

Ingeniería metabólica en *Saccharomyces cerevisiae* y estudio de levaduras nativas productoras de aromas isoprenoides

por

Q.F.B.C. Marianne Barquet

Tesis entregada como parte de los requerimientos
para la obtención del título de

MAGISTER EN QUÍMICA

Facultad de Química
Universidad de la República

2012

Uruguay

Director: Dra. Carina Gaggero

Codirector: Dr. Francisco Carrau

Departamento de Biología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable - M.E.C.

Sección Enología

Cátedra de Ciencia y Tecnología de los Alimentos-Facultad de Química

A mis padres, Beatriz y Sergio

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo.

A mis padres y mis hermanos, especialmente a Nicolás, gracias por el apoyo incondicional a lo largo de todo este tiempo.

A mis tutores, Dra. Carina Gaggero y al Dr. Francisco Carrau, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo y por sus enseñanzas durante todo este tiempo.

A los Dres. Eduardo Boido, Laura Fariña y Eduardo Dellacassa quienes fueron pilares fundamentales en cuanto se refiere al estudio de los aromas de los vinos.

A todos mis compañeros de Laboratorio del Departamento de Biología Molecular y de la sección Enología de Facultad, a los que aún están y los que han seguido otros caminos, por los buenos momentos y por todo lo que he aprendido con ustedes.

A las Cátedras de Farmacognosia y Productos Naturales, Alimentos y Microbiología de Facultad de Química y al Laboratorio de Biología Celular de Membranas del IPMon por prestarnos sus equipos e infraestructura para hacer posible la realización de este trabajo.

Finalmente a los organismos que colaboraron con el financiamiento del trabajo; ANII (Beca de iniciación y posgrado), PEDECIBA Química, CSIC, Bodegas Carrau.

Parte de este trabajo de Tesis ha sido publicado y presentado en congresos:

Artículos completos publicados en revistas arbitradas

- “Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-Saccharomyces subspecies”. Barquet M, Martín V, Medina K, Pérez G, Carrau F. and Gaggero C. 2012. Applied Microbiology and Biotechnology, v.: 93, p.:807-814. ISSN: 01757598.

Presentaciones en eventos

- “Impacto de la Ingeniería metabólica sobre la producción de vinos de exportación”. Barquet M, Fariña L, Boido E, Aguilar PS, Eduardo Dellacassa E, Carrau F. and Gaggero C. XIII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Santiago de Chile. 2011.
- “Biosíntesis de aromas monoterpenoides por Saccharomyces cerevisiae en ausencia de genes o precursores vegetales”. Barquet M, Fariña L, Boido E, Aguilar PS, Eduardo Dellacassa E, Carrau F and Gaggero C. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología/ IX Encuentro Nacional de Microbiólogos 2010.
- “Nuevo método de PCR para discriminar cepas dentro de una misma especie de levaduras no-Saccharomyces”. Barquet M, Martin V, Medina K, Perez G, Carrau F and Caggero C. XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, 2009.
- “Utilización de levaduras no-Saccharomyces en Chardonnay: Estudio del impacto sobre el potencial aromático en vinos de alta gama.” Elzaurdia Í, Sosa M, Barquet M, Medina K, Carrau M, Gioia O, Gaggero C. and Carrau F. XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología. 2009.

Abreviaturas

A	adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparragina
Asp	Aspartico
bp	pares de base
C	citosina
°C	grados Celsius
Cel/mL	células por mililitro
CoA	Coenzima A
COQ	Coenzima Q
DMAPP	dimetilalilpirofosfato
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm
FPP	farnesilpirofosfato
FPPS	farnesilpirofosfato sintetasa o sintasa
g	Gramo
mg	Miligramos
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
G	guanina
GC	Cromatografía gaseosa
GGPP	geranilgeranilpirofosfato
Gln	Glutamina
Glu	glutámico
Gly	Glicina
GPP	geranilpirofosfato
GRAS	Generalmente considerado como seguro
His	histidina
HMG-CoA	hidroximetil glutaril Coenzima A
HPP	Hexaprenilpirofosfato
hs	Horas
Ile	Isoleucina
IPP	isopentenilpirofosfato
L	litro
mL	mililitro
µL	microlitro
λ	longitud de onda
Leu	Leucina

Lys	Lisina
µm	Micras
nm	nanómetros
M	Molar
mM	Micromolar
nM	Nanomolar
m/z	relación masa con respecto a la carga
MEP/DOXP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato/ 1-desoxi-D-xylulosa 5-fosfato
Met	Metionina
min	Minutos
MS	espectrometría de masa
MVA	vía ácido mevalonico
p	Probabilidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de hidrogeniones
Phe	fenilalanina
r.p.m.	revoluciones por minuto
rRNA	acido ribonucleico ribosomal
s	segundos
Ser	serina
SIM	monitoreo de iones simple
SNPs	Polimorfismos de nucleótidos simples
T	timina
Thr	treonina
TIC	Corriente Iónica Total
Tm	Temperatura de annealing
Tr	tiempo de retención
tRNAs	acido ribonucleico de transferencia
Trp	triptófano
Tyr	tirosina
U	unidad
uma	unidades de masa atómica.
Ura	Uracilo
V/cm	Relación directa voltios con centímetros
v/v	Relación volumen con volumen
Val	valina

Indice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	2
Isoprenoides.....	2
Rutas metabólicas.....	4
Usos de los Isoprenoides.....	9
OBJETIVOS	12
Capítulo I. Sobreproducción de Coq1p	13
Los monoterpenos en el aroma del vino y justificación del trabajo.....	13
Materiales y Métodos.....	18
Modificación de la expresión del gen <i>COQ1</i>	19
Cepas.....	19
Plásmidos.....	19
Cebadores.....	20
Medios de cultivo.....	20
Transformación.....	21
Fermentaciones.....	22
Medio similar mosto.....	23
Condiciones de crecimiento.....	24
Seguimiento de la fermentación/crecimiento en fase exponencial.....	25
Análisis de isoprenoides.....	25
Medio similar vino.....	25
Puesta a punto de metodología analítica para el análisis de isoprenoides.....	26
Extracción y concentración de isoprenoides.....	26
Determinación de isoprenoides.....	27
Análisis estadístico de los datos.....	29
Resultados y Discusión.....	30

Modificación de la expresión del gen <i>COQ1</i>	30
Resultados de la Puesta a Punto de la metodología analítica para el análisis de isoprenoides.....	32
Cinética de crecimiento: crecimiento en fase exponencial y Fermentación.....	41
Análisis estadístico.....	52
Discusión.....	53
Capítulo II. Diversidad molecular de <i>COQ1</i>	57
Introducción.....	57
Coenzima Q (COQ).....	57
Diversidad molecular de <i>COQ1</i> en cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nativas de Uruguay.....	65
Materiales y Métodos.....	69
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
Diseño de cebadores.....	69
Amplificación por PCR.....	71
Análisis de las secuencias de <i>COQ1</i>	71
Resultados y Discusión.....	73
Análisis de los cromatogramas.....	73
Análisis de las secuencias.....	74
Capítulo III. Caracterización molecular de cepas no-<i>Saccharomyces</i> nativas uruguayas productores de aromas de interés	82
Introducción.....	82
Levaduras no- <i>Saccharomyces</i>	82
Tipificación Molecular.....	83
Materiales y Métodos.....	86
Cepas de levaduras no – <i>Saccharomyces</i>	86
Cebadores.....	87
Cultivo de levaduras y extracción de ADN genómico.....	87
Caracterización molecular a nivel de especie.....	88
Caracterización molecular de individuos dentro de una misma especie..	88

Diseño de Cebadores.....	88
Análisis por PCR.....	89
Análisis de Clusters.....	90
Resultados y Discusión.....	91
Diseño de cebadores.....	91
Análisis por PCR con los distintos cebadores.....	91
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	108
Anexo I. Curvas de calibración para la cuantificación de isoprenoides.....	108
Anexo II. Secuencias del gen <i>COQ1</i> obtenidas con las cepas nativas.....	116
Anexo III. Resultados del análisis de la amplificación por PCR para los distintos cebadores ensayados.....	122
Anexo IV Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-Saccharomyces subspecies (Barquet et al., 2012).....	128

Resumen

Los isoprenoides o terpenoides comprenden una familia numerosa y estructuralmente muy diversa de productos naturales. Los isoprenoides se consideran metabolitos secundarios aunque cumplen funciones en varios procesos básicos de las plantas. En los aceites esenciales de muchas plantas se encuentran tanto monoterpenos (terpenos de 10 carbonos) como sesquiterpenos (compuestos de 15 carbonos). Son ampliamente utilizados a nivel industrial como productos farmacéuticos, aditivos aromáticos, pesticidas, desinfectantes y como potenciales biocombustibles.

En el caso de los vinos, los terpenos son característicos de variedades “aromáticas”. Tradicionalmente se ha considerado que los aromas terpenoides de un vino provienen únicamente de precursores vegetales. Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de biosíntesis de terpenoides por levaduras en ausencia de genes o precursores vegetales. Se ha propuesto una posible vía metabólica para explicar este hallazgo que incluye al gen *COQ1* sobre el final de la ruta.

En este trabajo se confirmó la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) de sintetizar de *novo* mono y sesquiterpenos. En condiciones de crecimiento en fase exponencial el gen *COQ1* participa en la síntesis de isoprenoides cumpliendo una función de geranylpirofosfato sintasa no descrita previamente. También se comprueba una actividad de nerolidol sintasa. Los niveles de isoprenoides aumentan al sobreproducir *COQ1* en estas condiciones, en particular para el sesquiterpeno nerolidol y el monoterpeno geraniol, alcanzando una producción de nerolidol del orden de 300 µg/L. Al analizar un conjunto de cepas de *S. cerevisiae* nativas uruguayas se encontraron nuevos polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) en *COQ1*.

Se desarrolló un nuevo método de PCR, rápido, sencillo y reproducible, que permite discriminar individuos dentro de una misma especie en levaduras no-*Saccharomyces* nativas productoras de aromas isoprenoides. La variabilidad intraespecífica encontrada en cepas nativas de *S. cerevisiae* (detección de nuevos SNPs) y en las levaduras no-*Saccharomyces* se podrá utilizar junto a esta estrategia de ingeniería metabólica para producir isoprenoides con impacto no sólo en la producción de vinos, sino también en la producción de aromas y fragancias, en la salud humana y en la protección vegetal.

Introducción General

Isoprenoides

Los isoprenoides o terpenoides comprenden una familia numerosa y estructuralmente muy diversa de productos naturales. Son polímeros de la molécula isopreno (2-metil-1,3-butadieno) y se clasifican según su número en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos.

Hemiterpenos: con una sola unidad de isopreno, poseen 5 carbonos. Como ejemplo están los hidrocarburos volátiles, como es el hemiterpeno 2-metil-1,3-butadieno, liberados por los álamos a la atmósfera, siendo importantes en la investigación de biomateriales y biocombustibles (Bohlmann & Keeling, 2008).

Monoterpenos: son terpenos de 10 carbonos, se encuentran en los aceites esenciales de muchas plantas a las que dan su olor y sabor característicos: mentol, geraniol, limoneno, pineno, alcanfor, etc. Se utilizan comercialmente como compuestos aromáticos de sabor y como fragancias (por ejemplo, citronelol y geraniol).

Sesquiterpeno: terpenos de 15 carbonos, están presentes en los aceites esenciales. Un ejemplo es la artemisinina que se utiliza como antimalárico.

Diterpenos: (cuatro isoprenos, 20 carbonos) Es de destacar el fitol que forma parte de la clorofila y es precursor de la vitamina A. Las vitaminas A, E y K también son diterpenos. Dentro de estos compuestos encontramos entre otros, al diterpeno paclitaxel (Taxol) utilizado como anti carcinogénico y las giberelinas usadas como agroquímicos.

Triterpenos: Terpenos de 30 carbonos, se utilizan como medicamentos a base de hierbas como son la glicirricina y ginsenósidos,

Tetraterpenos: (ocho isoprenos, 40 carbonos). En este grupo son abundantes las xantofilas y carotenos que son pigmentos vegetales amarillo y anaranjado respectivamente. Dan color a los frutos, raíces (zanahoria), flores, etc. En la fotosíntesis absorben energía luminosa (UV) de longitudes de onda diferentes con las que capta la clorofila. El caroteno es precursor de la vitamina A. El licopeno, un pigmento carotenoide rojo contenido en el tomate y sandía, tiene propiedades antioxidantes y se ha considerado su uso para prevenir el cáncer de próstata; la astaxantina otro

carotenoides rojo, que se encuentra en animales de mar como los cangrejos, camarones y peces de color rojo, es un potente antioxidante que combate el estrés oxidativo mediante la captación de radicales libres y se ha visto que es beneficioso para prevenir enfermedades cardiovasculares y así como el envejecimiento celular (Chemler et al., 2006; Martin et al., 2003; Misawa 2011; Dudareva et al. 2005).

Politerpenos. Contienen más de 8 unidades de isopreno, incluyen la plastoquinona y la ubiquinona.

Históricamente, los isoprenoides se han considerado como metabolitos secundarios.

Actualmente se reconoce su función en numerosas procesos básicos de las plantas, incluyendo la respiración, fotosíntesis (pigmentos captadores de luz), crecimiento (actividades de regulación de las hormonas terpenoides vegetales), desarrollo, reproducción (su emisión de las flores promueve las interacciones planta-polinizador), defensa contra los insectos herbívoros y los ataques de patógenos y también participan en la adaptación a las condiciones ambientales.

Como ya se mencionó anteriormente los terpenoides de plantas son ampliamente utilizados como productos químicos de interés industrial, incluidos muchos productos farmacéuticos, aditivos aromáticos en las industrias de alimentos y cosméticos, pesticidas, desinfectantes y como potenciales biocombustibles.

Estos compuestos son comúnmente aislados de plantas aunque se obtienen bajos rendimientos e impurezas en las extracciones y se requiere un alto consumo de recursos naturales. Teniendo en cuenta que la síntesis química resulta difícil y costosa debido a la complejidad estructural de estos compuestos, se han buscado métodos alternativos para producir compuestos terpenoides de alto valor (Oswald et al., 2007; Martin et al., 2003; Misawa, 2011; Bohlmann & Keeling, 2008).

Rutas Metabólicas

A pesar de la diversidad que presentan los isoprenoides, todos se originan a partir de la condensación de los precursores universales de cinco carbonos, isopentenilpirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalilpirofosfato (DMAPP).

En las plantas superiores, los bloques de construcción de cinco carbonos de todos los terpenoides, el IPP y DMAPP, se derivan de dos vías independientes, localizadas en diferentes compartimientos celulares.

La vía clásica del mevalonato (MVA) también llamada vía de HMG-CoA reductasa (hidroximetil glutaril CoA reductasa), localizada en el citosol, parte de la condensación de acetil-CoA y el pool citosólico generado de IPP sirve como precursor para el farnesilpirofosfato (FPP) y la biosíntesis de sesquiterpenos y triterpenos.

La vía alternativa, metil eritritol fosfato MEP/DOXP, llamada no-mevalonato o vía gliceraldeído 3- fosfato/piruvato, localizada en los plástidos, proporciona IPP y DMAPP a partir de piruvato y gliceraldeído 3-fosfato como precursores de geranilpirofosfato (GPP), geranilgeranilpirofosfato (GGPP) y en última instancia, hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (Eisenreich et al., 1998, Boucher & Doolittle, 2000) (Figura 1). Recientemente trabajos de ingeniería metabólica en *Arabidopsis* y tabaco revelaron la existencia de pequeños niveles de FPP en plástidos y GPP en el citosol (Aharoni et al, 2003; Wu et al, 2006).

En la vía alternativa el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato se propone su formación a partir de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato a través del reordenamiento intramolecular seguido por un proceso de reducción, siendo uno de los precursores para la biosíntesis de IPP (Takahashi et al., 1998).

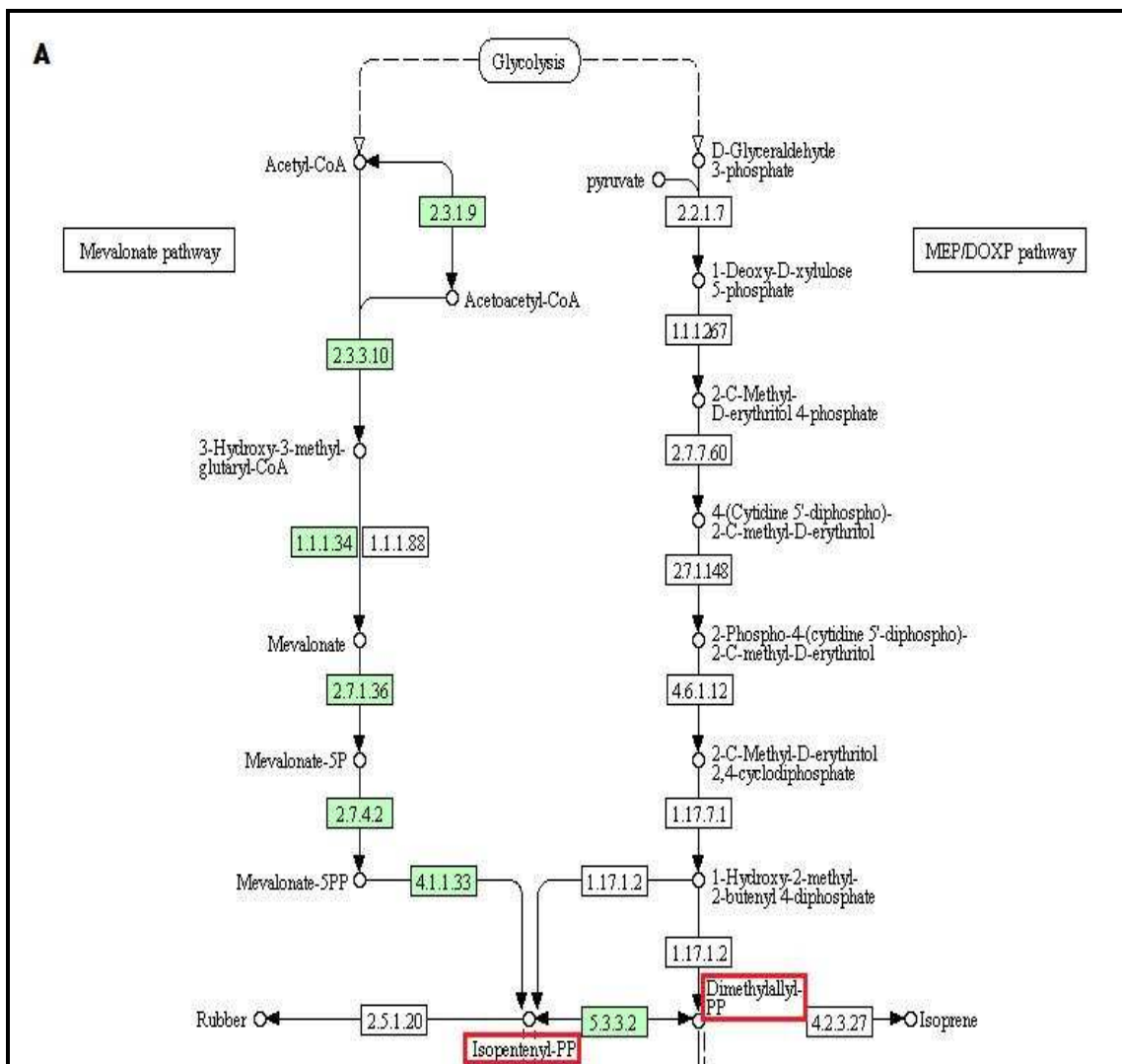
En el trabajo de Rodríguez et al., 2004 se proporciona la primera evidencia genética de la existencia de un vínculo metabólico entre la biosíntesis de isoprenoides y el catabolismo de la leucina.

Si bien el cruzamiento de diferentes IPP entre estas dos vías biosintéticas se ha documentado, las contribuciones relativas de cada vía a la biosíntesis de las diversas clases de terpenos siguen siendo inciertas. Mediante el marcado de precursores con isótopos estables, trabajando en plantas superiores, se ha observado la emisión de mono

y sesquiterpenos, la localización de la formación de terpenos volátiles en los plástidos, y el tráfico de IPP unidireccional de plástidos al citosol (Dudareva et al., 2005).

Varias eubacterias incluyendo *Escherichia coli* (*E.coli*) utilizan la vía alternativa no mevalonato para la biosíntesis de IPP en lugar de la vía ubicua mevalonato.

Los eucariotas, con la excepción de los eucariontes fotosintéticos, sólo utilizan la vía MVA. En la mayoría de las plantas y algas, además de la vía MVA con actividad en el citoplasma, opera la vía DOXP en sus cloroplastos (Boucher & Doolittle, 2000).



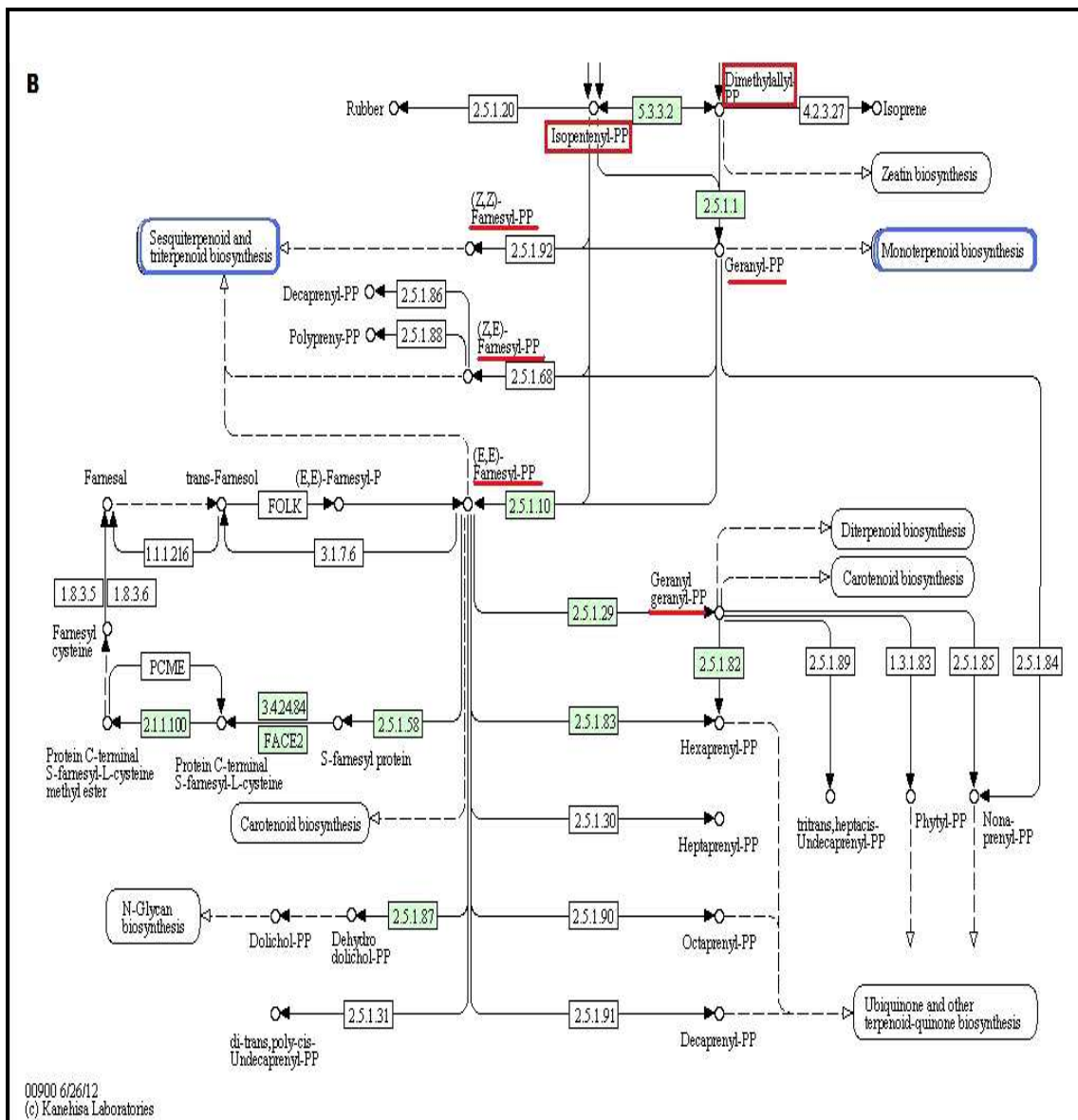


Figura 1 Vías metabólicas de síntesis de isoprenoides. A) Vía del Acido mevalónico (citósol de eucariotas) y la vía alternativa MEP/DOXP (plástidos de eucariotas/bacterias). B) Formación de los distintos isoprenoides a partir de los precursores IPP y DMAPP. Tomada de la base de datos, <www.genome.jp>.

En levaduras, la vía de mevalonato está principalmente dirigida hacia la formación de ergosterol (provitamina D2) que es esencial ya que le brinda fluidez y permeabilidad a la membrana.

El precursor universal de los monoterpénidos es el Geranylpirofosfato (GPP). En levaduras aparece como producto intermedio de síntesis de farnesilpirofosfato (FPP) (Oswald et al, 2007). La reacción de dos pasos que conduce a la síntesis de FPP está

catalizada por la farnesilpirofosfato sintetasa (FPPS) codificada por el gen *ERG20*. En la primera etapa de esta reacción FPPS condensa isopentenilpirofosfato (IPP) y dimetilalilpirofosfato (DMAPP) para formar geranylpirofosfato (GPP), con el fin de añadir otra molécula de IPP en el segundo paso (Kuranda et al. 2010).

FPP es el precursor de varias clases de metabolitos esenciales para la levadura que se utilizan en varias rutas biosintéticas como ergosterol, dolicoles y geranylgeranylpirofosfato (GGPP), los que contribuyen con la estructura de la membrana, la síntesis de la pared celular, prenilación de proteínas y síntesis de ubiquinona y el grupo hemo (Ver Figura 2).

La primera enzima que consume FPP y es parte de la rama de la biosíntesis de esteroides es la escualeno sintetasa, codificado por el gen *ERG9*. En una secuencia de 15 reacciones enzimáticas el escualeno se convierte en ergosterol, que es el producto final de esterol que se acumula en las levaduras (Kuranda et al., 2010).

Otra rama de la ruta de isoprenoides que depende de FPP es la biosíntesis de dolicol. La primera enzima dedicada exclusivamente a esta tarea es la cis-preniltransferasa, se utiliza como iniciador FPP y cataliza las adiciones posteriores de las moléculas de IPP para formar largas cadenas. El número de residuos de isopreno en la molécula dolicol es específico para cada especie y varía desde 14 a 17 en *Saccharomyces cerevisiae* y 19-22 en los mamíferos (Martin et al., 2003).

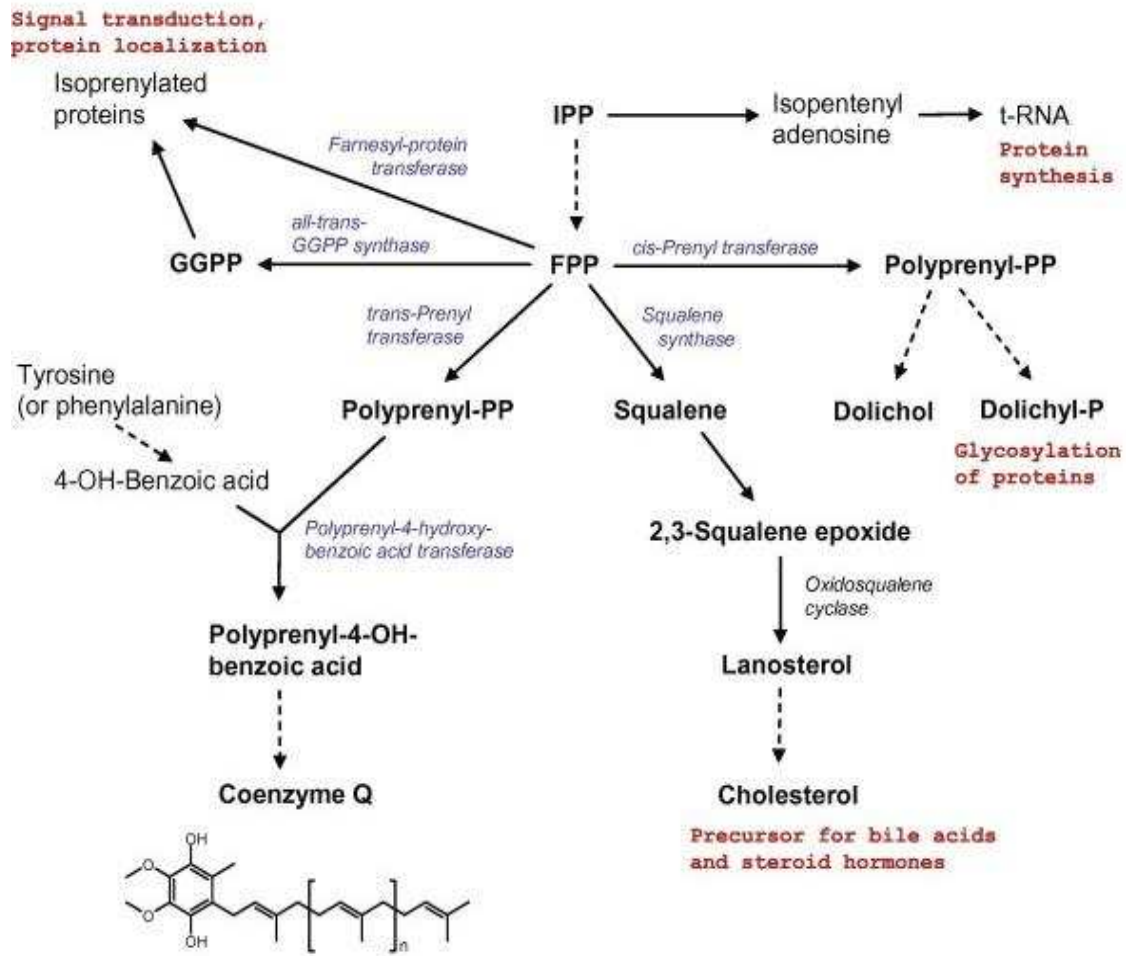


Figura 2 Formación de Coenzima Q, colesterol (ergosterol en levaduras) y dolicol a partir de Farnesilpirofosfato. Abreviaturas: CoA, coenzime A; DMAPP, dimetilalilpirofosfato; FPP, farnesilpirofosfato; GGPP, geranilgeranil pirofosfato; HMG, 3- hidroxil-3-metilglutaril; 4OH, 4- hidroxil; IPP, isopentenilpirofosfato. En azul figuran las enzimas claves. Tomado de Turunen et al., 2004.

Usos de los Isoprenoides

Los isoprenoides son muy utilizados en la industria y debido al pequeño número de compuestos disponibles comercialmente, existe una tendencia hacia la ingeniería metabólica y la industria biotecnológica para producir altos niveles de terpenoides específicos.

La biosíntesis de productos naturales a partir de microorganismos ofrece una serie de ventajas frente a los métodos químicos convencionales como por ejemplo: bajos requerimientos de energía, baja emisión de CO₂, menor utilización de solventes tóxicos y metales para la catálisis, esquemas de purificación simples, materias primas renovables y la capacidad de las enzimas de realizar síntesis quirales (Chemler et al., 2006; Fischer et al, 2011).

En muchos casos se ha empleado a *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) como huéspedes microbianos para los procesos de ingeniería de las vías de síntesis de isoprenoides funcionales debido a las ventajas que presentan: facilidad de cultivo y manipulación, bajo costo, organismo GRAS (Generalmente considerado como seguro) y al gran número de herramientas genéticas disponibles.

A lo largo de los años las investigaciones han trabajado en la ingeniería metabólica de las distintas vías de isoprenoides, en la expresión o sobre-expresión de alguna enzima clave así como en el control de la regulación por inhibición de las vías.

La mayoría de los estudios se han centrado en la creación de vías específicas trabajando con isoprenoides heterólogos en *E. coli* o en levadura (*S. cerevisiae*).

Se han reportado trabajos utilizando cepas mutantes *E. coli* y *S. cerevisiae* que expresan una geraniol sintasa de plantas (*Ocimum basilicum*) para la expresión heteróloga de sintasas monoterpenoides. En ambos casos se logra aumentar la excreción de geraniol. También se muestra que la expresión de la geraniol sintasa afecta la vía general de ergosterol, dependiendo del contexto genético de la cepa utilizada (Oswald et al., 2007).

En condiciones de vinificación, se ha logrado la expresión en *S. cerevisiae* de sintasas de monoterpenos de origen vegetal. En una cepa de levadura de vino de *S. cerevisiae*

que expresa un gen de S-linalol sintasa de *Clarkia breweri* se logra excretar linalol a niveles superiores al umbral de percepción humana (Herrero et al., 2008; Rico et al., 2010).

Se ha modificado la expresión del gen que codifica para amorfa-4,11-dieno sintasa y la vía mevalonato de *Saccharomyces cerevisiae* en *E. coli*, aumentando las concentraciones de amorfadieno, el sesquiterpeno precursor de olefina a artemisinina, llegando a concentraciones de 24 µg cariofileno/mL (Martin et al., 2003).

Por otro lado se ha visto que mutaciones específicas de aminoácidos en el sitio catalítico del gen *ERG20* que codifica para la farnesilpirofosfato sintasa (FPPS) en *S. cerevisiae*, aumenta la cantidad de geraniol producido (Fischer et al., 2011).

También en levadura se ha logrado duplicar la producción de linalol mediante la sobre-expresión del gen que codifica el dominio catalítico endógeno de una enzima limitante en la vía del mevalonato, 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, (Misawa, 2011).

En levaduras y animales la HMG-CoA sintasa y la HMG-CoA reductasa están sujetas a regulación por retroalimentación de esteroides (ergosterol en levaduras y colesterol en animales). La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, que participa en la vía del mevalonato, se ha convertido en una diana terapéutica ya que trabajando sobre la misma se podría lograr la normalización de los elevados niveles de colesterol.

La regulación de la vía de isoprenoides en la levadura *S. cerevisiae* se ha estudiado mediante la respuesta transcripcional a corto plazo de dos inhibidores, la lovastatina que bloquea la ruta isoprenoide y el ácido zaragocico que sólo bloquea la rama de esteroides. Se ha visto que los efectos a nivel celular sobre el farnesilpirofosfato (FPP) son diferentes. La Lovastatina disminuye el nivel de FPP, mientras que el ácido zaragocico mediante la inhibición de la principal enzima que consume FPP aumenta la disponibilidad de FPP en la célula (Kuranda et al., 2010).

Se han realizado otros estudios de fármacos (lovastatina, fluvastatina y atorvastatina) donde se ha visto que inhiben a todos los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, codificada por dos genes *HMG1* y *HMG2*. Por otra parte el ácido zaragocico inhibe la escualeno sintetasa, codificada por *ERG9*. Tres diferentes azoles (miconazol,

sulconazol, y el fluconazol) inhiben la lanosterol 14-a-desmetilasa codificada por el gen *ERG11* (Dimster-Denk et al., 1999).

Más recientemente se han estudiado rutas biosintéticas modificados tanto en *E. coli* como en *S. cerevisiae* para la producción de varios biocombustibles de avanzada, tales como butanol, isopentanol, terpenos, etil ésteres de ácidos grasos y alcanos.

Los intermediarios de la ruta biosintética de terpenos, IPP, GPP y FPP, pueden ser hidrolizados por pirofosfatasa para formar combustibles como alcoholes. Específicamente, isopentanol e isoamilacetato se han propuesto como aditivos de la gasolina. Farnesol y farneseno, generados a partir de FPP, se han propuesto como combustibles diesel. Olefinas monoterpenos ciclados como el limoneno, pineno, sabineno y terpineno han sido identificadas como precursores para potenciales combustibles de aviación (Zhang et al., 2011).

OBJETIVOS

El propósito de este trabajo es demostrar que la sobreproducción del gen *COQ1*, en ausencia de genes o precursores vegetales, afecta la producción de terpenoides en *S. cerevisiae*, orientados a la mejora del perfil aromático del vino.

Se estudió la diversidad molecular del gen *COQ1* en cepas nativas de *S. cerevisiae* productoras de aromas de interés. También se caracterizaron molecularmente cepas nativas de levaduras no- *Saccharomyces* capaces de producir compuestos aromáticos deseables para la industria del vino.

Este trabajo se centró en levaduras productoras de aromas que fueron seleccionadas para la industria del vino, es preciso destacar que muchos de los compuestos estudiados tienen un elevado valor tanto a nivel industrial (biocombustibles, industria farmacéutica, alimenticia, etc.) como a nivel de la salud humana, animal y vegetal.

En el transcurso de este trabajo se han abordado los siguientes objetivos:

- I.** Optimización de las mejores condiciones para lograr la síntesis de isoprenoides, en particular de mono y sesquiterpenos, en cepas de laboratorio que sobre-expresan el gen *COQ1*.
- II.** Estudio de la diversidad molecular del gen *COQ1* en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Uruguay.
- III.** Caracterización molecular de cepas no- *Saccharomyces* nativas productoras de aromas de interés.

Capítulo I - Sobreproducción de Coq1p

Los monoterpenos en el aroma del vino

El aroma es una de las propiedades más importantes utilizadas para definir la calidad de un vino y depende de varios factores como son el cultivar de vid, la región donde se cultiva la vid (el clima y el suelo), las cepas de levaduras, las condiciones de fermentación y las técnicas de manejo tanto en el viñedo como en la bodega.

El aroma del vino atendiendo al origen de los compuestos que lo constituyen se puede clasificar en aromas varietales, pre-fermentativos, fermentativos y post fermentativos (Peynaud, 1996).

El aroma varietal se compone de aquellas sustancias que proceden directamente de la variedad de uva utilizada.

El aroma pre-fermentativo está constituido por compuestos que se generan en el transcurso de la manipulación, preparación, extracción y acondicionamiento del mosto en la bodega.

El aroma fermentativo, es el que se atribuye a los compuestos generados por el metabolismo de los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica y maloláctica (bacterias ácido lácticas). La levadura más importante corresponde a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, siendo ésta la que finalmente se impone durante el proceso de fermentación alcohólica. También contribuyen en menor grado las levaduras de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, etc, presentes durante los primeros días de fermentación.

El aroma post-fermentativo, aparece como consecuencia de una serie de reacciones enzimáticas y/o físico-químicas que tienen lugar en el proceso de envejecimiento y crianza del vino.

El aroma está determinado por varios cientos de compuestos volátiles de diversa naturaleza química como son los alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas e hidrocarburos, por lo cual el aroma final derivará del balance y de la interacción de todos estos compuestos (Ver Figura 1.1).

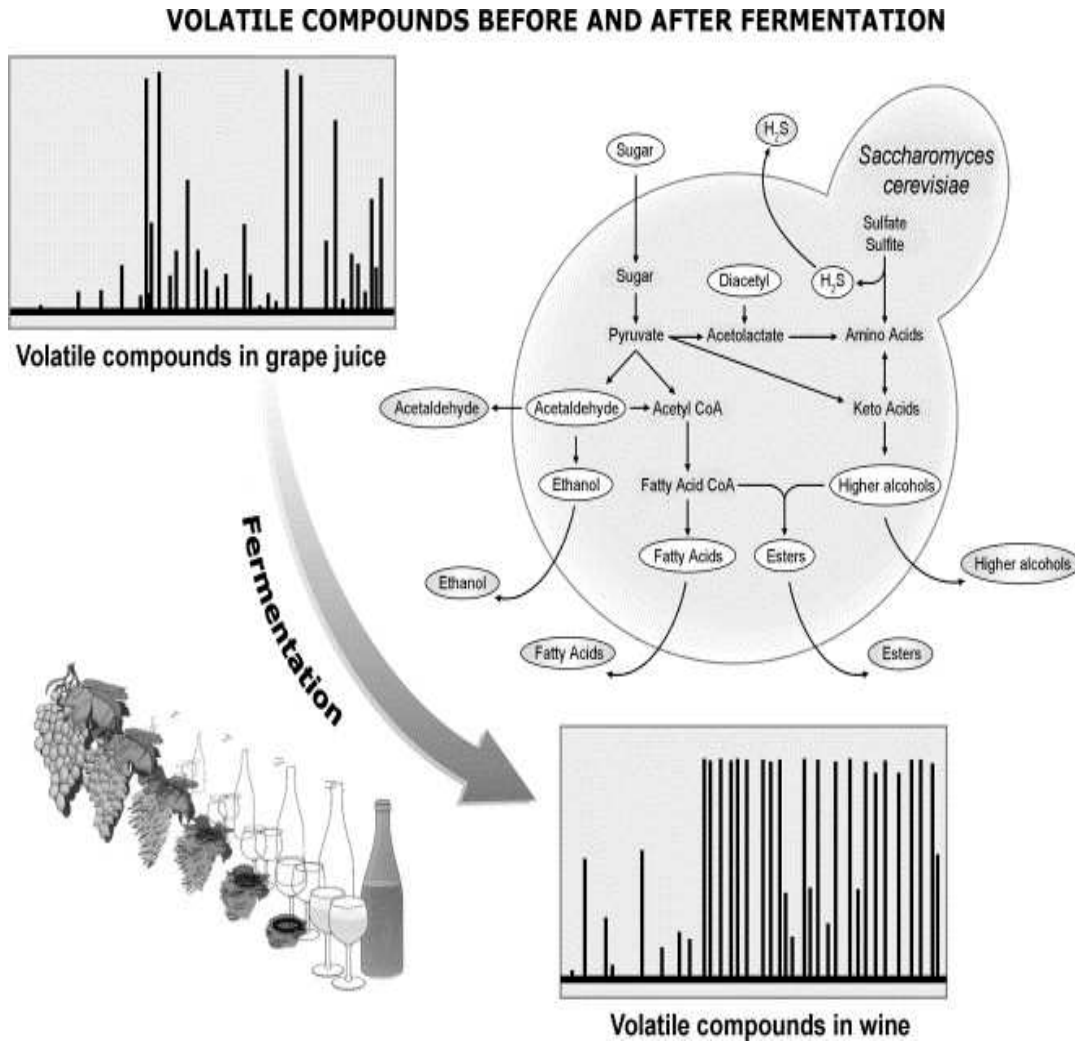


Figura 1.1 Metabolismo del aroma en *Saccharomyces cerevisiae*. Tomado de Swiegers & Pretorius (2005).

La producción de aromas por levaduras puede modificarse comprendiendo las vías metabólicas involucradas de cualquiera de los compuestos antes mencionados. En este trabajo nos focalizaremos en la síntesis de monoterpénos y otros isoprenoides.

Los terpenos están presentes en la uva como formas libres volátiles y también como precursores no volátiles glicosidados que no confieren aroma.

Los terpenos son importantes para definir el aroma y el sabor de vinos producidos a partir de variedades aromáticas como son los Moscateles, Riesling, Gewurstraminer, etc., mientras que en variedades no aromáticas de *Vitis vinifera* estos compuestos están presentes en niveles bajos.

Los monoterpenos son compuestos de grandes cualidades sensoriales y sus diferentes isómeros pueden presentar diferentes aromas, como es el caso del geraniol que presenta “aroma rosa”, “cítrico” mientras que su isómero cis, denominado nerol, tiene un olor a “verde fresco”.

Dentro de los alcoholes monoterpénicos que imparten aromas florales encontramos al geraniol, nerol, linalol y alfa-terpineol, siendo el linalol y geraniol los más importantes ya que están presentes en mayores concentraciones y presentan umbrales más bajos de percepción frente a otros terpenos del vino (Riberau-Gayon et al, 1975).

Los monoterpenos son producidos por plantas superiores, algas, hongos y levaduras.

Los hongos Ascomycetes (*Ceratocystis*) y algunos Basidiomicetes (*Penicillium*), producen mono y sesquiterpenos (Lanza & Palmer, 1977; Larsen & Frisvad 1994; Larsen & Frisvad, 1995). Muchos hongos son capaces de biotransformar monoterpenos, como por ejemplo, *Penicillium spp* y *Botrytis cinerea*.

Las levaduras que producen terpenoides incluyen las especies *Kluyveromyces lactis* (Drawert & Barton, 1978), *Torulaspora delbrueckii*, antes denominada *Saccharomyces fermentati* (Fagan et al., 1981), *Ambrosiozyma monospora* (Klingenberg & Sprecher, 1985) y algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora uvarum* (Carrau et al., 2005). Asimismo *S. cerevisiae* es capaz de biotransformar monoterpenos, por ejemplo reducir geraniol a citronelol (Kling & Dickinson 2000; Gamero et al., 2011).

Se han desarrollado diferentes estrategias biotecnológicas para mejorar el sabor del vino a través de la mejora del contenido de terpenoides.

La hidrólisis enzimática del mosto conteniendo glucoconjugados monoterpénicos da como resultado la volatilización de agliconas y en consecuencia el aumento de los aromas. La misma puede llevarse a cabo mediante la adición de preparados con enzimas exógenas (Günata et al, 1990, Van Rensburg & Pretorius, 2000), mediante el uso de levaduras vínicas transgénicas que produzcan dichas actividades (Pretorius & Bauer, 2002) o mediante el uso de levaduras de *S. cerevisiae* nativas de Uruguay productoras de β -glucosidasas (Perez et al, 2010).

Los terpenoides se producen a partir de los mismos precursores universales (*ver* vías isoprenoides).

El requerimiento básico para la producción de monoterpenos por levaduras *in vivo* es la presencia de geranilpirofosfato (GPP) activo, ya que se ha demostrado que la falta de formación de compuestos monoterpenoides se atribuye a una falta de actividad y no a la disponibilidad de GPP (Oswald et al., 2007).

GPP se forma como un intermedio transitorio en la síntesis de dos pasos de farnesilpirofosfato (FPP) catalizada por la farnesilpirofosfato sintetasa (FPPS).

La actividad de la enzima implicada en la desfosforilación de GPP aún no ha sido identificada. Faulkner et al. (1999) mostraron que los genes *LPP1* y *DPPI* que codifican fosfatasas, diacilglicerolfosfato aceptan isoprenoides pirofosfatos como sustratos *in vitro*.

En la levadura, las dos actividades geranilpirofosfato sintasa y farnesilpirofosfato sintasa son compartidas por una enzima FPPS, en consecuencia no pueden separarse fácilmente. FPPS funciona como una enzima dimérica que puede utilizar como sustrato tanto IPP y DMAPP como IPP y GPP.

La fuerte unión de GPP al sitio catalítico de FPPS quizás pueda explicar porqué en general en los animales y microorganismos no se libera GPP y por lo tanto no está disponible para la biosíntesis de subproductos C10 (Oswald et al., 2007).

En trabajos previos la mejora de los rendimientos de isoprenoides en *S. cerevisiae* se ha realizado con cepas de laboratorio convencionales, siendo de suma importancia trabajar con aislamientos naturales o industrialmente relevantes.

Este trabajo se basa en el trabajo previo de Carrau et al. (2005), en donde se ha demostrado que cepas nativas de *S. cerevisiae* y no – *Saccharomyces* son capaces de producir monoterpenos, en condiciones de fermentación en un medio artificial que simula un mosto de uva. Mediante análisis bioinformático se propuso que la enzima mitocondrial Coq1p estaría involucrada en la producción de monoterpenos en una vía metabólica alternativa localizada en la mitocondria, que interconecta el catabolismo de leucina y la vía del ácido mevalónico (Figura 1.2).

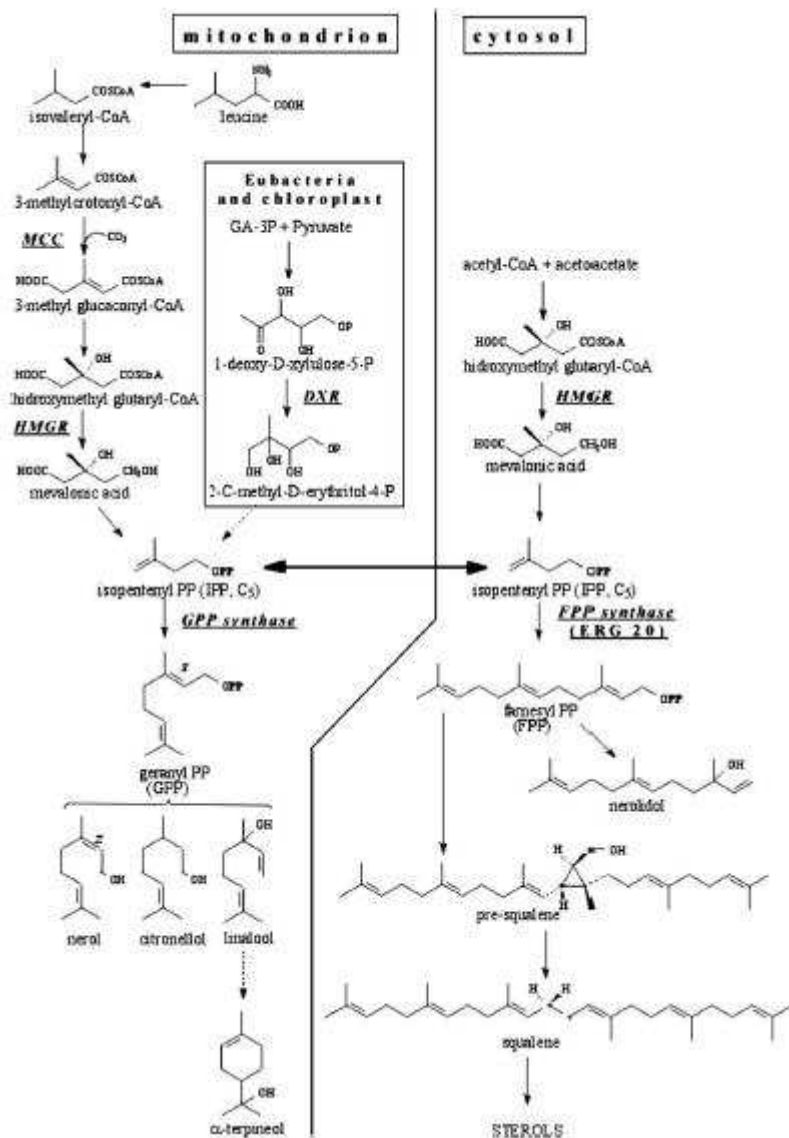


Figura 1.2 -.Vías biosintéticas de esteroides y su posible relación con la formación de monoterpenos en *Saccharomyces cerevisiae*. MCC: vía del catabolismo de la leucina que ocurre en la mitocondria de organismos eucariotas pero no ha sido descrita para *S. cerevisiae*. Se propone que la proteína mitocondrial Coq1p cumpliría el rol de GPP sintasa explicando así la biosíntesis de monoterpenos en *S. cerevisiae*. Tomado de Carrau et al., 2005.

El propósito de este trabajo es demostrar mediante una estrategia de ingeniería metabólica que la sobre-expresión del gen *COQ1*, que participaría sobre el final de la vía metabólica propuesta, afecta la producción de isoprenoides en *S. cerevisiae*, en ausencia de genes o precursores vegetales, orientados a la mejora del perfil aromático del vino.

Capítulo I - Materiales y Métodos

A continuación se ilustra en la Figura 1.3 la secuencia de actividades desarrolladas en este capítulo.

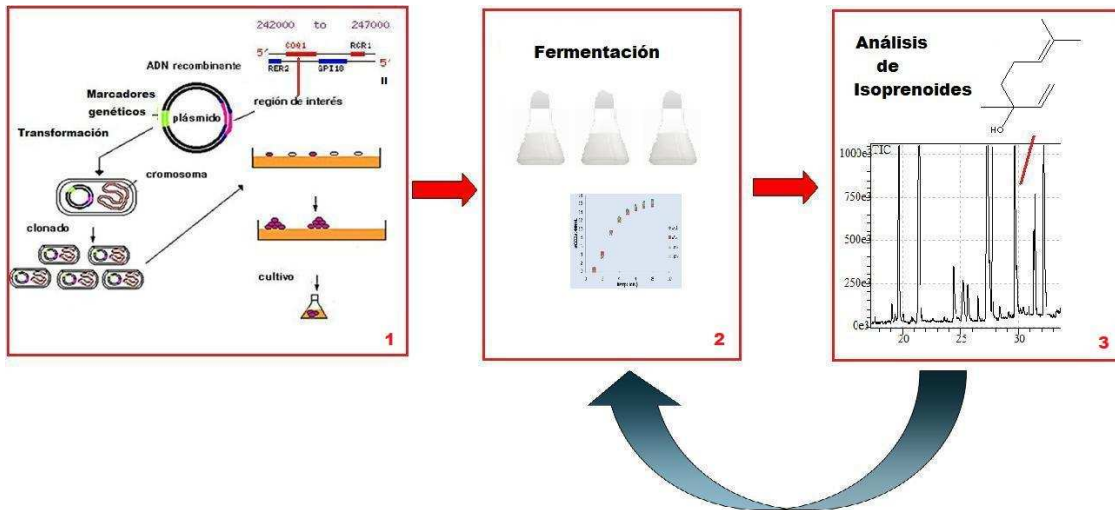


Figura 1.3. Esquema de las actividades desarrolladas: 1) modificación de la expresión del gen *COQ1* 2) Fermentaciones de las cepas contruidas 3) análisis de los metabolitos producidos, para evaluar si la sobre-expresión del gen *COQ1* afecta la producción de isoprenoides.

- 1- Modificación de la expresión del gen *COQ1*
- 2- Fermentaciones de las cepas obtenidas
- 3- Análisis de isoprenoides
- 4- Análisis estadístico de los datos

1- Modificación de la expresión del gen *COQ1*

Cepas

Las cepas utilizadas para la modificación de la expresión del gen *COQ1* figuran en la Tabla 1.1. Cabe señalar que en este estudio se han utilizado las cepas Montrachet 522 (M522) y BY4743 como organismos modelo de levadura industrial y de laboratorio respectivamente.

Tabla 1.1 - Cepas utilizadas para la modificación de la expresión del gen *COQ1*

Cepa	Genotipo	Referencia
BY4743	<i>MATa/alpha his3D1/his3D1 leu2D0 /leu2D0 lys2D0/LYS2 MET15/met15D0 ura3D0 /ura3D0</i>	UCDavis
33138	mutante homocigota de BY4743 en el gen <i>COQ1</i>	Saccharomyces Genome Deletion Project

Para lograr altos rendimientos de plásmido se utilizó la cepa *E. coli* DH10B, cuyo fenotipo es F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL nupG* λ ⁻.*

Plásmidos

Los plásmidos utilizados se describen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2 - Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmidos	Descripción	Referencia
pHA1-1	Gen <i>COQ1</i> expresado bajo promotor <i>ADHI</i> en plásmido multicopia pADCL	Gin & Clarke, 2005
pADCL	vector múltiples copias LEU2, promotor <i>ADHI</i>	Gin & Clarke, 2005
pRSQ1-1	Gen <i>COQ1</i> clonado bajo su propio promotor en plásmido de bajo número de copias pRS316	Gin & Clarke, 2005
pRS316	vector bajo numero de copias, URA3 CEN6	Gin & Clarke, 2005

Para una etapa posterior de trabajo y con el objetivo de modular la expresión del gen *COQ1* mediante la utilización del Toolbox kit (Janke et al., 2004), se cuantificaron los plásmidos que figuran en la Tabla 1.3 y se diseñaron cebadores largos que figuran en la Tabla 1.4 que serán utilizados para la sustitución de promotores en el cromosoma.

Tabla 1.3- Plásmidos cuantificados, para modular la expresión de *COQ1*

Plásmidos	ng/ul	Promotor	Marcador
pyn N18	20	TEF (transcription elongation factor) constitutivo	KanMX4
pyn N14	49.5	GPD Constitutivo	KanMX4
pyn N1	23.9	CUP1-1 Promotor fuerte, Inducible CuSO ₄	KanMX4

Tabla 1.4 - Cebadores largos, que serán utilizados para la sustitución de promotores en el cromosoma

Cebador	Secuencia 5'-3'
S1_COQ1	TTCTACAACACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGA ATTGAGTCAGTGGGACGATGCGTACGCTGCAGGT CGAC
S4_COQ1	GGCATCTTCGAGTGAAATCAATTTGATGTGATGA GCAGCGCCAGACCTTTGAAACATCGATGAATTCT CTGTCTG
pYMN14_GPD_Fw*	GACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG
pYM-N1_CUP1_Fw*	GAAGCAAATAACTCCTTGTCTTG
pYM-N18_TEF_Fw*	TTCGATGACCTCCCATTGAT

* Cebadores para verificar las construcciones obtenidas

Medios de cultivo

YPD: extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%. Se utiliza para el crecimiento de las cepas de levaduras. En los medios sólidos se agrega agar 2%.

Medio mínimo glicerol: Agar 1.5%, Aminoácidos (Histidina 20 mg/L, Metionina 20mg/L, Triptofano 50 mg/L, Lisina 50 mg/L), Aminoácido de selección (Leu 100mg/L o Ura 20mg/L), 1X YNB (Yeast Nitrogen Base, Sigma), (NH₄)₂SO₄ 0.5 %, Glicerol 3%.

Medio mínimo sin Uracilo (Ura -) / medio mínimo sin Leucina (Leu-): Agar 1.5%, Aminoácidos (Histidina 20 mg/L, Metionina 20mg/L, Triptofano 50 mg/L, Lisina 50 mg/L), Aminoácido de selección (Leu 100mg/L / Ura 20mg/L), 1X YNB, (NH₄)₂SO₄ 0.5 %, Glucosa 3%.

Transformación

Para obtener altos rendimientos se transformaron los 4 plásmidos (pRSQ1-1, pHA1-1, pRS316 y pADCL) en células competentes *E. coli* DH10B, se purificaron los plásmidos y a continuación se transformaron las cepas de *S. cerevisiae*.

Transformación de *S. cerevisiae*

Las dos cepas de *S. cerevisiae* (BY4743 y 33138) se transformaron según protocolo optimizado de Jason Brickner's y Gustavo Pesce's por Pablo Aguilar 2005, el cual se basa en una incubación con acetato de litio seguido de shock térmico.

Protocolo de Transformación (P.Aguilar 2005)

1. Inocula las cepas en 5 mL de YPD y se incuba a temperatura ambiente durante 16 hs.
2. Se diluye el cultivo en 50 mL de YPD para alcanzar una D.O. _{600nm} =0.05. Se incuba a 220 r.p.m. y 30°C durante 5-6 hs.
3. Cuando la D.O._{600nm} del cultivo ≥ 0.4 y ≤ 0.5 , se recogen las células por centrifugación a 3000 r.p.m durante 3 minutos. Se resuspenden las células en 1 mL de LiTE y se transfieren a un tubo Eppendorf.
4. El pellet se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 2 min, se resuspenden en 300 μ L 1X LiTE. Se utilizan 100 μ L células por transformación.
5. Se agregan 100 μ L de células en 2 tubos que contienen 5 μ L de DNA de esperma de salmón hervido (10 mg/mL) (se calienta por 30 min y se congela, se descongela a 100°C antes de usar).
6. Se agrega el ADN transformante (≤ 10 μ L) (0.25 μ g)
7. Se agrega 750 μ L PEG LiTE a cada uno.
8. Se incuba 30 minutos a 30°C

9. Se agrega 100 μ L de DMSO (dimetilsulfoxido) y se incuba a 42°C durante 10 minutos en un bloque calefactor (Shock térmico).
10. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 2 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende en 1 mL de YPD.
11. Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 2 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en 300 μ L YPD. Se incuba a temperatura ambiente por 1 hora.
12. Se siembran en placa en el medio de selección correspondiente (Leu-/Ura-).

Soluciones: 5X LiTE: 0.5 M LiOAc, 50mM Tris-HCl pH 7.6 y 5 mM EDTA.

1X LiTE: 0.1 M LiOAc, 10 mM Tris-HCl pH 7.6 y 1 mM EDTA.

PEG LiTE: 40% PEG₂₀₀₀ 1X LiTE (4 partes 50% PEG₂₀₀₀ y 1 parte 5X LiTE).

Las transformaciones de los distintos plásmidos complementan distintas auxotrofías, por lo cual la selección se llevó a cabo en medio mínimo sin el complemento nutricional objeto de la selección: medio mínimo Leu- o medio mínimo Ura-.

Luego de la transformación, los transformantes se purificaron reaislando 2 veces a partir de colonias aisladas en los medios mínimos correspondientes.

Las cepas transformadas se ensayaron en un medio mínimo conteniendo glicerol como única fuente de carbono, a 30°C durante 24-48 hs.

2- Fermentaciones de las cepas obtenidas

- 2.1. Se realiza una puesta a punto de las condiciones de fermentación (microvinificación), utilizando como referencia la cepa comercial Montrachet 522.
- 2.2. En una segunda etapa se realizaron estudios de cinética de crecimiento, en condiciones de crecimiento en fase exponencial y fermentación, para comparar la producción de isoprenoides.

2.2.1. Fermentación: temperatura controlada de 25°C, con agitación cada 24hs, hasta el fin de la fermentación (condiciones establecidas en la puesta a punto 2.1.).

2.2.2. Crecimiento en fase exponencial: temperatura controlada de 25°C, con agitación continua, hasta el fin de la fase exponencial.

Medio Símil Mosto:

- **Fuentes de Carbono:** glucosa 60 g/L y fructuosa 60 g/L
- **Sales:** KH_2PO_4 1.14 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.23 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.44 g/L
- **Ácidos:** tartrato ácido de potasio 2.5 g/L, ácido L-málico 3 g/L, ácido cítrico 0.2 g/L
- **Microelementos:** $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 200 µg/L, ZnCl_2 135 µg/L, FeCl_2 30 µg/L, CuCl_2 15 µg/L, H_3BO_3 5 µg/L, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 30 µg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25 µg/L, KIO_3 10 µg/L (se prepara una solución stock 1000X)
- **Ergosterol :** 12.5 mg/L (disuelto en mínimo volumen de etanol caliente).
- **Vitaminas:** Myo-inositol 100 mg/L, Piridoxina.HCl 2 mg/L, ácido nicotínico 2 mg/L, Pantotenato de Calcio 1 mg/L, Tiamina HCl 0.5 mg/L, PABA-K (ácido paraminobenzoico) 0.2 mg/L, Riboflavina 0.2 mg/L, Biotina 0.125 mg/L, ácido Fólico 0.2 mg/L (se prepara una solución stock 100X)
- **Aminoácidos:** Ala 5.9 mg/L, Arg 137.3 mg/L, ASN 36.5 mg/L, ASP 23.1 mg/L, Gln 48.7 mg/L, Glu 30.8 mg/L, Gly 4.1 mg/L, His 45.8 mg/L, Ile 24.1 mg/L, Lys 61.5 mg/L, Met 20 mg/L, Phe 11.6 mg/L, Ser 48.2 mg/L, Thr 42.2 mg/L, Trp 12.1 mg/L, Tyr 2.4 mg/L, Val 24.1 mg/L (se prepara una solución stock 100X). Se agrega el aminoácido Ura o Leu (20 mg/L) de acuerdo al medio de selección correspondiente (Leu-/Ura-).
- **$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$:** 400 mg/L

El medio tiene un contenido total de Nitrógeno de 170 mg/L, YAN (Yeast Assimilable Nitrogen).

Condiciones de crecimiento

Las cepas transformadas $BY4743_{pHA1-1}$, $BY4743_{pADCL}$, 33138_{pHA1-1} , 33138_{pADCL} (codificadas como BYpCOQ, BYp, MUTpCOQ y MUTp respectivamente) se incuban en medio mínimo sin leucina (Leu-) a 30°C durante 24-48 hs.

Las cepas BY4743 (BY) y 33138 (-MUT-, mutante homocigota en el gen *COQ1*) se incuban en medio YPD a 30°C durante 24-48 hs.

Se preparan dos medios similar mosto, sin el agregado de Leucina en un caso para mantener la presión de selección de los plásmidos y el otro con Leucina para el crecimiento de las cepas BY4743 y 33138, el medio se ajusta a pH 3.5 y se filtra por membrana de 0.22 μm . Se utiliza este mismo medio tanto para los pre-inóculos como para los ensayos de crecimiento.

A partir de colonias aisladas se inocula en el medio similar mosto correspondiente y se incuba a 25°C con agitación de 100 r.p.m. durante 24 hs (pre-inóculo).

A partir de los pre-inóculos correspondientes se cuantifica el número de células en cámara de Neubauer y se inocula para los diferentes ensayos de manera de obtener una concentración inicial de 1×10^5 cel/mL. Se utilizan Erlenmeyers de 250 mL con la mitad de volumen de medio y tapones de algodón.

En la puesta a punto se realizaron ensayos en Erlenmeyers de 500 mL con la mitad de volumen de medio y tapones de algodón, luego se escaló a la mitad de volumen estableciéndose como protocolo.

Se realizan estudios de cinética de crecimiento en las siguientes condiciones:

- Fermentación: temperatura controlada de 25°C, con agitación cada 24hs, hasta el fin de la fermentación. La fermentación se considera finalizada cuando la pérdida de peso alcanza un valor constante.
- Crecimiento en fase exponencial: temperatura controlada de 25°C, con agitación continua, hasta el fin de la fase exponencial.

Al finalizar los ensayos las muestras se filtraron por membrana de 0.45 μm a frascos ámbar autoclavados y se agregó metabisulfito de potasio. Se guardaron en heladera para el posterior análisis de aromas.

Estos ensayos se realizaron en paralelo y por duplicado.

Seguimiento de la fermentación/crecimiento en fase exponencial

El seguimiento de la fermentación-crecimiento en fase exponencial, consistió en registrar las pérdidas de peso de las muestras cada 24 horas, la determinación de la densidad óptica a 600nm ($D.O._{600nm}$), seguimiento de la población celular y porcentaje de muerte celular.

La determinación de la densidad óptica se realizó mediante espectrometría midiendo la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 600nm ($D.O._{600nm}$).

Los recuentos de células totales se realizaron utilizando la cámara de Neubauer.

El recuento de células muertas se realizó mediante la técnica de tinción de Azul de metileno con la cámara de Neubauer.

3- Análisis de isoprenoides

La evaluación de los isoprenoides obtenidos se realizó mediante el sistema de detección por Cromatografía Gaseosa acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS) de monitoreo de iones simples (SIM).

3.1 Primero se realizó una puesta a punto de la metodología analítica para el análisis de isoprenoides. La misma incluye las puesta a punto de las condiciones de extracción, concentración y de las medidas de isoprenoides en GC/MS modalidad SIM, estableciéndose de esta manera un protocolo de trabajo.

Para la puesta a punto se trabajó con mezclas de estándares de isoprenoides a distintas concentraciones por duplicado en medio similar vino.

3.2 Determinación de los isoprenoides obtenidos en los ensayos de cinética de crecimiento en fase exponencial y fermentación (2.2).

Medio similar Vino: Solución etanol –agua (12:88 v/v), 3.5 g/L de ácido tartárico, 2.5 g/L ácido málico, 60 mg/L metabisulfato de potasio. Se ajusta a pH 3.2 con NaOH. (Schneider 2001).

3.1 Puesta a punto de metodología analítica para el análisis de isoprenoides

3.1.1 Extracción y concentración de isoprenoides

Como primera etapa para la extracción de compuestos volátiles, se compararon distintas técnicas de extracción en fase sólida utilizadas comúnmente en vinos (Boido et al., 2002).

Se utilizó la técnica de extracción en columna con resina Amberlite XAD-2 (base poliestirénica) y extracción en cartuchos que contienen una resina de tipo copolímero de estireno-divinilbenceno ISOLUTE_ENV+ 1g (International Sorbent Technology).

Se ensayaron diferentes métodos de concentración de la muestra, mediante rotaevaporación y columnas Vigreux.

Extracción de isoprenoides

- Las resinas tipo Amberlite XAD-2, se empacan en una columna preparativa. El acondicionamiento de la columna se realiza eluyendo sucesivamente metanol, éter etílico, agua. Luego se eluye la muestra junto al estándar interno, utilizando agua (en una relación 1 muestra: 2 agua) y los compuestos libres se eluyen mediante una mezcla de pentano-diclorometano (azeótropo) y se almacena dicha fracción en el freezer. A las 24 hs la muestra almacenada en el freezer se trasvasa y se seca con Na_2SO_4 , se filtra a través de lana de vidrio y se procede a la concentración de la misma.
- La extracción en cartuchos ISOLUTE_ENV+ 1g, (International Sorbent Technology) copolímero de estireno-divinilbenceno. La columna se activa eluyendo primero 15 mL metanol y luego 20 mL H_2O . Se adiciona el estándar interno junto a la muestra y se eluye utilizando una relación 1:2 en agua. Se lava la columna con 20 mL de agua y posteriormente se eluyen los compuestos libres con 30 mL CH_2Cl_2 y se almacena dicha fracción en el freezer. La columna se lava con 45 mL de metanol y se deja pronta para un nuevo análisis. A las 24 hs la muestra almacenada en el freezer se trasvasa y se seca con Na_2SO_4 , se filtra a través de lana de vidrio y se procede a la concentración de la misma.

Concentración de la muestra

La concentración de la muestra se realiza en dos etapas, la primera mediante rotaevaporación o utilizando columnas Vigreux del mismo tamaño, en ambos casos se utiliza un baño termostático a 40°C y se concentra hasta un volumen de 3mL aprox. para las columnas o 5mL aprox. para la rotaevaporación.

La segunda etapa de concentración se realiza previo al análisis cromatográfico, se concentran las muestras mediante corriente de nitrógeno a un volumen de 0.1 mL.

3.1.2 Determinación de isoprenoides

La evaluación de los isoprenoides obtenidos se realizó mediante GC-MS de monitoreo de iones simples (SIM). En la puesta a punto se establecieron las condiciones experimentales.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu QP 5050.

Las condiciones experimentales utilizadas fueron: Columna: columna capilar de sílica fundida con fase estacionaria de polietilenglicol, columna DB-Wax (30m x 0.25 mm x 0.25µm), Gas carrier: He (0.9 mL/min). Programa de Temperatura: 40°C x 8 min, Rampa: 3°C/min, 180°C x 0 min, Rampa: 5°C / min, 220°C x 5 min, Rampa: 20°C/min, 240°C x 20 min. Inyector: modo splitless, Volumen de inyección: 1 µL. Temperatura del inyector: 250 °C Temperatura interface: 250°C; rango de adquisición de masa, 35-350 uma.

Los estándares de trabajo se procesaron en GC/MS Corriente Iónica total (TIC), en donde se verificó su identidad comparando los patrones de fragmentación obtenidos, con los encontrados en la biblioteca del equipo (espectros comerciales –Wiley, Adams, 2007- y propios). Estos patrones son únicos para cada compuesto.

La identificación de los distintos isoprenoides se realizó mediante modalidad SIM a partir de la comparación, de los tiempos de retención y los patrones de fragmentación, de la muestra con los estándares, los cuales se deben corresponder. Algunas de las muestras también se procesaron en GC/MS (TIC).

Para el análisis cualitativo, se utilizaron fragmentos iónicos (m/z) específicos para cada componente que se detallan a continuación en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5 - Fragmentos iónicos m/z correspondientes a los estándares utilizados

Estándar	fragmentos iónicos (m/z)
Linalol	71,93
Alfa terpineol	59, 93
Citronelol	69,93
Nerol	69,93
Geraniol	69,93
cis-nerolidol	69,93
trans-nerolidol	69,93
2-octanol	45,55,69

Durante la puesta a punto se probaron distintos estándares internos como heptanol, 1-octanol, 4-hidroxi-4metil-2-pentanona, 2-butanol, 4-metil-2-pentanol, 1,8-cineol y 2-octanol.

Selectividad y Especificidad

Se determina la selectividad y especificidad del método realizando corridas de mezcla de estándares de referencia, del blanco y de la muestra fermentada.

La mezcla de estándares de referencia se refiere a la mezcla de estándares de isoprenoides en el medio similar vino.

El blanco (matriz) se define como el medio similar mosto, sin el agregado de ninguna levadura, sometido a las mismas condiciones de ensayo. Se procesa de igual forma que las muestras.

Se evaluó:

- Selectividad: Tiempo de retención (Tr) de sustancias presentes en los blancos (matriz) y en las mezclas de estándares que potencialmente puedan interferir en el análisis.
- Especificidad: Tiempos de retención de los isoprenoides.

La cuantificación de los isoprenoides se realizó mediante curvas de calibración, utilizando el 2-octanol como estándar interno (el fragmento iónico $m/z = 45$) y se utilizaron fragmentos iónicos m/z específicos para cada componente, como se detalla en el Anexo I.

4- Análisis estadístico de los datos

Se analizaron los resultados obtenidos de la producción de isoprenoides en las distintas condiciones de crecimiento mediante el test estadístico de Wilcoxon (prueba no paramétrica, de dos muestras relacionadas), utilizando el paquete estadístico de STATISTICA 7.0.

Capítulo I - Resultados y Discusión

1- Modificación de la expresión del gen *COQ1*

Las transformaciones obtenidas con los distintos plásmidos complementan auxotrofías, por lo cual la selección se llevó a cabo en medio mínimo sin leucina (Leu-) o sin Uracilo (Ura-).

Los resultados de la transformación se muestran en las Figuras 1.4 y 1.5 y en la Tabla 1.6.

Se confirmó el crecimiento de las cepas en un medio mínimo (MM) con glicerol como única fuente de carbono. (Fig. 1.4 y Fig.1.5 Tabla 1.6)

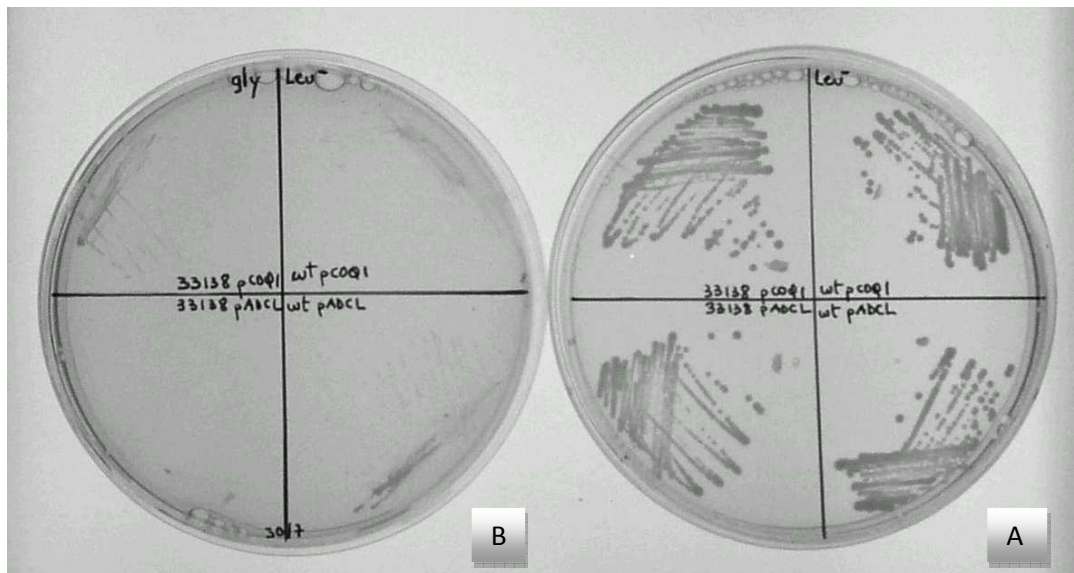


Figura 1.4 Crecimiento de las levaduras transformadas BY4743 (wt) y 33138 con los plásmidos pHA1-1 (pCOQ1) y su respectivo vector vacío (pADCL). A) Selección en medio mínimo sin leucina (Leu-). B) Crecimiento en medio mínimo con glicerol (Gly) como única fuente de carbono y sin leucina (Leu-).

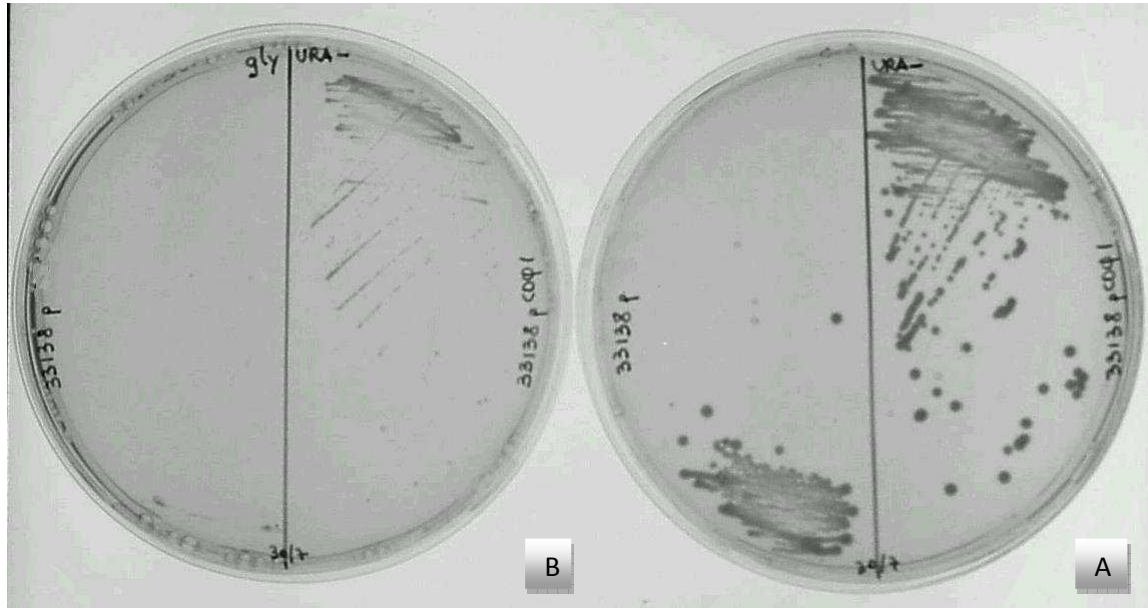


Figura 1.5 Crecimiento de las levaduras transformadas 33138 con los plásmidos pRSQ1-1 (33138 pCOQ1) y su respectivo vector vacío pRS316 (33138p). A) Selección en medio mínimo sin Uracilo (Ura-). B) Crecimiento en medio mínimo con glicerol (Gly) como única fuente de carbono y sin Uracilo (Ura-).

Tabla 1.6. Análisis de los transformantes obtenidos

Cepa	Promotor	Genotipo	código	Medio selección	Crec. en MM con glicerol
BY4743 _{pHA1-1}	ADH1	BY4743 transformada con el plásmido pHA1-1	BYpCOQ	Leu -	+
BY4743 _{pADCL}	ADH1	BY4743 transformada con el vector vacío pADCL	BYp	Leu -	+
33138 _{pHA1-1}	ADH1	33138 transformada con el plásmido pHA1-1	MUTpCOQ	Leu -	+
33138 _{pADCL}	ADH1	33138 transformada con el vector vacío pADCL	MUTp	Leu -	-
BY4743 _{pRSQ1-1}	COQ1	BY4743 transformada con el plásmido pRSQ1-1	BYpRSCOQ	Ura -	+
BY4743 _{pRS316}	COQ1	BY4743 transformada con el vector vacío pRS316	BYpRS	Ura -	+
33138 _{pRSQ1-1}	COQ1	33138 transformada con el plásmido pRSQ1-1	MUTpRSCOQ	Ura -	+
33138 _{pRS316}	COQ1	33138 transformada con el vector vacío pRS316	MUTpRS	Ura -	-

Se confirmó que solamente las cepas que expresan *COQ1* son capaces de crecer en el medio mínimo utilizando glicerol como única fuente de carbono (Ashby & Edward, 1990). Este resultado confirma que el mutante 33138 tiene deletadas las dos copias de *COQ1* y que los plásmidos pHA1-1 y pRSQ1-1 expresan proteínas funcionales Coq1p. En este trabajo se ensayaron las cepas transformadas con el plásmido pHA1-1, en las que el gen *COQ1* está bajo control del promotor ADH1, de expresión fuerte y constitutiva, que se ha visto producen altos niveles de Coq1p (Gin & Clarke, 2005). Si bien se cuenta con las cepas transformadas con el plásmido pRSQ1-1 en las que el gen *COQ1* está bajo control de su propio promotor, en vista de que a partir de este plásmido se produce menor cantidad de proteína que en una cepa wild type sin el plásmido (Gin & Clarke, 2005), en el caso de que se quiera ensayar el efecto del promotor *COQ1* se propone como futura estrategia modular la expresión del gen *COQ1* mediante la sustitución de promotores en el cromosoma, para lo cual ya se cuenta con los cebadores adecuados (ver Materiales y Métodos).

Resultados de la Puesta a Punto de la metodología analítica para el análisis de isoprenoides

A continuación se muestran los resultados de la puesta a punto de las distintas condiciones ensayadas; fermentaciones, extracción, concentración y análisis de isoprenoides.

2.1- Fermentaciones de las cepas obtenidas

Los resultados obtenidos de la puesta a punto de las fermentaciones por duplicado de las cepas BY4743_{pHA1-1} (BYpCOQ), BY4743_{pADCL} (BYp), 33138_{pHA1-1} (MUTpCOQ), 33138_{pADCL} (MUTp) y la cepa comercial Montrachet 522 (M522) como referencia se muestran en las Figuras 1.6, 1.7 y 1.8.

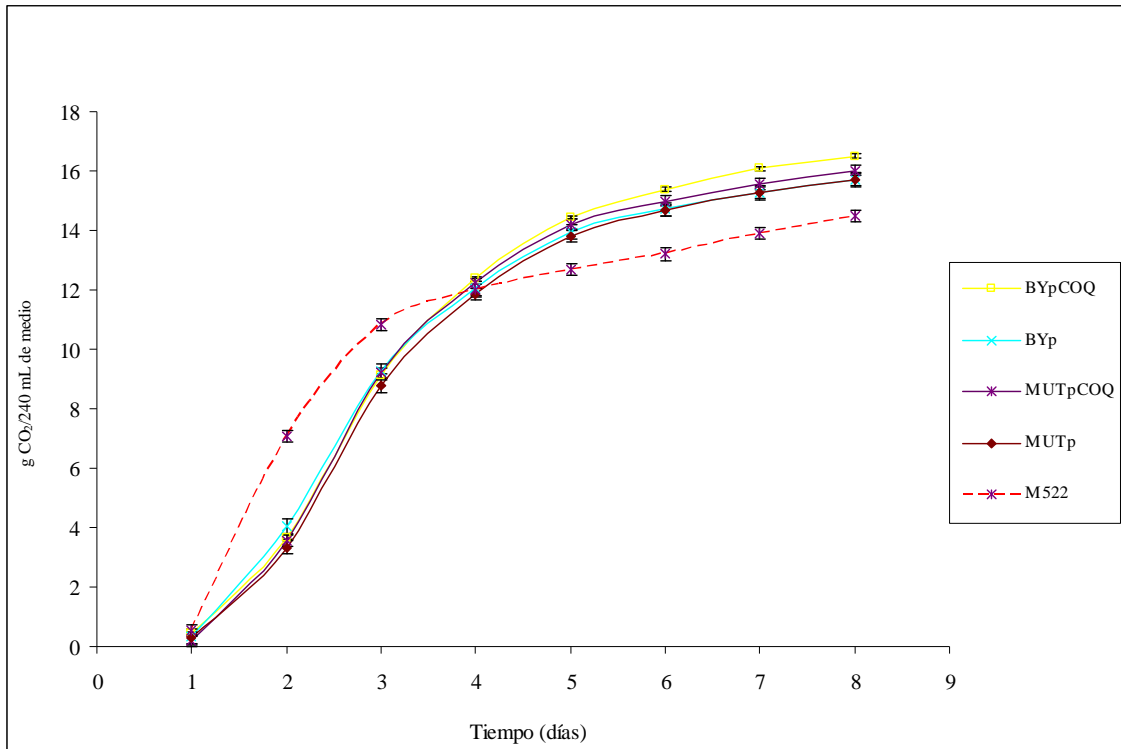


Figura 1.6. Cinética de fermentación. El seguimiento de la fermentación se realizó controlando la liberación de CO₂ mediante la pérdida de peso (g). Las muestras BY4743_{pHA1-1}, BY4743_{pADCL}, 33138_{pHA1-1}, 33138_{pADCL} están codificadas como BYpCOQ, BYp, MUTpCOQ y MUTp respectivamente. M522 cepa comercial Montrachet 522

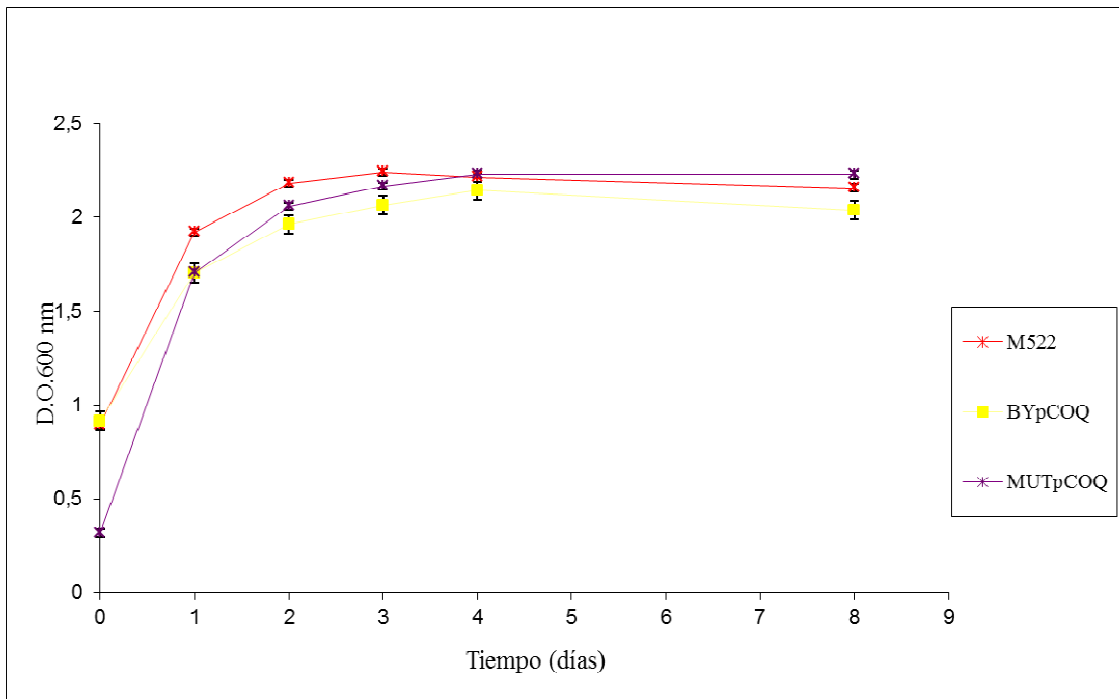


Figura 1.7 Seguimiento de la fermentación por D.O._{600nm} de las cepas M522, BY4743_{pHA1-1} (BYpCOQ) y 33138_{pHA1-1} (MUTpCOQ)

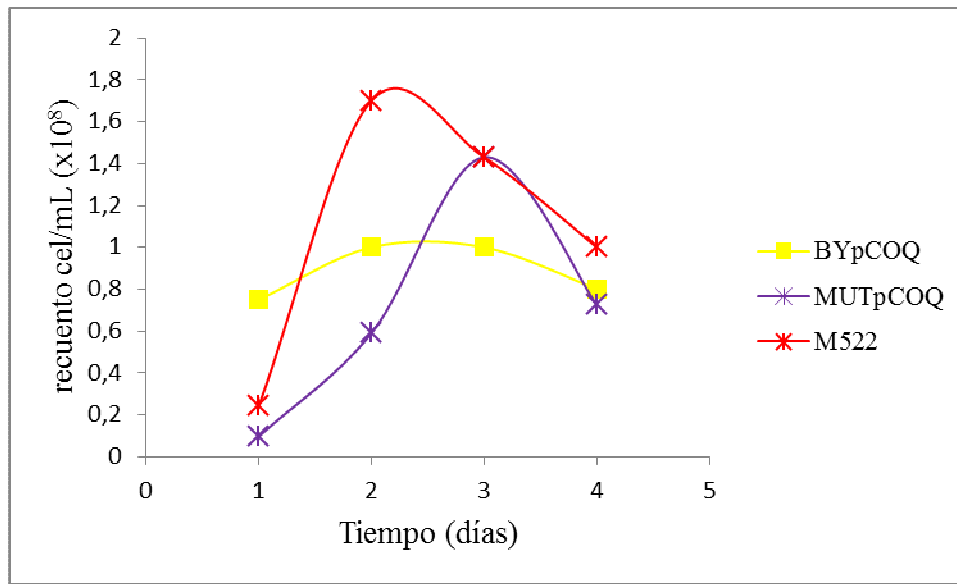


Figura 1.8 Recuentos de células totales durante la fermentación para las cepas M522, BY4743_{pHA1-1} (BYpCOQ) y 33138_{pHA1-1} (MUTpCOQ).

Las cepas BYpCOQ, BYp, MUTpCOQ, MUTp muestran el mismo perfil de velocidad de fermentación, tienen una buena capacidad fermentativa ya que se logra un buen desprendimiento de CO₂ comparado con M522 (Figura 1.6).

En todos los casos se estableció una buena correlación entre el recuento de células y la densidad óptica a una longitud de onda de 600nm (D.O._{600nm}). Se estableció que una D.O._{600nm} mayor a 0.5 unidades se corresponde con un crecimiento en fase exponencial y mayor a 2 unidades se corresponde a un crecimiento en fase estacionaria.

En las fermentaciones realizadas con la cepa MUTpCOQ (33138_{pHA1-1}) al segundo día de fermentación se observó un fuerte olor a “huevo podrido” correspondiente a aromas azufrados, que luego se diluye con el tiempo.

Frente a la aparición del “olor a huevo podrido” se probó agregar (NH₄)₂PO₄ (50mg/L) a la muestra, ya que es la práctica que se realiza comúnmente en bodega frente a una parada de fermentación y para evitar la formación de malos aromas. El ensayo se realizó en paralelo, con la muestra con y sin el agregado de amonio y se realizó el posterior análisis de aromas isoprenoides, pero no se observaron cambios significativos entre las muestras. En la práctica lo que se observó fue un retraso de unas 24h en la formación de los aromas “azufrados”. En los análisis de isoprenoides no hubo diferencias significativas.

La cepa sobreproductora 33138_{pHA1-1} quizás tenga mayores requerimientos de nitrógeno, pero en este caso no influye en la formación de compuestos terpenoides, por lo cual se deberá probar la influencia de este parámetro en la formación de compuestos azufrados. Mediante la puesta a punto se estableció como medio de cultivo el Medio Símil Mosto y las condiciones de fermentación a temperatura controlada de 25°C, con agitación cada 24hs.

1.1-1. Extracción y concentración de isoprenoides

Se realizó una optimización de la extracción de los isoprenoides formados ya que se esperaba que los mismos estuvieran presentes en concentraciones más bajas que las habituales en vinos, por lo cual fue necesario verificar la mejor estrategia de extracción. De la comparación de la extracción en columna con resina Amberlite XAD-2 (base poliestirénica) y extracción en cartuchos ISOLUTE_ENV+ 1g (copolímero de estireno-divinilbenceno) se decidió la utilización de los cartuchos ISOLUTE_ENV+ ya que con los mismos se obtuvo una mejor extracción de los compuestos, medidos como porcentaje de recuperación. En la elección se tuvo en cuenta la diferencia en los tiempos de análisis así como el volumen de solvente utilizado, siendo más favorable en ambos casos la utilización de los cartuchos.

Los resultados de la comparación de los distintos métodos de concentración de la muestra, rotaevaporación y columnas vigreux, en baño termostatzado muestran que mediante la rotaevaporación no se obtuvo reproducibilidad, observándose pérdida de compuestos. La concentración utilizando las columnas vigreux, cuando se usan distintos tamaños, no sólo cambia el tiempo de concentración de las muestras sino la reproducibilidad de los resultados. El baño termostatzado a temperaturas menores de 40°C, afecta el tiempo de procesamiento de las muestras y tampoco se obtiene una buena evaporación del solvente.

Se obtuvo una mejor recuperación con las columnas vigreux, utilizando columnas del mismo tamaño y con un baño termostatzado a 40°C, por lo cual se estableció éste como método de concentración.

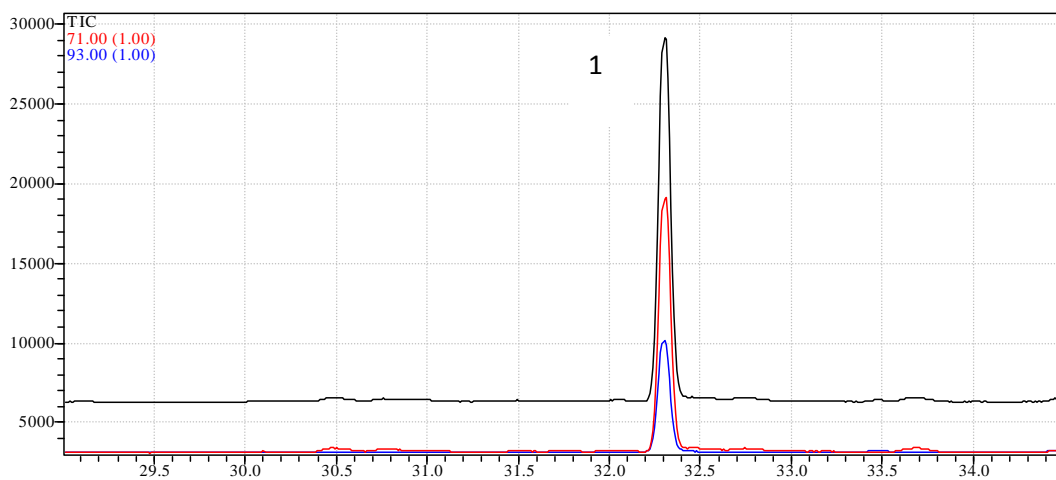
1.1-2. Análisis de isoprenoides

Tomando como referencia los datos de Carrau et al. (2005) en los cuales se cuenta con cuantificaciones de terpenoides dentro del rango 5- 0.5 µg/L y considerando la viabilidad de la obtención de cepas sobreproductoras de isoprenoides, se realizó una puesta a punto del sistema de detección por GC-MS en la modalidad SIM ya que la misma cuenta con mayor sensibilidad.

Se determinaron las condiciones experimentales del sistema modificando el programa de temperatura (las rampas) y ajustando las ventanas para la modalidad SIM.

La selectividad del método determina las interferencias que se puedan presentar debido a sustancias presentes en la matriz de análisis y la especificidad evalúa que el método reconozca los analitos inequívocamente en presencia de otros componentes que pudiesen estar presentes en la muestra. En la evaluación del blanco (matriz) con respecto a la sustancia de referencia no se observaron compuestos con los mismos tiempos de retención que los estándares; la matriz no presenta interferencia con la muestra ni con el estándar interno seleccionado (2-octanol). Los tiempos de retención observados en la muestra fermentada coinciden con los tiempos de retención de los estándares en la solución de referencia.

Se presenta uno de los cromatogramas obtenidos, a modo de ejemplo, donde se muestran los distintos isoprenoides en la Figura 1.9 y sus respectivos patrones de fragmentación en la Figura 1.10.



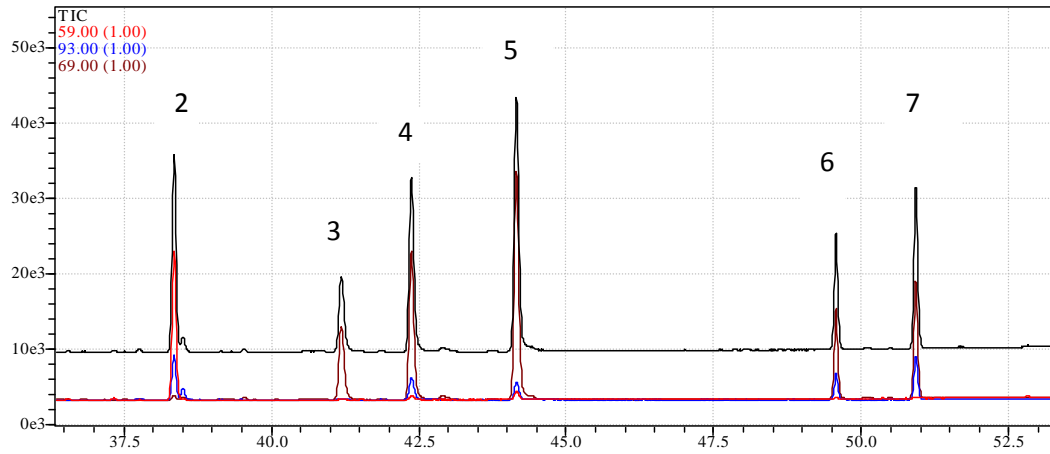
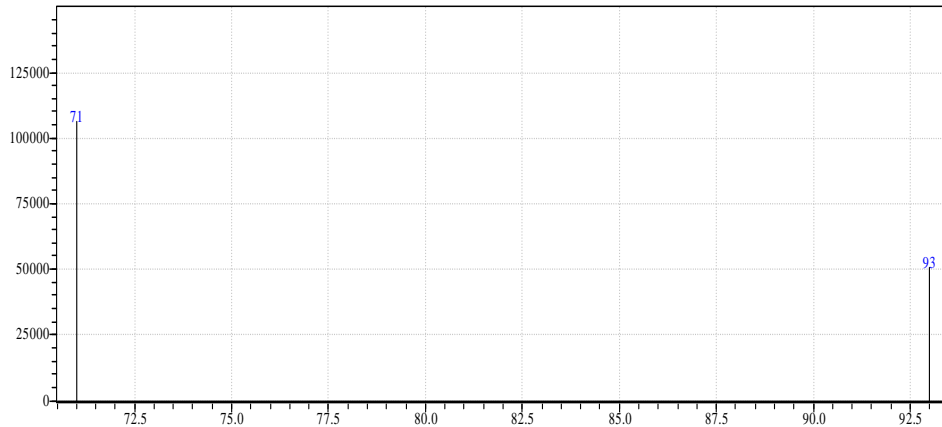
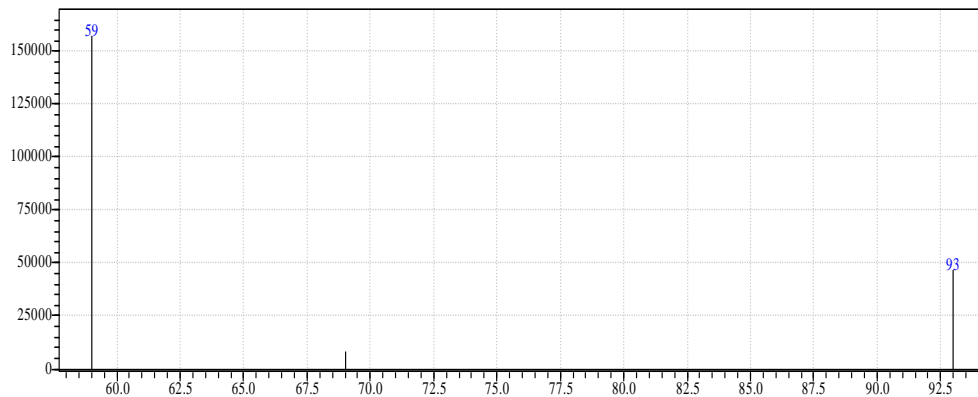


Figura 1.9 Cromatograma correspondiente a GC-MS/SIM para la solución estándar de referencia. Los terpenoides identificados de acuerdo al cromatograma de la solución de referencia corresponden a 1) linalol, 2) alfa-terpineol, 3) citronelol, 4) nerol, 5) geraniol, 6) cis-nerolidol y 7) trans-nerolidol.

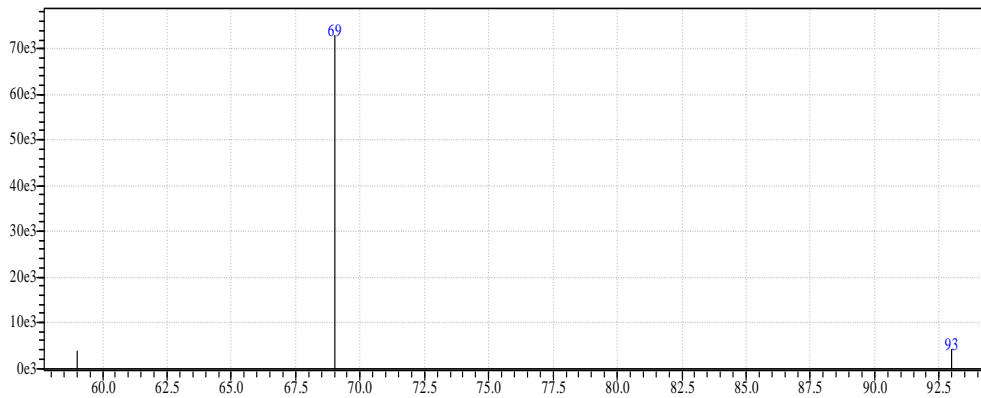
a) Linalol



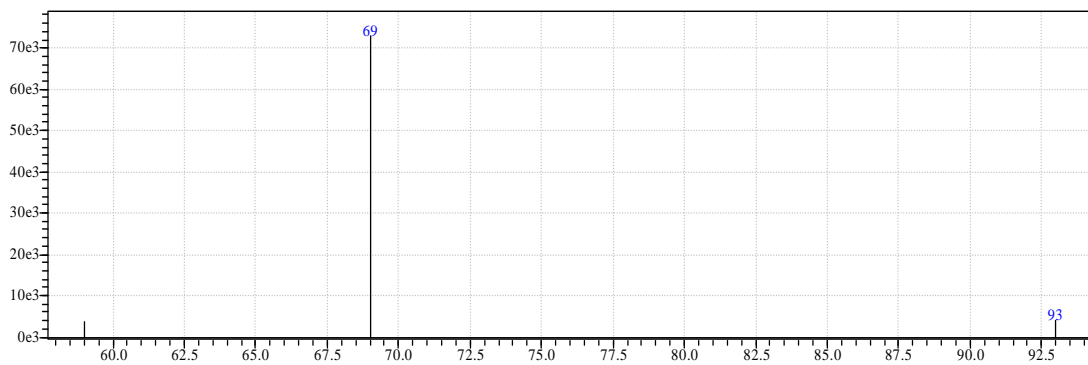
b) alfa terpineol



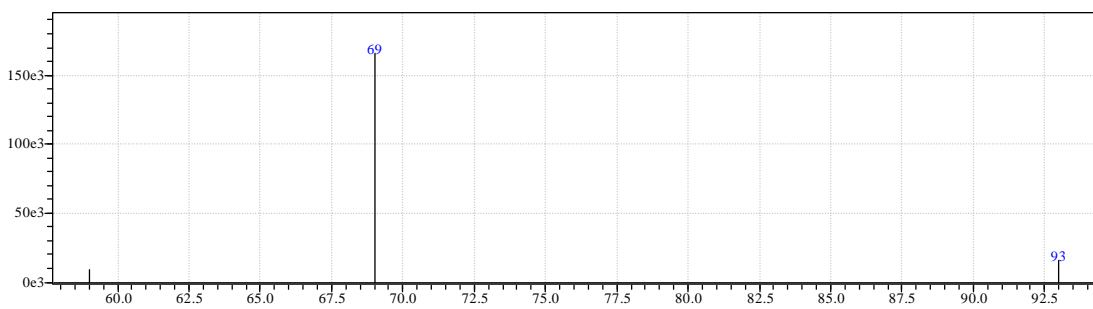
c) Citronelol



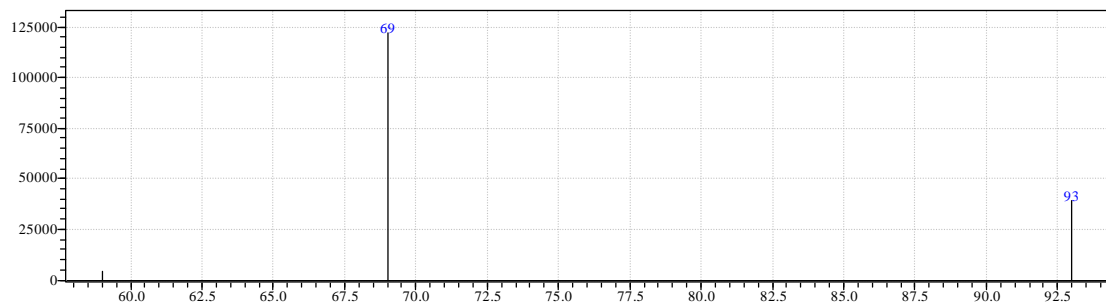
d) Nerol



e) Geraniol



f) cis-nerolidol



g) trans-nerolidol

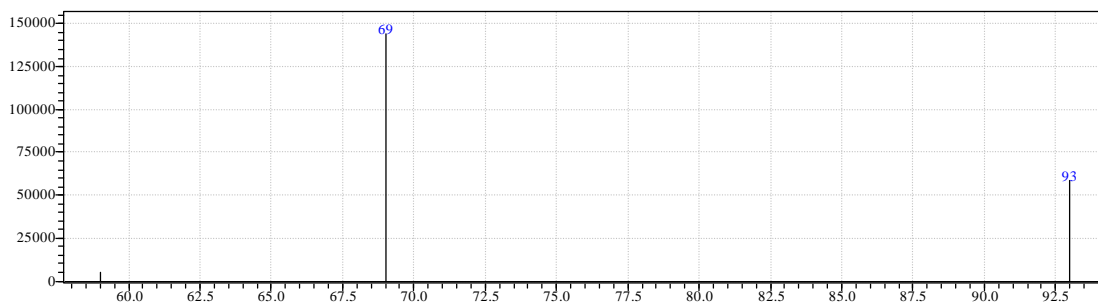


Figura 1.10 Patrones de Fragmentación para a) linalol, b) alfa terpineol, c) citronelol, d) nerol, e) geraniol, f) cis-nerolidol g) trans-nerolidol

Selección del estándar interno

Los estándares, 1-octanol, 4-hidroxi-4metil-2-pentanona, 2-butanol, 4-metil-2-pentanol se descartaron por comprobarse que existían interferencias con la matriz a la concentración de trabajo, en la modalidad SIM.

El 1,8-cineol de estructura similar a los terpenos en estudio, si bien a la concentración de trabajo no existen interferencias con la matriz en la modalidad SIM (utilizando fragmentos iónicos $m/z = 93/108$) no se obtuvo reproducibilidad en las réplicas analíticas ni en las biológicas, observándose variaciones en los tiempos de retención así como variaciones significativas en el porcentaje de recuperación del compuesto, por lo cual tampoco se utilizó como estándar interno.

Se confirmó la producción de heptanol por las cepas de trabajo, comparando las mismas muestras con y sin el estándar de heptanol, por lo cual también se descartó como estándar interno.

El 2-octanol (fragmento iónico $m/z = 45$) no presentó interferencias con la matriz y presentó buena reproducibilidad, por lo cual se estableció para este trabajo su uso como estándar interno.

Resumen:

Se establecieron las siguientes condiciones experimentales de trabajo:

- Medio Simil Mosto como medio de cultivo y las condiciones de fermentación a temperatura controlada de 25°C, con agitación cada 24hs.
- Método de extracción mediante los cartuchos ISOLUTE ENV+ (copolímero de estireno-divinilbenceno).
- Método de concentración de las muestras en una primera etapa; columnas vigreux del mismo tamaño, en baño termostatzado a 40°C.
- El método GC/MS modalidad SIM aplicado para la identificación de los distintos isoprenoides es selectivo y específico.

Determinación de Isoprenoides: Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-17 acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu QP 5050. Las condiciones experimentales utilizadas fueron: Columna: columna capilar de sílica fundida con fase estacionaria de polietilenglicol, columna polietilenglicol DB-Wax (30m x 0.25 mm x 0.25µm), Gas carrier: He (0.9 mL/min). Programa de Temperatura: 40°C x 8 min, Rampa: 3°C/min, 180°C x 0 min, Rampa: 5°C / min, 220°C x 5 min, Rampa: 20°C/min, 240°C x 20 min. Inyector: modo splitless, Volumen de inyección: 1 µL. Temperatura del inyector: 250 °C Temperatura interface: 250°C; rango de adquisición de masa, 35-350 uma.

Para el análisis cualitativo de isoprenoides en la modalidad SIM, se trabajará con los estándares linalol ($m/z = 71/93$), alfa-terpineol ($m/z = 59/93$), citronelol ($m/z = 69/93$), nerol ($m/z = 69/93$), geraniol ($m/z = 69/93$), nerolidol cis/trans ($m/z = 69/93$) y estándar interno 2-octanol ($m/z = 45/55/69$).

Para el análisis cuantitativo se trabajará con el estándar interno 2-octanol utilizando el fragmento iónico (m/z) $m/z = 45$. Para los compuestos se utilizará un solo fragmento iónico (m/z): linalol ($m/z = 71$), alfa-terpineol ($m/z = 59$), citronelol ($m/z = 69$), nerol ($m/z = 69$), geraniol ($m/z = 69$), cis-nerolidol ($m/z = 69$), trans-nerolidol ($m/z = 93$).

2.2 Estudio de la cinética de crecimiento: crecimiento en fase exponencial y Fermentación.

2.2.1 Cinética de Fermentación

Todas las fermentaciones fueron completadas, como se observa en la Figura 1.11.

Las cepas transformadas fueron las que dieron los valores más elevados de liberación de gas carbónico durante la fermentación. Las cepas sin plásmidos BY4743 y 33138 fueron las que dieron menor rendimiento fermentativo.

Se puede observar 2 grupos de comportamiento muy diverso con respecto a la capacidad fermentativa, presentándose en cada grupo una dinámica de velocidad de fermentación similar.

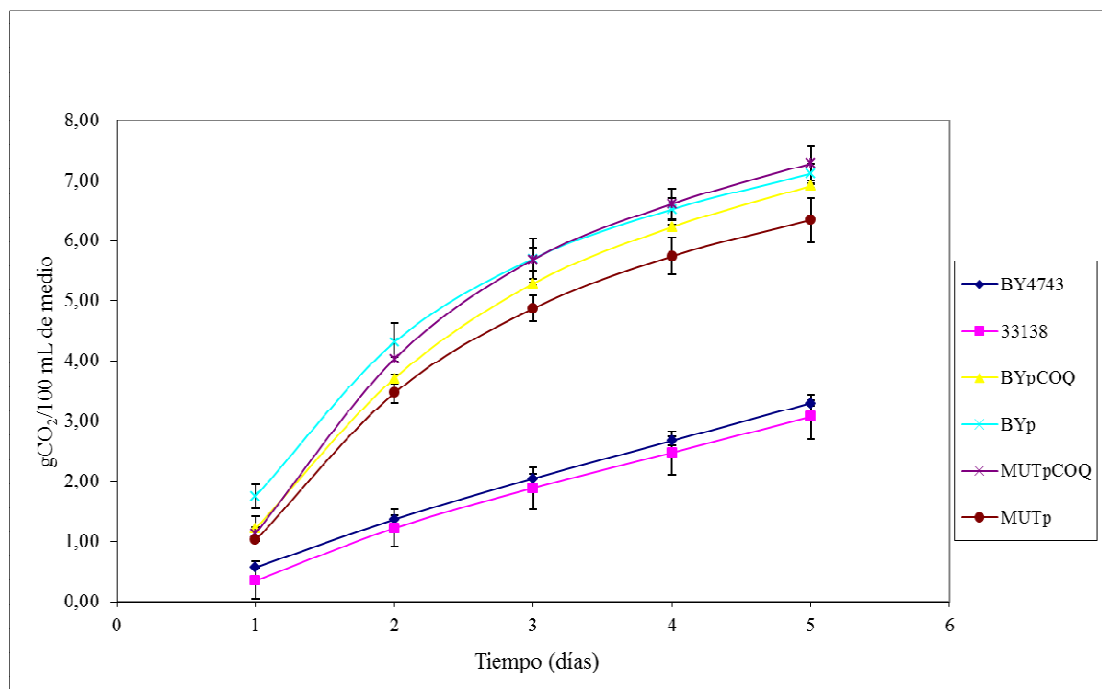


Figura 1.11 Cinética de fermentación. El seguimiento de la fermentación se realizó controlando la liberación de CO₂ mediante la pérdida de peso (g).

Seguimiento de población celular y porcentaje de muerte celular

Partiendo de un inóculo inicial de 10^5 cel/mL se observó hacia el final de la fermentación en el quinto día, una población celular con valores para todas las cepas comprendidos en el orden de 1×10^7 - 1×10^8 cel/mL. Tabla 1.7

Tabla 1.7 - Recuento de células totales y porcentaje de células muertas hacia el final de la fermentación.

Cepas	Recuentos	
	Células totales	% de muerte celular
BY4743	$5,1 \times 10^7$	9,5
33138	$1,7 \times 10^7$	menor a 1
BYpCOQ	$9,5 \times 10^7$	6,2
BYp	$1,1 \times 10^8$	1,7
MUTpCOQ	$1,4 \times 10^8$	1,8
MUTp	$1,4 \times 10^8$	4,3

Las cepas BY4743 y BYpCOQ presentaron los niveles más altos de muerte celular, mientras que las cepas BYp, MUTpCOQ y 33138 presentaron los valores más bajos.

La cepa 33138 presentó uno de los menores crecimientos de población celular así como de porcentaje de muerte celular.

La cepa MUTpCOQ presentó los niveles más altos de liberación de CO₂ (Figura 1.11) y un bajo porcentaje de muerte celular.

2.2.2 Cinética de crecimiento en fase exponencial

Todos los crecimientos fueron completados hasta el fin de la fase exponencial, cuando se alcanza un crecimiento del orden 1×10^8 cel/mL correspondiente a una D.O._{600nm} de 2 aprox., como se observa en la Figuras 1.12 y 1.13.

La cepa MUTpCOQ fue la que dio el mayor nivel de liberación de gas carbónico.

Se puede observar que se mantiene el comportamiento diferenciado en los mismos dos grupos con respecto a la dinámica de velocidad de crecimiento. Las cepas BY4743 y

33138 presentan una fase exponencial menos pronunciada que las cepas transformadas con plásmidos.

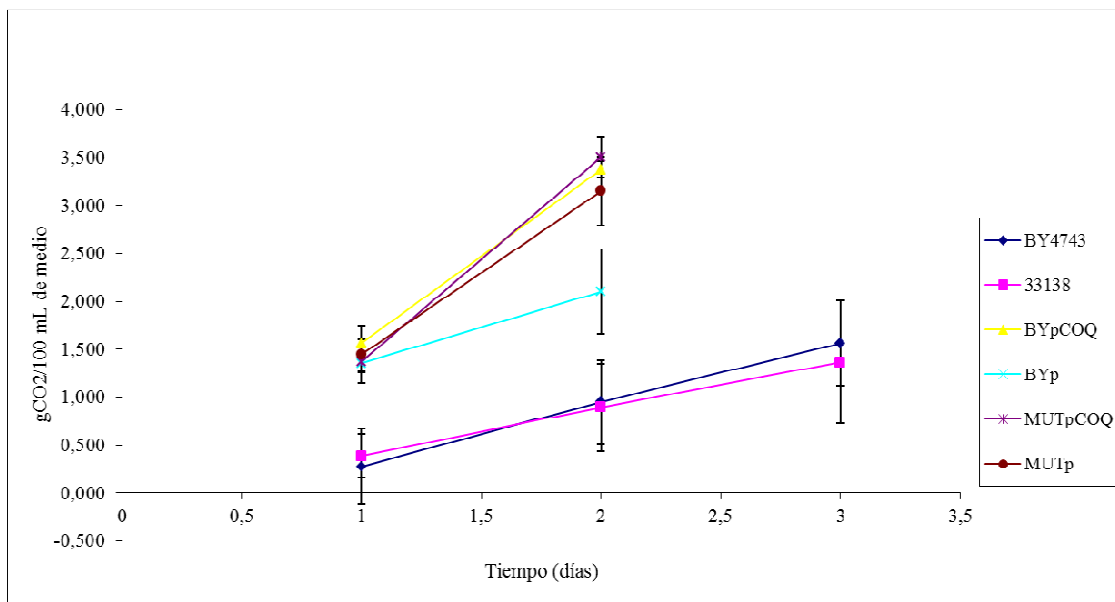


Figura 1.12 Crecimiento en fase exponencial. El seguimiento del crecimiento en fase exponencial se realizó controlando la liberación de CO₂ mediante la pérdida de peso (g).

Seguimiento por Densidad Óptica

Se determinó la D.O._{600nm} cada 24 hs y cuando se alcanzó una D.O._{600nm} de 2 unidades se procesaron las muestras para su posterior análisis de aromas. En el caso de las muestras BY4743 y 33138, cuando se alcanza una D.O._{600nm} de 1 unidad, se considera que se está en fase exponencial (de acuerdo a la relación observada con los recuentos de células). Figura 1.13b.

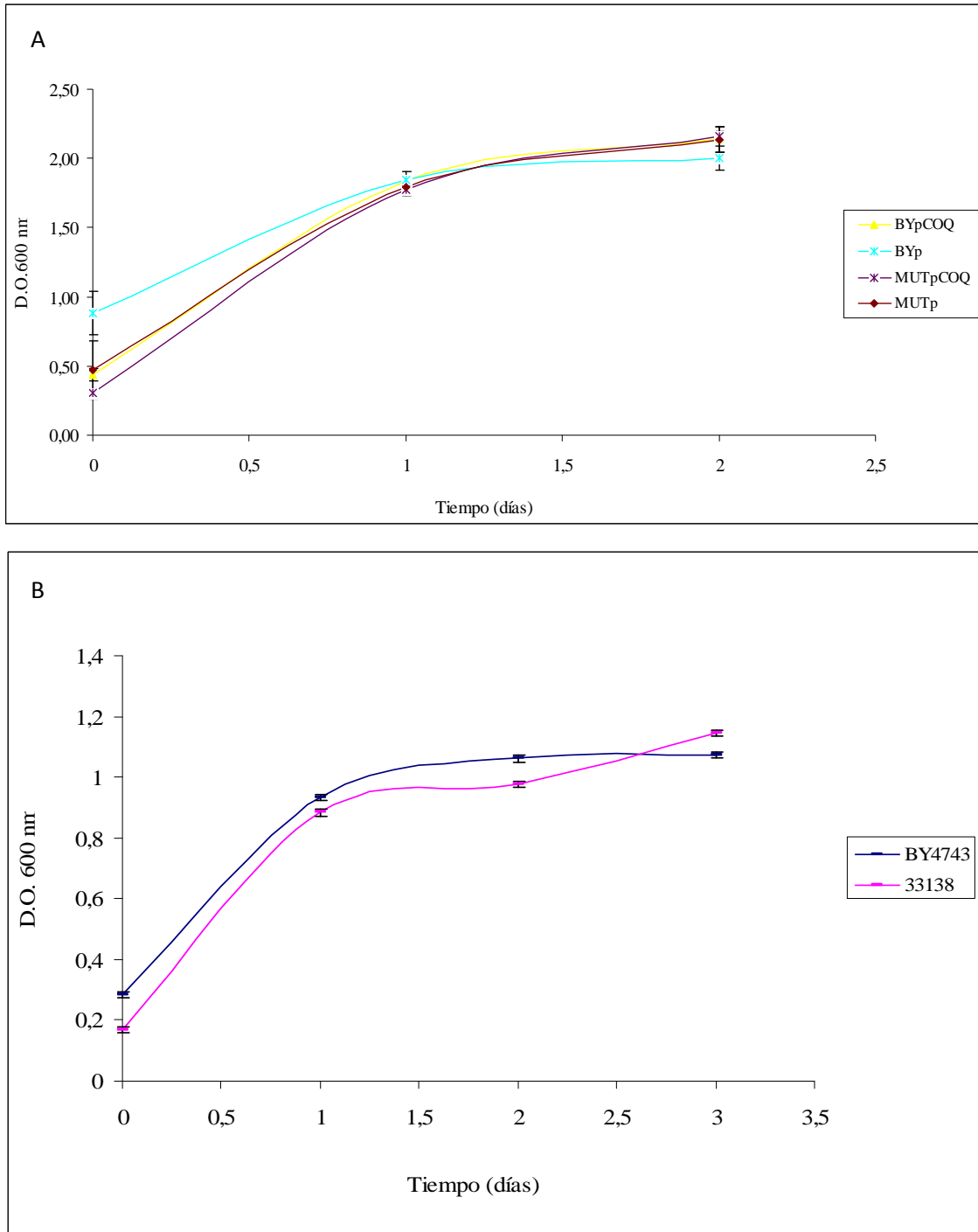


Figura 1.13. Seguimiento del crecimiento en fase exponencial por D.O._{600nm}, A) de las cepas transformadas con plásmidos y B) cepas sin plásmidos.

Seguimiento de la población celular total

Partiendo de un inóculo inicial de 10^5 cel/mL, se observó al final una población celular para la mayoría de las cepas del orden de 2×10^7 cel/mL.

En los estudios de cinética de crecimiento, tanto para la fermentación como para el crecimiento en fase exponencial, realizadas con la cepa 33138 se detectó un fuerte olor a “miel”. La muestra se analizó en busca de algún compuesto característico mediante GC/MS- TIC, utilizando la librería (base de datos) del equipo.

La muestra también se analizó mediante cromatografía gaseosa con detector olfatimétrico (GCO), que permite separar los compuestos y una vez separados son evaluados sensorialmente a la salida de la columna cromatográfica, a su vez el detector FID brinda un cromatograma. De esta manera se pueden asignar olores a los picos y/o determinarse a qué tiempos de retención se detectan. Si bien mediante GCO confirmamos la salida del aroma de tipo “miel” a $t_r = 27$ min, no lo pudimos correlacionar con ningún compuesto específico.

Mediante estas metodologías cromatográficas no pudimos identificar el compuesto. Por lo cual en un futuro se deberá procesar la muestra por otras técnicas para lograr la caracterización del compuesto.

1.2- Análisis de isoprenoides

Para la determinación de los monoterpenos y sesquiterpenos producidos en las distintas condiciones de crecimiento (en fase exponencial y fermentación), los compuestos se aislaron mediante extracción en fase sólida y se analizaron mediante GC-MS/SIM. Se utilizaron fragmentos iónicos (m/z) específicos para cada componente y $m/z = 45$ para el estándar interno 2-octanol.

Los resultados de la respuesta metabólica en la formación de terpenoides para las distintas condiciones figuran en la Tabla 1.8.

Tabla de Datos 1.8. Análisis de los isoprenoides producidos en las condiciones de crecimiento en fase exponencial A) y fermentación B). La cuantificación de los isoprenoides se realizó mediante curvas de calibración, utilizando el 2-octanol como estándar interno (el fragmento iónico $m/z = 45$). En los casos en los que no se detectaron compuestos se indica ND.

A) Crecimiento en fase exponencial

Cepas	Compuesto $\mu\text{g/L}$			
	Linalol	alfa-terpineol	Geraniol	trans- Nerolidol
MUTpCOQ	14,59	6,61	5,53	249,29
MUTp	12,35	4,66	2,26	95,51
BYpCOQ	12,76	5,55	13,86	320,16
BYp	10,70	4,84	4,22	103,71
33138	2,15	0,81	ND	21,74
By4743	3,55	0,35	0,63	98,71

B) Fermentación

Cepas	Compuesto $\mu\text{g/L}$			
	Linalol	alfa- terpineol	Geraniol	trans Nerolidol
MUTpCOQ	7,95	1,40	1,92	192,89
MUTp	9,07	7,43	5,47	202,75
BYpCOQ	6,91	5,61	5,39	142,96
BYp	7,3	3,23	7,67	185,32
33138	2,36	ND	ND	87,89
BY4743	1,81	ND	ND	97,07

Análisis de las cepas en contexto mutante 33138

Las Figuras 1.14 y 1.15 y la Tabla 1.8 muestran los resultados obtenidos para las distintas condiciones de crecimiento, para la cepa transformada con el plásmido sobreproductor pHA1-1 (MUTpCOQ), comparada con su respectivo vector (MUTp) y con la cepa parental 33138 (que tiene deletadas las dos copias cromosómicas de *COQ1*). Como se puede observar los mayores niveles obtenidos fueron para el sesquiterpeno nerolidol con valores de hasta 250 $\mu\text{g/L}$ y para el monoterpeno linalol con valores de hasta 15 $\mu\text{g/L}$.

Para los monoterpenos alfa-terpineol y geraniol los niveles no superan los 8 y 6 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

Se detectaron pequeñas cantidades de Nerol en la fermentación a niveles menores de 2 $\mu\text{g/L}$ para las muestras MUTpCOQ y MUTp. Los bajos niveles de Nerol obtenidos no permiten evaluar la modificación de su producción.

Para las condiciones de crecimiento los resultados muestran una mayor producción para la cepa sobreproductora MUTpCOQ con respecto a la cepa con el vector vacío MUTp y a la cepa sin plásmido 33138.

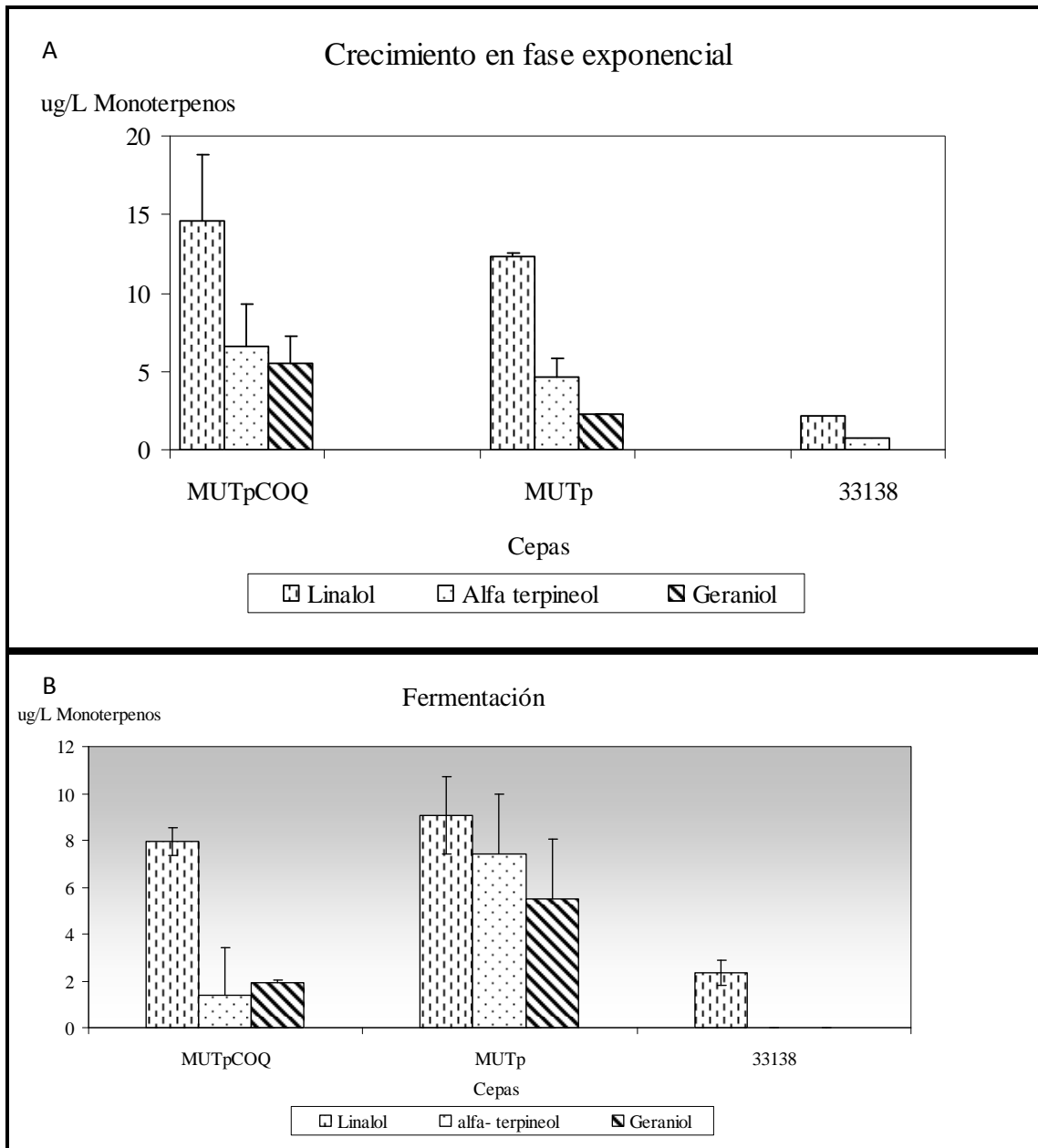


Figura 1.14 Análisis de monoterpenos producidos por las cepas en contexto 33138 (no tiene copias funcionales de *COQ1* en el cromosoma). MUTpCOQ: 33138 transformada con el plásmido pHA1-1

sobreproductora de Coq1p, MUTp: 33138 transformada con el plásmido vacío pADCL y 33138: cepa sin plásmido. Se muestran los resultados del análisis en condiciones de crecimiento en fase exponencial A) y en fermentación B).

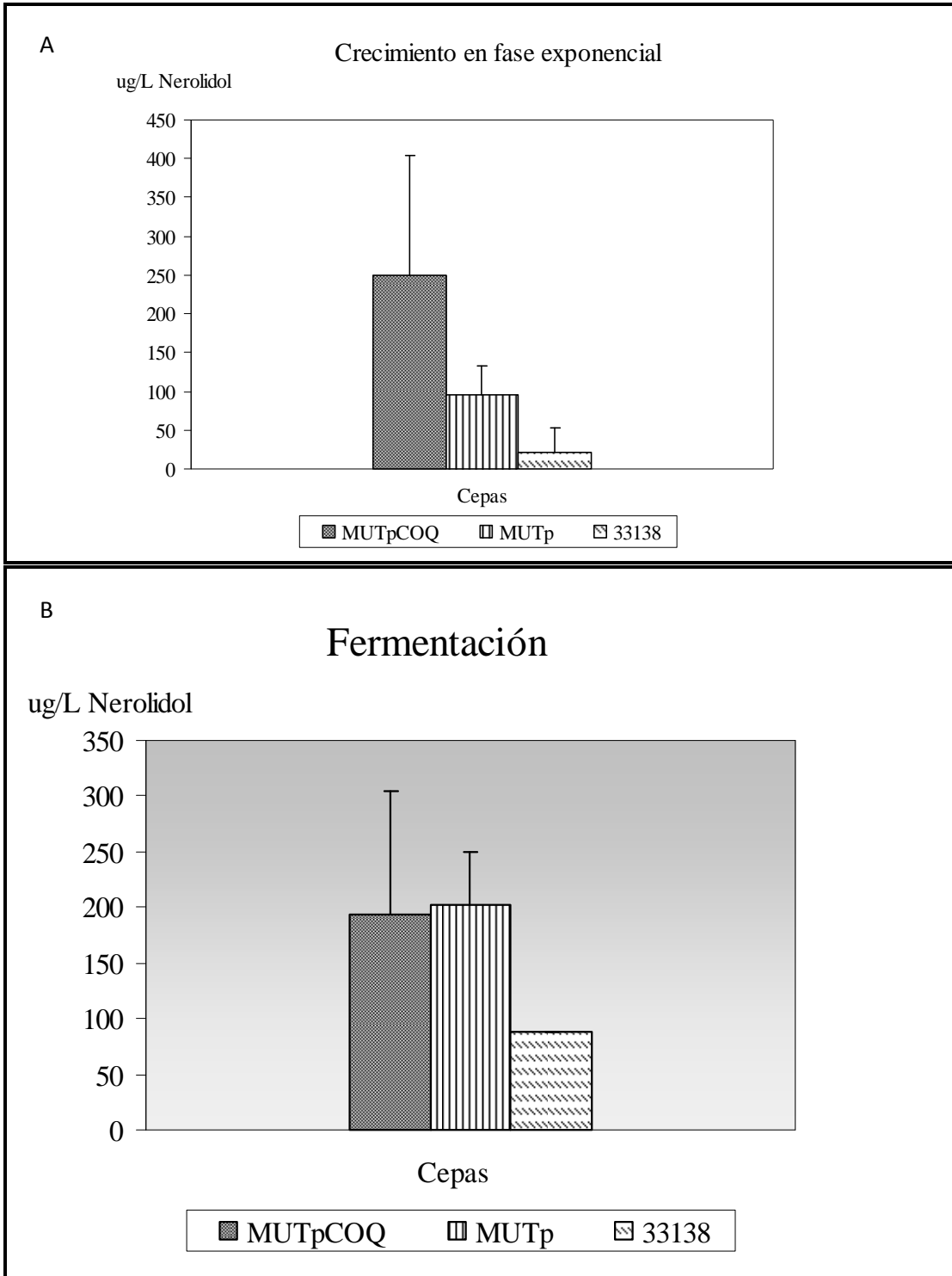


Figura 1.15 Análisis de sesquiterpeno, nerolidol producido por las cepas en contexto 33138 (no tiene copias funcionales de *COQ1* en el cromosoma). MUTpCOQ: 33138 transformada con el plásmido pHA1-

1 sobreproductor de Coq1p, MUTp: 33138 transformada con el plásmido vacío pADCL y 33138: cepa sin plásmido. Se muestran los resultados del análisis en condiciones de crecimiento en fase exponencial A) y en fermentación B).

Análisis de los isoprenoides producidos en contexto BY4743

Las Figuras 1.16 y 1.17 y la Tabla 1.8 muestran los resultados obtenidos con las distintas condiciones de crecimiento, para la cepa BY4743 transformada con el plásmido sobreproductor pHA1-1 (BYpCOQ), comparada con su respectivo vector (BYp) y con la cepa parental sin plásmido BY4743.

En este caso también se observan mayores niveles para la síntesis del sesquiterpeno nerolidol con valores de hasta 320 $\mu\text{g/L}$.

Para el monoterpeno linalol se alcanzan valores de 13 $\mu\text{g/L}$, muy similares a los obtenidos por las cepas en contexto 33138.

Para los monoterpenos alfa-terpineol y geraniol los niveles alcanzados fueron de hasta 5 y 14 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

No se detectó nerol en ninguna de las cepas para las distintas condiciones de crecimiento (fermentación, crecimiento en fase exponencial).

En las condiciones de crecimiento en fase exponencial se repite el mismo patrón en donde figura una mayor producción para la cepa sobreproductora de *COQ1* (BYpCOQ) con respecto a la cepa transformada con el vector vacío (BYp) y a la cepa sin plásmido BY4743.

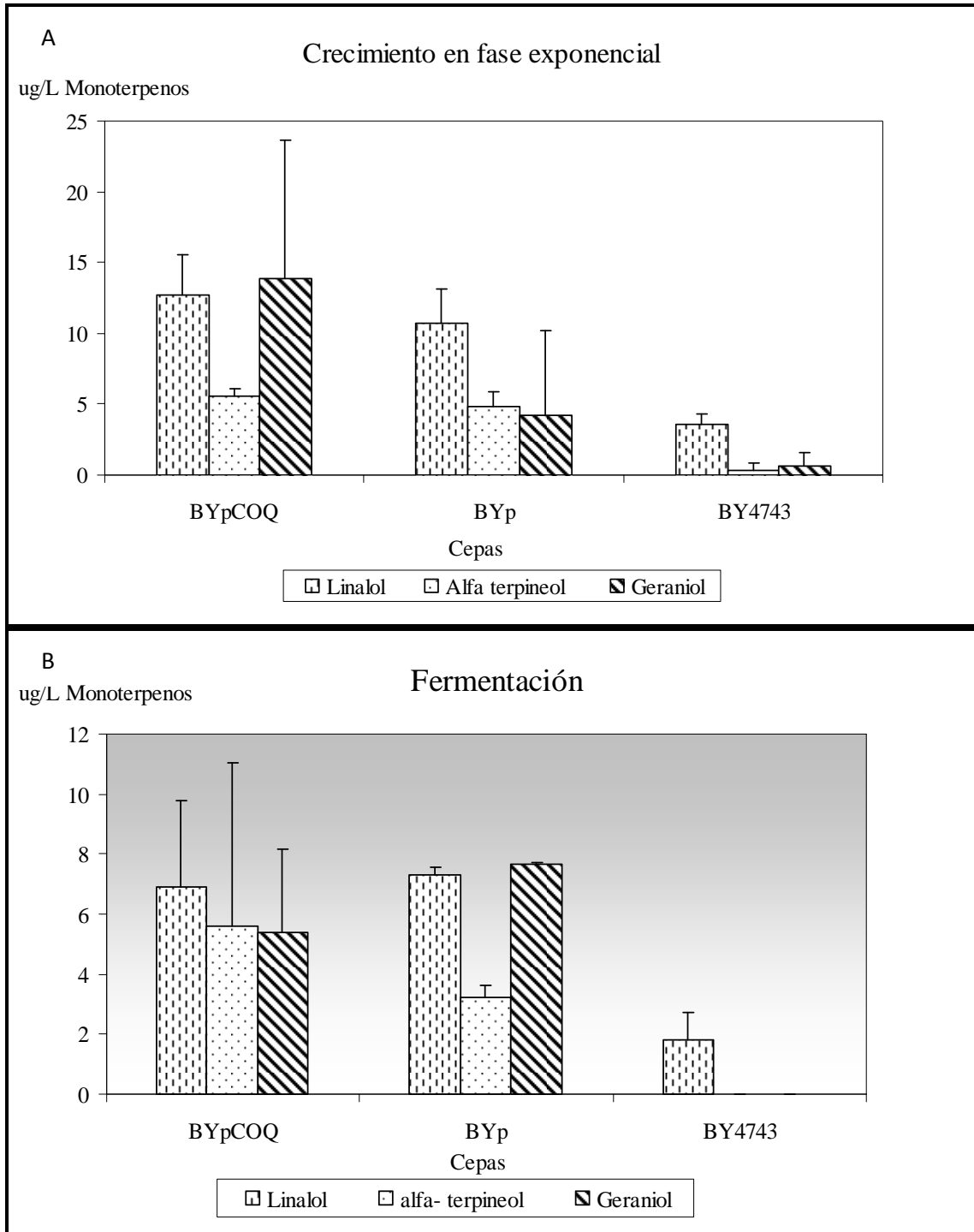


Figura 1.16 Análisis de monoterpenos producidos por las cepas en el contexto BY4743. BYpCOQ: BY4743 transformada con el plásmido pHA1-1, BYp: BY4743 transformada con el plásmido vacío pADCL y BY4743 wild type: cepa sin plásmido. Se muestran los resultados del análisis en condiciones de crecimiento en fase exponencial A) y en fermentación B).

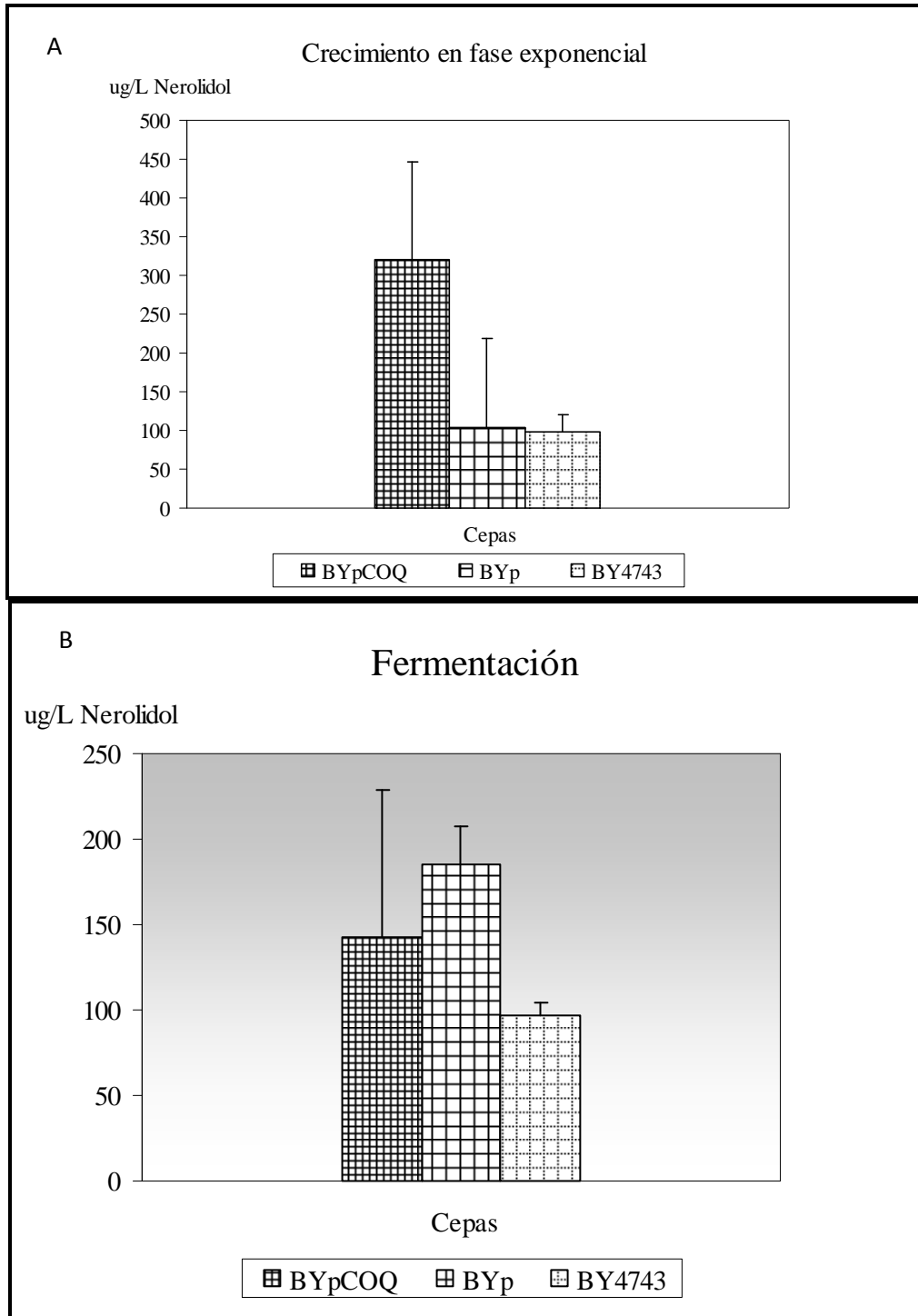


Figura 1.17 Análisis de sesquiterpeno, nerolidol producido por las cepas en el contexto BY4743. BYpCOQ: BY4743 transformada con el plásmido pHA1-1, BYp: BY4743 transformada con el plásmido vacío pADCL y BY4743 wild type: cepa sin plásmido. Se muestran los resultados del análisis en condiciones de crecimiento en fase exponencial A) y en fermentación B).

En las distintas condiciones crecimiento en fase exponencial y fermentación, para las cepas de trabajo, no se detectaron los isoprenoides citronelol ni cis-nerolidol.

Por otro lado, si calculamos la proporción relativa de isoprenoides entre la cepa sobre-expresante y la cepa control con el plásmido vacío, durante el crecimiento en fase exponencial (Tabla 1.9), podemos observar que en condiciones de sobre-expresión los isoprenoides que experimentan un mayor incremento son el monoterpene geraniol y el sesquiterpene trans- nerolidol.

Tabla 1.9. Proporción relativa de terpenoides de la cepa que sobreexpresa COQ1 vs la misma cepa con el vector vacío.

Compuesto	MUTpCOQ/MUTp	BYpCOQ/BYp
Linalol	1,2	1,2
alfa-terpineol	1,4	1,1
Geraniol	2,4	3,3
trans-Nerolidol	2,6	3,1

Los resultados obtenidos muestran que tanto la cepa MUTpCOQ como BYpCOQ, presentan una relación mayor a la unidad para los distintos isoprenoides medidos, indicando que el gen *COQ1* está implicado en la biosíntesis de los monoterpenos linalol, alfa-terpineol, geraniol y sesquiterpene trans-nerolidol. Los mayores valores de geraniol y trans-nerolidol obtenidos con la BYpCOQ, podrían deberse a las copias funcionales de *COQ1* en el cromosoma.

4. Análisis estadístico

Los resultados de la producción de isoprenoides en las diferentes condiciones de crecimiento se compararon mediante el test estadístico de Wilcoxon.

En el caso del monoterpene linalol se puede apreciar una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la producción del mismo en las diferentes condiciones de crecimiento ($Z = 2.90$, $p = 0.0037$).

Para los monoterpenos geraniol y alfa-terpineol si bien existen diferencias significativas entre las distintas cepas, no se observan diferencias significativas frente a las diferentes condiciones de crecimiento ($p > 0.05$)

Para el sesquiterpeno Nerolidol las cepas presentan a un 92%, diferencias significativas, pero tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas frente a las distintas condiciones de crecimiento ($p > 0.05$).

Discusión

Los resultados obtenidos indican que para las cepas transformadas el crecimiento de las levaduras así como el perfil de velocidad de fermentación son similares. La modificación genética introducida, mejora el perfil de crecimiento (con respecto a la cepa BY4743 y 33138) y no altera el proceso fermentativo (comparar con M522).

Las condiciones óptimas para la síntesis de isoprenoides dependen de la estrategia utilizada. La formación de terpenos va a depender no sólo de la cepa utilizada, sino también de las condiciones experimentales ensayadas, como son la temperatura y los nutrientes del medio que afectan la calidad y cantidad de producto formado (Berger, 1995).

En Carrau et al. (2005), trabajando con otras condiciones experimentales y con cepas de *S. cerevisiae* nativas de Uruguay se lograron niveles de nerolidol de 2 $\mu\text{g/L}$. Nuestros resultados muestran que cambiando las condiciones experimentales y trabajando con las cepas de laboratorio, BY4743 y 33138 se obtienen niveles de nerolidol del orden de 100 $\mu\text{g/L}$ con mayor producción para la cepa BY4743 con respecto a 33138.

La formación de los terpenos está influenciada por las condiciones redox (Carrau et al. 2005). Se ha visto, mediante el análisis fisiológico sobre mutantes nulos de *COQ1* (Huang et al., 2011), que si bien las cepas mutantes pueden crecer y reproducirse, se producen cambios en el metabolismo como son la formación de más especies reactivas de oxígeno y cambios en los potenciales de membrana mitocondrial, entre otros. Por otro lado, hay que considerar que en algunos casos los plásmidos multicopia para lograr altos niveles de expresión pueden requerir incrementos de poder reductor para la síntesis. Si bien todos estos factores pueden afectar la síntesis, nuestros resultados indican que en condiciones de crecimiento en fase exponencial (microaeróbica) se obtuvieron, en todos los casos, mayores niveles de isoprenoides para las cepas

sobreproductoras de Coq1p. También se evidencia la contribución en la producción de isoprenoides por otras vías.

Los resultados obtenidos durante el crecimiento en fase exponencial, en el cual el patrón de comportamiento que se obtuvo mostró una mayor producción para la cepa sobreproductora con respecto a su vector y a la cepa parental y no existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la producción de los isoprenoides geraniol, alfa terpineol, trans-nerolidol y aumento para el linalol, se establece como protocolo de análisis para la síntesis de isoprenoides trabajar en condiciones de crecimiento en fase exponencial.

Si bien *S. cerevisiae* tiene suficiente GPP libre, Oswald et al. (2007) han demostrado que la falta de formación de compuestos monoterpenoides se puede atribuir a una falta de actividad enzimática y no a la disponibilidad de GPP.

Por otro lado, como ya se ha mencionado anteriormente *S. cerevisiae* cataliza reacciones de biotransformación de monoterpenos. Entre ellas se encuentran las reacciones de reducción de geraniol a citronelol, translocaciones de geraniol y nerol a linalol y ciclaciones de nerol y linalol a alfa-terpineol.

En nuestro caso no se detectó citronelol en ninguna de las cepas de trabajo y dado que la conversión de geraniol a citronelol es estereoespecífica en *S. cerevisiae* (Gramática et al., 1982) tampoco hubo bioconversión. Esto pudo deberse a un bajo pool endógeno de la enzima oxido-reductasa correspondiente o a la poca cantidad de sustrato (geraniol) disponible. Por lo cual no obtuvimos síntesis ni bioconversión para el citronelol.

Las reacciones químicas de biotransformación se han reportado en sistemas de fermentación, en donde hay mayor tiempo de contacto entre el medio y las levaduras, y poco se ha trabajado en condiciones de crecimiento exponencial.

En el trabajo de Fischer et al. (2011) se demuestra que la conversión de geraniol a linalol depende del tiempo y del pH. En nuestro caso, en ambas condiciones (crecimiento en fase exponencial y fermentación) se trabaja a un pH de 3.5, por lo cual este factor va a influir de la misma manera. Cuando trabajamos en condiciones de crecimiento en fase exponencial, el período de tiempo es corto como para que influya en la conversión química. A su vez el análisis estadístico muestra que para el caso del geraniol no existen diferencias significativas entre las dos condiciones por lo cual la

probabilidad de conversión de geraniol a linalol en nuestras condiciones de trabajo son bajas.

Considerando que se obtuvo mayor producción de linalol en las condiciones de crecimiento en fase exponencial y que para el alfa-terpineol no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas en las dos condiciones, la biotransformación del linalol al alfa-terpineol no sería significativa.

Estos resultados confirman que las posibles biotransformaciones para los monoterpenos geraniol, linalol y alfa-terpineol se consideran despreciables, confirmando que su producción surge de GPP y no de la bioconversión.

La producción de linalol es mayor durante el crecimiento en fase exponencial que para la fermentación. Si bien la disminución en la concentración a lo largo del tiempo podría deberse a la pérdida del terpenoide volátil bajo las condiciones experimentales, se debería esperar el mismo comportamiento para los otros terpenos. Al no observarse pérdida en los otros terpenos, se considera que las pérdidas por las condiciones experimentales son despreciables y que el aumento observado en el linalol en las condiciones de crecimiento en fase exponencial se debe al sistema de expresión.

Los mayores niveles de terpenoides se obtuvieron para el trans- nerolidol, no detectándose cis-nerolidol.

El nerolidol, es un alcohol sesquiterpeno derivado de farnesilpirofosfato (FPP), por otro lado también obtuvimos geraniol, monoterpeno cuyo precursor es geranilpirofosfato (GPP), por lo cual los resultados sugieren que Coq1p podría estar actuando como una enzima con actividad dual sobre dos sustratos diferentes (GPP y FPP).

En trabajos previos (Fischer et al., 2011) se ha visto que en levaduras la enzima FPPS tiene actividad de geranil y farnesilpirofosfato sintasa.

Se ha establecido que GPPS tiene actividad como heterodímero (Burke et al., 1999). Estudios mutacionales de farnesilpirofosfato sintasa (FPPS) y geranilgeranilpirofosfato sintasa (GGPPS) (Narita et al., 1999) demuestran que las especificidades se definen principalmente por unos pocos elementos estructurales, en los cuales el primer motivo rico en aspartato es fundamental.

La comparación de secuencias de aminoácidos de Coq1p con FPPS muestra la presencia de tres dominios altamente conservados, en los cuales se encuentra el dominio rico en

aspartato y la comparación de los coeficientes de hidrofobicidad indican que las dos proteínas se pliegan en similares estructuras tridimensionales (Ashby & Edward, 1990).

Nuestros resultados metabolómicos muestran que la sobreexpresión de Coq1p promueve la formación de compuestos mono y sesquiterpenicos. En condiciones de crecimiento en fase exponencial el gen *COQ1* participa en la síntesis de isoprenoides cumpliendo una función de geranilpirofosfato sintasa no descrita previamente. También se comprueba una actividad de nerolidol sintasa. En la literatura se han descrito enzimas vegetales con actividad dual linalol/nerolidol sintasa (Nagegowda et al., 2008)

En este trabajo la formación de terpenoides por levaduras se logró en ausencia de genes o precursores vegetales.

Capítulo II - Diversidad molecular de *COQ1*

Introducción

Coenzima Q (COQ)

La vía de isoprenoides en *S. cerevisiae* se puede considerar que consta de dos partes distintas: una sección que es común a muchas ramas y termina con la formación de hexaprenilpirofosfato (HPP) (Ver Figura 2.1) y otra parte de la vía dedicada principalmente a la biosíntesis de ergosterol (Huang et al., 2011).

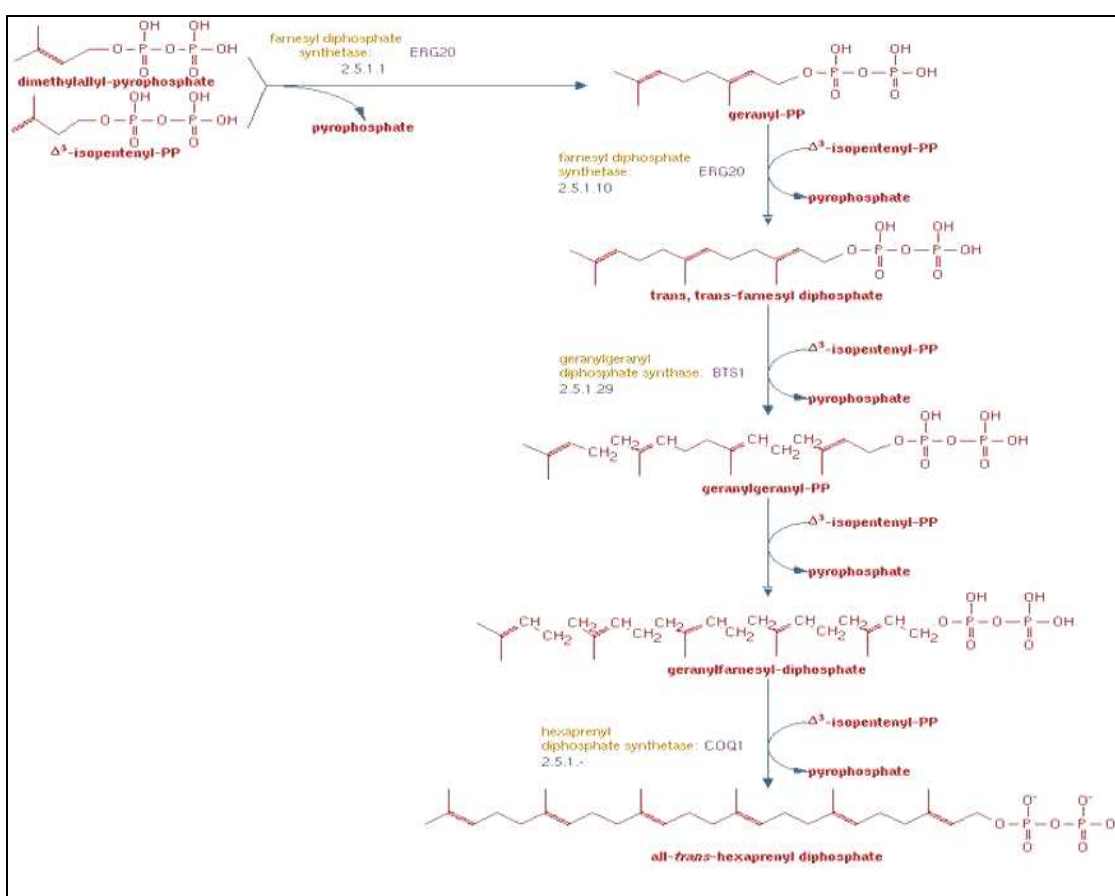


Figura 2.1 Biosíntesis de hexaprenilpirofosfato, HPP. Tomado de www.yeastgenome.org

El gen *COQ1* de levadura codifica para una hexaprenilpirofosfato sintasa (Ashby & Edwards, 1990), responsable de determinar la longitud de la cola de la cadena isoprenoide de la coenzima Q específica de cada especie (Okada et al., 1998).

La Coenzima Q o ubiquinona o Q es un lípido unido a la membrana mitocondrial, compuesto por una benzoquinona y un isoprenoide de cadena lateral de longitud variable (Figura 2.2), que se encuentra en las membranas de todas las células eucariotas (Zhang et al., 2008).

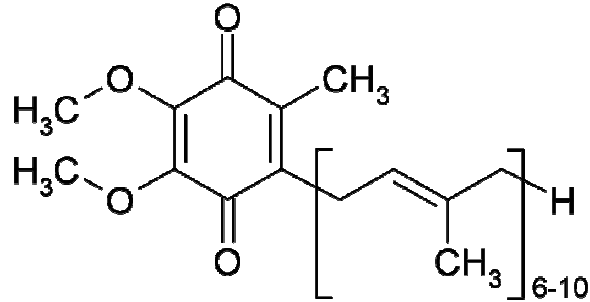


Figura 2.2 Coenzima Q

El precursor del anillo aromático benzoquinona es el ácido 4-hidroxibenzoico (4-HB) derivado de la tirosina. En la levadura, 4-HB también puede ser sintetizado a partir de corismato a través de la vía del ácido shikímico (Figura 2.3).

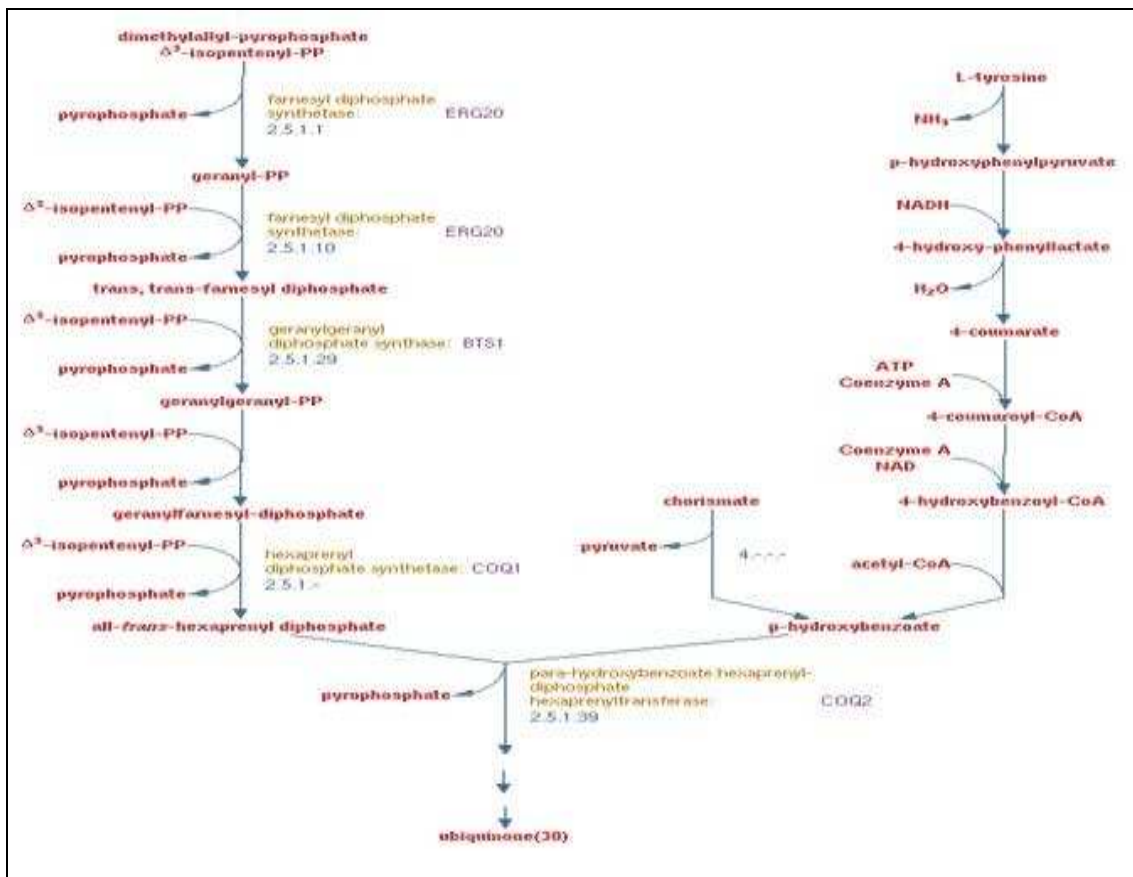


Figura 2.3 Biosíntesis de Ubiquinona. A la derecha figura la vía de síntesis de la benzoquinona.

Tomado de www.yeastgenome.org

Se cree que todos los genes eucariotas biosintéticos de ubiquinonas son similares a los encontrados en *S. cerevisiae* con la excepción de aquellos implicados en la síntesis de la cadena lateral isoprenoide (Zhang et al., 2008).

Los bloques de construcción para la síntesis de la cadena lateral se proporcionan a partir de dimetilalilpirofosfato (DMAPP) e isopentenilpirofosfato (IPP).

De acuerdo con la longitud de la cadena isoprenoide producida se pueden clasificar los tipos de trans-poliprenil difosfato sintasa (trans poli- PDS) como de cadena corta (C10-C25) o de cadena larga (C30-C50). Los poli-PDS de cadena corta como farnesilpifosfato sintasa (FPPS) y geranilgeranilpirofosfato sintasa (GGPPS) catalizan la condensación inicial de isopentenilpirofosfato (IPP) (C5) a dimetilalilpirofosfato (DMAPP) (C5) y la adición posterior de isopentenilpirofosfato respectivamente, mientras que los poli-PDS de cadena larga catalizan la condensación de IPP a FPP (C15) o GGPP (C20) para generar productos más largos que el hexaprenilpirofosfato (C30) .

La longitud de la cadena isoprenoide se determina por el producto generado por el poliprenil difosfato sintasa (poli-PDS), que se clasifican en homodímero (por ej., octa-PDS IspB en *E. coli*) y heterotetrámero (ej. deca-PDS Dps1 y D-less poliprenilo difosfato sintasa (Dlp1) en *S. pombe* y en los tipos humanos - ambos ejemplos de homo y heterotetrameros son ortólogos de Coq1-) (Ver más adelante) (Zhang et al., 2008).

De acuerdo al número de isoprenos de su cadena lateral pueden diferenciarse distintos tipos de coenzimas Q, encontramos a *Saccharomyces cerevisiae* que sintetiza 6 unidades de isopreno (Q6), *Escherichia coli* sintetiza 8 (Q8), 9 unidades sintetiza *C. elegans* (Q9) y 10 unidades sintetizan la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* y los seres humanos (Q10).

Se han realizado estudios para determinar la importancia de la longitud de la cadena lateral. Los resultados muestran que las células parecen tener una preferencia por su propio tipo de ubiquinona, logrando así la máxima actividad. La preferencia se relaciona con la hidrofobicidad, con una posible afinidad entre la cadena isoprenoide y la composición lipídica de la membrana de un determinado organismo (Okada et al., 1998).

La química redox de Q es responsable de su función en la cadena respiratoria de transporte de electrones de las membranas mitocondriales, funciona como antioxidante lipófilo y reduce el estrés oxidativo (Tran & Clarke, 2007).

Q es un portador de electrones en la cadena respiratoria, acepta electrones de cualquiera de los complejo I (NADH-reductasa) o II (succinato deshidrogenasa) y luego los dona al complejo III (complejo bc1 o coenzima Q- citocromo C reductasa) participando en la estabilización del mismo (Gin & Clarke, 2005). Actúa como antioxidante mediante la ruptura de la cadena de lípidos de peroxi radicales. Participa en la oxidación de sulfuro y también regula las propiedades fisicoquímicas de las membranas. Estudios recientes han sugerido funciones adicionales, como el alargamiento de la esperanza de vida en *Caenorhabditis elegans* (Q10) y en el metabolismo de pirimidina en los seres humanos (Zhang et al., 2008).

Q se utiliza ampliamente como un suplemento dietético y en una variedad de terapias clínicas, incluyendo el tratamiento de varias enfermedades neuro-degenerativas y ciertos defectos de la cadena respiratoria (Tran & Clarke, 2007).

La Coenzima Q10 (CoQ10) juega un papel fundamental en la fosforilación oxidativa ya que distribuye los electrones entre las diferentes deshidrogenasas y los segmentos del citocromo de la cadena respiratoria (Mollet et al., 2007).

Las secuencias de aminoácidos de la proteína Coq1 e isoprenilpirofosfato sintasas relacionadas de diferentes eucariotas contienen siete motivos altamente conservados (Wang & Ohnuma, 2000).

El análisis de la secuencia de aminoácidos ha demostrado que siete regiones conservadas y dos motivos ricos en aspartato-DDXXD se encuentran en todo tipo de trans- poli-PDS. La primera región tiene un motivo DDXXD o DDXXXXD llamado FARM (Primer motivo rico en Asp), que ha sido designada como la región de determinación de la longitud de cadena y la que se une al sustrato alílico DMAPP, GPP o FPP, dependiendo de la reacción catalizada (Fischer et al., 2011). El segundo motivo presenta una secuencia DDXXD llamada SARM (segundo motivo rico en Asp) que se une a isopentenilpirofosfato homoalílico (Ashby & Edward, 1990; Szkopinska & Plochocka, 2005). Los dos sitios de unión están cerca espacialmente.

El sitio catalítico de la enzima consiste en una gran cavidad central formada en su mayor parte por R-hélices antiparalelas con las dos regiones ricas de aspartato FARM y SARM situadas en las paredes opuestas.

Los mecanismos de las proteínas de cadena corta de poli-PDS han sido bien caracterizados y se han resuelto sus estructuras cristalinas tridimensionales.

Coq1 contiene las siete regiones normalmente conservadas que se observan en las trans-PDS, incluyendo el primer y segundo motivos ricos en aspartato FARM y SARM. Presenta más secuencias entre los dominios I y II y entre los dominios IV y V. En las posiciones cuarta y quinta delante del motivo FARM posee residuos de aminoácidos de tamaño pequeño (Ala188 y Ser189), similares a las IspB de *E. coli* y Dps1 de *S. pombe* (ortólogos de Coq1); esto es una característica importante de las trans-PDS de cadena larga (Zhang et al., 2008).

Cuando se compara la secuencia de aminoácidos de hexaprenilpirofosfato sintetasa con secuencias de aminoácidos de la enzima relacionada farnesilpirofosfato sintetasa se encuentra la presencia de tres dominios altamente conservados (Ashby & Edward, 1990).

Estudios mutacionales de farnesilpirofosfato sintasa (FPPS) que provocan la conversión a geranilpirofosfato sintasa (GPPS), apoyan la idea de la evolución a partir de un ancestro en común de la familia de preniltransferasas, y que las especificidades se definen principalmente por unos pocos elementos estructurales: los aminoácidos en la cuarta y quinta posición antes del primer motivo rico en aspartato y la inserción de dos aminoácidos en dicho motivo (Narita et al., 1999).

En el caso de GGPPS de *Sulfolobus acidocaldarius*, la sustitución de un aminoácido no aromático por uno aromático en la posición cuarta antes de la FARM o la inserción de dos aminoácidos en la FARM provoca la conversión a FPPS. Esto sugiere, independientemente de si acortan el producto en una unidad de longitud, que una enzima con ambos tipos de mutaciones debería producir un producto más corto que FPP como es la GPP (Narita et al., 1999).

En otro estudio se trabajó con FPPS mutada en la posición 197 mediante un cambio del aminoácido K a E (K197E, en el dominio catalítico). Este aminoácido está en el centro activo de la enzima entre dos motivos ricos-aspartato lo que lleva a un aumento de la

profundidad de la bolsa de unión al sustrato y por consiguiente la actividad de la FPPS mutada K197E está disminuida (Plochocka et al., 2000).

Los conocimientos actuales sobre la ruta biosintética de Q en organismos eucariotas se derivan principalmente de la caracterización de la acumulación de intermediarios en cepas mutantes Q-deficientes de *Saccharomyces cerevisiae* (Tran & Clarke, 2007).

En la levadura, hay ocho genes *COQ* requeridos para la biosíntesis de Q. Las mutaciones o deleciones en cualquiera de estos genes dan lugar a la pérdida de producción de Q y falta de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables, como etanol y glicerol (Misawa, 2011).

Mutantes nulos de *coq* que no respiran (son incapaces de crecer en fuentes de carbono no fermentables), mediante la adición exógena de Q6 en medio líquido y con aireación vigorosa se observó que se restauraba la respiración. Sin embargo, a diferencia de los otros mutantes *coq* deficientes en Q (*coq1-coq9*), el mutante *coq10* tiene niveles casi normales de Q6, lo que indica que esta proteína no es necesaria para la biosíntesis de Q. En su lugar, el polipéptido Coq10 puede funcionar como una chaperona de unión a Q, necesaria para el correcto funcionamiento de Q en la cadena respiratoria de transporte de electrones (Tran & Clarke, 2007).

En otros estudios se ha observado que cepas que no tiene Coq1 mostraron menores niveles de GPP, FPP, GGPP, teniendo un efecto negativo sobre la acumulación de los mismos y un incremento en la cantidad de algunos esteroides de escualeno a ergosterol. En este estudio también se observa una correlación inversa entre los niveles de Coq1 y esteroides (Huang et al., 2011).

La expresión de homólogos de Coq1 de una variedad de organismos puede restaurar la biosíntesis de Q y la respiración en mutante nulos de *coq1* de levadura por poliprenil difosfato sintasas (PDS) de otros organismos y las isoformas Q producidas contienen distinto número de unidades de isopreno (Okada et al., 1998).

En algunos casos, estos ortólogos provienen de organismos que no producen Q. Por ejemplo, *Haemophilus influenzae* produce dimetilmenaquinona teniendo una cola

heptaprenil, mientras que *Sulfolobus acidocaldarius* (*S. acidocaldarius*) produce calderiellaquinone con una cola hexaprenil.

El ortólogo de Coq1p en *S. acidocaldarius* es una geranilgeranilpirofosfato sintasa (GGPPS) que ha sido mutagenizada y seleccionada por la capacidad de producir productos preniles más largos, como en el caso del pentaprenilpirofosfato (Gin & Clarke, 2005).

El ortólogo Coq1 de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Dps1) falla para complementar el mutante nulo *coq1* de *S. cerevisiae* (Suzuki et al., 1997).

Se propusieron varias teorías para explicar porque Coq1 se comporta de manera diferente cuando se expresa en *S. pombe*, entre las cuales se mencionan los mecanismos de plegado de la proteína, modificaciones post traduccionales y la existencia de algún otro factor que funcione como chaperona (Zhang et al., 2008).

Se ha demostrado que Coq1 no puede trabajar sola en *S. pombe*, sino que forma un heterodímero con Dps1 de *S. pombe* (se genera entre Coq1 y Dps1 de las diferentes especies) dando como resultado una actividad de deca-PDS.

Se ha informado en *S. pombe* la formación de dos componentes similares de PDS con diferentes actividades; FPS1 forma una FPPS homomérica y también forma un complejo con la proteína heteromérico FPS1-como Spo9 para generar una GGPPS. Estos ejemplos muestran la formación de PDS como complejo heteromérico y según cuales sean los componentes que se combinan se puede modificar el producto final. Se piensa en un proceso por el cual las trans-PDS han evolucionado a partir de homo a hetero tipos (Zhang et al., 2008).

Las poliprenil difosfato sintasas de *S.pombe*, de ratón y de humano son heterotetrámeros de dos subunidades de proteínas PDSS1 y PDSS2 (Tran & Clarke, 2007).

Algunas prenilttransferasas de cadena corta se piensa que funcionan como homodímeros, sin embargo Burke et al. (1999) trabajando con anticuerpos demuestran la actividad catalítica de ambas subunidades, confirmando que la GPPS funciona como heterodímero, estableciéndose como precedente para la hexaprenilpirofosfato sintetasa y heptaprenilpirofosfato sintasa de origen microbiano.

Se han identificado homólogos de los genes *COQ* de levadura en mamíferos, a través de la homología de secuencias. Homólogos humanos de las proteínas Coq2 y Coq3 y CoQ7 complementan funcionalmente los mutantes nulos de levaduras, indicando

además que la vía de la biosíntesis de la coenzima Q es conservada en humanos (Tran & Clarke, 2007).

En la secuenciación de prenildisfosfato sintasa subunidad 1 (PDSS1), que codifica el ortólogo humano del gen *COQ1* de levadura (clave para la síntesis de Q10), se ha identificado una sustitución de nucleótidos homocigotos que modifican una región de aminoácidos conservada de la proteína (D308E, ácido aspártico altamente conservado en la posición 308 por un ácido glutámico).

Se han transformado los genes *COQ1* y *COQ2* mutantes de humanos en levaduras y se obtuvo un crecimiento defectuoso en medio respiratorio, lo que indica que estas mutaciones son de hecho la causa de la deficiencia de la fosforilación oxidativa. El estudio realizado en una familia consanguínea con la deficiencia de CoQ10 que se atribuye a una mutación sin sentido homocigótica en PDSS1, se manifiesta como una enfermedad multisistémica con aparición temprana de sordera, encefaloneuropatía, obesidad, livedo reticularis y valvulopatía (Mollet et al., 2007).

Diversidad molecular de *COQ1* en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Uruguay

El gen *COQ1* en *S. cerevisiae* carece de intrones y codifica para una proteína de 473 aminoácidos. En este capítulo se busca determinar la diversidad molecular de *COQ1* en cepas de *S. cerevisiae* nativas de Uruguay mediante la determinación de polimorfismos de nucleótidos simples o SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*). La importancia de la detección de pequeños cambios en los dominios conservados o en el sitio catalítico podría cambiar la especificidad del sustrato, como ya se mencionó anteriormente, y esto a su vez se podría utilizar como herramienta para modular la expresión de isoprenoides.

Los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) se refieren a la variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (cambios puntuales en cualquiera de las cuatro bases: adenina o A, timina o T, citosina o C y guanina o G) en una misma región del genoma cuando se comparan diferentes individuos. Las inserciones y deleciones (indels) de una base también pueden ser consideradas como SNPs.

Dependiendo del lugar donde ocurra el SNP puede tener diferentes consecuencias a nivel fenotípico. Los SNPs que se localicen dentro de una secuencia codificante pueden modificar o no (mutación silenciosa) la cadena de aminoácidos y pueden llegar a alterar la función y estructura de las proteínas codificadas.

Los SNPs que se encuentren en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el splicing, la unión de factores de transcripción, etc.

La mayoría de los SNPs se localizan en regiones no codificantes del genoma y no tienen impacto directo conocido en el fenotipo de un individuo, estos SNPs son útiles como marcadores en genética de poblaciones y en estudios de evolución.

Existen diversas técnicas de genotificación de SNPs cuando son cambios conocidos previamente, se detallan en la Figura 2.4. La hibridación con oligonucleótidos específicos de un determinado alelo (ASO – allele specific oligonucleotides-) para detectar la falta de coincidencia de una sola base en el extremo 3', fue la primera reportada en 1979. A lo largo de los años diferentes técnicas se fueron desarrollando para mejorar los rendimientos, la precisión, aumentar la cobertura de análisis del

genoma, obtener análisis de SNPs a gran escala y lograr que las metodologías sean accesibles en términos económicos.

Method	Most significant advantage	Disadvantage	Special feature
Hybridization methods			
Reverse dot blot ²⁸	Widely used	Limited genotype discrimination	
GeneChip microarrays ³⁹	Multiplexing possible	Prone to non-specific background	Precursor to microarrays
DASH ⁴⁴	Very high probe density	High failure rates ^{41,42} , expensive	High-tech manufacturing process ⁴⁰
PNA ⁴⁶ and LNA ⁴⁸ probes	Inexpensive labelling method	Complex design rules	Dedicated instrument
TaqMan ^{49,50}	Specific as ASO probes	Not widely available	Innovative chemical design
Molecular Beacons ^{51,52}	Simplicity of assay	Expensive probes	Quantitative real-time PCR
	Simplicity of assay	Expensive probes	Versatile stem-loop structure
Allele-specific PCR			
Intercalating dye ⁶⁰	Real-time PCR assay	Requires optimization	
FRET primers ^{61,62}	Inexpensive labelling method	Non-specific products detected	Accurate quantification ¹³⁸
AlphaScreen ⁶⁴	Simplicity of assay	Expensive primers	Universal FRET primers
	Detects specific product	Expensive probes	Applicable to ASO hybridization
Primer extension			
SNPstream, GBA ⁶⁸	Accurate genotyping	Similar reagents as in PCR	
Multiplex minisequencing, SNaPshot ^{69,71}	Inexpensive and robust	Multiple detection steps	Automated high-throughput process
Pyrosequencing ^{72,74}	Multiplexing capacity	Size separation step	Compatible with capillary DNA sequencers
MassEXTEND, MassArray ⁷⁵	Sequencing of up to 50 bases	Expensive, difficult to multiplex	Dedicated instrument
GOOD assay ⁷⁷	Labelling method avoided	Expensive instrument	Multiplexing capacity ⁷⁶
	Labelling method avoided	Multi-step procedure	Sensitive mass spectrometric detection
Microarray miniseq, APEX ^{97,70}	Potential for high throughput	Requires microarray instruments	Four-colour or single-colour detection
Microarray primer extension ⁸²	Potential for high throughput	Requires microarray instruments	'Array of arrays' format
'Tag' arrays ^{85,86}	Flexible assay design	Requires microarray instruments	Generic 'tag' microarrays
Coded microspheres ⁸⁷	Multiplexing potential	Microspheres not widely available	Flow cytometric detection
TDI, fluorescence polarization ⁹⁴	Simplicity of assay	Difficult to multiplex	Universal detection principle
Oligonucleotide ligation			
Colorimetric OLA ^{95,96}	Variety of assay formats	Multiple labelled probes required	
Sequence-coded OLA ⁹⁷	Robust assay	Multiple detection steps	Resembles ELISA
Microarray ligation ¹⁰⁰	Multiplexing capacity	Size separation step, expensive probes	Polymer for sequence coding
Ligase chain reaction ¹⁰²	Potential for high throughput	Requires microarray instruments	Universal zip code microarray
Padlock probes ¹⁰⁸	Alternative to PCR	Lower efficiency than PCR	Thermostable ligase
Rolling circle amplification ⁹⁸	Localized detection	Probes difficult to produce	Avoids target amplification
	Signal amplification	Steric hindrance on solid phases	Based on circularized oligonucleotides
Endonuclease cleavage			
Restriction site analysis	Inexpensive, requires no equipment	Not suitable for high throughput	Traditional method
Invader assay ¹¹²	PCR amplification avoided	Requires large amount of DNA	Interesting FLAP endonuclease

APEX, arrayed primer extension; ASO, allele-specific oligonucleotide; DASH, dynamic allele-specific hybridization; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GBA, genetic bit analysis; LNA, locked nucleic acid; OLA, oligonucleotide ligation assay; PNA, peptide nucleic acid; TDI, template-directed incorporation.

Figura 2.4 Características de los métodos de genotipificación de SNPs. Tomado de Syvänen 2001.

Las herramientas de secuenciación masiva (NGS, next generation sequencing) se están utilizando cada vez más en genética y en estudios de genómica y se propone para la genotipificación de SNPs en gran escala (Nielsen et al., 2011).

En el caso de *S. cerevisiae* se han secuenciado totalmente 63 cepas, entre las que se encuentran 7 cepas de laboratorio comúnmente usadas (A364A, W303, FL100, CEN.PK, Σ 1278b, SK1 and BY4716), cepas de diferentes nichos ecológicos (cerveza, pan, viñedos, individuos inmunocomprometidos, diferentes fermentaciones y de la naturaleza) y ubicadas en diferentes regiones geográficas. A partir de estos datos

genómicos se determinaron la frecuencia y distribución de SNPs en comparación con la secuencia del genoma de referencia S288C. Estos datos y las nuevas herramientas de visualización, que utilizan un marco probabilístico, están disponibles en la base de datos de SNPs Browser (YSB; http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps).

La evolución de los métodos de genotipificación de SNPs van desde métodos más simples basados en identificación de alelos en genes de interés a métodos sofisticados que proporcionan medidas probabilísticas de incertidumbre y que pueden incorporar información de muchos individuos y sitios enlazados.

Como estrategia de trabajo se amplificó el gen completo *COQ1* incluyendo la región promotora utilizando distintos pares de cebadores a partir de ADNs de cepas de *S. cerevisiae* nativas uruguayas previamente seleccionadas y luego se determinaron los SNPs presentes.

Para este trabajo se utilizaron las cepas M522 y BY4743 como organismos modelo de levadura industrial y de laboratorio, respectivamente.

Como cepa de referencia se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* S288C, ya que es la cepa secuenciada de referencia (www.yeastgenome.org). Sin embargo, esta cepa no suele ser el marco ideal para determinados estudios, ya que el background genético presenta algunos inconvenientes, tales como la baja eficiencia de esporulación, incapacidad para crecer en maltosa y también para iniciar el crecimiento filamentoso frente a la falta de nitrógeno (Schacherer et al., 2007).

La cepa BY4743 es la que se ha utilizado en el proyecto de delección de todos los marcos de lectura abiertos de *S. cerevisiae* (Saccharomyces Genome Deletion Project). Se trata de una cepa diploide generada por el cruzamiento entre las cepas de laboratorio BY4741 y BY4742, a su vez derivadas de S288C, por lo cual también está relacionada genéticamente a S288C.

Por estas razones y las enunciadas en el capítulo anterior es importante trabajar también con levaduras nativas además de las cepas de laboratorio.

Algunas de las levaduras nativas seleccionadas para este trabajo fueron ensayadas anteriormente (Carrau et al., 2005) y son productoras de monoterpenos (ver figura 2.5). En la figura 2.5 se observa que las cepas presentan diferentes perfiles aromáticos, sin

embargo se observa que el linalol y el alfa-terpineol son los terpenos que más se producen en todas estas cepas vínicas de *S. cerevisiae*, en las condiciones ensayadas.

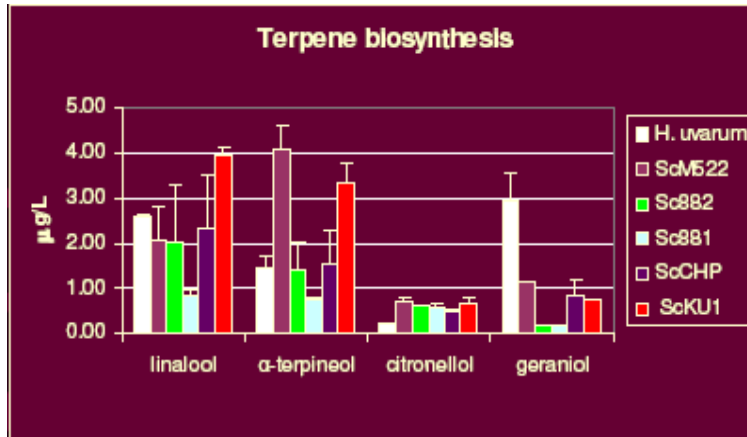


Figura - 2.5 Biosíntesis de monoterpenos por cepas de *S. cerevisiae* (Sc) y *Hanseniaspora uvarum*. (H.uvarum). Tomado de Carrau et al., 2005.

Las levaduras nativas de *S. cerevisiae* ensayadas son filogenéticamente distantes según un análisis realizado con microsatélites (ver Figura 2.6).

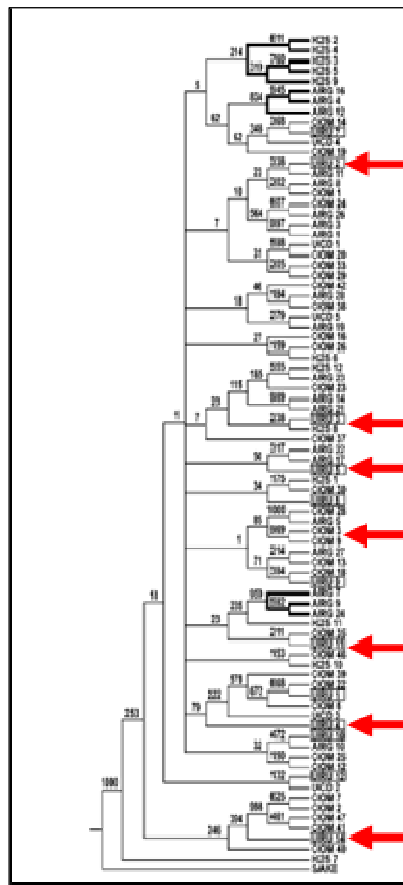


Figura 2.6 Dendrograma donde se marcan con flechas algunas de las cepas nativas seleccionadas. Se muestra su amplia distribución y alta diversidad. Tomado de Jubany et al., 2008.

Capítulo II- Materiales y Métodos

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Se trabajó con cepas de levaduras *S. cerevisiae* nativas Uruguayas y se utilizaron las cepas M522 y BY4743 como organismos modelo de levadura industrial y de laboratorio respectivamente. Ver Tabla 2.1

Como cepa de referencia se utilizó la cepa de *S. cerevisiae* S288C, cuyo genotipo es *MATa SUC2 gal2 mal mel flo1 flo8-1 hap1 ho bio1 bio6*. Es la cepa secuenciada de referencia de la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD).

Tabla 2.1: Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo

Cepa	Código
BY4743	281 (LAB-2)
M522	111 (COM-3)
FQU99/5	209 (URU-14)
CPKU1	112 (URU-6)
CP873	105 (URU-2)
CP874	106 (URU-3)
CP881	107 (URU-4)
CP882	108 (URU-5)
UY-04	205 (URU-11)
00/35	00.35

Diseño de cebadores

Para el diseño de cebadores se trabajó con la secuencia del cromosoma II de S288C correspondiente a la región de *COQ1*= YBR003W (241811 a 245232), utilizando la base de datos SGD <www.yeastgenome.org>, de forma que los cebadores abarquen tanto la región promotora como la región codificante de *COQ1*, según se muestra en la Figura 2.7.

Se utilizó dicha base de datos (< www.yeastgenome.org >) para realizar el alineamiento con otras especies de hongos, obteniéndose de esta manera las regiones conservadas por homología con *COQ1*. Para el diseño de los cebadores se eligieron regiones de *COQ1* en las cuales no se encontraron SNPs o indels en un conjunto de cepas completamente

secuenciadas (según la base de datos http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps).

Con la integración de los resultados obtenidos con las dos bases de datos se diseñaron cebadores de unas 20 pb, en regiones conservadas de *COQ1* en las que no se habían detectado SNPs, mediante el software Primer3 < <http://frodo.wi.mit.edu/> > (Figura 2.7).

Las secuencias de los cebadores se detalla en la Tabla 2.2

```

GTCTAGGTACACAGTTAGATGCACGCAATGTGCGCGAAAAGATGTTTTTTGTCCACTTTA
ACACAAATGAATGACCAGTATACCACCTATCCGTTTCCATACCGTCTTTTACTGTGTTT
ACCCTATTTTACTGCTTAAGTTCTATTGAAACCTGTCTATTATACGAAAAATTTTTTTT
TTTTTCATTCTAAGCATTTTTGTGGCATCTTCGGAAAAAGCCCGAGCGAGGGTAACAGGGT
TAGGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATATAAATCTATAGAGATTTTCTACAACACA
AGAAGTGTGCCATTCAAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTCAAAGGTCTGGCGC
TGCTCATCACATCAAATGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTGCAGT
TGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCATATC
ATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGTCTGG
CCAATCCGGTGTCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAGGCAAAAAAGTAAT
TCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTTGTCAGAGCACTTTCTGAAAATCCCATGACAGAAAGAAA
TCACTTGAAAATAGACAAGTCGGATGTTCTCTGAGACCCAATTTACTCTAAACCTAGTCA
AAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCACTACATATTTCTCACGGTAT
TAAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTTTTGACAA
ACAAAGAGGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAGAGATGATACACAC
TGCCTCTTTACTTCATGATGACGTTAATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAAGGCCAAG
CGGAAATGCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCGGGTGATTTTCTCTTAGGGAG
AGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCTGTAGAACTAATGTTCTAATAG
TATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACGCGGA
TATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGCTTGAAGT
TAAAGAGCAGACTTTCTGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAATTATCTCATGATCA
GATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACCTATCTGAAAGACTGCTGCTTT
GATATCAAAATCTTGAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGCATCACCTGCCGTTATCGA
CGAATGCTATGATTTCCGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATATGCT
TGATTTTACTGTGCTGCTGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCGGATCTAAAAATTAGG
TATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGTCATGAAAAGAAGACCCATCTTTAGGTCCACTAAT
TTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATCTATTGATTCTGTGAGACTCCA
TAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCATTACAAAA
TCTACGGGATCTCTTCTCGAATCTGATGCTCGTTCTGCCCTAGAGTTTTTAACTAATAG
TATACTAACAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGGGTGAAGAATAAAGAGA
AAATGAGAAGGTCATAGTGTGCGCATTATTCTATATTCTATATGTAATAGTTTTTTATAT
GTTTTTAGTAAAAAGAAGAAATATAACAAGCATTAAAGATCAGGCTGGTGGTAAAAAAGCTG
CAAATAGGATAGTCTGTAAAGGTATCCAGAATGCCAACAGTATATGTAATAAATTTGACTA
TCTTATCGTCACCTTTCCGATTTTCCATTTTTTTTGGATCAGAAGTTTTAACCAATCTAT
CAGCCAAATACCAAAGGTGCAAGGGTAAAAAGGAGGCTATACGATTCAGAAATTTGGACAT
GGGCAAAAAAGCATACTATGACGACCAGTGTCTGTTGATCCATACGAGAGCCTTCAAGT
TATAGGAGGGATAAATTTGCTGAAATATATGGAGGAATAGATTAATAATAAATAATTTG
GGACAGCAAAACAAAAGTTTGGGATGTTGTTTGGGGTCCAGTATTTCAATAACCAACTC
CCCAATAATGACTCTGAATGTAGGAATATAAAGAAGTTTTTCTGTGATAAAAAATGCTTGAAA

```

Figura 2.7: Secuencia del Cromosoma II de *S.cerevisiae* correspondiente a la región de *COQ1*= YBR003W de 242468 a 244808. Se observan las 4 regiones seleccionadas correspondientes a **Prom_COQ1**, **CDS1_COQ1**, **CDS2_COQ1**, **CDS3_COQ1**. Codón de inicio **ATG**, codón de terminación **TAA**. En amarillo se observan las regiones conservadas y en verde las regiones conservadas en las que además no se detectaron SNPs.

Tabla 2.2: Secuencias de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia 5'-3'
Prom_COQ1_Fw	GCATTTTGTGGCATCTTCG
Prom_COQ1_rev	CAGGAACATCCGACTTGTC
CDS1_COQ1_Fw	CGTCCCTTGTTAGTGTTGTTG
CDS1_COQ1_rev	CTACGACTTCGGGGTTGTGT
CDS2_COQ1_Fw	GAGATGATACACACTGCGTCTTT
CDS2_COQ1_rev	CGGATGGCTTCCCTAAATCT
CDS3_COQ1_Fw	CAACAGGGGCTGCAATTATC
CDS3_COQ1_rev	AATGCGACACTATGACCTTCTT

Amplificación por PCR

Se aislo ADN genómico según protocolo descrito en Jubany et al., 2008. Se trabajó con una concentración de ADN genómico de 2 ng/μL. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el termociclador Thermo PXE 0.2 Thermal Cycler.

La reacción de PCR contenía 1 μM de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 2 mM MgSO₄, 1X *Taq* buffer y *Taq* DNA Polymerase (1 U) en un volumen final de 20 μL.

El programa de PCR utilizado: 5 min a 95°C, 35 ciclos de (1 min a 94°C, 1 min a 53°C, 1min a 72°C) y una extensión final de 10 min a 72°C.

Los productos de PCR obtenidos se separaron a bajo voltaje en geles de agarosa al 1.5 % para cuantificarlos y luego se enviaron a secuenciar en Macrogen, Korea (<dna.macrogen.com>). Se secuenciaron las dos hebras de ADN.

Análisis de las secuencias de *COQ1*

Se analizaron las secuencias de cada cepa obtenidas con cada uno de los cebadores (Prom_COQ1, CDS1_COQ1, CDS2_COQ1, CDS3_COQ1), se examinaron visualmente los cromatogramas obtenidos para cada hebra, fw y rev, en busca de heterocigosis. Se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizando la herramienta online del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) y luego se volvió a confirmar la secuencia con los respectivos cromatogramas.

Una vez obtenidas las distintas secuencias correspondientes a las zonas Prom_COQ1, CDS1_COQ1, CDS2_COQ1, CDS3_COQ1 se confirmó el solapamiento de las regiones y se obtuvo la secuencia final correspondiente a la región de COQ1= YBR003W para cada cepa (Ver Anexo II).

Una vez obtenidas las secuencias *COQ1*= YBR003W correspondientes a las distintas cepas, se analizaron comparando sus secuencias entre sí y con respecto a la cepa secuenciada de referencia S288C, se realizó el alineamiento de las regiones mediante la herramienta ClustalW <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>> y la base de datos NCBI.

El resultado del alineamiento obtenido también se analizó mediante la base de datos <www.genome.jp>, utilizando el análisis de agrupamiento mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average, método no ponderado de grupo con media aritmética).

Se compararon los resultados obtenidos con respecto a la base de datos “YSB: Yeast SNPs Browser” de *S. cerevisiae* <http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/>.

Una vez obtenidas las secuencias proteicas de Coq1, utilizando la base de datos NCBI se buscaron diferencias con la secuencia proteica de referencia mediante la base de datos “Global Proteome Machine Database” (gpmdb) <<http://gpmdb.thegpm.org/seq.html>>.

Capítulo II - Resultados y Discusión

Análisis de los cromatogramas

Se analizaron los cromatogramas de las distintas regiones correspondientes Prom_COQ1, CDS1_COQ1, CDS2_COQ1, CDS3_COQ1 para cada cepa de estudio en busca de heterocigosis.

En un solo caso se observó heterocigosis, para la cepa 108 en la región CDS3 y la misma fue confirmada en ambas hebras, reportándose como SNP correspondiente a la posición 244178 de la región de COQ1 (Figura 2.8, Tabla 2.3).

En los casos en los cuales se observó superposición de dos picos de diferentes colores pero no fueron confirmados para ambas hebras no se reportaron como SNPs.

En ningún caso se obtuvo diferente lectura de nucleótidos en las regiones superpuestas con los distintos cebadores (Ver Anexo II).

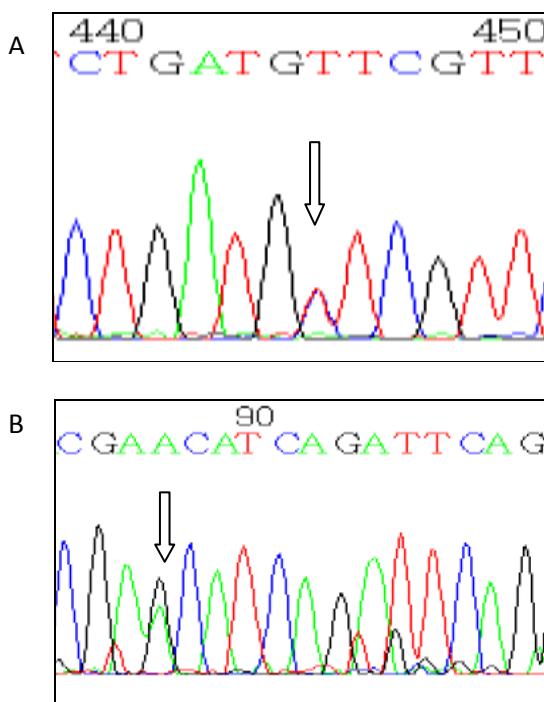


Figura 2.8 Parte de la secuencia CDS3_COQ1 correspondiente a la cepa 108. En A y B se observa la secuencia obtenida con los oligos *108_CDS3_CDS3_COQ1 fw* y *rev* respectivamente. La flecha indica el SNP encontrado.

Análisis de las secuencias

En el análisis de las secuencias correspondientes a la región de *COQ1*= YBR003W, se detectaron SNPs con respecto a la cepa de referencia S288C en las distintas cepas nativas seleccionadas 209 (FQU99/5), 112 (URU-6), 105 (URU-2), 106 (URU-3), 107 (URU-4), 108 (URU-5), UY-04 (205 o URU-11), 00.35 y la cepa comercial M522 (111 o COM-3) . En el caso de la cepa BY4743 no se detectaron SNPs para dicha región.

Mediante el análisis de agrupamiento se reconocen 3 grupos diferentes: por un lado se agrupan las cepas de laboratorio (la cepa de referencia S288C y la cepa BY4743), luego se encuentra un grupo mayoritario integrado por las cepas nativas uruguayas 209, 112, 105, 106, 107, UY-04, 00.35 junto a la cepa comercial M522 y por último se encuentra la cepa 108 (URU-5) la cual presenta un SNP más que el grupo anterior (Figuras 2.9 y 2.10 y Tabla 2.3).

<p>108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1</p>	<p>242809 ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC ATGTTTCAAAGGCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGC *****</p>	<p>242868</p>
<p>108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1</p>	<p>TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT TTTAAATCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATT *****</p>	<p>242928</p>
<p>108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1</p>	<p>CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA CTTTGGGAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATA *****</p>	<p>242988</p>
<p>108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1</p>	<p>GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA</p>	<p>243048</p>

106_COQ1	GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA	
105	GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA	
00_35	GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA	
S288C	GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA	
BY4743_COQ1	GTTGCCCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAA	243108
108_COQ1	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
112	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
209	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
UY_04_COQ1	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
M522	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
107_COQ1	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
106_COQ1	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
105	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
00_35	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
S288C	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	
BY4743_COQ1	ACAGAAGGCAAAAAAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTGCAAGAGCACTTTCTGAA	243168
108_COQ1	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
112	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
209	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
UY_04_COQ1	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
M522	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
107_COQ1	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
106_COQ1	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
105	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
00_35	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
S288C	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	
BY4743_COQ1	ATTCCCATGACAGAAAGAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCA	243228
108_COQ1	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
112	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
209	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
UY_04_COQ1	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
M522	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
107_COQ1	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
106_COQ1	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
105	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
00_35	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
S288C	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	
BY4743_COQ1	ATTTACTCTAAACCTAGTCAAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCA	243288
108_COQ1	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
112	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
209	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
UY_04_COQ1	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
M522	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
107_COQ1	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
106_COQ1	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
105	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
00_35	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
S288C	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	
BY4743_COQ1	CTACATATCTTCACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTG	243348
108_COQ1	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
112	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
209	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
UY_04_COQ1	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
M522	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
107_COQ1	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
106_COQ1	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
105	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
00_35	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
S288C	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	
BY4743_COQ1	CCAGAAGAAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAG	243408
108_COQ1	ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT	
112	ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT	
209	ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT	

Capítulo II. Diversidad molecular de *COQ1*

UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT ATTGTAGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGAT *****	243468
108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG ACAAGAAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCG *****	243528
108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC GGTGATTTTCTCTTAGGAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTC *****	243588
108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA GTAGAACTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAA *****	243648
108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT AATACTTCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTT *****	243708
108_COQ1 112 209 UY_04_COQ1 M522 107__COQ1 106_COQ1 105 00_35 S288C BY4743_COQ1	CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG CCTTCTAAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCAGTTCGTTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGG *****	243768

108_COQ1	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
112	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
209	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
UY_04_COQ1	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
M522	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
107_COQ1	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
106_COQ1	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
105	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
00_35	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
S288C	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
BY4743_COQ1	CTGCAATTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACT	
	*****	243828
108_COQ1	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
112	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
209	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
UY_04_COQ1	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
M522	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
107_COQ1	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
106_COQ1	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
105	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
00_35	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
S288C	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
BY4743_COQ1	TATCTGAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGG	
	*****	243888
108_COQ1	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
112	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
209	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
UY_04_COQ1	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
M522	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
107_COQ1	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
106_COQ1	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
105	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
00_35	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
S288C	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
BY4743_COQ1	GCATCACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAAATCTAGGTATATGTTTC	
	*****	243948
108_COQ1	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
112	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
209	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
UY_04_COQ1	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
M522	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
107_COQ1	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
106_COQ1	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
105	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
00_35	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
S288C	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
BY4743_COQ1	CAACTCGTAGATGATATGCTTGTGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCC	
	*****	244008
108_COQ1	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
112	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
209	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
UY_04_COQ1	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
M522	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
107_COQ1	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
106_COQ1	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
105	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
00_35	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
S288C	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
BY4743_COQ1	GGCGCGGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGAC	
	*****	244068
108_COQ1	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
112	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
209	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
UY_04_COQ1	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
M522	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
107_COQ1	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
106_COQ1	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
105	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
00_35	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
S288C	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	
	CCCTCTTTAGGTCCTAATAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAA	

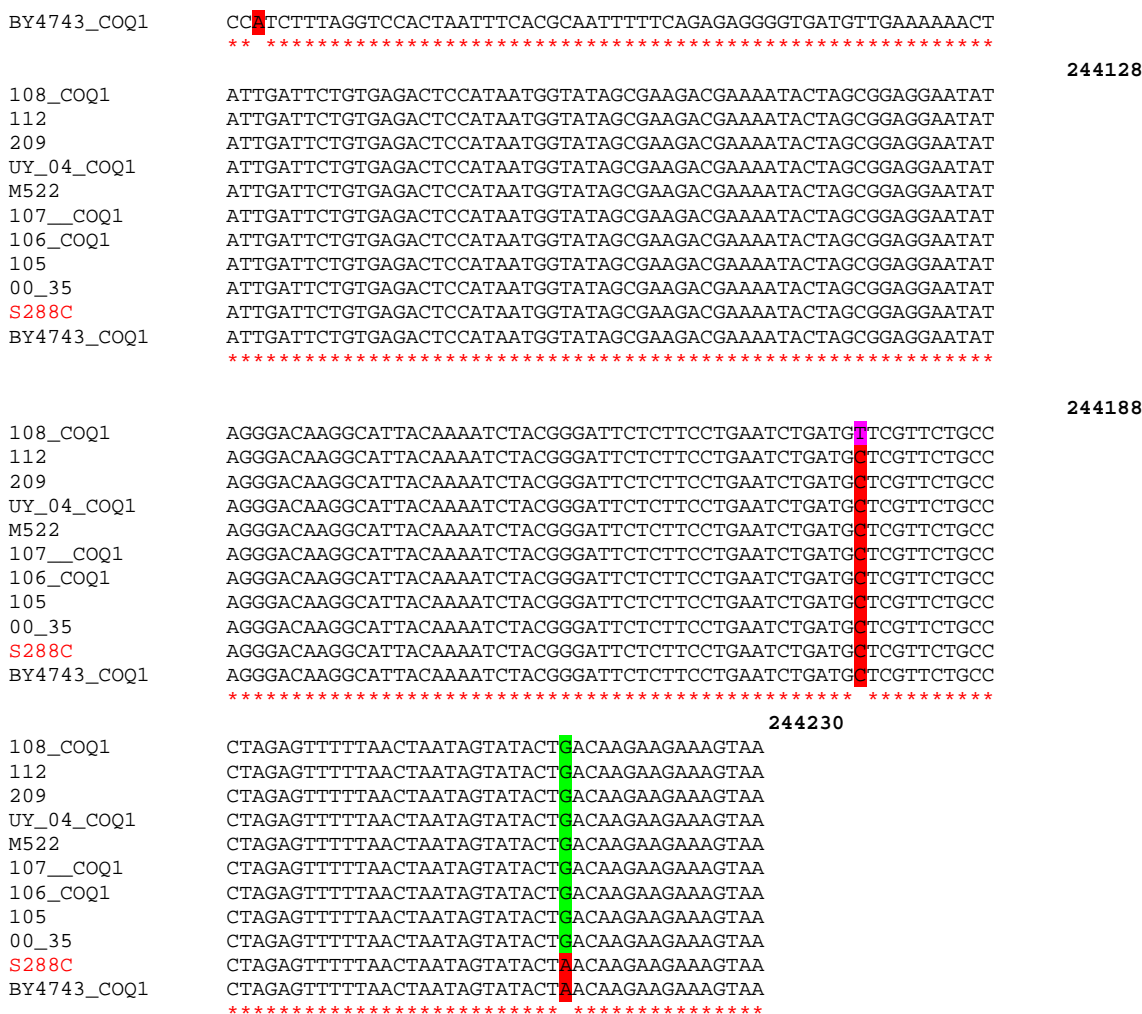


Figura 2.9 Alineamiento de las secuencias COQ1= YBR003W, chr II 242809 a 244230, correspondientes a las distintas cepas en estudio. La cepa secuenciada de referencia S288C figura en rojo. En amarillo se muestra el SNP ya reportado según la base de datos <http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/>. En verde figuran los SNPs no reportados previamente, comunes para todas las cepas analizadas y en rosa se muestra el SNP no reportado adicional exclusivo para la cepa 108.

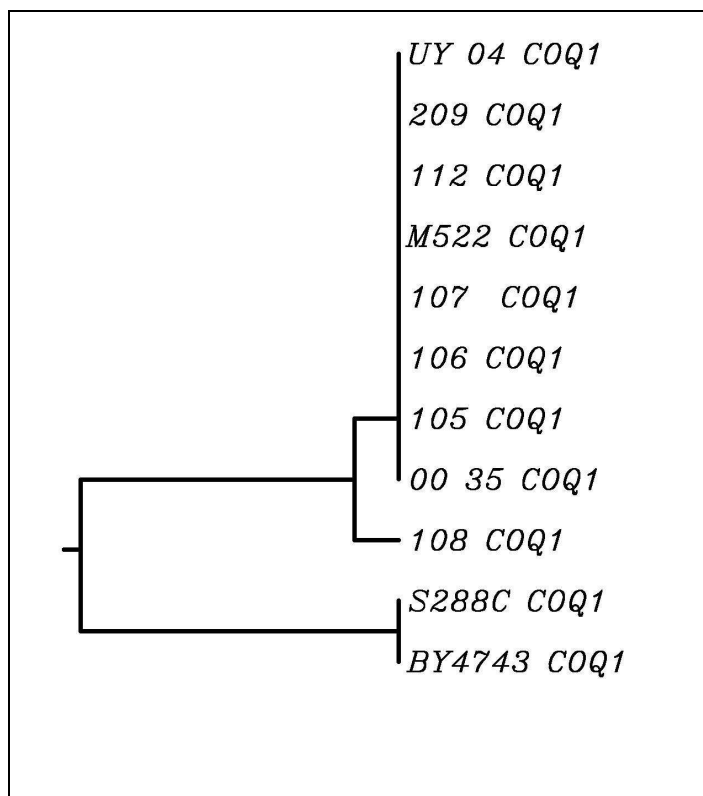


Figura 2.10 El análisis de clusters muestra el resultado del alineamiento de las 10 cepas seleccionadas junto a la cepa de referencia S288C utilizando el algoritmo UPGMA.

Tabla 2.3: SNPs detectados en *COQ1*= YBR003W. En * figura el SNP reportado previamente según la base de datos gbrowse <http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/>.

Cepas	Posición SNP YBR003W COQ1	Nucleótido (S288C/cepas)	Codón (S288C/cepas)	Aminoácido S288C/cepas)
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	243436	G/A	GCT/ACT	Ala/Thr
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	243486	G/A	GGG/GGA	Gly/Gly
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	243609	T/C	GAT/GAC	Asp/Asp
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	243768	C/T	ACC/ACT	Thr /Thr
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	243846*	C/T	ATC/ATT	Ile/Ile
209, 112, 105, 106, 107, 108,	244011	A/G	CCA/CCG	Pro/Pro

UY-04 (205), 00.35, M522 (111)				
108	244178	C/C-T	GCT/GCT-GTT	Ala/Ala-Val
209, 112, 105, 106, 107, 108, UY-04 (205), 00.35, M522 (111)	244215	A/G	CTA/CTG	Leu/Leu

Se utiliza la base de datos The Yeast SNPs Browser, [gbrowse <http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps>](http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps), para comparar los SNPs obtenidos con los depositados en dicha base. Este buscador permite detectar la presencia y localización de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) y los eventos de delección e inserción en todo el genoma de la levadura con precisión cercana de nucleótidos y además brinda una señal de predicción a través de todas las bases en el genoma (Schacherer et al., 2007).

De acuerdo a esta base de datos [gbrowse \(<http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/>\)](http://gbrowse.princeton.edu/cgi-bin/gbrowse/yeast_strains_snps/) para la zona de la región que corresponde a la secuencia YBR003W COQ1 chrII 242811 a 244232 se han reportado SNPs en las posiciones: 243331, 243439, 243489, 243610, 243769, 243800, 243846, 244014, 244065, de los cuales el único encontrado en las cepas analizadas fue el correspondiente a la posición 243846. También se detectaron SNPs no reportados previamente (Tabla 2.3).

Los resultados del análisis de las secuencias proteicas de Coq1 se muestran en la Figura 2.11.

Para la posición 243436 con el cambio de nucleótido se genera un cambio de codones en los cuales se pasa de un aminoácido no polar (hidrófobo) Ala a un aminoácido polar (hidrofílicos) Thr.

El cambio para la cepa 108 (URU 05- CP882) en la posición 244178 se da un cambio entre dos aminoácidos no polares, Ala por Val; la sustitución (A478V) modifica el dominio VII de la región conservada que presentan las poli-PDS, la cual podría cambiar la especificidad del sustrato (Figura 2.11). Si bien esta cepa (Sc882) presenta perfiles de monoterpenos muy similares a las otras cepas analizadas (ver Figura 2.5), se deberá analizar si este cambio afecta la producción del sesquiterpeno Nerolidol.

Los otros cambios observados en las distintas posiciones que se mencionan en la Tabla 2.3, codifican para diferentes codones del mismo aminoácido (Figura 2.11).

108

MFQRSGAAHHIKLISSRRCRFKSSFAVALNAASKLVTPKILWNNPISLVSKEMNTLAKNI
 VALIGSGHPVLNKVTSYFETEGKKvrpllvlllsralsEIPMTERNHLKIDKSDVPEDP
 I
 IYSKPSQNQLFQRPASSISPLHILHGKPLNPLTKGPEPLPEETFDKQRGILPKQRRLAE
 DDXXD
 IVEMIHTASLLHDDVIDHSDTRGRPSGNIAFTNKMAVLAGDFLLGRATVSI SRLHNPEV
 II III
 VELMSNSIANLVEGEFQMQLKNTSIDADIDTIENGHKL LPVPSKKLEVKEHDFRVPSRQQG
 IV
 LQLSHDQIIETAFEYIHKTYLKTAALISKSCRCAAILSGASPAVIDECYDFGRNLGICF
 V
 DDXXD
 QLVDDMLDFTVSGKDLGKPSGADLKLGIATAPVLF AWKEDPSLGPLISRNF SERGDVEKT
 VI
 IDSVRLHNGIAKTKILAE EYRDKALQNL RDSLPESDARSAL EFLTNSILTRRK
 VII

S288C

MFQRSGAAHHIKLISSRRCRFKSSFAVALNAASKLVTPKILWNNPISLVSKEMNTLAKNI
 VALIGSGHPVLNKVTSYFETEGKKvrpllvlllsralsEIPMTERNHLKIDKSDVPEDP
 I
 IYSKPSQNQLFQRPASSISPLHILHGKPLNPLTKGPEPLPEETFDKQRGILPKQRRLAE
 DDXXD
 IVEMIHTASLLHDDVIDHSDTRGRPSGNAAFTNKMAVLAGDFLLGRATVSI SRLHNPEV
 II III
 VELMSNSIANLVEGEFQMQLKNTSIDADIDTIENGHKL LPVPSKKLEVKEHDFRVPSRQQG
 IV
 LQLSHDQIIETAFEYIHKTYLKTAALISKSCRCAAILSGASPAVIDECYDFGRNLGICF
 V
 DDXXD
 QLVDDMLDFTVSGKDLGKPSGADLKLGIATAPVLF AWKEDPSLGPLISRNF SERGDVEKT
 VI
 IDSVRLHNGIAKTKILAE EYRDKALQNL RDSLPESDARSAL EFLTNSILTRRK
 VII

Figura 2.11. Secuencia proteica correspondiente a Coq1 para las cepas 108 y S288C. En rojo figuran los aminoácidos en los cuales se encontraron cambios en los codones. En verde figuran los cambios de aminoácidos encontrados. En celeste figuran parte de los residuos de al menos un dominio de péptido observado, según la base de datos. En amarillo se encuentra el péptido encontrado sólo en las cepas de laboratorio, S288C y BY4743. En violeta figuran los dominos ricos en Asp DDXXD (FARM y SARM). Subrayados se muestran los siete dominios conservados I-VII de las poli-PDS.

Capítulo III - Caracterización molecular de cepas no- *Saccharomyces* nativas uruguayas productoras de aromas de interés

Introducción

Levaduras no-*Saccharomyces*

Existe una gran biodiversidad de cepas de levaduras nativas presentes en las uvas que se pueden dividir en dos grandes grupos: levaduras no-*Saccharomyces* (constituyen más del 90% del total de levaduras presentes) y levaduras *Saccharomyces*.

Dentro de las levaduras *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* es la principal, está presente en muy bajo número en la piel de la uva, en mayor número en la bodega y aumenta durante el proceso de fermentación. Si bien *S. cerevisiae* es la levadura más importante para la producción del vino, siendo capaz de completar el proceso de fermentación, existen varias levaduras no- *Saccharomyces* capaces de impartir aromas florales y frutales y enriquecer el bouquet del vino.

Entre las levaduras no- *Saccharomyces* las especies más frecuentes en los viñedos son las levaduras apiculadas, *Hanseniaspora uvarum* (*H.uvarum*) y su forma imperfecta *Kloeckera apiculata* (50-75% de los aislamientos), otros géneros significativos son *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Hansenula* y *Rhodotorula*. Estos géneros son los mayoritarios en los primeros días de la fermentación y luego se reducen dando paso al crecimiento de la especie *S. cerevisiae*.

Los metabolitos producidos durante el crecimiento de las levaduras no-*Saccharomyces* incluyen glicerol, acetaldehído, ácido acético, ácido succínico, alcoholes superiores, ácidos grasos y ésteres.

Algunas levaduras no-*Saccharomyces* pertenecientes a la géneros *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Candida*, *Pichia* y *Kloeckera* poseen actividad β - glucosidasa (Perez et al., 2010), por lo cual pueden desempeñar un papel importante en la liberación de compuestos volátiles a partir de precursores no volátiles.

Como ya hemos mencionado anteriormente (Carrau et al., 2005) se ha reportado la producción de terpenos por cepas nativas Uruguayas de *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* como *H. uvarum*.

H. uvarum presentó un perfil aromático diferente a las otras cepas, destacándose con una mayor producción de geraniol.

A pesar de la gran diversidad de cepas de levaduras nativas presentes en la uva y en la bodega, a nivel industrial existe una cantidad limitada de cepas comerciales no necesariamente bien adaptadas a las condiciones de mosto originales. Es importante considerar el potencial de la flora nativa en cuanto a la adaptación para una normal fermentación y su contribución a una mayor complejidad aromática.

Recientemente se ha probado que la utilización de cultivos mixtos, inoculando levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces cerevisiae*, logra mejorar las cualidades sensoriales de los vinos y es una estrategia para obtener vinos diferentes (Elzaurdia et al., 2009; García et al., 2010).

Considerando la gran biodiversidad de cepas nativas de levaduras no-*Saccharomyces* existente, las distintas posibles aplicaciones, los resultados de trabajos anteriores donde se evidencia la producción de terpenos por *H. uvarum* y considerando que cada individuo dentro de una misma especie tiene un genoma único, en esta primera etapa se buscó desarrollar un método sencillo y reproducible para la tipificación molecular de cepas de levaduras no-*Saccharomyces* a nivel de subespecie.

Tipificación molecular

Los métodos de identificación de cepas dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* han tenido un gran desarrollo en los últimos años, inclusive en levaduras nativas de Uruguay (Jubany et al, 2008).

En el caso de las levaduras no-*Saccharomyces*, existen métodos moleculares para identificar especies basados en polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de regiones ribosomales variables ITS (espaciadores transcritos internos) y el gen correspondiente al 5.8S rRNA o por secuenciación de la región variable D1/D2 del ADN ribosomal 26S (Figura 3.1). Sin embargo, aún no se han desarrollado métodos

moleculares para diferenciar cepas dentro de una misma especie en levaduras no-*Saccharomyces*.

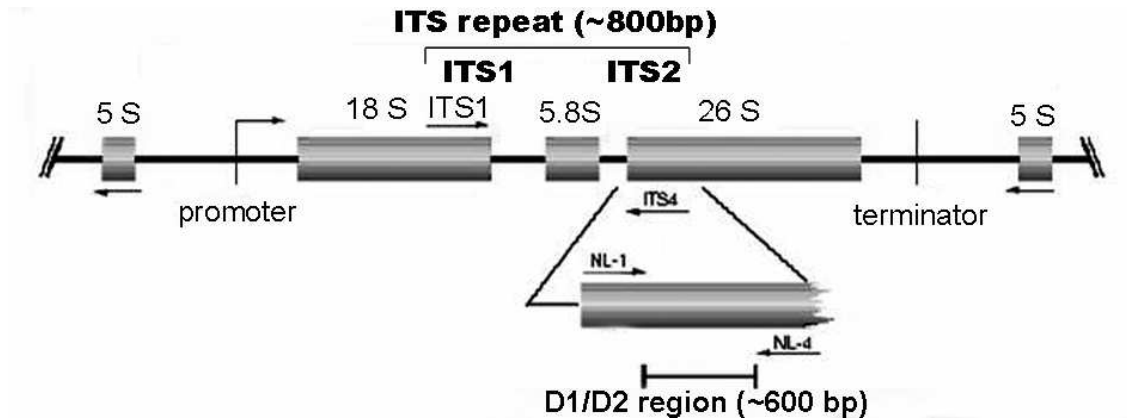


Figura 3.1 Esquema de la región de ADN ribosomal que se amplifica para la identificación de levaduras a nivel de especie.

Se han reportado distintos métodos para la discriminación a nivel de cepas, que utilizan diferentes tipos de cebadores para amplificar por PCR regiones polimórficas presentes en múltiples copias en los genomas eucariotas.

El método Interdelta reportado por Legras y Karst (2003), amplifica regiones de ADN entre los elementos delta de retrotransposones Ty presentes en múltiples copias en el genoma de *S. cerevisiae* pero este método no se ha ensayado con cepas no-*Saccharomyces*.

El ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) reportado por Zietkiewicz et al. (1994), utiliza cebadores compuestos por repetidos en tándem, que amplifican regiones genómicas entre dos loci de microsatélites con oligonucleótidos que hibridan con la secuencia de repetición.

Los cebadores que contienen repetidos en tándem del tipo $(GAC)_5$ o $(GTG)_5$ se han utilizado para diferenciar especies de levaduras no-*Saccharomyces*, pero no fueron adecuados para discriminar a nivel de subespecies (Capece et al., 2003).

Otras metodologías utilizadas para discriminar cepas no-*Saccharomyces* fueron las técnicas de amplificación de ADN con bajas temperaturas de “annealing” (RAPD-PCR) (Baleiras-Couto et al. 1994, Capece et al 2005) y también por polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción amplificados (AFLP). AFLP se ha utilizado para

diferenciar cepas de *M.pulcherrima*, *Candida Zemplanina* y *H.uvarum* (Spadaro et al. 2008, Esteve-Zarzoso et al. 2010).

En esta primera etapa, dado que hasta el momento no se cuenta con genomas completamente secuenciados disponibles de las principales especies de levaduras seleccionadas a partir de la uvas o mostos (*Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplanina*), se buscó desarrollar un método simple y reproducible de PCR para discriminar cepas de levaduras no-*Saccharomyces* a nivel de subespecies.

Para poder encontrar diferencias a nivel genómico, se ensayaron diferentes métodos ya reportados basados en la amplificación de regiones interdelta, mediante cebadores de tipo DOP-PCR (Jordan et al., 2002) y cebadores basados en repetidos en tándem. Por otro lado se diseñaron cebadores basados en repetidos en tándem de trinucleótidos, solos o en combinación con cebadores basados en secuencias conservadas de tRNAs, específicos para Ascomycetes.

Capítulo III – Materiales y Métodos

Cepas de levaduras no – *Saccharomyces*

Se trabajó con las cepas de levaduras nativas uruguayas No-*Saccharomyces*, transferidas por la Sección Enología de la Facultad de Química, que figuran en la Tabla 3.1

Tabla 3.1: Cepas de levadura no-*Saccharomyces*. Se indica el código de ingreso a Gen Bank de la secuencia ribosomal D1/D2 correspondiente a cada cepa, el código con el que se denomina cada cepa, la especie a la que corresponde y la variedad de vid de la que fue aislada.

Número de acceso GenBank	Código	Especie	Variedad de vid
JN709464	UY_T02/25AF	<i>H. vineae</i>	Tannat
JN051411	UY_T02/19AF	<i>H. vineae</i>	Tannat
JN051394	UY_T02/5AF	<i>H. vineae</i>	Tannat
JN709465	UY_T06/05G	<i>H. uvarum</i>	Tannat
JN051410	UY_C06/35G	<i>H. uvarum</i>	Cab Sauv
JN709466	UY_T06/13G	<i>H. uvarum</i>	Tannat
JN051404	UY_T06/01G	<i>H. opuntiae</i>	Tannat
JN709468	UY_T06/12G	<i>H. opuntiae</i>	Tannat
JN709467	UY_T06/14G	<i>C. zemplinina</i>	Tannat
JF999997	UY_T06/08G	<i>C. zemplinina</i>	Tannat
JN051408	UY_A03/19G	<i>M. pulcherrima</i>	Arinarnoa
JN051395	UY_CH03/08G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay
JN051396	UY_CH03/21G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay
JN051406	UY_CH03/29G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay
JN051409	UY_M03/02G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot
JN051397	UY_M03/25G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot
JN051402	UY_M03/26G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot
JN051401	UY_M00/08G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot
JN051412	UY_M00/09G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot
JN051413	UY_MM00/19G	<i>M. pulcherrima</i>	Moscatel Miel
JN051398	UY_PV03/16G	<i>M. pulcherrima</i>	Petit Verdot
JN051399	UY_PV03/18G	<i>M. pulcherrima</i>	Petit Verdot
JN051391	UY_SB00/03G	<i>M. pulcherrima</i>	Sauvignon blanc
JN051405	UY_T03/10G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat
JN051407	UY_T03/28G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat
JN051400	UY_T00/21G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat
JN051403	UY_T00/23G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat

Cebadores

La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en la Tabla 3.2

Tabla 3.2: Secuencias de cebadores

Cebador	Secuencia 5'-3'	Referencia
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGG AAAAG	Kurtzman and Robnett, 1998
NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	Kurtzman and Robnett, 1998
Tydelta12	TCAACAATGGAATCCCAAC	Legras and Karst, 2003
Tydelta21	CATCTTAACACCGTATATGA	Legras and Karst, 2003
DOP-S	CAGCAGNNNGTAGCCCS	Este trabajo
DOP	CTCGAGNNNGAGCCGA	Jordan et al., 2002
DOP-5end	CAGGAGNNNGAGCCGA	Este trabajo
DOP-8BJ	CTCGAGNNNAAGCGAT	Este trabajo
SSSTSS	TCT TCC TCT ACT TCG TCC	Este trabajo
TTVTGT	ACC ACC GTC ACC GGT ACC	Este trabajo
5CAG	CAGCAGCAGCAGCAG	Boss et al., 2007
ISSR-CGA	DHBCGACGACGACGACGA	Hantula et al., 1996
ISSR-CCA	DDCCACCACCACCA	Hantula et al., 1996
ISSR18-15	GATCCAGCAGCAGCC	Este trabajo
ISSR18-16	GATCCAGCAGCAGCAG	Este trabajo
ISSR-MB	CTCACAACAACAACAACA	Este trabajo
TtRNA _{Sc}	GCTTCTATGGCCAAGTTG	Este trabajo

Cultivo de levaduras y extracción de ADN genómico.

Cultivo de levaduras

Todas las cepas de levaduras se incuban en medio YPD (Ver M&M capítulo I) a 30°C durante 24-48 hs. A partir de colonias aisladas se inocula 1 colonia en 1 mL de YPD. Los cultivos líquidos se incuban a 30°C con agitación durante 24 hs. Luego de una dilución 1/10 en medio líquido YPD se procede al aislamiento de ADN cuando los cultivos están en fase exponencial de crecimiento.

Extracción de ADN genómico de levaduras

Se aísla el ADN optimizando la técnica rápida descrita en Jubany et al. (2008) escalándola al medio. La calidad y concentración del ADN obtenido se estima en geles de agarosa 0.7 %. El ADN se diluye para obtener una concentración 10-20 ng en 5 µL para las posteriores reacciones de PCR.

Caracterización molecular a nivel de especie

Se amplifica la región variable D1/D2 del ADN ribosomal 26S utilizando los cebadores NL-1 y NL-4 según protocolo descrito por Kurtzman and Robnett, 1998.

Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a Macrogen, Korea (<dna.macrogen.com>). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en GenBank utilizando la herramienta de BLAST del NCBI y posteriormente fueron ingresadas a dicha base de datos (número de acceso, Tabla 3.1).

Caracterización molecular de individuos dentro de una misma especie

Diseño de cebadores

El diseño de cebadores basados en secuencias conservadas de tRNAs se realizó a partir de un alineamiento de tRNAs de Thr de *S. cerevisiae*. En una región conservada para todas las secuencias de tRNAs de Thr se diseñó el cebador TtRNASc: 5'- GCT TCT ATG GCC AAG TTG-3 (Figura 3.2)

Todos los cebadores se ensayaron inicialmente mediante un programa de PCR Virtual <<http://grup.cribi.unipd.it/cgi-bin/mateo/vpccr2.cgi>> desarrollado por Lexa et al., 2001 utilizando el genoma secuenciado de *S. cerevisiae* como molde genómico y temperatura de “annealing”: 50°C. Se verificó previamente este programa con la región variable D1/D2 utilizando los oligos NL1 y NL4 obteniéndose el amplicon esperado de 615 bp.

En base a estos resultados se eligieron los mejores cebadores (Tabla 3.2) para realizar las posteriores reacciones de PCR.

Análisis por PCR

Se seleccionaron un grupo de cepas nativas representativas de cada especie para ensayar los diferentes cebadores.

Se amplificó la región interdelta utilizando los cebadores Ty delta12 y Ty delta21. La mezcla de reacción contenía: 1µM de cada cebador, 0.2 mM dNTPs, 2.5mM MgCl₂, 1X *Taq* buffer y *Taq* DNA Polimerasa (1 U) en un volumen final de 50 µL.

El programa de PCR utilizado: 4 min a 95°C, 35 ciclos de (30s a 95°C, 30s a 45°C, 90s a 72°C) y una extensión final de 10 min a 72°C.

En la amplificación de cebadores de tipo DOP-PCR, se utilizaron los cebadores DOP-S, DOP, DOP-5end, DOP-8BJ, cada uno por separado.

La mezcla de reacción contenía: 3.0 µM cebador único, 0.2 mM dNTPs, 1.5mM (o 2.5mM) MgCl₂, 1X *Taq* buffer y *Taq* ADN Polimerasa (1 U) en un volumen final de 50 µL.

El programa de PCR utilizado: 1 min a 94°C, 5 ciclos de (60s a 94°C, 90s a 45°C, 120s a 72°C) 3 min a 72°C, 35 ciclos de (1min a 94°C, 1min a 62°C, 3 min a 72°C) con una extensión final de 10 min a 72°C.

Para la amplificación de los cebadores de los repetidos en tándem, tipo minisatélite (SSSTSS, TTVTGT), de trinucleótidos (5CAG) o de tipo ISSR (ISSR 18-16, ISSR 18-15, ISSR-MB, ISSR –CGA, ISSR – CCA), se utilizó la estrategia de amplificarlos solos o en combinación con TtRNASc.

También se amplificó el cebador TtRNASc solo.

En todos los casos la reacción de PCR contenía: 1µM primer, 0.1 (o 0.2??) mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1X *Taq* buffer y *Taq* DNA Polimerasa (1 U) en un volumen final de 50 µL.

Se ensayaron diferentes programas de PCR:

- 4 min a 95°C, 35 ciclos de (30s a 95°C, 30s a 45°C, 90s a 72°C) con una extensión final de 10 min at 72°C.

- 2 min a 94°C, 35 ciclos de (30s a 94°C, 2min a 50°C, 2.5min a 72°C) con una extensión final de 10 min at 72°C.

Hasta llegar al programa PCR óptimo que fue el utilizado:

- 5 min a 95°C, 35 ciclos de (1min a 95°C, 1min a 50°C, 90s a 72°C) con una extensión final de 10 min a 72°C.

En todos los casos se trabajó con una concentración de ADN genómico de 1 ng/μL. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en el termociclador Thermo PXE 0.2 Thermal Cycler. Los productos de PCR obtenidos se separaron a bajo voltaje en geles de agarosa al 2 % y en geles nativos de poliacrilamida al 8 %.

Las reacciones se realizaron por duplicado (biológico y analítico), se ensayaron a un volumen final de 20 μL y con distintas Taqs ADN Polimerasas.

Análisis de Clusters

Se trabajo sólo con las *M. pulcherrima* debido a su gran interés enológico. Los patrones de bandas obtenidos se analizaron con el programa GelCompare versión 4.2 (Applied Maths BVBA, Belgium), usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Average, Método no ponderado de grupo con media arimética) clustering de bandas y el coeficiente de Jaccard.

Capítulo III- Resultados y Discusión

Diseño de cebadores

Los genes que codifican para tRNAs están conservados, presentes en múltiples copias y distribuidos en diferentes cromosomas en todos los organismos.

A partir del alineamiento de tRNAs de Thr de *S. cerevisiae*, en una de las regiones conservadas se diseñó el cebador TtRNASc: 5'- GCT TCT ATG GCC AAG TTG-3' (Figura 3.2)

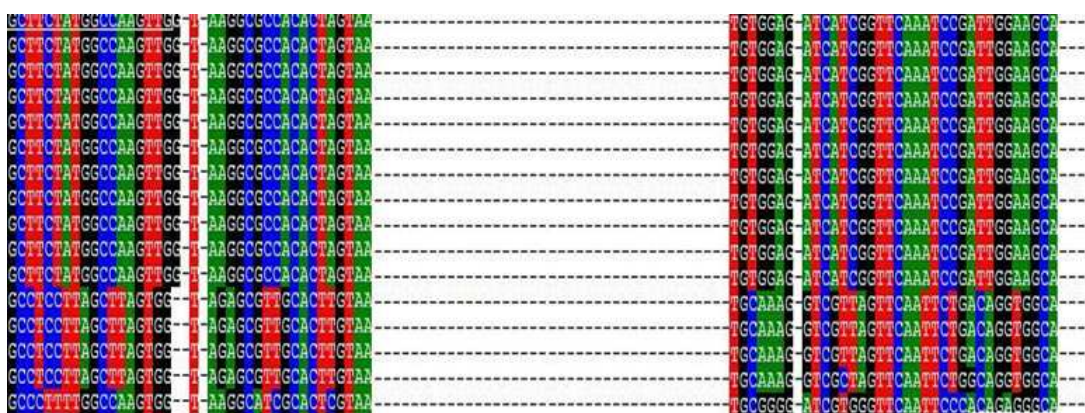


Figura 3.2: Alineamiento de tRNAs de Thr de *S. cerevisiae*. En la primera línea a la izquierda se muestra el cebador diseñado subrayado con línea blanca.

Los resultados del BLAST, utilizando la base de datos NCBI, para la secuencia TtRNASc muestran una homología del 100% con secuencias de hongos Ascomycetes.

Análisis por PCR con los distintos cebadores

Para todos los casos que se muestran a continuación, los duplicados tanto biológicos (a partir de aislamientos de ADN independientes) como analíticos (amplificaciones independientes a partir de un mismo ADN) dieron los mismos resultados.

En la amplificación de la región interdelta utilizando los cebadores Tydelta12 y Tydelta21 no se detectó producto de amplificación.

En la amplificación con cebadores de tipo DOP-PCR para los cebadores DOP, DOP-8BJ y DOP5end no se obtuvo amplificación. En el caso del cebador DOP-S amplifica sólo una de las muestras de *Cándida zemplinina* (correspondiente a la cepa UY_T06/20G).

Los repetidos en tándem de trinucleótidos están distribuidos al azar en todos los genomas de eucariotas y son los repetidos más abundantes en el genoma de *S. cerevisiae*. Las regiones que contienen secuencias repetidas en tándem o microsatélites son las que evolucionan a mayor velocidad.

En el caso de la amplificación de los repetidos en tándem ya reportados, 5CAG, ISSR-CGA y ISSR-CCA, se obtienen amplificaciones para todas las cepas. Con el cebador 5CAG se obtuvieron pocas bandas, no permitiendo la diferenciación entre cepas. En el caso de ISSR-CGA y ISSR-CCA, se obtuvieron unas cuantas bandas pero no es posible diferenciar más de 4 grupos.

La estrategia de amplificar utilizando la combinación de cebadores conteniendo repetidos en tándem junto al TtRNASc mejora la amplificación generando un mayor número de bandas; cuando se utilizó la combinación de oligos de TtRNASc junto al ISSR-CCA la discriminación mejoró y permitió diferenciar 5 grupos totales.

Los cebadores TTVTGT y SSSTSS no dieron producto de amplificación cuando se utilizaron solos. Se ensayaron usando la estrategia de combinarlos junto al TtRNASc pero únicamente la combinación de TTVTGT junto al TtRNASc amplificó, generando el mismo patrón de bandas para todas las cepas *M. pulcherrima*.

Para los cebadores desarrollados en base al programa de PCR Virtual (ISSR18-16, ISSR18-15, ISSRMB), en todos los casos cuando se utilizaron solos no mostraron amplificación pero amplificaron cuando se utilizaron junto al oligo de TtRNASc (Ver Anexo III).

Analizando los resultados obtenidos se observa que la estrategia de combinar los cebadores TtRNASc junto a ISSR-MB o 5CAG genera un mayor patrón de bandas permitiendo así una mejor discriminación entre las cepas.

Utilizando esta estrategia se pudo lograr la discriminación de individuos dentro de las especies *H. vineae*, *H. uvarum*, *H. opuntiae* y *C. zemplinina* (Figura 3.3) y *M. pulcherrima* (Figura 3.4).

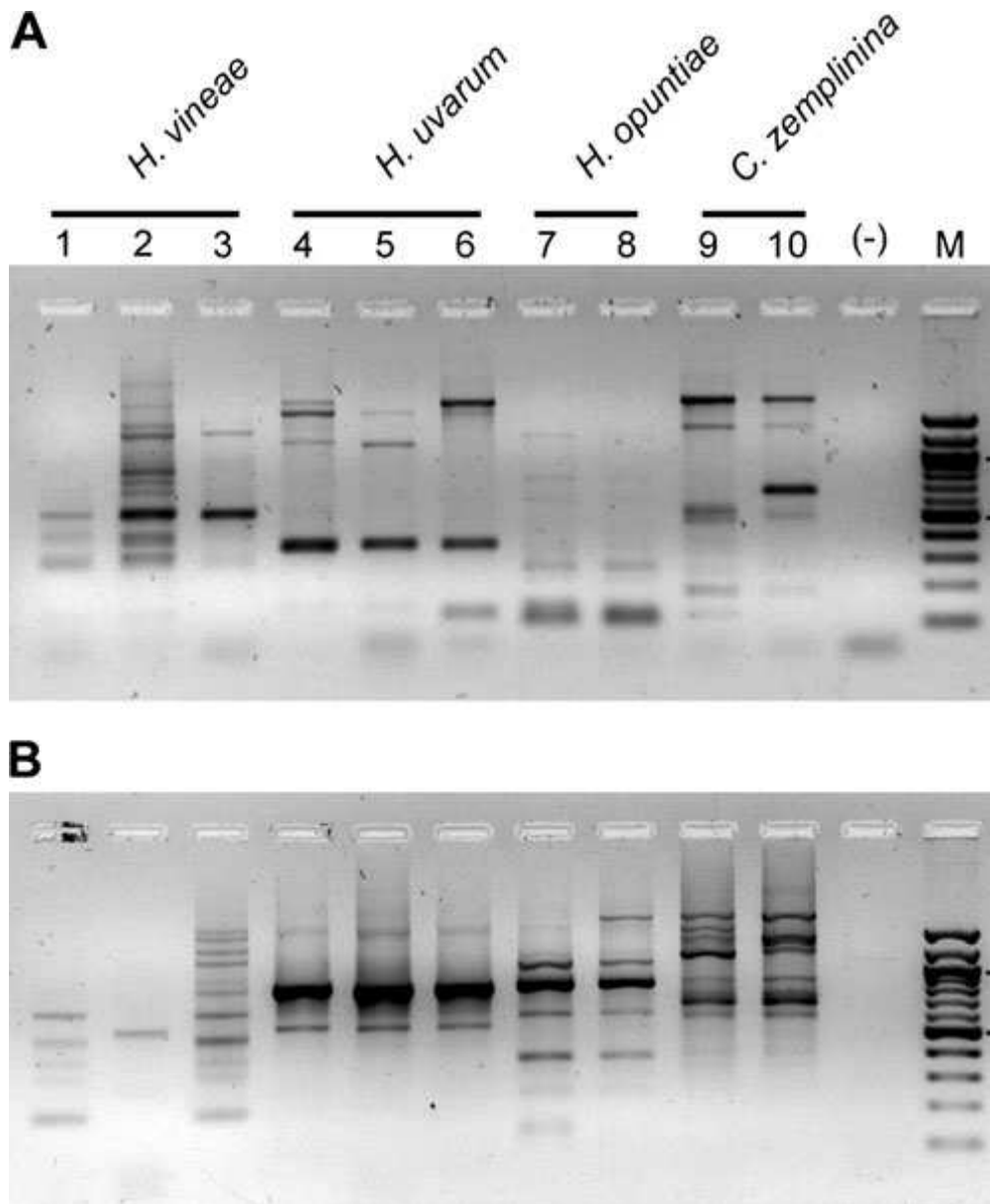


Figura 3.3. Análisis por PCR utilizando distintas combinaciones de cebadores: A) TtRNASc y 5CAG y B) TtRNASc y ISSR-MB. Los ADNs utilizados son los mismos en A y B y corresponden a cepas de las siguientes especies: *H. vineae* (1. UY_T02/25AF, 2. UY_T02/19AF, 3. UY_T02/5AF), *H. uvarum* (4. UY_T06/05G, 5. UY_C06/35G, 6. UY_T06/13G), *H. opuntiae* (7. UY_T06/01G, 8. UY_T06/12G), y *C. zemplinina* (9. UY_T06/14G, 10. UY_T06/08G). (-) corresponde al control negativo sin ADN. M corresponde al marcador de peso molecular de 100 bp, se indican las bandas correspondientes a 0.5 y 1 kb.

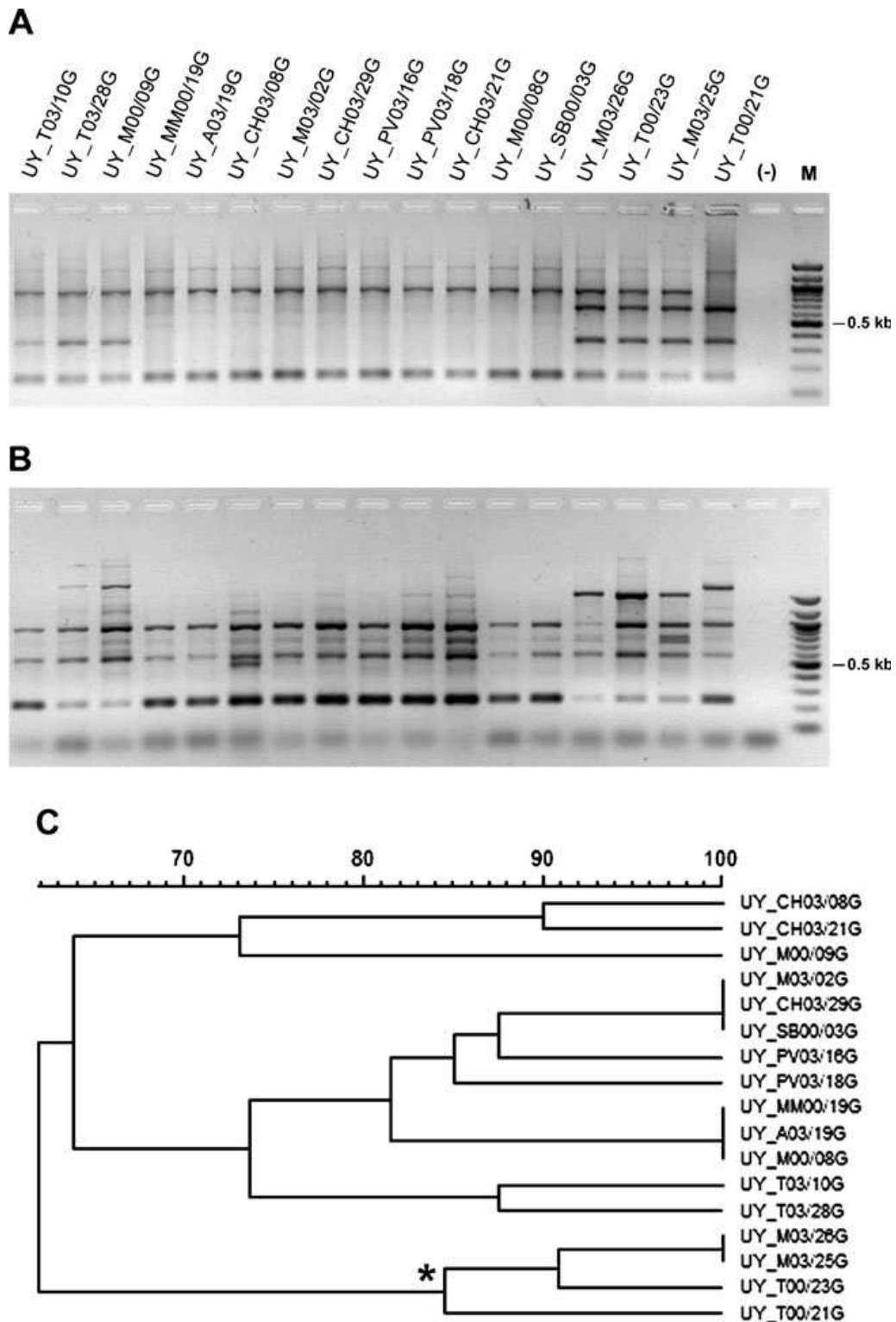


Figura 3.4 A) Análisis de la amplificación por PCR de las cepas de *M.pulcherrima* utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y 5CAG. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100 bp. B) Análisis de la amplificación por PCR de las cepas de *M.pulcherrima* utilizando la combinación de

Capítulo III. Caracterización molecular de cepas no-*Saccharomyces* nativas uruguayas productores de aromas de interés

cebadores TtRNAs_c y ISSR-MB. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100 bp. C) análisis de clustering UPGMA de las 17 cepas seleccionadas de *M.pulcherrima*, análisis realizado mediante la combinación de los resultados obtenidos en A y B.

El análisis de clustering para las cepas *M. pulcherrima* nativas uruguayas permite el reconocimiento de 2 grupos con un valor de similitud del 62%. El agrupamiento presentado tiene un significado biológico, se observa que en el cluster marcado con un asterisco (*) se agrupan las cepas con mayor actividad beta glucosidasa a pH 6 (Barquet et al., 2012).

Mediante la utilización de este método se logra una diferenciación de 12 individuos de un total de 17.

Conclusiones Generales y Perspectivas

Las conclusiones generales de este trabajo se detallan a continuación:

- *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de sintetizar de *novo* mono y sesquiterpenos.
- La sobreproducción de isoprenoides de las cepas transformadas con plásmidos puede optimizarse en condiciones de crecimiento en fase exponencial con agitación.
- La sobreexpresión del gen *COQ1* bajo control de un promotor fuerte en el plásmido pHA1-1 es una estrategia eficaz ya que se logra mayor acumulación de compuestos en las cepas sobre-expresantes que en el control, estableciéndose una actividad dual de Coq1p como geranilpirofosfato sintasa y nerolidol sintasa, no descrita previamente.
- Se detectaron SNPs en cepas de levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* nativas uruguayas y en la cepa comercial Montrachet 522 no reportados anteriormente.
- La sustitución de aminoácidos (A478V) en la cepa de *S. cerevisiae* (URU-5 – CP882) nativa uruguaya, que modifica el dominio VII de la región conservada no afecta la producción de monoterpenos.
- Obtuvimos un nuevo método de PCR, que utiliza una combinación de cebadores basados en repetidos de trinucleótidos y en una región conservada de tRNAs, que permite discriminar individuos dentro de una misma especie de levaduras no-*Saccharomyces* (Barquet et al., 2012, Anexo IV).

Perspectivas

La confirmación de que las cepas de *S. cerevisiae* son capaces de sintetizar mono y sesquiterpenos de *novo* y el hallazgo de la participación del gen *COQ1* en la síntesis de isoprenoides con actividad dual de geranilpirofosfato sintasa y nerolidol sintasa, puede tener impacto no sólo en la producción de vinos, sino también en la producción de aromas y fragancias, salud humana y en la protección vegetal.

La mayor producción de nerolidol mediante la sobre-expresión de *COQ1*, podría utilizarse en la protección vegetal, ya que el nerolidol se utiliza como biopesticida para

el control de ácaros y en la protección de cultivos (Troy Biosciences Inc. and Natural Plant Protection S.A. 2007, <www.epa.org>).

La participación del gen *COQ1* en la síntesis de isoprenoides, mono y sesquiterpenos, se podría utilizar como estrategia para estudiar la regulación de la vía de isoprenoides hacia la formación de esteroides.

Diferentes cepas de levaduras producen diferentes perfiles aromáticos, la selección de distintas cepas nativas de *S. cerevisiae* de acuerdo a la variabilidad genética de *COQ1* encontrada permitirá seleccionar una cepa de cada grupo y utilizar esta estrategia (mediante el clonado correspondiente) para producir mono y sesquiterpenos. La misma puede aplicarse a levaduras no-*Saccharomyces* (vía clonado y expresión de homólogos de *COQ1*) que también contribuyen al proceso de fermentación del vino generando una mayor complejidad aromática.

Trabajar con cepas nativas de *S. cerevisiae* y no- *Saccharomyces* para la síntesis de isoprenoides es de suma importancia ya que apostamos a una futura aplicación industrial.

Si bien la aplicación comercial de microorganismos genéticamente modificados genera controversias, cada vez son más aceptados. Existen en la actualidad dos levaduras modificadas genéticamente, reconocidas como GRAS por la FDA (Food and Drug Administration, Administración de Medicamentos y Alimentos) de EEUU, disponibles en el mercado. ECMoO1, modificada para degradar mejor la urea durante el proceso de fabricación del vino y la ML01 modificada para mejorar la fermentación maloláctica (Howard L. 2005; Husnik et al., 2007).

La estrategia desarrollada en este trabajo podría aplicarse en un futuro para mejorar los aromas del vino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aharoni A, Giri A, Deuerlein S, Griepink F, de Kogel WJ, Verstappen FW, Verhoeven HA, Jongma MA, Schwab W. and Bouwmeester HJ. 2003. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell*. **15**: 2866–2884.
- Applied Maths NV. 2010. GelCompareII. Quick Guide. (<www.applied-maths.com>).
- Ashby M. and Edward P. 1990. Elucidation of the Deficiency in Two Yeast Coenzyme Q Mutants. Characterization of the structural gene encoding hexaprenyl pyrophosphate synthetasa. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**: 13157-13164.
- Baleiras Couto M, Van der Vossen J, Hofstra H. and Huisin't Veld J. 1994. RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **24**:249-260.
- Barquet M, Martín V, Medina K, Pérez G, Carrau F. and Gaggero C. 2012. Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:807-814.
- Berger R. 1995. *Aroma Biotechnology*. Editorial Springer. ISBN: 3.540.58606.7
- Bohlmann J. and Keeling C. 2008. Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal* **54**: 656–669.
- Boido E, Lloret A, Medina K, Carrau F. and Dellacassa E. 2002. Effect of -glycosidase activity of *Oenococcus oeni* on the glycosylated flavor precursors of Tannat wine during malolactic fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 2344-2349.

- Boss D, Maurhofer M, Zala M, Défago G. and Brunner P. 2007. ISSR fingerprinting for the assessment of the bindweed biocontrol agent *Stagonospora convolvuli* LA39 after field release. *Letters in Applied Microbiology* **45**:244–251.
- Boucher Y. and Ford Doolittle W. 2000. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Molecular Microbiology* **37**: 703-716.
- Burke C, Mark R, Wildung M. and Croteau R. 1999. Geranyl diphosphate synthase: Cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13062–13067.
- Capece A, Salzano G. and Romano P. 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *International Journal of Food Microbiology* **84**:33-9.
- Capece A, Fiore C, Maraz A. and Romano P. 2005. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *Journal of Applied Microbiology* **98**:136–144.
- Carrau F, Medina K, Boido E, Fariña L, Gaggero C, Dellacassa E, Versini G. And Henschke P. 2005. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **243**:107-115.
- Chemler J., Yan Y, and Koffas M. 2006. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* **5**:20.
- Dimster-Denk D, Rine J, Phillips J, Scherer S, Cundiff P, DeBord K, Doug Gilliland D, Hickman S, Jarvis A, Tong L. and Ashby M. 1999. Comprehensive evaluation of isoprenoid biosynthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing the Genome Reporter Matrix™. *Journal of Lipid Research* **40**: 850-860.

- Drawert F. and Barton H. 1978. Biosynthesis of flavor compounds by micro-organisms. 3. Production of monoterpenes by the yeast *Kluyveromyces lactis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **26**: 765–767.
- Dudareva N, Andersson S, Orlova I, Gatto N, Reichelt M, Rhodes D, Boland W. and Gershenzon J. 2005. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. Proc Natl Acad Sci U S A **102**: 933–938.
- Eisenreich W, Schwarz M, Cartayrade A, Arigoni D, Zenk M. and Bacherl A. 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. Chemistry & Biology **5**: 221 – 233.
- Elzaurdia Í, Sosa M, Barquet M, Medina K, Carrau M, Gioia O, Gaggero C, Carrau F. 2009. “Utilización de levaduras no-*Saccharomyces* en Chardonnay: Estudio del impacto sobre el potencial aromático en vinos de alta gama.” En XII Congreso Latinoamericano de Viticultura y Enología, Montevideo- Uruguay.
- Esteve-Zarzoso B, Hierro N, Mas A. and Guillamón J. 2010. A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing. LWT - Food Science and Technology **43**:1480- 1484.
- Fagan GL, Kepner RE. and Webb AD. 1981. Production of linalool, *cis*-nerolidol and *trans*-nerolidol, and *trans, trans*-farnesol by *Saccharomyces fermentati* growing as a film on simulated wine. *Vitis* **20**: 36–42.
- Fischer M, Meyer S, Claudel P, Bergdoll M. and Karst F. 2011. Metabolic Engineering of Monoterpene Synthesis in Yeast. Biotechnology and Bioengineering **108**:1883-1892.
- Gamero A, Manzanares P, Querol A. and Belloch C. 2011. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. International Journal of Food Microbiology **145**: 92–97.

- García V, Vasquez H, Fonseca F, Manzanares P, Viana F, Martinez C. and Ganga M. 2010. Effects of using mixed wine yeast cultures in the production of Chardonnay wines. *Revista Argentina de Microbiología* **42**: 226-229.
- Gin P. and Clarke C. 2005. Genetic Evidence for a Multi-subunit Complex in Coenzyme Q Biosynthesis in Yeast and the Role of the Coq1 Hexaprenyl Diphosphate Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**: 2676–2681.
- Gramatica P, Manitto P, Ranzi P, Delbianco A. and Francavilla M. 1982. Stereospecific reduction of geraniol to (R)- (+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*. **38**:775– 776.
- Günata Y, Bayonove C, Tapiero C. and Cordonnier R. 1990. Hydrolysis of grape monoterpenyl β -D-glucosides by various β -glucosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**: 1232-1236.
- Hantula J, Dusabenyagasani M. and Hamelin R. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - A novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology* **26**:159-166.
- Herrero O, Ramon D. and Orejas M. 2008. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for de novo production of aromatic monoterpenes in wine. *Metabolic Engineering* **10**: 78–86.
- Howard L. 2005. GRAS NOTIFICATION. For the use of a modified yeast for reduction of ethyl carbamate in fermented beverages. First Venture Technologies Corporation (www.fda.gov).
- Huang B, Zeng H, Dong L, Li Y, Sun L, Zhu Z, Chai Y. and Chen W. 2011. Metabolite target analysis of isoprenoid pathway in *Saccharomyces cerevisiae* in response to genetic modification by GC-SIM-MS coupled with chemometrics. *Metabolomics* **7**:134–146.

- Husnik J, Delaquis P, Cliff M. and Van Vuuren H. 2007. Functional Analyses of the Malolactic Wine Yeast ML01. *American Journal of Enology and Viticulture* **58**:1.
- Janke C. and Knop M. 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*. **21**: 947–962.
- Jordan B, Charest A, Dowd J, Blumenstiel J, Yeh R, Osman A, Housman D. and Landers J. 2002. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**:2942-7.
- Jubany S, Tomasco I, Ponce de Leon I, Medina K, Carrau F, Nicolas Arrambide N, Naya H. and Gaggero C. 2008. Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Yeast Research* **8**: 472–484.
- King A. and Dickinson J. 2000. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **16**: 499- 506.
- Klingenberg A. and Sprecher E. 1985. Production of monoterpenes in liquid cultures by the yeast *Ambrosiozyma monospora*. *Planta Medica* **3**: 264–265.
- Kuranda K, Francois J. and Palamarczyk G. 2010. The isoprenoid pathway and transcriptional response to its inhibitors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **10**: 14–27.
- Kurtzman C. and Robnett C. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 331-371.

- Lanza E. and Palmer J. 1977. Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratocystis monoliniformis*. *Phytochemistry* **16**: 1555–1560.
- Larsen TO. and Frisvad JC. 1994. A simple method for collection of volatile metabolites from fungi based on diffusive sampling from petri dishes. *Journal of Microbiological Methods* **19**: 297–305.
- Larsen TO. and Frisvad JC. 1995. Characterization of volatile metabolites from 47 *Penicillium* taxa. *Mycological Research* **99**: 1153–1166.
- Legras J. and Karst F. 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*. **221**:249-55.
- Lexa M, Horak J. and Brzobohaty B. 2001. Virtual PCR. *Bioinformatics* **17**: 192-193.
- Martin V, Pitera D, Withers S, Newman J. and Keasling J. 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature Biotechnology* **21**: 796-802.
- Misawa N. 2011. Pathway engineering for functional isoprenoides. *Current Opinion in Biotechnology* **22**:1–7.
- Mollet J, Giurgea I, Schlemmer D, Dallner G, Chretien D, Delahodde A, Bacq D, De Lonlay P, Munnich A. and Rötig A. 2007. Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders. *The Journal of Clinical Investigation* **117**:765–772.
- Nagegowda D, Gutensohn M, Wilkerson C. and Dudareva N. 2008. Two nearly identical terpene synthases catalyze the formation of nerolidol and linalool in snapdragon flowers. *The Plant Journal* **55**: 224–239.

- Narita K, Ohnuma S, and Nishino T. 1999. Protein Design of Geranyl Diphosphate Synthase. Structural Features that define the product specificities of prenyltransferases. *The Journal of Biochemistry* **126**: 566-571.
- Nielsen R, Paul J, Albrechtsen A. and Song Y. 2011. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. *Nature reviews* **12**: 443-451.
- Okada K, Kainou T, Matsuda H. and Kawamukai M. 1998. Biological significance of the side chain length of ubiquinone in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **431**: 241-244.
- Oswald M, Fischer M, Dirninger N. and Karst F. 2007. Monoterpenoid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **7**: 413-421.
- Perez G, Fariña L, Barquet M, Boido E, Gaggero C, Dellacassa E. and Carrau F. 2010. A quick screening method to identify beta-glucosidase activity in native wine yeast strains. Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 47-55.
- Peynaud, E. 1996. *Enología Práctica. Conocimiento y elaboración del vino*, 3era edición. Editorial Mundi-prensa.
- Plochocka D, Karst F, Swiezewska E. and Szkopinska A. 2000. The role of ERG20 gene (encoding yeast farnesyl diphosphate synthase) mutation in long dolichol formation. Molecular modeling of FPP synthase. *Biochimie* **82**:733-738.
- Pretorius I.S. and Bauer F.F., 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnology* **20**: 426-432.
- Riberau-Gayon P, Boidron J.N and Terrier A. 1975. Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **23**:1042-1047.

- Rico J, Pardo E. and Orejas M. 2010. Enhanced Production of a Plant Monoterpene by Overexpression of the 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Catalytic Domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6449–6454.
- Rodríguez J, Ruiz-Sala P, Ugarte M. and Peñalva M. 2004. Fungal Metabolic Model for 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 4578–4587.
- Schacherer J, Ruderfer D, Gresham D, Dolinski K, Botstein D. and Kruglyak L. 2007. Genome-Wide Analysis of Nucleotide-Level Variation in Commonly Used *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *PLoS ONE* **2**(3): e322.
- Schneider R. 2001. Contribution à la connaissance de l'arôme et du potentiel aromatique du Melon B (*Vitis vinifera*L.) et des vins de Muscadet. These pour obtenir le grade de Docteur de L'Université Montpellier II
- Spadaro D, Sabetta W, Acquadro A, Portis E, Garibaldi A. and Gullino M. 2008. Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. *Microbiology Research* **163**:523-530.
- Suzuki K, Okada K, Kamiya Y, Zhu X, Nakagawa T, Kawamukai M. and Matsuda H. 1997. Analysis of the decaprenyl diphosphate synthase (dps) gene in fission yeast suggests a role of ubiquinone as an antioxidant. *The Journal of Biochemistry* **121**:496–505.
- Swiegers J. and Pretorius I. 2005. Yeast Modulation of Wine Flavor. *Advances in Applied Microbiology*. **57**: 131-175.
- Syvänen A. 2001. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* **2**: 930-942

- Szkopinska A. and Plochocka D. 2005. Farnesyl diphosphate synthase; regulation of product specificity. *Acta Biochimica Polonica* **52**:45–55.
- Takahashi S, Kuzuyamat T, Watanabe H. and Seto H. 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 9879–9884.
- Tran U. and Clarke C. 2007. Endogenous Synthesis of Coenzyme Q in Eukaryotes. *Mitochondrion* **7(Suppl)**: S62–S71.
- Troy Biosciences Inc. and Natural Plant Protection S.A. 2007. Biopesticides registration action document, Farnesol y nerolidol. EPA-HQ-OPP-2007-0569 (www.epa.org).
- Turunen M, Olsson J. and Dallner G. 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* **1660**: 171-199.
- Van Rensburg P. and Pretorius I.S., 2000. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalysts for efficient biotransformations—a review. *South African Journal for Enology and Viticulture* **21**, 52–73.
- Varela M, González-Tizón A, Mariñas L. and Martínez-Lage A. (2007) Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus* mussels. *Biochemical Genetics* **45**:565–578.
- Wang K. and Ohnuma S. 2000. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*.**1529**:33–48.
- Wu S, Schalk M, Clark A, Miles RB, Coates R. and Chappell J. 2006.Redirection of cytosolic or plastidic isoprenoid precursors elevates terpene production in plants. *Nature Biotechnology* **24**:1441– 1447.

Zhang F, Rodriguez S. and Keasling J. 2011. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. *Current Opinion in Biotechnology*. **22**:1–9.

Zhang M, Luo J, Ogiyama Y, Ryoichi Saiki R. and Kawamukai M. 2008. Heteromer formation of a long-chain prenyl diphosphate synthase from fission yeast Dps1 and budding yeast Coq1. *FEBS Journal* **275**: 3653–3668.

Zietkiewicz E, Rafalski A. and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**:176–183.

ANEXOS

ANEXO I

Curvas de Calibración para la cuantificación de isoprenoides

Las muestras utilizadas para realizar las curvas de calibración se obtienen mediante soluciones de estándares de los isoprenoides a distintas concentraciones, de modo de cubrir el rango de cuantificación.

Los estándares, linalol, alfa-terpineol, citronelol, geraniol, nerol, cis/trans-nerolidol se encuentran disueltos en un “Medio Simil Vino” a pH 3,2 con una concentración de etanol del 12% (v/v), que mimetizan las condiciones físico-químicas del vino (ver Tabla 1.10) (Schneider, 2001).

Una vez obtenidas las distintas soluciones patrón, el procesamiento fue el mismo que para las muestras, se realizó la extracción de los compuestos volátiles mediante técnicas de extracción en fase sólida utilizando los cartuchos ISOLUTE_ENV+ 1g, (International Sorbent Technology, copolímero de estireno-divinilbenceno) y se analizaron mediante la detección por Cromatografía Gaseosa acoplado a Espectrometría de Masas (GC-MS) de monitoreo de iones simples (SIM), utilizando 2-octanol, heptanol y 1,8-cineol como estándares internos y los fragmento iónico (m/z) $m/z = 45, 70$ y $93/108$ respectivamente.

La cuantificación de los distintos compuestos se realizó utilizando un solo fragmento iónico (m/z): linalol ($m/z = 71$), alfa-terpineol ($m/z = 59$), citronelol ($m/z = 69$), Nerol ($m/z = 69$), Geraniol ($m/z = 69$), Nerolidol cis ($m/z = 69$), Nerolidol trans ($m/z = 93$).

Tabla 1.10 Composición y concentración de los distintos compuestos que constituyen el “Medio simil vino” (Schneider, 2001).

Medio simil Vino	
Compuesto	Concentración
Etanol	12 % v/v
Ácido tartárico ³	3.5 g/L
ácido málico	2.5 g/L,
metabisulfato de potasio	60 mg/L
Agua	88 % v/v
NaOH c.s.p ajustar el pH	pH 3.2

Tabla 1.11 Áreas de los distintos estándares en el “Medio símil Vino” en las distintas concentraciones.

		Soluciones estándares en Medio símil Vino					
		Áreas de los estándares para las distintas concentraciones teóricas					
		0,5 ug/L		5 ug/L		30 ug/L	
Estándares	m/z	1	2	1	2	1	2
1,8 cineol	93	21804	69253	32277	39385	279939	24633
	108	21286	67909	30988	37480	285073	25033
2 octanol	45	1325337	5411059	2010228	2560882	14483113	1226820
heptanol	70	311016	1223327	448646	575315	2316005	175824
linalol	71	793	3061	10810	14969	747792	60698
alfa terpineol	59	2191	10763	21431	30052	1112676	105524
	93	679	3313	5916	8576	331898	31688
citronelol	69	2668	17418	12080	16173	690661	62749
Nerol	69	1304	5524	14668	20613	1035128	86779
	93	250	1384	3131	4418	167191	17503
Geraniol	69	3792	28593	25151	33186	1476058	127154
	93	233	1420	2280	3036	121378	13036
Nerolidol cis	69	683	5519	11462	14590	798464	60179
	93	220	1694	3315	4515	245986	19574
Nerolidol trans	69	971	7277	15038	19785	1019364	87232
	93	363	3207	5435	7385	399506	34719

		Soluciones estándares en Medio símil Vino					
		Áreas de los estándares para las distintas concentraciones teóricas					
		100 ug/L		170 ug/L		240 ug/L	
Estandares	m/z	1	2	1	2	1	2
1,8 cineol	93.00	332615	71501	34710	42510	6733	5141
	108.00	326396	68772	34012	44118	6859	5706
2 octanol	45.00	25763447	5236895	2109200	2798728	375161	299476
heptanol	70.00	6943622	1199627	498173	648535	85840	70672
linalol	71.00	4281674	744489	481484	673437	126777	102975
alfa terpineol	59.00	6765431	1177185	745037	1006133	190579	163536
	93.00	2016009	333215	206606	305829	58779	49481
citronelol	69.00	4406465	748620	450869	646756	110871	91616
Nerol	69.00	7885556	1231277	729800	1047745	156711	136736
	93.00	1287317	200202	117405	187709	34180	28055

Anexo I. Curvas de calibración para la cuantificación de isoprenoides

Geraniol	69.00	11314236	1824166	964046	1479492	213584	189726
	93.00	935197	145995	78491	134063	24029	20432
Nerolidol cis	69.00	5791304	1045373	531476	756370	107154	89981
	93.00	1813105	322716	158414	244109	35312	29853
Nerolidol trans	69.00	7534794	1377516	693753	998837	144687	125281
	93.00	3123008	543066	260102	405559	58879	50740

Tabla 1.12 Relación de áreas: Área del estándar / Área del estándar interno

			Relación de áreas: Área del estándar / Área del estándar interno					
			0,5 ug/L		5 ug/L		30 ug/L	
Estándar	Estándar interno	m/z	1	2	1	2	1	2
linalol	1,8 cineol	93	0,04	0,04	0,33	0,38	2,67	2,46
		108	0,04	0,05	0,35	0,40	2,62	2,42
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,01	0,01	0,05	0,05
	heptanol	70	0,00	0,00	0,02	0,03	0,32	0,35
Alfa Terpineol	1,8 cineol	93	0,10	0,16	0,66	0,76	3,97	4,28
		108	0,10	0,16	0,69	0,80	3,90	4,22
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,01	0,01	0,08	0,09
	heptanol	70	0,01	0,01	0,05	0,05	0,48	0,60
Citronelol	1,8 cineol	93	0,12	0,25	0,37	0,41	2,47	2,55
		108	0,13	0,26	0,39	0,43	2,42	2,51
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,01	0,01	0,05	0,05
	heptanol	70	0,01	0,01	0,03	0,03	0,30	0,36
Nerol	1,8 cineol	93	0,01	0,02	0,10	0,11	0,60	0,71
		108	0,01	0,02	0,10	0,12	0,59	0,70
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01
	heptanol	70	0,00	0,00	0,01	0,01	0,07	0,10
Geraniol	1,8 cineol	93	0,17	0,41	0,78	0,84	5,27	5,16
		108	0,18	0,42	0,81	0,89	5,18	5,08
	2 octanol	45	0,00	0,01	0,01	0,01	0,10	0,10
	heptanol	70	0,01	0,02	0,06	0,06	0,64	0,72
Nerolidol cis	1,8 cineol	93	0,03	0,08	0,36	0,37	2,85	2,44
		108	0,03	0,08	0,37	0,39	2,80	2,40
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,01	0,01	0,06	0,05
	heptanol	70	0,00	0,00	0,03	0,03	0,34	0,34
Nerolidol Trans	1,8 cineol	93	0,02	0,05	0,17	0,19	1,43	1,41
		108	0,02	0,05	0,18	0,20	1,40	1,39
	2 octanol	45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,03

Anexo I. Curvas de calibración para la cuantificación de isoprenoides

	heptanol	70	0,00	0,00	0,01	0,01	0,17	0,20
			Relación de áreas: Área del estándar / Área del estándar interno					
			100 ug/L		170 ug/L		240 ug/L	
Estándar	Estandar interno	m/z	1	2	1	2	1	2
linalol	1,8 cineol	93	12,87	10,41	13,87	15,84	18,83	20,03
		108	13,12	10,83	14,16	15,26	18,48	18,05
	2 octanol	45	0,17	0,14	0,23	0,24	0,34	0,34
	heptanol	70	0,62	0,62	0,97	1,04	1,48	1,46
Alfa Terpineol	1,8 cineol	93	20,34	16,46	21,46	23,67	28,31	31,81
		108	20,73	17,12	21,91	22,81	27,79	28,66
	2 octanol	45	0,26	0,22	0,35	0,36	0,51	0,55
	heptanol	70	0,97	0,98	1,50	1,55	2,22	2,31
Citronelol	1,8 cineol	93	13,25	10,47	12,99	15,21	16,47	17,82
		108	13,50	10,89	13,26	14,66	16,16	16,06
	2 octanol	45	0,17	0,14	0,21	0,23	0,30	0,31
	heptanol	70	0,63	0,62	0,91	1,00	1,29	1,30
Nerol	1,8 cineol	93	3,87	2,80	3,38	4,42	5,08	5,46
		108	3,94	2,91	3,45	4,25	4,98	4,92
	2 octanol	45	0,05	0,04	0,06	0,07	0,09	0,09
	heptanol	70	0,19	0,17	0,24	0,29	0,40	0,40
Geraniol	1,8 cineol	93	34,02	25,51	27,77	34,80	31,72	36,90
		108	34,66	26,52	28,34	33,53	31,14	33,25
	2 octanol	45	0,44	0,35	0,46	0,53	0,57	0,63
	heptanol	70	1,63	1,52	1,94	2,28	2,49	2,68
Nerolidol cis	1,8 cineol	93	17,41	14,62	15,31	17,79	15,91	17,50
		108	17,74	15,20	15,63	17,14	15,62	15,77
	2 octanol	45	0,22	0,20	0,25	0,27	0,29	0,30
	heptanol	70	0,83	0,87	1,07	1,17	1,25	1,27
Nerolidol Trans	1,8 cineol	93	9,39	7,60	7,49	9,54	8,74	9,87
		108	9,57	7,90	7,65	9,19	8,58	8,89
	2 octanol	45	0,12	0,10	0,12	0,14	0,16	0,17
	heptanol	70	0,45	0,45	0,52	0,63	0,69	0,72

Tabla 1.13 Relación de áreas: Área del compuesto / Área del patrón interno, ajustado a la concentración del 2- octanol.

Linalol	Am/A s.Cs	0,10	0,09	0,88	0,96	8,46	8,10	27,22	23,29	37,39	39,41	55,35	56,32
	ug/L	0,50	0,50	4,98	4,98	29,31	29,31	99,94	99,94	169,99	169,99	240,03	240,03

Anexo I. Curvas de calibración para la cuantificación de isoprenoides

Alfa terpineol	Am/A s.Cs	0,27	0,33	1,75	1,92	12,58	14,09	43,01	36,82	57,86	58,89	83,21	89,45
	ug/L	0,54	0,54	5,43	5,43	31,96	31,96	108,98	108,98	185,37	185,37	261,75	261,75
Citronelol	Am/A s.Cs	0,33	0,53	0,98	1,03	7,81	8,38	28,02	23,42	35,01	37,85	48,41	50,11
	ug/L	0,49	0,49	4,94	4,94	29,07	29,07	99,13	99,13	168,61	168,61	238,08	238,08
Nerol	Am/A s.Cs	0,03	0,04	0,26	0,28	1,89	2,34	8,18	6,26	9,12	10,99	14,92	15,34
	ug/L	0,51	0,51	5,06	5,06	29,78	29,78	101,56	101,56	172,75	172,75	243,93	243,93
Geraniol	Am/A s.Cs	0,47	0,87	2,05	2,12	16,69	16,98	74,87	86,59	93,25	103,77		
	ug/L	0,51	0,51	5,08	5,08	29,89	29,89	173,34	173,34	244,77	244,77		
Nerolidol cis	Am/A s.Cs	0,08	0,17	0,93	0,93	9,03	8,03	41,27	44,27	46,78	49,22		
	ug/L	0,51	0,51	5,06	5,06	29,75	29,75	172,55	172,55	243,65	243,65		
Nerolidol trans	Am/A s.Cs	0,04	0,10	0,44	0,47	4,52	4,64	20,20	23,74	25,71	27,75		
	ug/L	0,51	0,51	5,06	5,06	29,75	29,75	172,55	172,55	243,65	243,65		

Curvas de Calibración de isoprenoides

A continuación se muestran las distintas Curvas de calibración obtenidas, utilizando el 2-octanol como estándar interno.

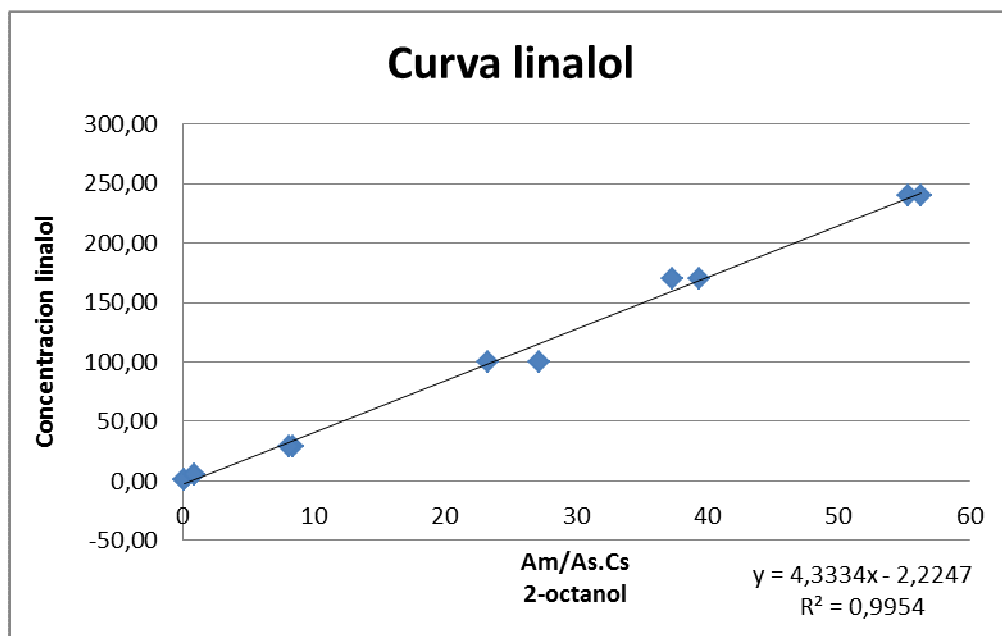


Figura 1.18 Curva de calibración del linalol, $r^2 = 0,99$.

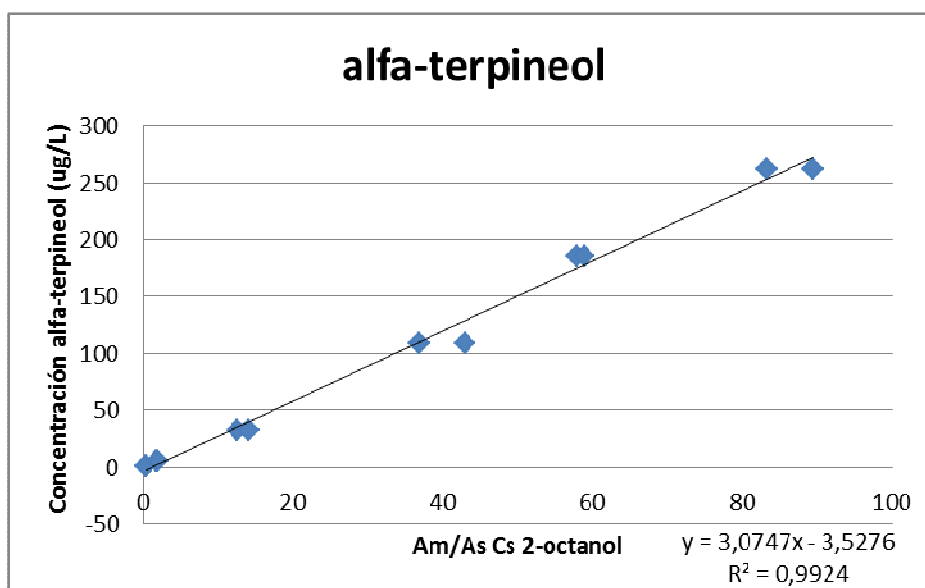


Figura 1.19 Curva de calibración del alfa terpineol, $r^2 = 0,99$.

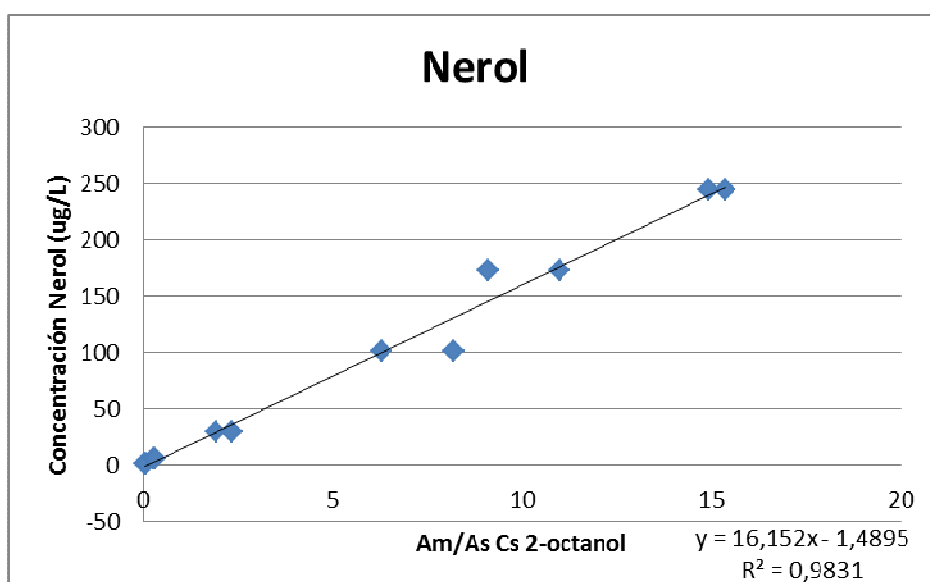


Figura 1.20 Curva de calibración del Nerol, $r^2 = 0,98$.

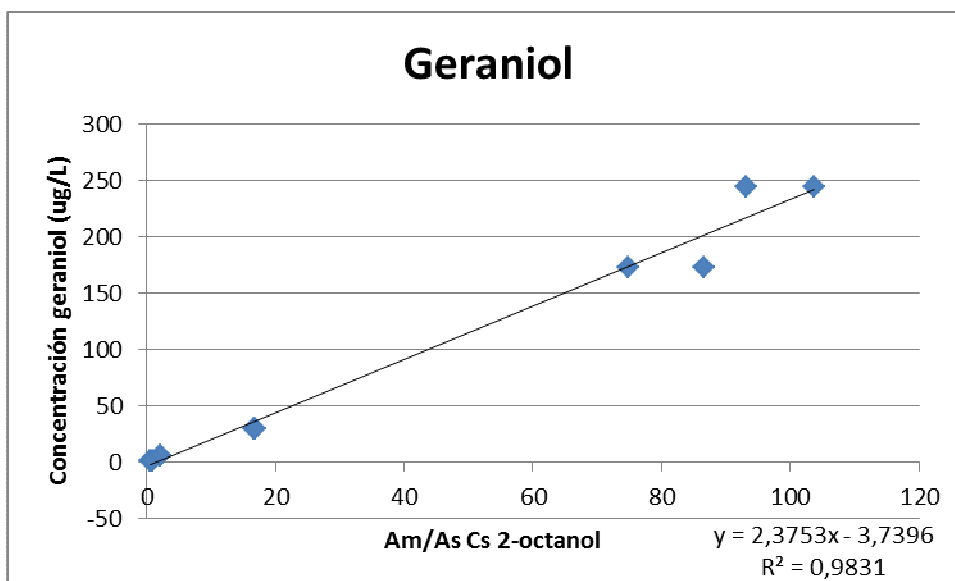


Figura 1.21 Curva de calibración del geraniol, $r^2 = 0,98$.

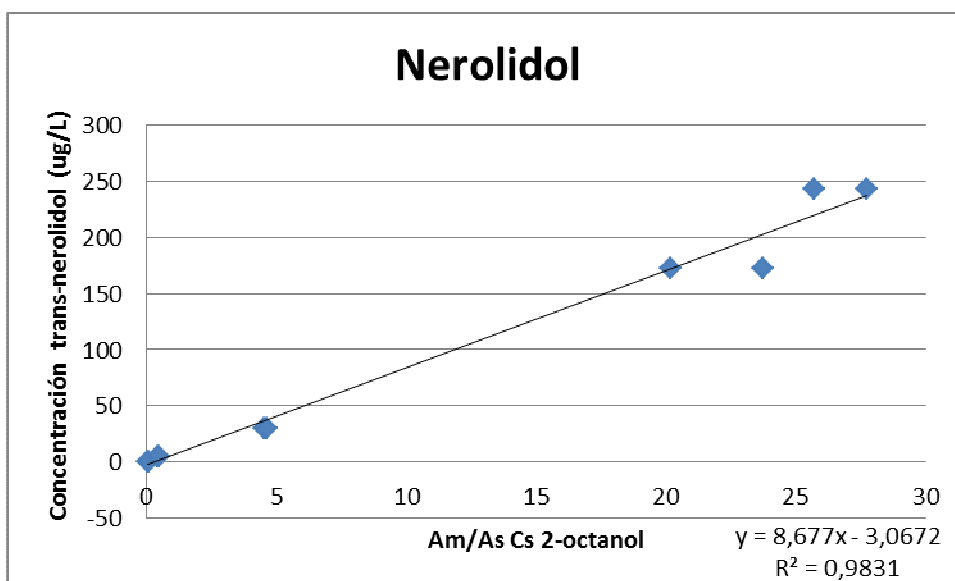


Figura 1.22 Curva de calibración del trans-nerolidol, $r^2 = 0,98$.

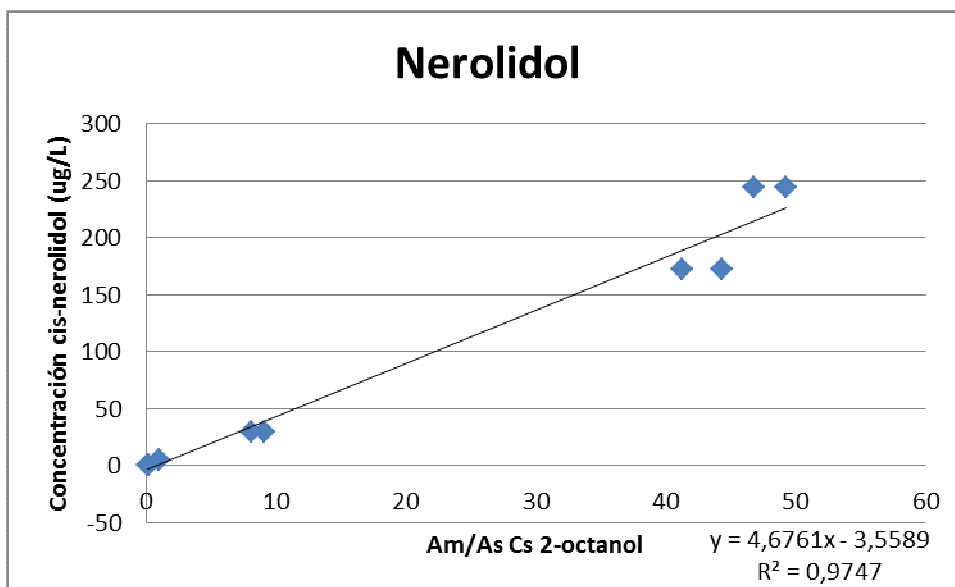


Figura 1.23 Curva de calibración del cis-nerolidol, $r^2 = 0,97$.

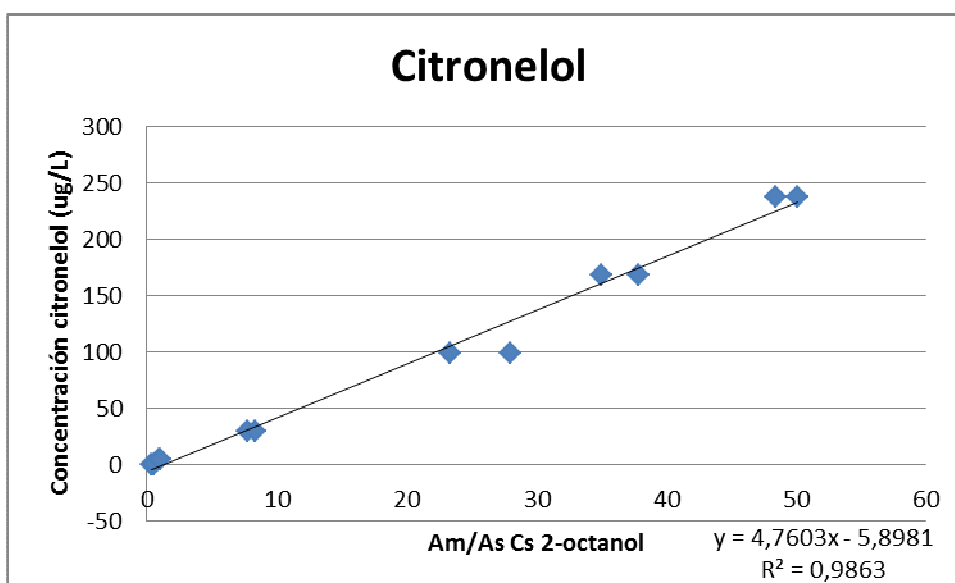


Figura 1.24 Curva de calibración del citronelol, $r^2 = 0,98$.

ANEXO II

Secuencias del gen *COQ1* obtenidas con las cepas nativas

A continuación se presentan las secuencias finales obtenidas para cada cepa, correspondiente a la región promotora y a la región codificante de *COQ1*.

Se observan las 4 regiones seleccionadas correspondientes a **Prom_COQ1**, **CDS1_COQ1**, **CDS2_COQ1**, **CDS3_COQ1**, que fueron amplificadas con los cebadores indicados con los mismos colores. En rojo figura el solapamiento de las regiones, confirmada por ambas hebras con los distintos cebadores.

En amarillo se observa el SNP obtenido a continuación de **TATA box**, para las cepas en estudio. Codón de inicio **ATG**, codón de terminación **TAA**

```

TTTTCACTCTAAGCATTTTGTGGCATCTTCGGAAAAAGCCCAGCGAGGGTAAACAGGGT
TAGGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATTATAATCTATAGAGATTTTCTACAACACA
AGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTCAAAGGTCTGGCGC
TGCTCATCACATCAAATTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTGCAGT
TGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCATATC
ATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGTCTGG
CCATCCGGTGTCAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAAACAGAAGGCCAAAAAGTACC
TCCCTTGTAGTGTGTGTTGTTGTCAAGAGCACTTTCTGAAATTTCCCATGACAGAAAGAAA
TCACTTGAAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCAATTTACTCTAAACCTAGTCA
AAATCAACTATTTCAACGTCTGCAAGTAGCATATCCCCTACATATTCTTCACGGTAT
TAAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTGCCAGAAAGAACTTTTGACAA
ACAAAGAGGGATTTTACCCAAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAGAGATGATACACAC
TGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAAGGCCAAG
CGAAAATGCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTTCTCTTAGGGAG
AGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAGAACTAATGTCTAATAG
TATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACGCGGA
TATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGCTTGAAGT
TAAAGAGCAGACTTTCTGTGTTCCAAGCCGCCAACAGGGGCTGCAATTATCTCATGATCA
GATTATAGAAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACCTATCTGAAGACTGCTGCTTT
GATATCAAAATCTTGAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCACTCACCTGCCGTTATCGA
CGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATATGCT
TGATTTTACTGTGCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGGCGCGGATCTAAAATTAGG
TATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTCATGGAAAGAAGACCCATCTTTAGGTCCACTAAT
TTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATATTGATTCTGTGAGACTCCA
TAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCATTACAAAA
TCTACGGGATTTCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCTGCCTAGAGTTTTTAATAATAAG
TATACTAACAAAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGGGTGAAGAATAAAGAGA
AAATGAAGAAGGTCATAGTGTCCGATT
    
```

Figura 2.12 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa S288C

```

ACAGGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATTATAATGTATAGAGATTTTCTA
CAACACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTCAAAGGT
CTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCT
TTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATC
CCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCG
GGTCTGGCCATCCGGTGTCAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAAACAGAAGGCCAAA
AAGTACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTCAAGAGCACTTTCTGAAATTCCCATGACAG
AAAGAAATCACTTGAAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCAATTTACTCTAAAC
CTAGTCAAAATCAACTATTTCAACGTCTGCAAGTAGCATATCCCCTACATATTCTTC
    
```

ACGGTATTAAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTT
 TTGACAAACAAAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTA**GAGATGA**
TACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTA**TTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAA**
GGCCAAGCGGAAATACTGCCCTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCGGGTGATTTTCTC
TAGGAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATT**ACACAACCCCGAAGTCGTAG**AACTAATGT
 CTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTG
 ACGCGGACATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTAAAAAGC
 TTGAAGTTAAAGAGCAGACTTTCGTGTTCCAAGCCGC**CAACAGGGGCTGCAATTATC**TC
 ATGATCAGATTATAGAA**ACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTG**
CTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCG
TTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATG
ATATGCTTGATTTTACTGTGCTGGA**AGATTTAGGGAAGCCATCCG**GCGCGGATCTAA
 AATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTTCATGGAAGAAGACCCGCTTTAGGTC
 CACTAATTCACGCAATTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATATTGATTCTGTGA
 GACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCAT
 TACAAAATCTACGGGATCTCTTCTGAATCTGATGCTCGTCTGCCCTAGAGTTTTTAA
 CTAATAGTATACTGACAAGAAGAAAG**TAA**ACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.13 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 00_35

AGGGTAACAGGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACAT**TATAAT**GATAGAGA
 TTTTCTACAACACAAGAAGTGTGCCATTCACTCCGAATTGAGTACAGTGGGACG**ATG**TTT
 CAAAGGTCTGGCGCTGCTCATCACATCAAATGATTTTCTCCTCGAAGATGCCGCTTTAAA
 TCCTCCTTTCAGTTCCTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGG
 AATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCC
 CTCATCGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAA
 GGCAAAAAGTA**CGTCCCTTGTAGTGTGTG**TTGTCAAGAGCAC**TTTCTGAAATTC**
ATGACAGAAAGAAATCACTTGA**AAAT****TGACAAGTCGGATGTCCTC**AGGACCCAATTTAC
 TCTAAACCTAGTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCTACTACAT
 ATTCTTACGGTATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAA
 GAAACTTTTGACAAACAAAGAGGGATTTTACCCAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTA
GAGATGATACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTA**TTGATCATTCTGATACAAGA**
AGAGGAAGGCCAAGCGGAAATACTGCCCTTACCAACAAGATGGCCGTTTGGCGGGTGAT
TTTCTCTTAGGAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATT**ACACAACCCCGAAGTCGTAGAA**
 CTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACT
 TCCATTGACGCGGACATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCT
 AAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGACTTTCGTGTTCCAAGCCGC**CAACAGGGGCTGCAA**
TTATCTCATGATCAGATTATAGAA**ACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTG**
AAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCA
CCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTC
GTAGATGATATGCTTGATTACTGTGCTGGA**AGATTTAGGGAAGCCATCCG**GCGCG
 GATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTTCATGGAAGAAGACCCGCTCT
 TTAGGTCCACTAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATATTGAT
 TCTGTGAGACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGAC
 AAGGCATTACAAAATCTACGGGATCTCTTCTGAATCTGATGCTCGTCTGCCCTAGAG
 TTTTTAACTAATAGTATACTGACAAGAAGAAAG**TAA**ACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.14 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 105

GGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACAT**TATAAT**GATAGAGATTTTCTACAA
 CACAAGAAGTGTGCCATTCACTCCGAATTGAGTACAGTGGGACG**ATG**TTTCAAAGGTCTG
 GCGCTGCTCATCACATCAAATGATTTTCTCCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTG
 CAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCA
 TATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGT
 CTGGCCATCCGGTGTAAACAAGTTACTAGTTACTATTTGAAACAGAAGGCAAAAAG
 TA**CGTCCCTTGTAGTGTGTG**TTGTCAAGAGCAC**TTTCTGAAATTC****CCATGACAGAA**
 GAAATCACTTGA**AAAT****TGACAAGTCGGATGTCCTC**AGGACCCAATTTACTCTAAACCTA
 GTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCTACTACATATCTTTCAGG
 GTATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTTTTG

ACAAACAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTA **GAGATGATAC**
ACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTA **TGATCATTTCTGATACAAGAAGAGGAAGGC**
CAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTCTCTTAG
GAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATT **ACACAACCCCGAAGTCGTAG**AACTAATGTCTA
 ATAGTATGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACG
 CGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGCTTG
 AAGTTAAAGAGCAGCACTTTCGTGTTCCAAGCCGC **CAACAGGGGCTGCAATTATC**TCATG
 ATCAGATTATAGAA **ACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTGCTG**
CTTTGATATCAAAATCTTGCAAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCGTTA
TTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATA
TGCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAA **AGATTTAGGGAAGCCATCCG**GCGCGGATCTAAAAT
 TAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGACCCGCTTTTAGGTCCAC
 TAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGATTCTGTGAGAC
 TCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCATTAC
 AAAATCTACGGGATTCCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCTGCCCTAGAGTTTTTAATA
 ATAGTATACTGACAAGAAGAAAG **TAA**ACCTTGAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.15 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 106

ACAGGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACAT **TATAATG**TATAGAGATTTTCTA
 CAACACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACG **ATG**TTTCAAAGGT
 CTGGCGTCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCT
 TTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACCTCCAAGATTCTTTGGAATAATC
 CCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCG
 GGTCTGGCCATCCGGTGTCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAAGGCAAAA
 AAGTA **CGTCCCTTGTAGTGTGTTG**TTGTCAAGAGCAC **TTTCTGAAATTTCCCATGACAG**
AAAGAAATCACTTGAAAAAT **AGACAAGTCGGATGTTCCCT**AGGACCAATTTACTCTAAAC
 CTAGTCAAAATCAACTATTTCAACGTCTGCAAGTAGCATATCCCCTACATATTCTTC
 ACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTT
 TTGACAAACAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTA **GAGATGA**
TACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTA **TGATCATTTCTGATACAAGAAGAGGAA**
GGCCAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTCTCT
TAGGAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATT **ACACAACCCCGAAGTCGTAG**AACTAATGT
 CTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCGAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTG
 ACGCGGACATCGATACCATCGAAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGC
 TTGAAGTTAAAGAGCAGCACTTT **CGTGTCCAAGCCGC** **CAACAGGGGCTGCAATTATC**TC
 ATGATCAGATTATAGAA **ACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTG**
CTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCG
TTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATG
ATATGCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAA **AGATTTAGGGAAGCCATCCG**GCGCGGATCTAA
 AATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGACCCGCTTTTAGGTC
 CACTAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGATTCTGTGA
 GACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCAT
 TACAAAATCTACGGGATTCCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCTGCCCTAGAGTTTTTAA
 CTAATAGTATACTGACAAGAAGAAAG **TAA**ACCTTGAATTTCAAATAAAGGGTGAAGAAT
 AAA

Figura 2.16 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 107.

CGAGGGTAACAGGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACAT **TATAATG**TATAGAG
 ATTTTCTACAACACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACG **ATG**TT
 TCAAAGGTCTGGCGTCTCATCACATCAAATTGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAA
 ATCCTCCTTTGCAAGTGTCTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCAAGATTCTTTG
 GAATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGC
 CCTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGTCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGA
 AGGCAAAAAAGTA **CGTCCCTTGTAGTGTGTTG**TTGTCAAGAGCACTTTCTGAAAT **ATTC**

CATGACAGAAAGAAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCAATTTA
 CTCTAAACCTAGTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCACTACA
 TATTTCTCACGGTATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGA
 AGAAACTTTTGACAAAACAAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGT
 AGAGATGATACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAG
 AAGAGGAAGGCCAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGA
 TTTTCTCTTAGGAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAG
 ACTAATGTCTAATAGTATGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATAC
 TTCCATTGACGCGGACATCGATAACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTC
 TAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGACTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCA
 ATTATCTCATGATCAGATTATAGAAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCT
 GAAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATC
 ACCTGCCGTTATTGACGAATGCTATGATTTCCGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAAC
 CGTAGATGATATGCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCG
 GGATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGACCCGTC
 TTTAGTCCACTAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGGA
 TTCTGTGAGACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGA
 CAAGGCATACAAAATCTACGGGATTCTTCTCTGAATCTGATGTTCTGTTCTGCCCTAGA
 GTTTTAACTAATAGTATACTGACAAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.17 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 108

GGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACATATATAATGTATAGAGATTTTCTACAA
 CACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTCAAAGGTCTG
 CGCTGCTCATCACATCAAATGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTG
 CAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCA
 TATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGT
 CTGGCCATCCGGTGTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAGGCAAAAAAG
 TACGTCCTTGTAGTGTGTTGTTGTCAAGAGCACTTTCTGAAATTTCCATGACAGAAA
 GAAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCAATTTACTCTAAACCTA
 GTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCACTACATATTTCTTACG
 GTATTTAAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAAGAAACTTTTG
 ACAAACAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAAGATGATAC
 ACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAAGGC
 CAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTTCTCTTAG
 GAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAGCAACTAATGTCTA
 ATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACG
 CGGACATCGATAACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAGCTTG
 AAGTTAAAGAGCACGACTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAATTATCTCATG
 ATCAGATTATAGAAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTGCTG
 CTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCGTTA
 TTGACGAATGCTATGATTTCCGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATA
 TGCTTGAATTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCGGATCTAAAAT
 TAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAGAAGACCCGTCCTTTAGGTCCAC
 TAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGATTCTGTGAGAC
 TCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGACAAAGGACTTAC
 AAAATCTACGGGATTCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCTGCCCTAGAGTTTTTAACTA
 ATAGTATACTGACAAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.18 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 111

GGTTAGGGGATTAGAAGATTAAAGTAAGACACATATATAATGTATAGAGATTTTCTACAA
 ACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTCAAAGGTCTGG
 CGCTGCTCATCACATCAAATGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTG
 AGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCAT
 ATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGT
 TGGCCATCCGGTGTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAGGCAAAAAAGT
 ACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTCAAGAGCACTTTCTGAAATTTCCATGACAGAAAG
 AAATCACTTGAAAATTGACAAGTCGGATGTTCCCTGAGGACCCAATTTACTCTAAACCTAG
 TCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCACTACATATTTCTTACGG
 TATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTTTTGA
 CAAACAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAAGATGATAC
 CACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAAGGCC

AAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTTCTCTTAGG
AAGAGCAA CAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAGAACTAATGTCTAA
TAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACGC
GGACATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGCTTGA
AGTTAAAGAGCAGCACTTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAATTATCTCATGA
TCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTGCTGC
TTTGATATCAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCGTTAT
TGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATA
GCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCGGATCTAAAAT
AGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTTCATGGAAGAAGACCCGCTTTAGGTCCACT
AATTTACGCAATTTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGATTCTGTGAGACT
CCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCATTACA
AAATCTACGGGATTCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCGCCCTAGAGTTTTTAATAA
TAGTATACTGACAAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.19 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 112

GGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATTTATAATGTATAGAGATTTTCTACAA
CACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTTCAAAGGTCTG
GCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCTTTG
CAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATCCCA
TATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCGGGT
CTGGCCATCCGGTGTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAAGGCAAAAAAG
TACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTTGCAAGAGCACTTTCTGAAATTTCCCATGACAGAA
GAAATCACTTGAAAATTTGACAAGTCCGGATGTTCCCTAGGACCCAATTTACTCTAAACCTA
GTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCTACATATTTCTTACG
GTATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTTTTG
ACAAACAAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAAGATGATAC
ACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAAGGC
CAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTTCTCTTAG
GAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAGAACTAATGTCTA
ATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTGACG
CGGACATTCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGCTTG
AAGTTAAAGAGCAGCACTTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAATTATCTCATG
ATCAGATTATAGAAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTGCTG
CTTTGATATCAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCGTTA
TTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTCGTAGATGATA
TGCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCGGATCTAAAAT
TAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTTCATGGAAGAAGACCCGCTTTAGGTCCAC
TAATTTACGCAATTTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAACTATTGATTCTGTGAGAC
TCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCATTAC
AAAATCTACGGGATTCTTCTCTGAATCTGATGCTCGTTCGCCCTAGAGTTTTTAATAA
ATAGTATACTGACAAGAAGAAAGTAAACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.20 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 205

ACAGGGTTAGGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATTTATAATGTATAGAGATTTTCTA
CAACACAAGAAGTGTGCCATTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACGATGTTTTCAAAGGT
CTGGCGCTGCTCATCACATCAAATTGATTTTCTCGAAGATGCCGCTTTAAATCCTCCT
TTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGGAATAATC
CCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCCCTCATCG
GGTCTGGCCATCCGGTGTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAACAGAAAGGCAAAA
AAGTAACGTCCCTTGTAGTGTGTTGTTGTTGCAAGAGCACTTTCTGAAATTTCCATGACAG
AAAGAAATCACTTGAAAATTTGACAAGTCCGGATGTTCCCTAGGACCCAATTTACTCTAAAC
CTAGTCAAAATCAACTATTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCCTACATATTTCTTAC
ACGGTATTAACCACTAAATCCCTTGACAAAAGGTCTGAGCCTTTGCCAGAAGAACTTT
TTGACAAAAGAGGGATTTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTAAGATGATAC
TACACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATTGATCATTCTGATACAAGAAGAGGAA
GGCCAAGCGGAAATACTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGATTTTCTCT
TAGGAAGAGCAACAGTGTCAATTTCAAGATTACACAACCCCGAAGTCGTAGAACTAATGT
CTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACTTCCATTG

ACGCGGACATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCTAAAAAGC
 TTGAAGTTAAAAGAGCAGCACTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAATTATCTC
 ATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACTTATCTGAAGACTG
 CTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCACCTGCCG
 TTATTGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCTGATG
 ATATGCTTGATTTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCGGATCTAA
 AATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTTTGCATGGAAAAGAAGACCCGCTTTAGGTC
 CACTAATTCACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATATTGATCTGTGA
 GACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGACAAGGCAT
 TACAAAATCTACGGGATTCTTCTCCTGAATCTGATGCTCGTTCCTGCCCTAGAGTTTTAA
 CTAATAGTATACTGACAAGAAGAAAAG TAA ACCTTGAAATTTCAAATAAAGG

Figura 2.21 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 209

GAGGGTAACAGGGTTAGGGATTAGAAGATTAAGTAAGACACATTATAATCTATAGAGA
 TTTTCTACAACACAAGAAGTGTGCCATTTCAGTCCGAATTGAGTACAGTGGGACG ATGTTT
 CAAAGGTCTGGCGCTGCTCATCACATCAAAATGATTTTCATCTCGAAGATGCCGCTTTAAA
 TCCTCCTTTGCAGTTGCTTTAAACGCTGCCAGTAAGTTGGTAACTCCCAAGATTCTTTGG
 AATAATCCCATATCATTAGTCTCGAAGGAGATGAACACATTGGCCAAAAATATAGTTGCC
 CTCATCGGGTCTGGCCATCCGGTGCTAAACAAGGTTACTAGTTACTATTTTGAAAACAGAA
 GGCAAAAAGTA GTCCCTTGTAGTGTGTGTTGTCAAGAGCACTTTCTGAAATTCCT
 ATGACAGAAAAGAAATCACTTGAAAAT TGACAAGTCGGATGTTCTGAGGACCCAATTTAC
 TCTAAACCTAGTCAAAATCAACTATTTTCAACGTCCTGCAAGTAGCATATCCCACTACAT
 ATTCTTACGGTATTAACCCTAAATCCCTTGACAAAAGGTCCTGAGCCTTTGCCAGAA
 GAACTTTTGACAAACAAGAGGGATTTACCCAAACAGAGAAGATTAGCAGAGATTGTA
 GAGATGATACACTGCGTCTTTACTTCATGATGACGTTATGATCATTCTGATACAAGA
 AGAGGAAGGCCAAGCGGAAATGCTGCCTTTACCAACAAGATGGCCGTTTTGGCGGGTGAT
 TTTCTCTTAGGGAGAGCAA CAGTGTCAATTTCAAGATT ACACAACCCCGAAGTCGTAGAA
 CTAATGTCTAATAGTATTGCGAATCTTGTGCAAGGTGAGTTCATGCAACTGAAAAATACT
 TCCATTGACCGGATATCGATACCATCGAAAATGGCCATAAGCTACTTCCGGTTCCTTCT
 AAAAAGCTTGAAGTTAAAGAGCAGCACTTTCGTGTTCCAAGCCGC CAACAGGGGCTGCAA
 TTATCTCATGATCAGATTATAGAACTGCATTTGAATACTACATACACAAGACCTATCTG
 AAGACTGCTGCTTTGATATCAAAATCTTGCAGATGTGCTGCTATATTATCTGGGGCATCA
 CCTGCCGTTATCGACGAATGCTATGATTTCCGGTAGAAATCTAGGTATATGTTTCCAACCT
 GTAGATGATATGCTTGAATTTACTGTGTCTGGAAAAGATTTAGGGAAGCCATCCGCGCG
 GATCTAAAATTAGGTATTGCTACTGCTCCAGTCTTGTGTTGCATGGAAAAGAAGACCCATCT
 TTAGGTCCACTAATTTACGCAATTTTTCAGAGAGGGGTGATGTTGAAAAAATATTGAT
 TCTGTGAGACTCCATAATGGTATAGCGAAGACGAAAATACTAGCGGAGGAATATAGGGAC
 AAGGCATTACAAAATCTACGGGATTCTTCTCCTGAATCTGATGCTCGTTCCTGCCCTAGAG
 TTTTAACTAATAGTATACTAACAAGAAGAAAAG TAA ACCTTGAAATTTCAAATAAAGGT
 GAAG

Figura 2. 22 Secuencia correspondiente a la región de *COQ1* para la cepa 281

ANEXO III

Resultados del análisis de la amplificación por PCR para los distintos cebadores ensayados.

A continuación se presentan los resultados del análisis de la amplificación por PCR para los distintos cebadores ensayados. En la Tabla 3.3 figuran las cepas utilizadas y la relación de codificación.

Tabla 3.3 Cepas de levaduras no- *Saccharomyces* y la relación de códigos utilizada.

Codigo	Codificación usada	Especie
UY_T02/25AF	22	<i>H. vineae</i>
UY_T02/19AF	21	<i>H. vineae</i>
UY_T02/5AF	23	<i>H. vineae</i>
UY_T06/05G	1	<i>H. uvarum</i>
UY_C06/35G	20	<i>H. uvarum</i>
UY_C06/27G	19	<i>H. uvarum</i>
UY_T06/13G	5	<i>H. uvarum</i>
UY_T06/01G	7	<i>H. opuntiae</i>
UY_T06/19G	2	<i>H. opuntiae</i>
UY_T06/12G	12	<i>H. opuntiae</i>
UY_T06/14G	6	<i>C. zemplinina</i>
UY_T06/20G	3	<i>C. zemplinina</i>
UY_T06/08G	9	<i>C. zemplinina</i>
UY_A03/19G	16	<i>M. pulcherrima</i>
UY_CH03/08G	18	<i>M. pulcherrima</i>
UY_CH03/21G	CH21-03	<i>M. pulcherrima</i>
UY_CH03/29G	14	<i>M. pulcherrima</i>
UY_M03/02G	17	<i>M. pulcherrima</i>
UY_M03/25G	M25-03	<i>M. pulcherrima</i>
UY_M03/26G	24	<i>M. pulcherrima</i>
UY_M00/08G	00_8	<i>M. pulcherrima</i>
UY_M00/09G	25	<i>M. pulcherrima</i>
UY_MM00/19G	26	<i>M. pulcherrima</i>
UY_PV03/16G	P16-03	<i>M. pulcherrima</i>
UY_PV03/18G	P18-03	<i>M. pulcherrima</i>
UY_SB00/03G	00_3	<i>M. pulcherrima</i>
UY_T03/10G	13	<i>M. pulcherrima</i>
UY_T03/28G	15	<i>M. pulcherrima</i>
UY_T00/21G	00_21	<i>M. pulcherrima</i>
UY_T00/23G	27	<i>M. pulcherrima</i>

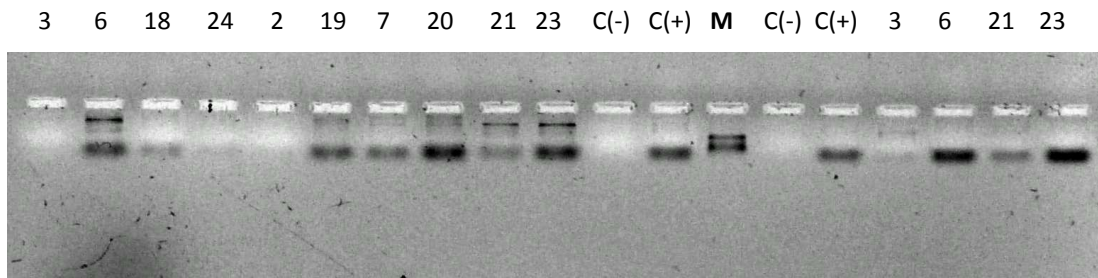


Figura 3.5 Análisis de la amplificación por PCR utilizando el cebador 5CAG. Se utilizó como marcador de peso molecular M: pBR322 digerido con MspI. Luego del marcador se observa el análisis de la amplificación por PCR utilizando el cebador DOP-S para las *C. Zemplinina* y *H. vineae*. Como control positivo se utilizó la utilizó ADN de la cepa 282 de *S. cerevisiae*.

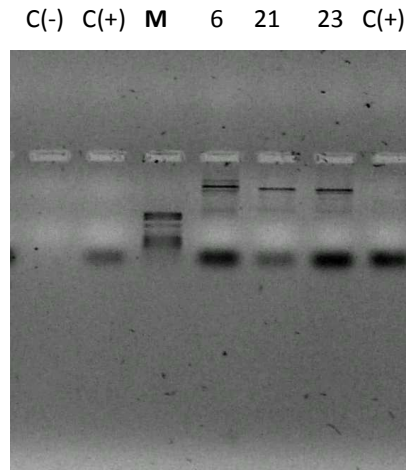


Figura 3.6 Análisis de la amplificación por PCR utilizando el 5CAG. Se utilizó como marcador de peso molecular M: pBR322 digerido con MspI. Como control positivo se utilizó la utilizó la cepa 282 de *S. cerevisiae*.

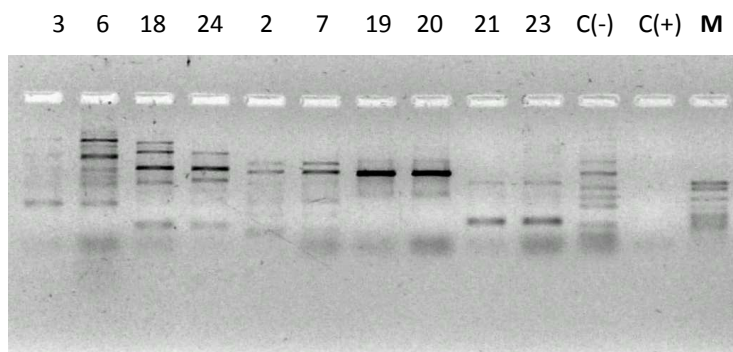


Figura 3.7 Se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y 5CAG. Se utilizó como marcador de peso molecular M: pBR322 digerido con MspI.

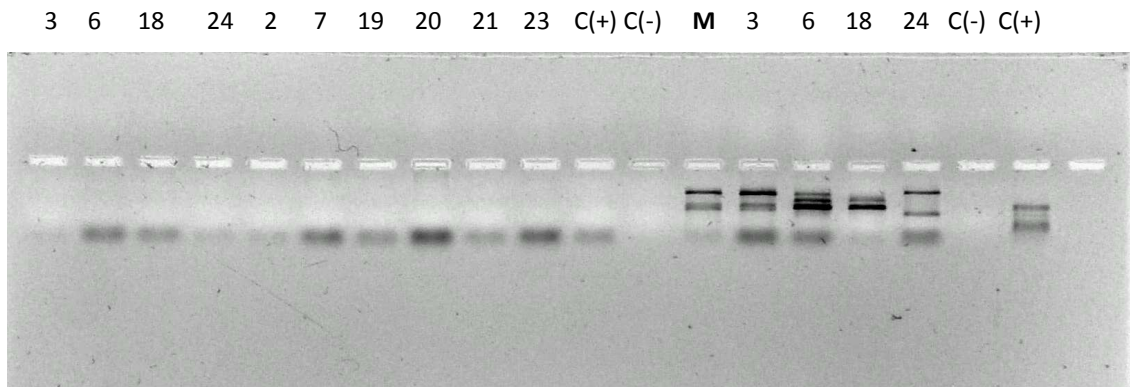


Figura 3.8 Se observa la amplificación utilizando el cebador TtRNASc. Se utilizó como marcador de peso molecular M: pBR322 digerido con MspI. Luego del marcador se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR18-15.

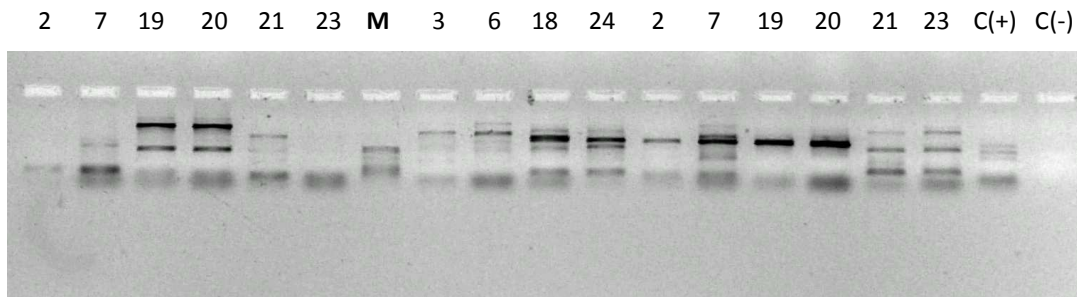


Figura 3.9 Amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR18-15. Se utilizó como marcador de peso molecular M: pBR322 digerido con MspI. Luego del marcador se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR18-16.

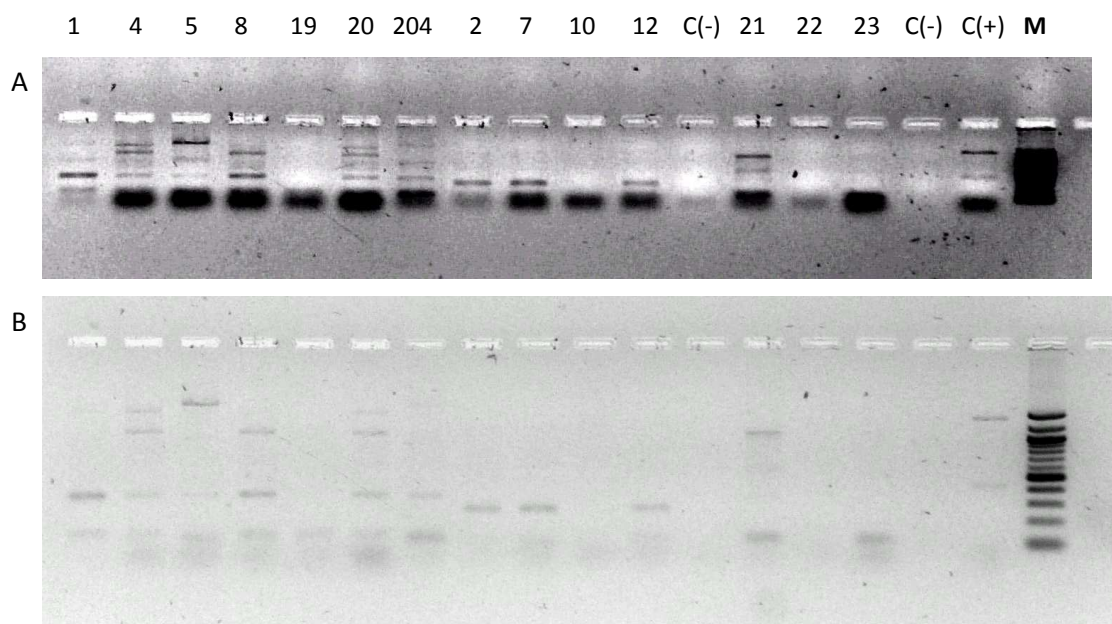


Figura 3.10 Amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSRMB, luego del control negativo se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR18-15. A y B) es el mismo gel corrido durante más tiempo. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

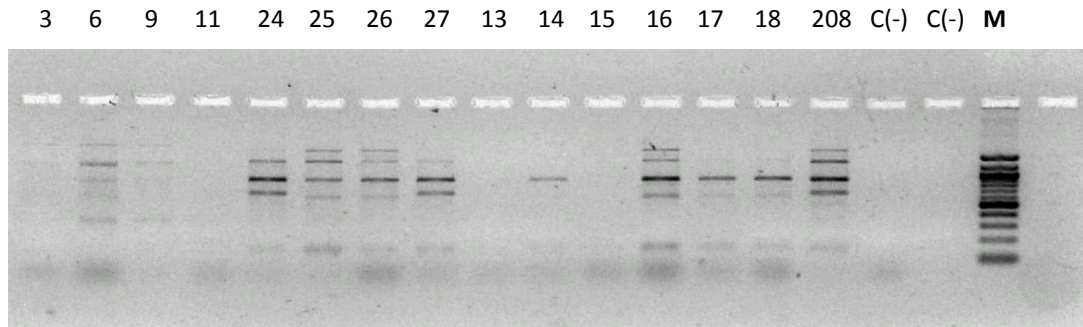


Figura 3.11 Amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y 5CAG. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

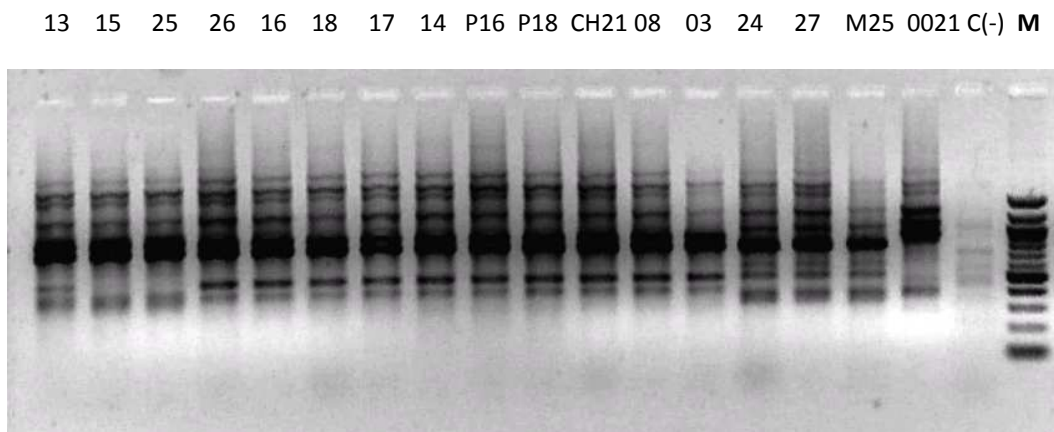


Figura 3.12 Amplificación utilizando el cebador ISSR-CGA. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

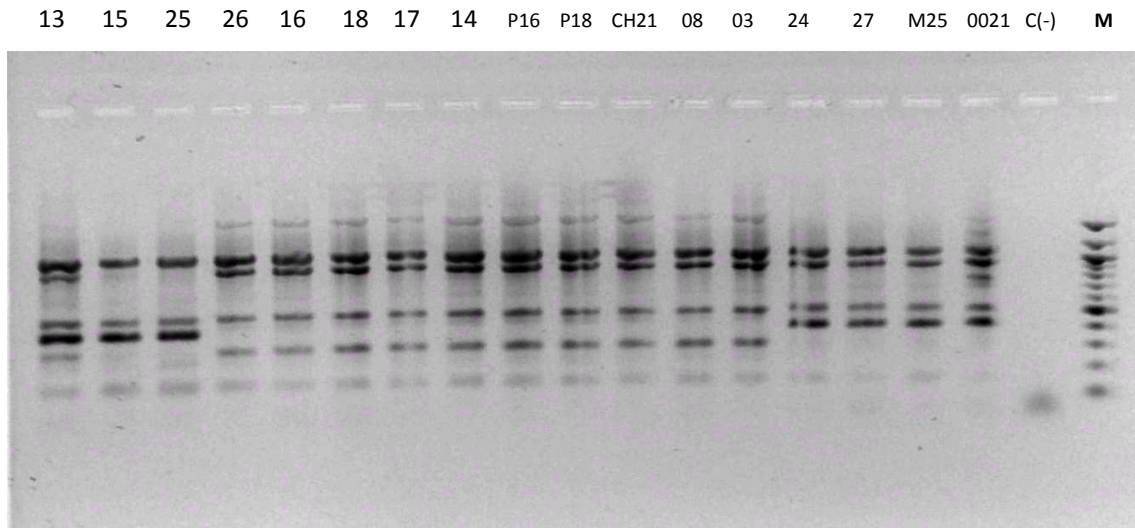


Figura 3.13 Amplificación utilizando el cebador ISSR-CGA. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

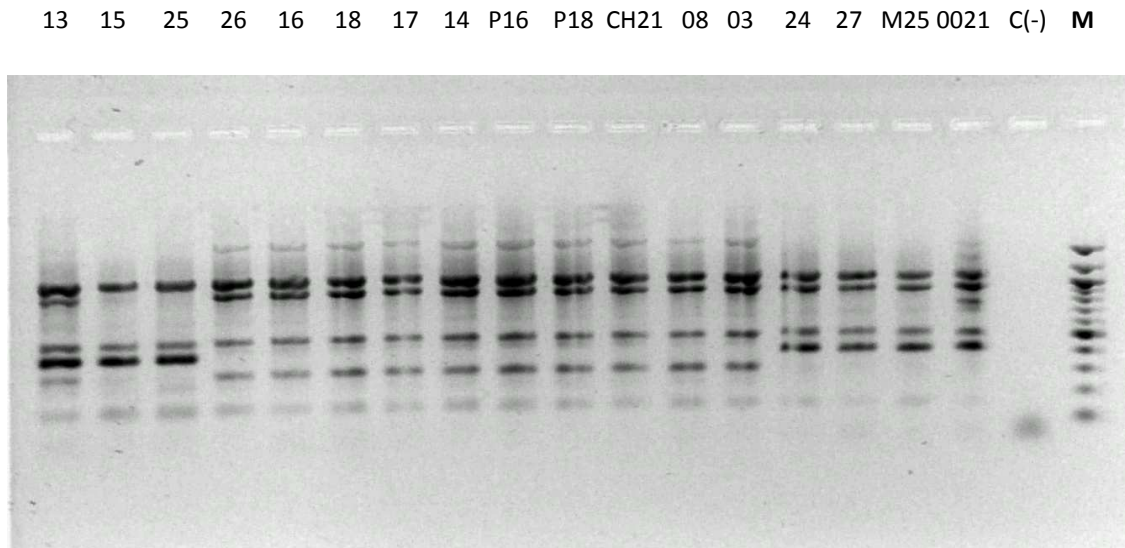


Figura 3.14 Se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR-CCA. Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

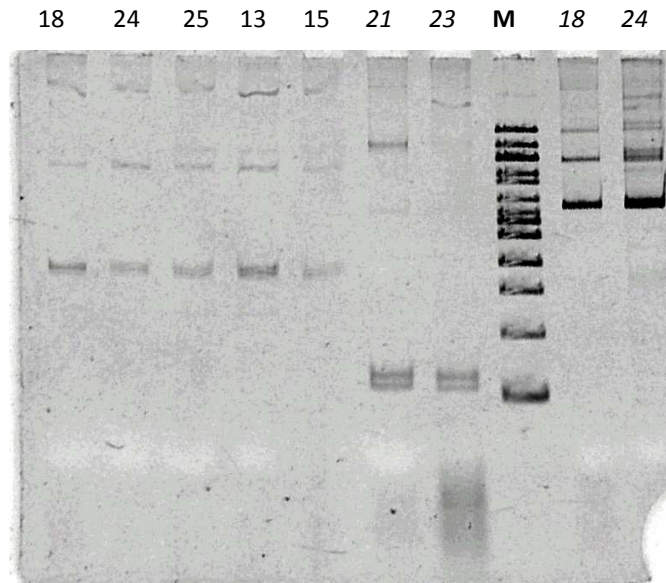


Figura 3.15 Amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y TTVTGT y las muestras que figuran en *itálica* (dos previas y posteriores al marcador) se observa la amplificación utilizando la combinación de cebadores TtRNASc y ISSR 18-15. Gel nativo de poliacrilamida 8%, Se utilizó como marcador de peso molecular M: 100bp

ANEXO IV – paper Barquet et al., 2012

Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces* subspecies

Marianne Barquet · Valentina Martín ·
Karina Medina · Gabriel Pérez · Francisco Carrau ·
Carina Gaggero

Received: 27 September 2011 / Revised: 20 October 2011 / Accepted: 6 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract There is a worldwide trend to understand the impact of non-*Saccharomyces* yeast species on the process of winemaking. Although the predominant species at the end of the fermentation is *Saccharomyces cerevisiae*, several non-*Saccharomyces* species present during the first days of the process can produce and/or release aromas that improve the bouquet and complexity of the final wine. Since no genomic sequences are available for the predominant non-*Saccharomyces* species selected from grapes or musts (*Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora vineae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida zemplinina*), a reproducible PCR method was devised to discriminate strains at the subspecies level. The method combines different oligonucleotides based on tandem repeats with a second oligonucleotide based on a conserved tRNA region, specific for ascomycetes. Tandem repeats are randomly dispersed in all eukaryotic genomes and tRNA genes are conserved and present in several copies in different chromosomes. As an example, the method was applied to discriminate native *M. pulcherrima* strains but it could be extended to differentiate strains from other non-*Saccharomyces* species. The biodiversity of species and strains found in the grape ecosystem is a

potential source of new enzymes, fungicides and/or novel sustainable methods for biological control of phytopathogens.

Keywords Molecular typing · Tandem repeat · tRNA · Non-*Saccharomyces* grape yeasts · *Metschnikowia pulcherrima*

Introduction

Although there is a great biodiversity of native yeast strains in grapes and musts, only a limited number of strains are used for winemaking. There is a great potential in the grape native flora for the selection of new strains. In Uruguay, there is an ongoing multidisciplinary program for the isolation and selection of native yeast and bacterial strains from grapes. Native *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains capable of producing desirable aromas in conditions of low nitrogen demand have been selected (Carrau 1997; Carrau et al. 2008). A phylogenetic study of *S. cerevisiae* strains based on microsatellite markers confirmed that the Uruguayan native strains were as biodiverse as all the commercial strains tested, coming from different geographical origins (Jubany et al. 2008).

Controlled mixed cultures of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* wine yeasts are currently being assayed to improve the aromatic profile of wines (Ciani et al. 2010; Comitini et al. 2011; De Benedictis et al. 2011). Several yeast species associated with winemaking, especially non-*Saccharomyces* species, are capable of producing β -glucosidases (Vasserot et al. 1989; Rosi et al. 1994; González-Pombo et al. 2008; Pérez et al. 2011). Some of these non-*Saccharomyces* strains could play a key role in the biological control of phytopathogens on grapes and fruits (Rabosto et al. 2006). In this work, we focused our attention on *Metschnikowia pulcherrima* strains since they

M. Barquet · C. Gaggero (✉)
Molecular Biology Department,
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE),
11600 Montevideo, Uruguay
e-mail: carina@iibce.edu.uy

C. Gaggero
e-mail: carina6g@gmail.com

V. Martín · K. Medina · G. Pérez · F. Carrau
Enology Section, Food Science and Technology Department,
Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR),
11800 Montevideo, Uruguay

are natural inhabitants of fruits, buds, and floral parts of many fruit trees. Strains with very different technological applications have been described within the *M. pulcherrima* species, such as post-harvest biological control of fruits (Spadaro et al. 2010), production of the antimicrobial pigment pulcherrimin (Türkel and Ener 2009), and biodegradation of the mycotoxin patulin (Reddy et al. 2011).

Considering the great diversity and potential applications of different non-*Saccharomyces* yeast strains within the same species, it is important to devise simple and reliable molecular typing techniques to discriminate at the subspecies level. Discrimination at the strain level has been reported with different kinds of PCR primers that amplify polymorphic regions present in multiple copies in eukaryotic genomes. The interdelta method reported by Legras and Karst (2003) amplifies DNA regions between delta elements from Ty retrotransposons present in multiple copies in the genome of *S. cerevisiae*, but it has not been assayed with non-*Saccharomyces* strains. The Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) fingerprinting technique, reported by Zietkiewicz et al. (1994), utilizes primers based on tandem repeats to amplify inter-SSR DNA sequences. The ISSR fingerprinting technique provides highly reproducible results due to a stringent annealing temperature. A single primer composed of simple sequence repeats, with or without an anchor made up of a few bases at the 5' region, can amplify genomic regions between two microsatellite loci with oligonucleotides that anneal to the repeat sequence. ISSR circumvents the requirement for flanking sequence information, and thus has found wide applicability in a variety of plants and fungi (Wolfe et al. 1998; Wolfe 2005; Hantula et al. 1996; Capece et al. 2003).

Primers containing tandem repeats (GAC)₅ or (GTG)₅ were used to differentiate non-*Saccharomyces* species but they were not suitable to discriminate at the subspecies level (Capece et al. 2003). Few molecular methods have been reported to differentiate non-*Saccharomyces* grape yeasts at the strain level. A low level intraspecific discrimination of *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* spoilage yeasts was obtained using mtDNA restriction analysis with *Hin*I (Martorell et al. 2006). Restriction enzyme analysis with *Not*I followed by pulsed field gel electrophoresis (REA-PFGE) of chromosomal DNA was used to discriminate *Brettanomyces bruxellensis* (anamorph of *D. bruxellensis*) strains (Miot-Sertier and Lonvaud-Funel 2007). Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR), performed with a unique decamer primer and low annealing temperature, was used to discriminate strains of *D. bruxellensis* and *P. guilliermondii* (Martorell et al. 2006), *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* (Baleiras-Couto et al. 1994) and *Hanseniaspora uvarum* (Capece et al. 2005; De Benedictis et al. 2011). *M. pulcherrima* strains could be successfully

differentiated using conventional amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Spadaro et al. 2008) and *Candida zemplinina* and *H. uvarum* strains could be discriminated with a simplified AFLP (Esteve-Zarzoso et al. 2010).

The aim of this work was to develop a simple, reproducible PCR method to discriminate non-*Saccharomyces* yeast strains at the subspecies level. Considering that tandem repeats are randomly dispersed in all eukaryotic genomes and tRNA genes are conserved and present in several copies in different chromosomes, we developed a method combining different oligonucleotides based on tandem repeats with a second oligonucleotide based on a conserved tRNA region, specific for ascomycetes.

Materials and methods

Isolation of native non-*Saccharomyces* yeast strains

Five individual healthy berries per plant were hand picked from different parts of a grape cluster. Samples of each grape variety were obtained from 40 plants of a vineyard block of approximately 1 ha located in Canelones region, Uruguay. Berries from the border rows of the plantation were not sampled. Sampling was performed in the morning and 200 berries per block were carefully collected in bags (avoiding breakage of the pedicel) and placed in the refrigerator until use. Microorganisms were isolated by two different procedures, indicated with the letter G or F in the strain code name (see Table 1). Method G consisted in grinding the berries in a sterile mortar, adding 10 mL sterilized saline, shaking 2 min, and then performing serial dilutions in saline. Method F consisted in the isolation from grape must fermentation at the beginning or half of the process (before must density reached 1,030).

WL Nutrient agar medium was used as a rapid method to discriminate species based on colony morphology (Pallmann et al. 2001), and lysine agar (Fowell 1965) was used as an initial rough discrimination between *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* strains. All strains were maintained in YPD [1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose] agar medium at 4°C for routine use. Yeast strains were kept at -80°C in YPD liquid medium with 20% glycerol for long-term storage.

Screening method for β -glucosidase activity

Screening was carried out on Esculin Glycerol Agar (EGA) medium as described in Perez et al. (2011). The final pH of the medium was 6.0 or 4.0, as indicated. The pH was adjusted to 4.0 with a citrate-phosphate buffer and the liquid medium was autoclaved separately from the agar and mixed right before pouring the plates. Strains with β -glucosidase activity

Table 1 Properties of non-*Saccharomyces* yeast strains used in this study

Accession	Code	Species	Grape variety	β -Glu pH6	β -Glu pH4	Antagonism EI (%)
JN709464	UY_T02/25AF	<i>H. vineae</i>	Tannat	(+++)	(-)	72
JN051411	UY_T02/19AF	<i>H. vineae</i>	Tannat	(+++)	(-)	85
JN051394	UY_T02/5AF	<i>H. vineae</i>	Tannat	(+++)	(-)	90
JN709465	UY_T06/05G	<i>H. uvarum</i>	Tannat	(+)	(-)	ND
JN051410	UY_C06/35G	<i>H. uvarum</i>	Cabernet Sauvignon	(+)	(-)	100
JN709466	UY_T06/13G	<i>H. uvarum</i>	Tannat	(+)	(-)	ND
JN051404	UY_T06/01G	<i>H. opuntiae</i>	Tannat	(+)	(-)	100
JN709468	UY_T06/12G	<i>H. opuntiae</i>	Tannat	(+)	(-)	ND
JN709467	UY_T06/14G	<i>C. zemplinina</i>	Tannat	(-)	(-)	ND
JF999997	UY_T06/08G	<i>C. zemplinina</i>	Tannat	(-)	(-)	ND
JN051408	UY_A03/19G	<i>M. pulcherrima</i>	Arinarnoa	(+)	(-)	100
JN051395	UY_CH03/08G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay	(+)	(+)	100
JN051396	UY_CH03/21G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay	(+)	(+)	100
JN051406	UY_CH03/29G	<i>M. pulcherrima</i>	Chardonnay	(+)	(+)	100
JN051409	UY_M03/02G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot	(+)	(+)	100
JN051397	UY_M03/25G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot	(+++)	(+++)	100
JN051402	UY_M03/26G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot	(++)	(-)	100
JN051401	UY_M00/08G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot	(+)	(+)	100
JN051412	UY_M00/09G	<i>M. pulcherrima</i>	Merlot	(+)	(+)	100
JN051413	UY_MM00/19G	<i>M. pulcherrima</i>	Moscatel Miel	(++)	(+/-)	100
JN051398	UY_PV03/16G	<i>M. pulcherrima</i>	Petit Verdot	(+)	(+)	100
JN051399	UY_PV03/18G	<i>M. pulcherrima</i>	Petit Verdot	(+)	(+)	100
JN051391	UY_SB00/03G	<i>M. pulcherrima</i>	Sauvignon blanc	(++)	(+)	100
JN051405	UY_T03/10G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat	(+)	(-)	14
JN051407	UY_T03/28G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat	(+)	(-)	100
JN051400	UY_T00/21G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat	(+++)	(+)	100
JN051403	UY_T00/23G	<i>M. pulcherrima</i>	Tannat	(+++)	(+/-)	100

Codes used to name the strains indicate that they were isolated in Uruguay (UY), followed by the initial(s) of the grape variety they were isolated from and the last two digits of the year of isolation. The strain numbering is followed by G or F, depending on the isolation procedure (see "Materials and methods"). The β -glucosidase activity determination and in vitro antagonism against *B. cinerea* are described in "Materials and methods". ND stands for not determined

hydrolyzed the substrate and a dark brown color developed in the agar. The diameter of the brown halo was measured after 8 days. Results were expressed according to the range of halo diameter as + (14–17 mm), ++ (18–22 mm), or +++ (23–27 mm). Results shown as +/- indicate a halo diameter <14 mm (see Table 1). All determinations were performed in duplicates.

In vitro inhibition of *Botrytis cinerea*

Inocula of the antagonistic yeasts were prepared by culturing in 100-mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of YPD and incubating on a rotary shaker (100 rpm) at 25°C for 48 h. Yeasts cells were collected by centrifugation at 2,000×g for 15 min, washed, resuspended in sterilized saline solution, counted using a Neubauer chamber, and adjusted to a concentration of 1×10^8 cells/mL.

Spore suspensions of *B. cinerea* were prepared by growing the pathogen on PDA at 20°C for 7 days. Spores were then collected and suspended in sterile water containing 0.1% Tween 80, filtered through sterile cheesecloth, collected by centrifugation at 2,000×g for 15 min, washed, resuspended in sterilized water, counted using a Neubauer chamber, and adjusted to a concentration of 1×10^6 spores/mL.

An agar cylinder (5 mm thick×7 mm diam.) was cut from the center of a culture plate containing a chemically defined fermentation medium solidified with 20 g/L agar and prepared with a yeast assimilable nitrogen (YAN) concentration of 180 mgN/L, as described in Carrau et al. (2008). The bottom of the well was sealed with water agar. A 50- μ L sample of the yeast cell suspension was introduced into the wells; after 30 min, 50 μ L of the spore suspension of the pathogen was also pipetted into the well. For the control plates the same batch of spore suspension of

the pathogen was introduced in the wells. After 7 days of incubation at 20°C, the diameter of the fungal colony on the agar plate was measured and the Effectiveness Index (EI) was calculated as follows:

$$(\text{control diameter} - \text{inhibition assay diameter}) * 100 / \text{control diameter}$$

(Rabosto et al. 2006). So, if the antagonist totally inhibited the fungus growth, the inhibition assay diameter would be zero and the EI value was 100%. Each strain was evaluated by two replicates and the experiment was performed twice.

DNA isolation and identification of non-*Saccharomyces* species

Isolated fresh colonies from each strain were inoculated and grown on YPD medium at 30°C for DNA isolation. DNA was isolated scaling the method described by Jubany et al. 2008, to one half. The variable D1/D2 region from 26S rDNA gene was amplified using the primers NL-1 (5'-CATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) and NL-4 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGG) as described by Kurtzman and Robnett (1998). Amplifications were performed with an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 PCR cycles (denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C, and extension at 72°C for 2 min), with a final extension at 72°C for 10 min. Amplicons were purified and sequenced by Macrogen, Korea. DNA sequences were deposited in GenBank (see accession numbers in Table 1).

Oligonucleotides

Primers used in this study are shown in Table 2.

Table 2 Primers assayed in this study

Primer name	Sequence 5'-3'	Reference
Tydelta12	TCAACAATGGAATCCCAAC	Legras and Karst (2003)
Tydelta21	CATCTTAACACCGTATATGA	Legras and Karst (2003)
5CAG	CAGCAGCAGCAGCAG	Boss et al. (2007)
ISSR-CGA	DHBCGACGACGACGACGA	Hantula et al. (1996)
ISSR-CCA	DDCCACCACCACCACCA	Hantula et al. (1996)
ISSR18-15	GATCCAGCAGCAGCC	This work
ISSR18-16	GATCCAGCAGCAGCAG	This work
ISSR-MB	CTCACAACAACAACAACA	This work
TtRNASc	GCTTCTATGGCCAAGTTG	This work

B (G, T, or C), D (G, A, or T), H (A, T, or C)

Tandem repeat-tRNA PCR analysis

Primers used for the tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR analysis were the following: TtRNASc, ISSR-MB, and 5CAG. PCR amplifications were performed in a Thermo PXE 0.2 Thermal Cycler combining TtRNASc primer with either ISSR-MB or 5CAG primer. The PCR reaction mixes consisted of 5 µL genomic DNA (10–20 ng), 1 µM each primer, 0.2 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 5 µL 10× *Taq* buffer and 1 U *Taq* DNA polymerase in a final reaction volume of 50 µL. Amplification was performed as follows: 5 min at 95°C, 35 cycles of 60 s at 95°C, 60 s at 50°C, 90 s at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C.

PCR products were separated at low voltage (50 V) in 1.8% or 2% thin agarose gels. Amplifications performed with different *Taq* DNA polymerases and/or with DNAs isolated from independent experiments always gave the same profile. All experiments were performed in duplicates with independent DNA isolations.

Cluster analysis

Molecular patterns were analyzed with the Gel Compare software package, version 4.2 (Applied Maths BVBA, Belgium) using the UPGMA algorithm.

Results

Technological properties of non-*Saccharomyces* native strains

During the vintages of the years 2000, 2002, 2003, and 2006, native yeast strains were isolated from different grape varieties planted in the Canelones region of Uruguay. From a total of 306 isolates analyzed, we selected a group of several *Hanseniaspora* and *M. pulcherrima* strains able to produce β-glucosidase at pH 6.0 for further studies (see Table 1). Since wine has a low pH, β-glucosidase activity was also tested at pH 4.0. Out of 25 strains showing β-glucosidase activity at pH 6, only 13 strains (all of them *M. pulcherrima*) showed enzymatic activity at pH 4.0 in the EGA medium. All *M. pulcherrima* strains, except one, showed a strong antagonism against *B. cinerea* (see Table 1). *C. zemplinina* strains were also isolated and are included in this study to test the discrimination power of this new PCR method.

Considering the different technological applications for these non-*Saccharomyces* strains, it was imperative to discriminate them at the subspecies level with a simple and reproducible PCR method.

Low discrimination power with several previously reported and newly designed PCR primers

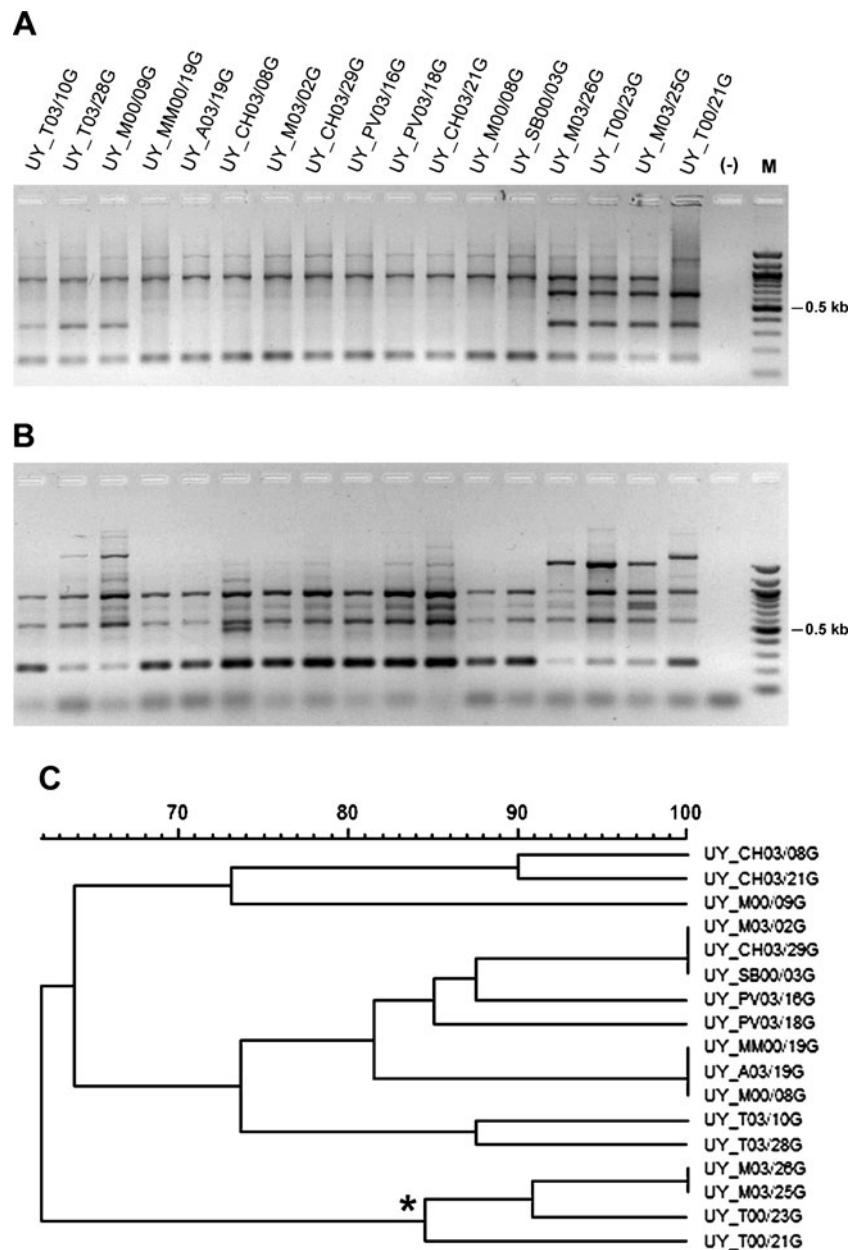
Since there are no genomic sequences available for the non-*Saccharomyces* species under study (*M. pulcherrima*, *H. vineae*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *C. zemplinina*), discrimination at the level of subspecies was attempted trying different kinds of PCR primers designed to amplify regions present in multiple copies in eukaryotic genomes (see Table 2).

Amplifications of interdelta regions with primers Tydelta12 and Tydelta21 following the protocol of Legras and Karst (2003) were unsuccessful.

Primers containing tandem repeats reported by others to discriminate at the subspecies level were assayed, as well as newly designed ones (see Table 2). Primers 5CAG, ISSR 18-15 and ISSR 18-16 were designed based on the ones reported by Boss et al. (2007), and Varela et al. (2007). Since primer 5CAG is present in many different chromosomes of *S. cerevisiae* and other fungal genomes, primers with different anchor sequences were designed (ISSR 18-15, ISSR 18-16).

When the ISSR primers (5CAG, ISSR18-15, ISSR18-16, ISSR-CGA, ISSR-CCA, and ISSR-MB) were used as a unique primer for PCR, only primers 5CAG, ISSR-CGA, and ISSR-CCA resulted in amplification products. However, none of them was very discriminatory, and the 17 *M.*

Fig. 1 UPGMA cluster analysis of the 17 *M. pulcherrima* strains. Cluster analysis was based on the TRtRNA PCR profiles generated with the following combination of primers: **a** 5CAG and TtRNASc, **b** ISSR-MB and TtRNASc, **c** phylogenetic analysis showing three distinct clusters and discriminating 12 different genotypes. An *asterisk* highlights the cluster of strains showing highest β -glucosidase activity



pulcherrima DNAs could only be separated into the same and only four groups with either ISSR-CGA or ISSR-CCA (results not shown).

Rationale for the design of the tandem repeat-tRNA PCR analysis

The aim of this work was to develop a simple and reproducible PCR method that would detect differences in the genomes of non-*Saccharomyces* strains of the same species.

It is known that tRNA genes are present in multiple copies throughout the genomes of most species. According to the Genomic tRNA database (Lowe and Eddy 1997; <http://gtrnadb.ucsc.edu/>), the *S. cerevisiae* genome contains 286 tRNA genes while other fungal genomes like *Yarrowia lipolytica* contain as much as 510 tRNA genes.

Based on the tRNA gene sequences from *S. cerevisiae*, we performed alignments of the same isoacceptors and tested different primers within consensus regions. The TtRNASc primer (5'-GCTTCTATGGCCAAGTTG-3') was designed based on a conserved region detected in the alignment of all the *S. cerevisiae* threonine tRNA gene sequences.

When performing a Blast search of the TtRNASc primer against all the tRNAs included in the Genomic tRNA database (Lowe and Eddy 1997; <http://gtrnadb.ucsc.edu/>; Last updated Mon Apr 18 16:36:02 2011), all the sequences producing significant alignments corresponded only to fungal tRNAs. This TtRNASc primer sequence aligns to different chromosomes of *S. cerevisiae* (8 chr), *Kluyveromyces lactis* (4 chr), *Eremothecium gossypii* (4 chr), and *Candida glabrata* (7 chr). At present, the tRNA database only includes tRNAs from the following ten fungal genomes: *Aspergillus fumigatus*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Debaryomyces hansenii*, *Encephalitozoon cuniculi*, *E. gossypii* (= *Ashbya gossypii*), *K. lactis*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Y. lipolytica*.

Performing a Blast search of the TtRNASc primer sequence against all non-redundant nucleotide sequences collection at NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) resulted in 100% homology only to sequences from the following fungal ascomycetes species: *S. cerevisiae*, *Saccharomyces paradoxus*, *Naumovozyza castellii*, *A. gossypii* (= *E. gossypii*), *Z. rouxii*, *Kluyveromyces thermotolerans* (= *Lachancea thermotolerans*), *C. glabrata*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *K. lactis*, *Z. bailii*, and *Scheffersomyces stipitii*.

Considering that the TtRNASc primer sequence is present in several copies in many different ascomycetous species, we combined it with primers based on tandem repeats and found that the discrimination level achieved was higher than the one obtained with unique primers. For

instance, combining the TtRNASc primer with either ISSR-CGA or ISSR-CCA, we could discriminate the 17 *M. pulcherrima* DNAs into five groups, instead of the four groups obtained with each of the ISSR primers alone. When the TtRNASc was used alone in a PCR, no amplified fragments were detected, implying that two adjacent tRNAs were not located at a distance that would result in amplification of PCR products within our detection range (100–2,000 bp). However, combining either ISSR-MB or 5CAG with TtRNASc primer resulted in a higher discrimination power. Taking together the results obtained amplifying the same samples with both pairs of primers, we could achieve an even higher discrimination power (see Fig. 1). The dendrogram in Fig. 1c shows that in spite of a similarity level higher than 62% within this group of strains, the TRtRNA PCR method could successfully discriminate 12 strains out of the 17 *M. pulcherrima*

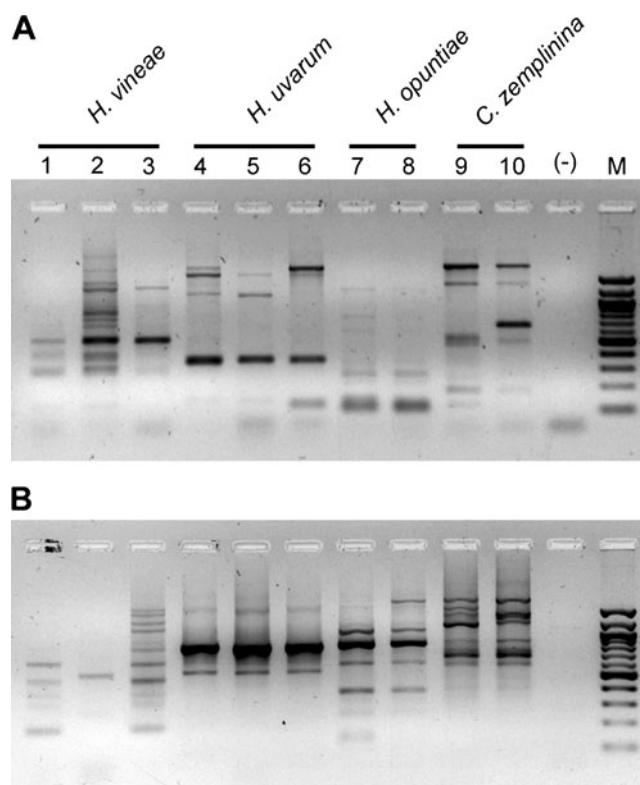


Fig. 2 TRtRNA PCR profiles for different strains of the following species: *H. vineae*, *H. uvarum*, *H. opuntiae* and *C. zemplinina*. Results of PCRs with the DNA from the same samples are shown in the same order in **a** and **b**, using the following combinations of primers: **a** 5CAG and TtRNASc, **b** ISSR-MB and TtRNASc, Lanes 1, 2, 3 correspond to *H. vineae* strains UY_T02/25AF, UY_T02/19AF and UY_T02/5AF. Lanes 4, 5, 6 correspond to *H. uvarum* strains UY_T06/05G, UY_C06/35G and UY_T06/13G. Lanes 7, 8 correspond to *H. opuntiae* UY_T06/01G and UY_T06/12G. Lanes 9, 10 correspond to *C. zemplinina* strains UY_T06/14G and UY_T06/08G. Minus sign stands for the PCR negative control without DNA, M stands for the 100 bp DNA ladder, where the strongest bands correspond to 0.5 and 1 kb

isolates under study. It is particularly noteworthy that the *M. pulcherrima* strains with higher β -glucosidase activity are grouped in the same cluster (see Table 1 and asterisk in Fig. 1c). Since the TtRNAsc primer sequence is present in many ascomycetous species, this PCR method should be applicable to discriminate strains within many different ascomycetes. In fact, we could successfully discriminate strains within either *H. vineae*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, or *C. zemplinina* species (see Fig. 2).

Discussion

M. pulcherrima and different species of *Hanseniaspora* have been reported as part of the natural yeast flora present in grapes from different regions of the world (Li et al. 2010; Raspor et al. 2006). Considering the potential technological applications for these strains, our goal was to discriminate them at the subspecies level by a simple and reproducible PCR method. The interdelta method reported by Legras and Karst (2003) can discriminate strains within *S. cerevisiae* species, but it was not applicable to these non-*Saccharomyces* species. According to Neuvéglise et al. (2002), the number of Ty retrotransposons per genome in sequenced hemiascomycetes is highly variable but lower than the number of Ty1 elements in *S. cerevisiae*.

Primers described by Hantula et al. (1996), based on tandem repeats which are randomly dispersed in eukaryotic genomes, could discriminate different isolates of the fungal species *Gremmeniella abietina* but had a low discrimination power within our non-*Saccharomyces* strains. Sequences for tRNA genes are conserved and also present in several copies in different chromosomes of eukaryotic genomes. Besides the primary function of tRNA genes as templates for the transcription of tRNA molecules, there is evidence that these repetitive elements might mediate the spatial and functional organization of the genome and drive genome evolution (McFarlane and Whitehall 2009). In fact, a method based on consensus primers derived from tRNA sequences was reported by Welsh and McClelland (1991) and used successfully to discriminate bacterial species and genera, but it was not suitable to discriminate strains within the same species. The TRtRNA PCR analysis described in this work combines primers based on tandem repeats and a consensus tRNA sequence, specific for ascomycetes. Twelve *M. pulcherrima* strains (out of 17 strains with a similarity level higher than 62%) were successfully discriminated with this TRtRNA PCR method. Strains from other non-*Saccharomyces* species (*H. vineae*, *H. uvarum*, *H. opuntiae*, *C. zemplinina*) were also discriminated. Recently, De Benedictis et al. (2011) achieved a lower discrimination power within highly similar *H. uvarum* isolates, combining three fingerprinting methods and using

annealing temperatures $\leq 45^\circ\text{C}$ in all cases. Analysis of 50 *H. uvarum* strains resulted in only nine different profiles, branching at a similarity value of 60%.

Spadaro et al. (2008) evaluated the usefulness of the AFLP technique for the genetic discrimination of 26 strains of *M. pulcherrima*, isolated from different sources and different geographical regions. The technique showed a high discrimination power and AFLP patterns could clearly distinguish all the strains. However, AFLP technique requires higher quality and quantity of DNA, and it is technically more demanding than the TRtRNA PCR method described in this work. Even the simplified AFLP method described by Esteve-Zarzoso et al. (2010) requires high quality and quantity of DNA to ensure reproducible results in the DNA digestion and ligation steps.

The simplicity, reproducibility, and high discrimination power of the TRtRNA PCR method described in this work could be used within a selection scheme where non-*Saccharomyces* yeast strains would be first typed at the species and strain level before embarking on more time-consuming and labor intensive methods to determine their performance in technological applications of interest.

Acknowledgments This research was funded by PEDECIBA Química, ANII Project PE_ACM_2009_952, CSIC 656 Group I + D and the Program of R & D on “Native Yeasts Selection for Wine Fermentation” of Castel Pujol Winery, Uruguay. M.B. received an ANII fellowship (BE_POS_2010_2634). We thank Mario Lalinde for visual art services.

References

- Baleiras Couto MM, van der Vossen JMBM, Hofstra H, Huis in't Veld JHJ (1994) RAPD analysis: a rapid technique for differentiation of spoilage yeasts. *Int J Food Microbiol* 24:249–260
- Boss D, Maurhofer M, Zala M, Défago G, Brunner PC (2007) ISSR fingerprinting for the assessment of the bindweed biocontrol agent *Stagonospora convolvuli* LA39 after field release. *Lett Appl Microbiol* 45:244–251
- Capece A, Salzano G, Romano P (2003) Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int J Food Microbiol* 84:33–39
- Capece A, Fiore C, Maraz A, Romano P (2005) Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J Appl Microbiol* 98:136–144
- Carrau F (1997) The emergence of a new Uruguayan wine industry. *J Wine Res* 8:179–185
- Carrau F, Medina K, Farina L, Boido E, Henschke PA, Dellacassa E (2008) Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast: effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res* 8:1196–1208
- Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10:123–133
- Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, Ciani M (2011) Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in

- controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiol 28:873–882
- De Benedictis M, Bleve G, Grieco F, Tristezza M, Tufariello M, Grieco F (2011) An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures. Antonie Van Leeuwenhoek 99:189–200
- Esteve-Zarzoso B, Hierro N, Mas A, Guillamón JM (2010) A new simplified AFLP method for wine yeast strain typing. LWT-Food Sci Technol 43:1480–1484
- Fowell RR (1965) The identification of wild yeast colonies on lysine agar. J Appl Bacteriol 28:373–383
- González-Pombo P, Pérez G, Carrau F, Carrascosa A, Guisán J, Batista-Viera F, Brena B (2008) One-step purification and characterization of an intracellular β -glucosidase of *Metschnikowia pulcherrima*. Biotechnol Lett 30:1469–1475
- Hantula J, Dusabenyagasani M, Hamelin RC (1996) Random amplified microsatellites (RAMS)—a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur J For Pathol 26:159–166
- Jubany S, Tomasco I, Ponce de León I, Medina K, Carrau F, Arrambide N, Naya H, Gaggero C (2008) Toward a global database for the molecular typing of *Saccharomyces cerevisiae* strains. FEMS Yeast Res 8:472–484
- Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73:331–371
- Legras JL, Karst F (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. FEMS Microbiol Lett 221:249–255
- Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, Reeves M (2010) Yeast species associated with wine grapes in China. Int J Food Microbiol 138:85–90
- Lowe TM, Eddy SR (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. Nucleic Acids Res 25:955–964
- Martorell P, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Fernández-Espinar MT, Loureiro V, Querol A (2006) Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. Int J Food Microbiol 106:79–84
- McFarlane RJ, Whitehall SK (2009) tRNA genes in eukaryotic genome organization and reorganization. Cell Cycle 8:3102–3106
- Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A (2007) Development of a molecular method for the typing of *Brettanomyces bruxellensis* (*Dekkera bruxellensis*) at the strain level. J Appl Microbiol 102:555–562
- Neuvéglise C, Feldmann H, Bon E, Gaillardin C, Casaregola S (2002) Genomic evolution of the long terminal repeat retrotransposons in hemiascomycetous yeasts. Genome Res 12:930–943
- Pallmann CL, Brown JA, Olineka TL, Cocolin L, Mills DA, Bisson LF (2001) Use of WL medium to profile native flora fermentations. Am J Enol Vitic 52:198–203
- Pérez G, Fariña L, Barquet M, Boido E, Gaggero C, Dellacassa E, Carrau F (2011) A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains. Application of esculin glycerol agar (EGA) medium. World J Microbiol Biotechnol 27:47–55
- Rabosto X, Carrau M, Paz A, Boido E, Dellacassa E, Carrau F (2006) Grapes and vineyard soils as sources of microorganisms for biological control of *Botrytis cinerea*. Am J Enol Vitic 57:332–338
- Raspor P, Milek DM, Polanc J, Mozina SS, Cadez N (2006) Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. Int J Food Microbiol 109:97–102
- Reddy KR, Spadaro D, Gullino ML, Garibaldi A (2011) Potential of two *Metschnikowia pulcherrima* (yeast) strains for in vitro biodegradation of patulin. J Food Prot 74:154–156
- Rosi I, Vinella M, Domizio P (1994) Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. J Appl Bacteriol 77:519–527
- Spadaro D, Sabetta W, Acquadro A, Portis E, Garibaldi A, Gullino ML (2008) Use of AFLP for differentiation of *Metschnikowia pulcherrima* strains for postharvest disease biological control. Microbiol Res 163:523–530
- Spadaro D, Ciavarella A, Dianpeng Z, Garibaldi A, Gullino ML (2010) Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. Can J Microbiol 56:128–137
- Türkel S, Ener B (2009) Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. Z Naturforsch C 64:405–410
- Varela MA, González-Tizón A, Mariñas L, Martínez-Lage A (2007) Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus* mussels. Biochem Genet 45:565–578
- Vasserot Y, Christiansen H, Chemardin P, Arnaud A, Galzy P (1989) Purification and properties of a β -glucosidase of *Hanseniaspora vineae* Van der Walt and Tscheuschner with the view to its utilization in fruit aroma liberation. J Appl Bacteriol 66:271–279
- Welsh J, McClelland M (1991) Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. Nucleic Acids Res 19:861–866
- Wolfe AD (2005) ISSR techniques for evolutionary biology. Methods Enzymol 395:134–144
- Wolfe AD, Xiang QY, Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of Penstemon (*Scrophulariaceae*) using hypervariable intersimple sequence repeat (ISSR) bands. Mol Ecol 7:1107–1125
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176–183