65.2	45.9
Número total de sitios	162.2	121.0

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.08	0.77 NS		5.3	0.02*
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	25	16	Sitios segregantes	25	16
Número total de sitios	551.8	415.5	Número total de sitios	551.8	428.5
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	4.1	1.5	No. diferencias promedio	27.2	53.2
Número total de sitios	551.8	415.5	Número total de sitios	551.8	428.5

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	3.97	0.05*		4.36	0.037*
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	CAT8	GAL4	Intra: Vínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	25	16	Sitios segregantes	25	16
Número total de sitios	551.8	428.6	Número total de sitios	551.8	428.5
Tamaño de muestra	293	323	Tamaño de muestra	293	323
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	26.7	45.7	No. diferencias promedio	26.7	47.7
Número total de sitios	551.8	428.6	Número total de sitios	551.8	428.5

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	1.03	0.31NS		12.72	0.00***
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	CAT8	GAL4	Intra: No V ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	20	21	Sitios segregantes	20	21
Número total de sitios	551.8	415.3	Número total de sitios	551.8	415.9
Tamaño de muestra	171	154	Tamaño de muestra	171	154
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	27.6	49.4	No. diferencias promedio	2.6	42.2
Número total de sitios	551.8	415.3	Número total de sitios	551.8	415.9

S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.68	0.41 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	20	21
Número total de sitios	551.8	415.9
Tamaño de muestra	171	154
Inter: Asia		
No. diferencias promedio	27.1	44.4
Número total de sitios	551.8	415.9

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.05	0.82 NS		1.78	0.18 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	22	40	Sitios segregantes	22	40
Número total de sitios	540	675	Número total de sitios	555	675
Tamaño de muestra	323	327	Tamaño de muestra	323	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	3.3	8.2	No. diferencias promedio	100.9	106.0
Número total de sitios	540	675	Número total de sitios	555	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	1.64	0.20 NS		1.64	0.2 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	22	40	Sitios segregantes	22	40
Número total de sitios	555	675	Número total de sitios	555	675
Tamaño de muestra	323	327	Tamaño de muestra	323	327
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	93.4	324.9	No. diferencias promedio	92.9	99.5
Número total de sitios	555	675	Número total de sitios	555	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.18	0.67 NS		0.17	0.68 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5	Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	33	44	Sitios segregantes	33	44
Número total de sitios	540	675	Número total de sitios	540	675
Tamaño de muestra	154	150	Tamaño de muestra	154	150
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	95.2	106.8	No. diferencias promedio	88.86	100.4
Número total de sitios	540	675	Número total de sitios	540	675

Sustituciones Totales	X ²	P
	0.17	0.68 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	33	44
Número total de sitios	540	675
Tamaño de muestra	154	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	88.3	99.9
Número total de sitios	540	675

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.14	0.70 NS		0.71	0.39 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	6	10	Sitios segregantes	6	10
Número total de sitios	121.5	153.9	Número total de sitios	126.5	154.2
Tamaño de muestra	323	150	Tamaño de muestra	323	150
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	1.8	1.9	No. diferencias promedio	47.6	53.1
Número total de sitios	121.5	153.9	Número total de sitios	126.5	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0.77	0.38 NS		0.89	0.35 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	6	10	Sitios segregantes	6	10
Número total de sitios	126.5	154.2	Número total de sitios	126.4	154.2
Tamaño de muestra	323	150	Tamaño de muestra	323	150
Inter: Asia			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	45.7	49.8	No. diferencias promedio	47.2	49.4
Número total de sitios	126.5	154.2	Número total de sitios	126.4	154.2

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	3.6	0.06 NS		3.84	0.05 S
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5	Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	3	14	Sitios segregantes	3	14
Número total de sitios	121.2	153.7	Número total de sitios	121.1	153.6
Tamaño de muestra	154	150	Tamaño de muestra	154	150
Inter: Am érica			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	45.7	52.8	No. diferencias promedio	44.4	49.5
Número total de sitios	121.2	153.7	Número total de sitios	121.1	153.6

Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	4.09	0.04*
	locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	3	14
Número total de sitios	121.0	153.6
Tamaño de muestra	154	150
Inter: Europa		
No. diferencias promedio	45.9	49.1
Número total de sitios	121.0	153.6

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.16	0.69 NS		2.45	0.12 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	16	33	Sitios segregantes	16	33
Número total de sitios	415.5	521.0	Número total de sitios	428.5	520.8
Tamaño de muestra	323	327	Tamaño de muestra	323	327
Inter: No v ínicas			Inter: Am érica		
No. diferencias promedio	1.5	6.2	No. diferencias promedio	53.2	52.9
Número total de sitios	415.5	521.0	Número total de sitios	428.5	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	1.78	0.18 NS		2.04	0.15 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: Vínicas	GAL4	BRE5	Intra: Vínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	16	33	Sitios segregantes	16	33
Número total de sitios	428.6	520.8	Número total de sitios	428.5	520.8
Tamaño de muestra	323	327	Tamaño de muestra	323	327
Inter: Europa			Inter: Asia		
No. diferencias promedio	45.7	50.1	No. diferencias promedio	47.7	50.2
Número total de sitios	428.6	520.8	Número total de sitios	428.5	520.8

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.41	0.52 NS		0.09	0.76 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	GAL4	BRE5	Intra: No V ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	21	31	Sitios segregantes	21	31
Número total de sitios	415.8	521.4	Número total de sitios	415.9	521.4
Tamaño de muestra	154	150	Tamaño de muestra	154	150
Inter: Am érica			Inter: Europa		
No. diferencias promedio	49.4	54.0	No. diferencias promedio	42.2	54.0
Número total de sitios	415.8	521.4	Número total de sitios	415.9	521.4

S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.29	0.59 NS
	locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	GAL4	BRE5
Sitios segregantes	21	31
Número total de sitios	415.9	521.4
Tamaño de muestra	154	150
Inter: Asia		
No. diferencias promedio	44.4	50.9
Número total de sitios	415.9	521.4

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	0.29	0.59 NS		10.8	0.00**
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	CAT8	Intra: No v ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	6	40	Sitios segregantes	6	44
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	675
Tamaño de muestra	50	171	Tamaño de muestra	50	150
Inter: V ínicas			Inter: V ínicas		
No. diferencias promedio	0.74	5.2	No. diferencias promedio	0.7	82.1
Número total de sitios	336	714	Número total de sitios	336	675

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Totales	X ²	P
	17.6	0.00***		18.75	0.00***
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	CAT8	BRE5	Intra: No v ínicas	BRE5	GAL4
Sitios segregantes	40	44	Sitios segregantes	44	33
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	675	540
Tamaño de muestra	171	150	Tamaño de muestra	150	154
Inter: V ínicas			Inter: V ínicas		
No. diferencias promedio	5.2	82.1	No. diferencias promedio	82.1	3.2
Número total de sitios	714	675	Número total de sitios	675	540

Sustituciones Totales	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	0	1.00 NS		0.02	0.89 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	EGT2	GAL4	Intra: No v ínicas	CAT8	GAL4
Sitios segregantes	6	33	Sitios segregantes	40	33
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	714	540
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	171	154
Inter: V ínicas			Inter: V ínicas		
No. diferencias promedio	0.7	3.2	No. diferencias promedio	5.21	3.2
Número total de sitios	336	540	Número total de sitios	714	540

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	1.08	0.29 NS		0.85	0.36
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No V ínicas	EGT2	CAT8	Intra: no V ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	20	Sitios segregantes	6	31
Número total de sitios	262.3	551.8	Número total de sitios	262.6	521.0
Tamaño de muestra	50	171	Tamaño de muestra	50	150
Inter: Asia			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	12.1	27.1	No. diferencias promedio	4.2	6.2
Número total de sitios	262.3	551.8	Número total de sitios	262.6	521.0

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	0.13	0.71		5.4	0.02*
	locus 1	locus 2	S. no sin ónimas	locus 1	locus 2
Intra: no V ínicas	BRE5	CAT8	Intra: No v ínicas	BRE5	GAL4
Sitios segregantes	31	40	Sitios segregantes	31	?
Número total de sitios	521.0	551.8	Número total de sitios	521.0	415.5
Tamaño de muestra	150	171	Tamaño de muestra	150	154
Inter: v ínicas			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	6.2	4.1	No. diferencias promedio	6.2	1.5
Número total de sitios	521.0	551.8	Número total de sitios	521.0	415.5

S. No Sin ónimas	X ²	P	S. No Sin ónimas	X ²	P
	2.04	0.15		8.3	0.00**
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: no V ínicas	EGT2	GAL4	Intra: no V ínicas	GAL4	CAT8
Sitios segregantes	6	?	Sitios segregantes	?	40
Número total de sitios	262.6	415.5	Número total de sitios	415.5	551.8
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	154	171
Inter: v ínicas			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	4.2	1.5	No. diferencias promedio	1.5	4.1
Número total de sitios	262.6	415.5	Número total de sitios	415.5	551.8

S. sinónimas	X ²	P	S. sinónimas	X ²	P
	0.43	0.51 NS		0.05	0.82
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: no V ínicas	EGT2	CAT8	Intra: no V ínicas	EGT2	BRE5
Sitios segregantes	3	40	Sitios segregantes	3	14
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	153.9
Tamaño de muestra	50	293	Tamaño de muestra	50	150
Inter: v ínicas			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	4.3	22.7	No. diferencias promedio	4.3	19.9
Número total de sitios	73.4	162.2	Número total de sitios	73.4	153.9

S. sinónimas	X ²	P	S. sinónimas	X ²	P
	1.77	0.18		1.21	0.27 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: No v ínicas	BRE5	CAT8	Intra: No v ínicas	BRE5	GAL4
Sitios segregantes	14	40	Sitios segregantes	14	0
Número total de sitios	153.9	162.2	Número total de sitios	153.9	121.5
Tamaño de muestra	150	293	Tamaño de muestra	150	154
Inter: v ínicas			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	19.9	22.7	No. diferencias promedio	19.9	1.8
Número total de sitios	153.9	162.2	Número total de sitios	153.9	121.5

S. sinónimas	X ²	P	Sustituciones Sin ónimas	X ²	P
	1.31	0.25		2.61	0.11 NS
	locus 1	locus 2		locus 1	locus 2
Intra: no V ínicas	EGT2	GAL4	Intra: no V ínicas	GAL4	CAT8
Sitios segregantes	3	0	Sitios segregantes	0	40
Número total de sitios	73.4	121.5	Número total de sitios	121.5	162.2
Tamaño de muestra	50	154	Tamaño de muestra	154	293
Inter: v ínicas			Inter: v ínicas		
No. diferencias promedio	4.3	1.8	No. diferencias promedio	1.8	22.7
Número total de sitios	73.4	121.5	Número total de sitios	121.5	162.2

Anexo 6. Diversidad nucleotídica de las tres poblaciones de *S. paradoxus* en las cuatro regiones nucleares y la mitocondrial.

CAT8					
Población de <i>S. paradoxus</i>	n	Sitios (segregantes)	No. Haplotipos	θ_w	π
Europa	14	665 (0)	1	0,0000	0,0000
Asia	8	665 (0)	1	0,0000	0,0000
América	14	665 (3)	3	0,0014	0,0026
Total	36	665 (20)	5	0,0073	0,0133

BRE5					
Población de <i>S. paradoxus</i>	n	Sitios (segregantes)	No. Haplotipos	θ_w	π
Europa	10	675 (3)	4	0,0016	0,0019
Asia	8	675 (1)	2	0,0006	0,0006
América	14	675 (9)	5	0,0042	0,0055
Total	32	675 (37)	11	0,0136	0,0236

GAL4					
Población de <i>S. paradoxus</i>	n	Sitios (segregantes)	No. Haplotipos	θ_w	π
Europa	12	555 (6)	4	0,0036	0,0036
Asia	8	555 (1)	2	0,0007	0,0008
América	14	555 (4)	3	0,0023	0,0033
Total	34	555 (37)	9	0,0163	0,0277

EGT2					
Población de <i>S. paradoxus</i>	n	Sitios (segregantes)	No. Haplotipos	θ_w	π
Europa	10	336 (5)	4	0,0053	0,0059
Asia	8	336 (2)	3	0,0023	0,0003
América	14	336 (5)	5	0,0047	0,0071
Total	32	336 (56)	12	0,0414	0,0781

COX2					
Población de <i>S. paradoxus</i>	n	Sitios (segregantes)	No. Haplotipos	θ_w	π
Europa	10	585 (27)	7	0,0163	0,0141
Asia	6	585 (16)	5	0,0120	0,0103
América	7	585 (7)	4	0,0049	0,0049
Total	22	585 (31)	15	0,0146	0,0234

BIBLIOGRAFÍA

- Aa,E., Townsend,J.P., Adams,R.I., Nielsen,K.M., and Taylor,J.W. (2006) Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **6**: 702-715.
- Aidoo,K.E., Nout,M.J.R., and Sarkar,P.K. (2006) Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Res.* **6**: 30-39.
- Amoa-Awua,W., E,S., and K,T.-D. (2007) Growth of yeasts, lactic and acetic acid bacteria in palm wine during tapping and fermentation from felled oil palm (*Elaeis guineensis*) in Ghana. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 599-606.
- Anisimova,M., Nielsen,R., and Yang,Z. (2003) Effect of Recombination on the Accuracy of the Likelihood Method for Detecting Positive Selection at Amino Acid Sites. *Genetics* **164**: 1229-1236.
- Antonelli,A., Castellari,L., Zambonelli,C., and Carnacini,A. (1999) Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1139-1144.
- Attfeld,P.V. (1997) Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotech* **15**: 1351-1357.
- Ayoub,M.J., Legras,J.L., Saliba,R., and Gaillardin,C. (2006) Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 699-711.
- Azumi,M. and Goto-Yamamoto,N. (2001) AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast* **18**: 1145-1154.
- Badr,A., Müller,K., Schäfer-Pregl,R., El Rabey,H., Effgen,S., Ibrahim,H.H. et al. (2000) On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.* **17**: 499-510.
- Bakalinsky,A.T. and Snow,R. (1990) The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 367-382.
- Barnett,J.R.P.a.D.Y. (1990) *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Barre,P., Vézinhel,F., Dequin,S., and Blondin,B. (1992) Genetic improvement of wine yeast. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers (ed).
- Barrio,E., González,S.S., Arias,A., Belloch,C., and Querol,A. (2006) Molecular mechanisms involved in the adaptive evolution of industrial yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*. Querol,A. and Fleet,G.H. (eds). Berlin: Springer-Verlag, 153-174.
- Barros Lopes,M., Soden,A., Martens,A.L., Henschke,P.A., and Langridge,P. (1998) Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**: 279-286.
- Bauer,F.F. and Pretorius,I.S. (2000) Yeast stress response and fermentation efficiency: How to survive the making of wine - a review . *South African Journal of Enology and Viticulture* **21**: 27-51.
- Belloch,C., Barrio,E., García,M.D., and Querol,A. (1998) Inter- and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast* **14**: 1341-1354.

Bibliografía

- Belloch,C., Barrio,E., Uruburu,F., García,M.D., and Querol,A. (1997) Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 397-408.
- Belloch,C., Querol,A., García,M.D., and Barrio,E. (2000) Phylogeny of the genus *Kluyveromyces* inferred from mitochondrial cytochrome-c oxidase II gene. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 405-416.
- Belloch,C., Orlic,S., Barrio,E., and Querol,A. (2008) Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Int. J. Food Microbiol.* **122**: 188-195.
- Ben Ari,G., Zenvirth,D., Sherman,A., Simchen,G., Lavi,U., and Hillel,J. (2005) Application of SNPs for assessing biodiversity and phylogeny among yeast strains. *Heredity* **95**: 493-501.
- Berger,K.H. and Yaffe,M.P. (2000) Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Microbiol.* **8**: 508-513.
- Betrán,E., Rozas,J., Navarro,A., and Barbadilla,A. (1997) The Estimation of the Number and the Length Distribution of Gene Conversion Tracts From Population DNA Sequence Data. *Genetics* **146**: 89-99.
- Bidenne,C., Blondin,B., Dequin,S., and Vezinhet,F. (1992) Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **22**: 1-7.
- Blandino,A., Al Aseeri,M.E., Pandiella,S.S., Cantero,D., and Webb,C. (2003) Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* **36**: 527-543.
- Bond,U., Neal,C., Donnelly,D., and James,T.C. (2004) Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridisation. *Curr. Genet.* **45**: 360-370.
- Bordonné,R., Dirheimer,G., and Martin,R.P. (1988) Expression of the *oxi1* and maturase-related RF1 genes in yeast mitochondria. *Curr. Genet.* **13**: 227-233.
- Bradbury,J., Richards,K., Niederer,H., Lee,S., Rod Dunbar,P., and Gardner,R. (2006) A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**: 27-37.
- Bryant,D. and Moulton,V. (2004) Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 255-265.
- Cardona,F., Carrasco,P., Perez-Ortin,J.E., del Olmo,M.I., and Aranda,A. (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **114**: 83-91.
- Carle,G.F. and Olson,M.V. (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 3756-3760.
- Casaregola,S., Nguyen,H.V., Lapathitis,G., Kotyk,A., and Gaillardin,C. (2001) Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1607-1618.
- Charlesworth,B. (1994) The effect of background selection against deleterious mutations on weakly selected, linked variants. *Genet. Res.* **63**: 213-227.
- Charoenchai,C., Fleet,G., Henschke,P., and Todd Ben (1997) Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Austr J Grape Wine* **3**: 8.
- Clement,M., Posada,D., and Crandall,K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1659.
- Cliften,P.F., Hillier,L.W., Fulton,L., Graves,T., Miner,T., Gish,W.R. et al. (2001) Surveying *Saccharomyces* genomes to identify functional elements by comparative DNA sequence analysis. *Genome Res.* **11**: 1175-1186.

- Cliften,P.F., Sudarsanam,P., Desikan,A., Fulton,L., Fulton,B., Majors,J. et al. (2003) Finding Functional Features in *Saccharomyces* Genomes by Phylogenetic Footprinting. *Science* **301**: 71-76.
- Codón,A.C. and Benítez,T. (1995) Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of baker's yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 343-352.
- Codón,A.C., Benítez,T., and Korhola,M. (1998) Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 154-163.
- Conant,G.C. and Wolfe,K.H. (2007) Increased glycolytic flux as an outcome of whole-genome duplication in yeast. *Mol. Syst. Biol.* **3**: 129.
- Connallon,T. and Knowles,L.L. (2007) Recombination rate and protein evolution in yeast. *BMC Evol. Biol.* **7**: 235.
- Coton,E., Coton,M., Levert,D., Casaregola,S., and Sohier,D. (2006) Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **108**: 130-135.
- Coulin,P., Farah,Z., Assanvo,J., Spillmann,H., and Puhan,Z. (2006) Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *Int. J. Food Microbiol.* **106**: 131-136.
- Coyne,J.A. and Orr,H.A. (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. ,B,Biol. Sci.* **353**: 287-305.
- Cracraft,J. (1989) Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In *Speciation and its consequences*. Otte,D.E.J.A. (ed). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 28-59.
- de Barros Lopes,M., Bellon,J.R., Shirley,N.J., and Ganter,P.F. (2002) Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res.* **1**: 323-331.
- de Barros Lopes,M., Rainieri,S., Henschke,P.A., and Langridge,P. (1999) AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 915-924.
- de Barros Lopes,M., Soden,A., Henschke,P.A., and Langridge,P. (1996) PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4514-4520.
- de Llanos,R. Estudio comparativo entre aislados clínicos y no clínicos de *Saccharomyces cerevisiae* y su papel como patógeno emergente. 2007. Universidad de Valencia. Thesis/Dissertation
- De Mot,R. and Verachtert,H. (1987) Some Microbiological and Biochemical Aspects of Starch Byconversion by Amylolytic Yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* **5**: 259-272.
- Delneri,D., Colson,I., Grammenoudi,S., Roberts,I.N., Louis,E.J., and Oliver,J.L. (2003) Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature* **422**: 68-72.
- Dietrich,F.S., Voegeli,S., Brachat,S., Lerch,A., Gates,K., Steiner,S. et al. (2004) The *Ashbya gossypii* Genome as a Tool for Mapping the Ancient *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Science* **304**: 304-307.
- Doebley,J.F., Gaut,B.S., and Smith,B.D. (2006) The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell* **127**: 1309-1321.
- Dowton,M. and Campbell,N.J.H. (2001) Intramitochondrial recombination - is it why some mitochondrial genes sleep around? *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 269-271.
- Dujon,B., Sherman,D., Fischer,G., Durrens,P., Casaregola,S., Lafontaine,I. et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**: 35-44.

Bibliografía

- Dujon, B. (2005) Hemiascomycetous yeasts at the forefront of comparative genomics. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**: 614-620.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., and Querol, A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 329-337.
- Excoffier, L.G.L.a.S.S. (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**: 47-50.
- Fay, J.C. and Benavides, J.A. (2005a) Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genet.* **1**: 66-71.
- Fay, J.C. and Benavides, J.A. (2005b) Hypervariable Noncoding Sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **170**: 1575-1587.
- Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E., and Querol, A. (2003) Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **20**: 1213-1226.
- Fernández-Espinar, M.T., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A., and 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-Espinar, M.T., López, V., Ramon, D., Bartra, E., and Querol, A. (2001) Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* **70**: 1-10.
- Fischer, G., James, S.A., Roberts, I.N., Oliver, S.G., and Louis, E.J. (2000) Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* **405**: 451-454.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeasts-growth during fermentation. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. and Heard, G.M. (eds). Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers, 27-55.
- Flores Berrios, E.P., Alba González, J.F., Arrizón Gavino, J.P., Romano, P., Capece, A., and Gschaedler Mathis, A. (2005) The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letf. Appl. Microbiol.* **41**: 147-152.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F.B., Amores, A., Yan, Y.L., and Postlethwait, J. (1999) Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**: 1531-1545.
- Fu, Y.-X. and Li, W.-H. (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* **133**: 693-709.
- Gadaga, T.H., Mutukumira, A.N., Narvhus, J.A., and Feresu, S.B. (1999) A review of traditional fermented foods and beverages of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* **53**: 1-11.
- Gil, J.V., Manzanares, P., Genoves, S., Valles, S., and Gonzalez-Candelas, L. (2005) Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology* **103**: 57-68.
- Gimble, F.S. (2000) Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes. *FEMS Microbiology Letters* **185**: 99-107.
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., Zambonelli, C., and Rainieri, S. (1998) Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Letf. Appl. Microbiol.* **27**: 31-34.
- Glover, R.L.K., Abaidoo, R.C., Jakobsen, M., and Jespersen, L. (2005) Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* isolated from a survey of pito production sites in various parts of Ghana. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 755-761.

- Glushakova,A., Ivannikova,Y., Naumova,E., Chernov,I., and Naumov,G. (2007) Massive isolation and identification of *Saccharomyces paradoxus* yeasts from plant phyllosphere. *Microbiology* **76**: 205-210.
- Goffeau,A., Barrell,B.G., Bussey,H., Davis,R.W., Dujon,B., Feldmann,H. et al. (1996) Life with 6000 Genes. *Science* **274**: 546-567.
- Gogarten,J.P. and Townsend,J.P. (2005) Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Micro* **3**: 679-687.
- González,S.S., Barrio,E., Gafner,J., and Querol,A. (2006) Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* **6**: 1221-1234.
- González,S.S., Barrio,E., and Querol,A. (2008) Molecular characterization of new natural hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* from brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2314-2320.
- González,S.S., Gallo,L., Climent,M.D., Barrio,E., and Querol,A. (2007) Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *Int. J. Food Microbiol.* **116**: 11-18.
- Greig,D., Borts,R.H., Louis,E.J., and Travisano,M. (2002a) Epistasis and hybrid sterility in *Saccharomyces*. *Proc. R. Soc. Lond. ,B, Biol. Sci.* **269**: 1167-1171.
- Greig,D., Louis,E.J., Borts,R.H., and Travisano,M. (2002b) Hybrid speciation in experimental populations of yeast. *Science* **298**: 1773-1775.
- Greig,D., Travisano,M., Louis,E.J., and Borts,R.H. (2003) A role for the mismatch repair system during incipient speciation in *Saccharomyces*. *J. Evol. Biol.* **16**: 429-437.
- Groth,C., Hansen,J., and Piskur,J. (1999) A natural chimeric yeast containing genetic material from three species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1933-1938.
- Guerra,J.B., Araujo,R.A.C., Pataro,C., Franco,G.R., Moreira,E.S.A., Mendonça-Hagler,L.C., and Rosa,C.A. (2001) Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaca. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**: 106-111.
- Guillamón,J.M., Barrio,E., Huerta,T., and Querol,A. (1994) Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 708-714.
- Guillamón,J.M., Barrio,E., and Querol,A. (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Syst. Appl. Microbiol.* **19**: 122-132.
- Guillamón,J.M., Sabaté,J., Barrio,E., Cano,J., and Querol,A. (1998) Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* **169**: 387-392.
- Guo,S.W. and Thompson,E.A. (1992) Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* **48**: 361-372.
- Haard,N.F., Odunfa,S.A., Cherl-Ho,L., Quintero-Ramírez,R., Lorence-Quiñones,A., and Wachter-Radarte,C. (1999) *Fermented Cereals. A Global Perspective*. Roma: FAO Agricultural Services Bulletins.
- Hansen,J. and Kielland-Brandt,M.C. (1994) *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. *Gene* **140**: 33-40.
- Harrison,P.M. and Gerstein,M. (2002) Studying Genomes Through the Aeons: Protein Families, Pseudogenes and Proteome Evolution. *J. Mol. Biol.* **318**: 1155-1174.
- Haydon,D.T., Bastos,A.D.S., and Awadalla,P. (2004) Low linkage disequilibrium indicative of recombination in foot-and-mouth disease virus gene sequence alignments. *J Gen Virol* **85**: 1095-1100.
- Hayford,A.E. and Jespersen,L. (1999) Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented maize dough by profiles of assimilation,

Bibliografía

- chromosome polymorphism, PCR and MAL genotyping. *Journal of Applied Microbiology* **86**: 284-294.
- Hennequin,C., Thierry,A., Richard,G.F., Lecointre,G., Nguyen,H.V., Gaillardin,C., and Dujon,B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 551-559.
- Herskowitz,I. (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **52**: 536-553.
- Hey,J. (2001) The mind of the species problem. *Trends Ecol. Evol.* **16**: 326-329.
- Hittinger,C.T., Rokas,A., and Carroll,S.B. (2004) Parallel inactivation of multiple GAL pathway genes and ecological diversification in yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 14144-14149.
- Hudson,R.R. (1987) Estimating the recombination parameter of a finite population model without selection. *Genet Res* **50**: 245-250.
- Hudson,R.R., Kreitman,M., and Aguadé,M. (1987) A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. *Genetics* **116**: 153-159.
- Hudson,R.R. and Kaplan,N.L. (1985) Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* **111**: 147-164.
- Hudson,R.a.C.J. (2002) Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution* **56**: 1557-1565.
- Hughes,T.R., Roberts,C.J., Dai,H.Y., Jones,A.R., Meyer,M.R., Slade,D. et al. (2000) Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* **25**: 333-337.
- Huson,D.H. and Bryant,D. (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* **23**: 254-267.
- James,S.A., Chi,J.P., Roberts,I.N., and Collins,M.D. (1997) A 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.
- Jespersen,L. (2003) Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *FEMS Yeast Res.* **3**: 191-200.
- Jespersen,L., Nielsen,D.S., Honholt,S., and Jakobsen,M. (2005) Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* **5**: 441-453.
- Jeyaram,K., Singh,W.M., Capece,A., and Romano,P. (2008) Molecular identification of yeast species associated with 'Hamei' -- A traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *International Journal of Food Microbiology* **124**: 115-125.
- Johnson,L.J., Koufopanou,V., Goddard,M.R., Hetherington,R., Schafer,S.M., and Burt,A. (2004) Population Genetics of the Wild Yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* **166**: 43-52.
- Johnston,J.R.y.M.R.K. (1986) Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 569-572.
- Jordan,P.W., Klein,F., and Leach,D.R.F. (2007) Novel Roles for Selected Genes in Meiotic DNA Processing. *PLoS Genet* **3**: e222.
- Jubany,S., Tomasco,I., Ponce de Leon,I., Medina,K., Carrau,F., Arrambide,N. et al. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Yeast Research, 2008. In Press
- Kellis,M., Birren,B.W., and Lander,E.S. (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**: 617-624.

- Kellis,M., Patterson,N., Endrizzi,M., Birren,B.W., and Lander,E.S. (2003) Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature* **423**: 241-254.
- Kimura M. (1983) *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Kimura,M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**: 624-626.
- Kishimoto,M. (1994) Fermentation characteristics of hybrids between the cryophilic wine yeast *Saccharomyces bayanus* and the mesophilic wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 432-435.
- Knop,M. (2006) Evolution of the hemiascomycete yeasts: on life styles and the importance of inbreeding. *BioEssays* **28**: 696-708.
- Koszul,R., Dujon,B., and Fischer,G. (2006) Stability of Large Segmental Duplications in the Yeast Genome. *Genetics* **172**: 2211-2222.
- Koufopanou,V., Hughes,J., Bell,G., and Burt,A. (2006) The spatial scale of genetic differentiation in a model organism: the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. ,B,Biol. Sci.* **361**: 1941-1946.
- Kovacech,B., Nasmyth,K., and Schuster,T. (1996) EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3264-3274.
- Kreitman,M. (2000) Methods to detect selection in populations with applications to the human. *ANNUAL REVIEW OF GENOMICS AND HUMAN GENETICS* **1**: 539-559.
- Kuehne,H.A., Murphy,H.A., Francis,C.A., and Sniegowski,P.D. (2007) Allopatric Divergence, Secondary Contact, and Genetic Isolation in Wild Yeast Populations. *Curr. Biol.* **17**: 407-411.
- Kumar,S., Tamura,K., and Nei,M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Kurtzman,C.P. and Fell,J.W. (2000) *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Kurtzman,C.P. and Robnett,C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.
- Kurtzman,C.P. and Robnett,C.J. (2003) Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* **3**: 417-432.
- Kurtzman,C.F.J. (1998) *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Lachance,M.A. (1995) Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* **68**: 151-160.
- Legras,J.L., Merdinoglu,D., Cornuet,J.M., and Karst,F. (2007) Bread, Beer and Wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol. Ecol.* **16**: 2091-2102.
- Legras,J.L., Ruh,O., Merdinoglu,D., and Karst,F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 73-83.
- Liti,G., Peruffo,A., James,S.A., Roberts,I.N., and Louis,E.J. (2005) Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **22**: 177-192.
- Liti,G., Barton,D.B.H., and Louis,E.J. (2006) Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics* **174**: 839-850.
- Liti,G. and Louis,E.J. (2005) Yeast evolution and comparative genomics. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 135-153.

Bibliografía

- Llorente,B., Durrens,P., Malpertuy,A., Aigle,M., Artiguenave,F., Blandin,G. et al. (2000) Genomic Exploration of the Hemiascomycetous Yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **487**: 122-133.
- Lopandic,K., Gangl,H., Wallner,E., Tschek,G., Leitner,G., Querol,A. et al. (2007) Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* **7**: 953-965.
- López,V., Querol,A., Ramón,D., and Fernández-Espinar,M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **68**: 75-81.
- Lynch,M. and Force,A. (2000) The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* **154**: 459-473.
- Maclean,C. and Greig,D. (2008) Prezygotic reproductive isolation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus*. *BMC Evol. Biol.* **8**: 1.
- Mallet,J. (1995) A species definition for the modern synthesis. *Trends Ecol. Evol.* **10**: 294-299.
- Marinoni,G., Manuel,M., Petersen,R.F., Hvidtfeldt,J., Sulo,P., and Piskur,J. (1999) Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts. *J. Bacteriol.* **181**: 6488-6496.
- Martini,A. (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Wine Res.* **4**: 165-176.
- Masneuf,I., Hansen,J., Groth,C., Piškur,J., and Dubourdieu,D. (1998) New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3887-3892.
- McDonald,J.H. and Kreitman,M. (1991) Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* **351**: 652-654.
- McGovern,P.E., Hartung,U., Badler,V.R., Glusker,D.L., and Exner,L.J. (1997) The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient Near East and Egypt. *Expedition* **39**: 3-21.
- Metzenberg,R.L. and Glass,N.L. (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *Bioessays* **12**: 53-59.
- Michel,R.H., McGovern,P.E., and Badler,V.R. (1992) Chemical evidence for ancient beer. *Nature* **360**: 24.
- Morrissey,W.F., Davenport,B., Querol,A., and Dobson,A.D.W. (2004) The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 647-655.
- Mortimer,R.K. and Polsinelli,M. (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* **150**: 199-204.
- Mortimer,R.K., Romano,P., Suzzi,G., and 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.
- Mortimer,R.K. (2000) Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. *Genome Res.* **10**: 403-409.
- Mortimer,R.K. and Johnston,J.R. (1986) Genealogy of principal strains of the Yeast Genetic Stock Center. *Genetics* **113**: 35-43.
- Moure,C.M., Gimble,F.S., and Quijcho,F.A. (2003) The Crystal Structure of the Gene Targeting Homing Endonuclease I-SceI Reveals the Origins of its Target Site Specificity. *Journal of Molecular Biology* **334**: 685-695.

- Mugula, J.K., Nnko, S.A.M., Narvhus, J.A., and Sørhaug, T. (2003) Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* **80**: 187-199.
- Murén, E.M.Ö.G.B.H.R. (2001) Identification of yeast deletion strains that are hypersensitive to brefeldin A or monensin, two drugs that affect intracellular transport. *Yeast* **18**: 163-172.
- Nadal, D., Colomer, B., and Pina, B. (1996) Molecular polymorphism distribution in phenotypically distinct populations of wine yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1944-1950.
- Naumov, G.I. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 295-302.
- Naumov, G.I., James, S.A., Naumova, E.S., Louis, E.J., and Roberts, I.N. (2000a) Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1931-1942.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Gaillardin, C. (1993) Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* yeast isolated in France and Italy. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 274-279.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Hagler, A.N., Mendonça-Hagler, L.C., and Louis, E.J. (1995) A new genetically isolated population of the *Saccharomyces sensu stricto* complex from Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**: 351-355.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Masneuf, I., Aigle, M., Kondratieva, V.I., and Dubourdieu, D. (2000b) Natural polyploidization of some cultured yeast *Saccharomyces sensu stricto*: Auto- and allotetraploidy. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 442-449.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Sancho, E.D. (1996) Genetic reidentification of *Saccharomyces* strains associated with black knot disease of trees in Ontario and *Drosophila* species in California. *Can. J. Microbiol.* **42**: 335-339.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Sniegowski, P.D. (1997) Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 341-344.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., and Sniegowski, P.D. (1998) *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Can. J. Microbiol.* **44**: 1045-1050.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Turakainen, H., Suominen, P., and Korhola, M. (1991) Polymeric genes *MEL8*, *MEL9* and *MEL10* - new members of a-galactosidase gene family in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **20**: 269-276.
- Naumova, E.S., Korshunova, I.V., Jespersen, L., and Naumov, G.I. (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Res.* **3**: 177-184.
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Ness, F., F.Lavallée, D.Dubordieu, M.Aigle, and L.Dulau (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* **62**: 89-94.
- Nguyen, H.V., Lepingle, A., and Gaillardin, C. (2000) Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae* including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**: 71-85.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., and Deerfield, D.W. (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBO News* **4**: 14.
- Nielsen, D.S., Honholt, S., Tano-Debrah, K., and Jespersen, L. (2005) Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* **22**: 271-284.

Bibliografía

- Nout, M.J.R. (2003) Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia. In *Yeasts in food*. Boekhout, T. and Robert, V. (eds). Abington: Woodhead Publishing Ltd, 451-473.
- Ohta, T. (1983) On the evolution of multigene families. *Theoretical Population Biology* **23**: 216-240.
- Ortiz-Basurto, R.I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., and Belleville, M.P. (2008) Analysis of the Main Components of the Aguardiente Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *J. Agric. Food Chem.* **1**: 1.
- Owuama, C. and Saunders, J. (1990) Physiological variants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* from palm wine and cashew juice. *The journal of applied bacteriology* **68**: 491-494.
- Palaisa, K., Morgante, M., Tingey, S., and Rafalski, A. (2004) Long-range patterns of diversity and linkage disequilibrium surrounding the maize Y1 gene are indicative of an asymmetric selective sweep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 9885-9890.
- Paterson, H.E.H. (1985) The recognition concept of species. In *Species and speciation*. Vrba, E.S. (ed). Pretoria: Transvaal Museum Monograph No. 4, 21-29.
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., and Compagno, C. (2006) How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* **22**: 183-186.
- Pretorius, I., van der Westhuizen T, and Augustyn O (1999) Yeast biodiversity in vineyard and wineries and its importance to the South African wine industry. *S Afric J Enol Vitic* **20**: 61-74.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675-729.
- Price, C.G.B.F.a.H.J.P. (1978) Genome comparison in yeast systematic delimitation of species within the genera *Scwanniomycetes*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, and *Pichia*. *Microbiol. Rev* **42**: 161-193.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E., and Perez-Ortin, J.E. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2057-2061.
- Pulvirenti, A., Solieri, L., Gullo, M., De Vero, L., and Giudici, P. (2004) Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology* **38**: 113-117.
- Pulvirenti, A., Zambonelli, C., Todaro, A., and Giudici, P. (2002) Interspecific hybridisation by digestive tract of invertebrates as a source of environmental biodiversity within the *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* **52**: 245-255.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., and Ramon, D. (1992a) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2948-2953.
- Querol, A., Barrio, E., and Ramon, D. (1992b) A comparative study of different methods of yeast-strain characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 439-446.
- Querol, A., Barrio, E., and Ramón, D. (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **21**: 315-323.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M., and Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **86**: 3-10.
- Querol, A. and Ramon, D. (1996) The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.* **7**: 73-78.
- Rachidi, N., Barre, P., and Blondin, B. (1999) Multiple Ty-mediated chromosomal translocation lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 841-850.

- Rainieri, S., Zambonelli, C., and Kaneko, Y. (2003) *Saccharomyces sensu stricto*: systematics, genetic diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.* **96**: 1-9.
- Redzepovic, S., Orlic, S., Majdak, A., and Pretorius, I.S. (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian wines. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**: 305-310.
- Reuter, M., Bell, G., and Greig, D. (2007) Increased outbreeding in yeast in response to dispersal by an insect vector. *Current Biology* **17**: R81-R83.
- Rieseberg, L.H. (1997) Hybrid origins of plant species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**: 359-389.
- Riofrío, J., I.S., F.C., M.C., and M.C. (2003) Caracterización limnológica de la laguna de Cashibococha (Ucayali-Perú) durante el año 2001. *Rev. Perú biol* **10**: 183-194.
- Rokas, A., Williams, B.L., King, N., and Carroll, S.B. (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**: 798-804.
- Romano, P., Capece, A., and Jespersen, L. (2006) Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*. Querol, A. and Fleet, G.H. (eds). Berlin: Springer-Verlag, 13-54.
- Rosi, I.V.M.D.P. (1994) Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J Appl Bacteriol.* **77**: 519-527.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.
- Ryu, S.L., Mikata, K., Murooka, Y., and Kaneko, T. (1998) A simple PCR method for distinguishing *Saccharomyces cerevisiae* from its sibling species by amplification of the *RPL2* region. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 249-252.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sampaio, J.P. and Gonçalves, P. (2008) Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 2144-2152.
- Sánchez-Marroquín, A. and Hope, P.H. (1953) Agave Juice, Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species. *J. Agric. Food Chem.* **1**: 246-249.
- Sato, M., Kishimoto, M., Watari, J., and Takashio, M. (2002) Breeding of brewer's yeast by hybridization between a top-fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and a cryophilic yeast *Saccharomyces bayanus*. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 509-511.
- Scannell, D.R., Butler, G., and Wolfe, K.H. Yeast genome evolution - the origin of the species. *Yeast* . 2007.
- Schütz, M. and Gafner, J. (1994) Dynamics of the yeast strain population during spontaneous alcoholic fermentation determined by CHEF gel electrophoresis. *Lett. Appl. Microbiol.* **19**: 253-257.
- Sebastiani, F., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., and Polsinelli, M. (2002) Crosses between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* generate fertile hybrids. *Res. Microbiol.* **153**: 53-58.
- Serra, A., Strehaiano, P., and Taillandier, P. (2005) Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast interspecific hybridization on these parameters. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 257-265.
- Sherman, F., Fink, G.R., and y Hicks, J.B. (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbord, NY: Cold Spring Harbord Laboratory.
- Slatkin, M.a.E.L. (1996) Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity* **76**: 377-383.
- Slavikova, E. and Vadkertiova, R. (1997) Seasonal occurrence of yeasts and yeast-like organisms in the river Danube. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 77-80.
- Sniegowski, P.D., Dombrowski, P.G., and Fingerman, E. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in

Bibliografía

- North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* **1**: 299-306.
- Sotero, V., D. Garcia, and E. Lessi (1996) Bebida fermentada a partir de pijuayo (*Bactris gasipaes* H.B.K.). Parámetros y evaluación. *Folia Amazonica* **8**: 5-18.
- Steinkraus, K. (1996) *Handbook of Indigenous Fermented Foods*.
- Taanman, J.W. and Capaldi, R.A. (1992) Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**: 22481-22485.
- Tachibana, C., Yoo, J.Y., Tagne, J.B., Kacherovsky, N., Lee, T.I., and Young, E.T. (2005) Combined Global Localization Analysis and Transcriptome Data Identify Genes That Are Directly Coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 2138-2146.
- Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* **105**: 437-460.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**: 585-595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Taylor, J.W., Jacobson, D.J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D.M., Hibbett, D.S., and Fisher, M.C. (2000) Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet. Biol.* **31**: 21-32.
- Templeton, A.R. (1989) The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In *Speciation and its consequences*. Endler, J.A. (ed). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 3-27.
- This, P., Lacombe, T., and Thomas, M.R. (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* **22**: 511-519.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Traven, A., Jelcic, B., and Sopta, M. (2006) Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep.* **7**: 496-499.
- Tsai, I.J., Bensasson, D., Burt, A., and Koufopanou, V. (2008) Population genomics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*: Quantifying the life cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 4957-4962.
- Ulloa, M., T, H., and P, L. (1987) *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. Mexico: Instituto Nacional Indigenista.
- Valente, P., Ramos, J.P., and Leoncini, O. (1999) Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can. J. Microbiol.* **45**: 949-958.
- van der Aa Kuhle, A., Jespersen, L., Glover, R.L.K., Diawara, B., and Jakobsen, M. (2001) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from West African sorghum beer. *Yeast* **18**: 1069-1079.
- Van Valen, L. (1976) Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* **25**: 233-239.
- Vaughan-Martini, A. and Kurtzman, C.P. (1985) Deoxyribonuclease-acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**: 508-511.
- Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1995) Facts, Myths and Legends on the Prime Industrial Microorganism. *J. Ind. Microbiol.* **14**: 514-522.
- Vaughan-Martini, A. and 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.

- Wacher,C., A.Cañas, P.E.Cook, E.Bárzana, and J.D.Owens (1993) Sources of microorganisms in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **9**: 269-274.
- Wacher-Rodarte,C. (1995) *Alimentos y bebidas fermentados tradicionales*. In *Biocnología Alimentaria*. García-Garibay,M.Q.R.a.A.L.-M. (ed). México: Limusa, 313-349.
- Wagner,A. (1998) The fate of duplicated genes: loss or new function? *BioEssays* **20**: 785-788.
- Wagner,A. (2000) Robustness against mutations in genetic networks of yeast. *Nat. Genet.* **24**: 355-361.
- Wang,S.A. and Bai,F.Y. (2008) *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 510-514.
- Watterson,G.A. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Pop. Biol.* **7**: 256-276.
- White,T.J., Bruns,J.T., Lee,E., and Taylor,J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide of Methods and Applications*. Innis,M.A., Gelfand,D.H., Sninsky,J.J., and White,T.J. (eds). San Diego, CA: Academic Press, 315-322.
- Wiley,E.O. (1978) The evolutionary species concept reconsidered. *Syst. Zool.* **27**: 17-26.
- Wolfe,K.H. and Shields,D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708-713.
- Zambonelli,C., Passarelli,P., Rainieri,S., Bertolini,L., Giudici,P., and Castellari,L. (1997) Technological properties and temperature response of interspecific *Saccharomyces* hybrids. *J. Sci. Food. Agric.* **74**: 7-12.

Con técnicas moleculares se detectó a *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* en bebidas tradicionales de Latinoamérica, y se demostró que *S. cerevisiae* presenta propiedades tecnológicas adecuadas para una fermentación vínica. Con el análisis filogenético, se detectó que *S. cerevisiae* esta compuesta por dos poblaciones, una de ambientes vínicos y la otra de ambientes no vínicos, muy diferentes entre ellas. Las poblaciones vínicas se caracterizan por ser un grupo muy homogéneo, con baja tasa de recombinación, alta frecuencia de homocigosis, con menos diversidad genotípica y menos divergencia nucleotídica. Esto indica una reciente domesticación, con reproducción clonal y sucesos de autodiploidización. En cambio, las poblaciones no vínicas están formadas por un grupo muy heterogéneo, con reproducción clonal pero la reproducción sexual más frecuente por anfimixis. La detección de alelos vínicos y no vínicos entre las cepas de las poblaciones latinoamericanas indica que existe flujo genético entre ambas poblaciones. Por otro lado, se detectó que los alelos vínicos de *S. cerevisiae* no provienen de *S. paradoxus* sino de los alelos no vínicos de *S. cerevisiae*. Finalmente se proponen que al menos tres eventos de hibridación dieron origen a las cepas híbridas aisladas de vinos, y probablemente a partir de uno solo para las cepas híbridas cerveceras. Sin embargo, los fenómenos de recombinación y de introgresión detectados entre diferentes especies de *Saccharomyces* permiten suponer que la hibridación puede ocurrir con mayor frecuencia.

