
3.3. Caracterización estructural de los polimorfismos de tamaño del cromosoma I

3.3.1 Identificación de variantes polimórficas de tamaño del cromosoma I en DC5

La cepa DC5 presentó una acusada inestabilidad cariotípica en los cromosomas de mayor movilidad electroforética, que en una cepa de laboratorio corresponden al cromosoma I. La mayoría de clones de DC5 presentan dos variantes de tamaño del cromosoma I, a las que designaremos como variante L y S (menor y mayor movilidad electroforética). Mediante una batería de *Southern blots* se procedió a la identificación de dichos cromosomas. Se hibridó una membrana que contenía el cariotipo de la cepa DC5 y de la cepa w303d con dos sondas subteloméricas; la sonda *YAL066W* (ORF situado en el brazo izquierdo del cromosoma I) y la sonda *YAR053W* (ORF situado en el brazo derecho del cromosoma I). La hibridación con la sonda *YAL066W* dio como resultado dos bandas para DC5, correspondientes a las variantes L y S, y una sola banda para w303d (Figura 3-12). En cambio, la hibridación con la sonda *YAR053W* dio dos bandas para la cepa w303d y una señal muy débil, prácticamente inexistente en la cepa DC5. La aparición de dos bandas en la cepa de laboratorio se explica por el hecho de que existen regiones de alta homología entre los brazos derechos del cromosoma I y del cromosoma VIII. En cambio, la no aparición de las bandas correspondientes en la cepa DC5 indicaba bien la ausencia de *YAR053W* o bien una alteración considerable de su secuencia. Para profundizar en la caracterización del brazo derecho del cromosoma I de DC5 se realizó otro conjunto de hibridaciones con las sondas *YAR031W* y *YAR023C*. La sonda *YAR023C* hibridó con las dos variantes de tamaño del cromosoma I de DC5, mientras que la sonda *YAR031W* tan sólo lo hizo con la variante mayor, L (figura 3-12). Este conjunto de datos indica que las dos variantes de tamaño del cromosoma I presentes en la cepa DC5 difieren en la estructura de sus brazos derechos, y que estas diferencias afectan a las secuencias más distales. El resultado obtenido fue el mismo para todo un conjunto de diferentes clones de DC5 aislados tras 100 duplicaciones en YPS (figura 3-12).

3.3.2 Caracterización estructural de variantes polimórficas del cromosoma I de DC5

La caracterización de las alteraciones estructurales detectadas en las dos variantes polimórficas del cromosoma I (figura 3-13), se realizó por RFLP-IPFGE (*polimorfismo de fragmentos de restricción – inversor de campo*) de diferentes cromosomas I digeridos con *SmaI*, procedentes de diversos clones de DC5. Este gel fue transferido e hibridado con diferentes sondas (figura 3-13).

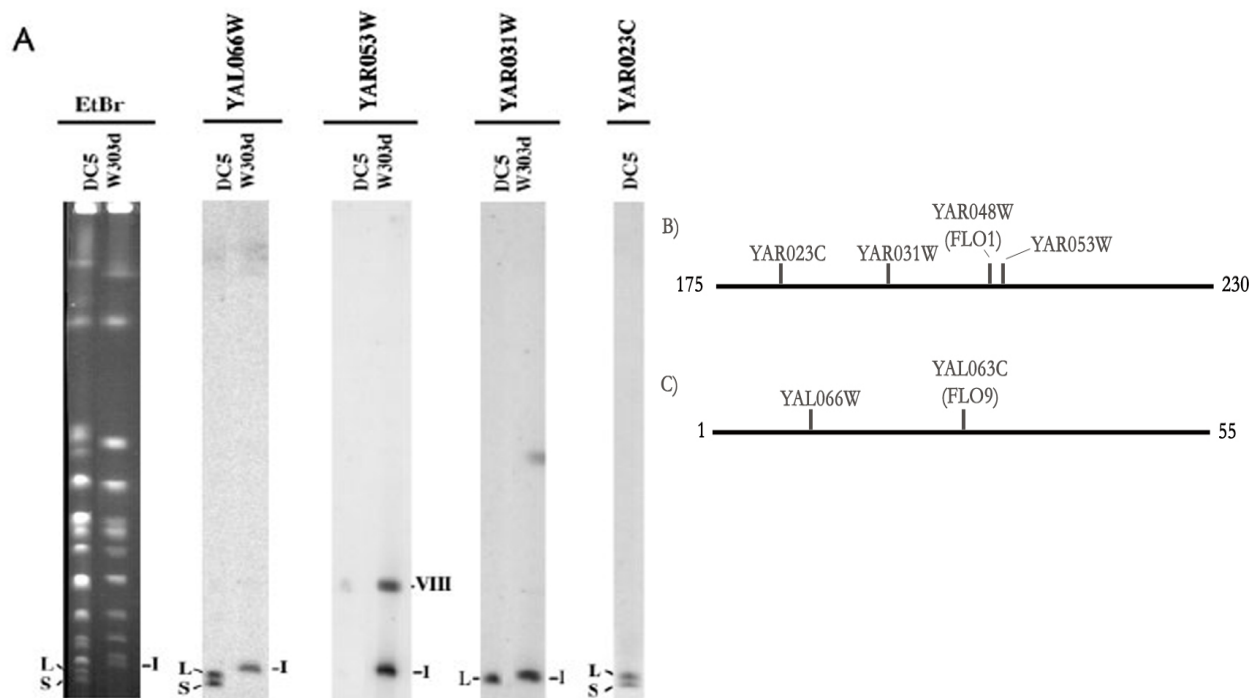


Figura 3-12. Caracterización de los brazos derecho e izquierdo del cromosoma I. (A) Cariotipo de DC5 y w303d y batería de *Southern*. La figura de la izquierda corresponde a un gel de BrEt, mientras que el resto son hibridaciones de este gel con las sondas indicadas en la parte superior. Los cromosomas aparecen designados como I (cromosoma I de w303d) L y S (variantes de tamaño grandes y pequeñas correspondientes al cromosoma I de la cepa DC5). (B y C) Esquema de la organización del brazo derecho (B) e izquierdo (C) del cromosoma I (230 Kb) de una cepa estándar (www.yeastgenome.org), en el que aparecen la situación de los ORFs empleados como sondas, así como los ORFs *YAR048W* (*FLO1*) y *YAL063C* (*FLO9*).

Según la secuencia de *S.cerevisiae* publicada para el cromosoma I (www.yeastgenome.org), al ser digerido con *SmaI* se obtienen fragmentos de 17679, 53501, 59232 y 99791 bp (tabla 3-5). Se realizó una electroforesis de IPFGE de diversos clones de la cepa DC5 digeridos con *SmaI* (ver materiales y métodos). Dicho gel fue transferido e hibridado con un conjunto de sondas que reconocían cada uno de los fragmentos esperados (figura 3-13). El mapa físico del cromosoma I para los anteriores clones de DC5 fue igual al esperado para una cepa de laboratorio, con la excepción del fragmento correspondiente al brazo derecho que resultó ser menor (unas 75 Kb frente a las 100 Kb esperadas) y las particularidades del brazo izquierdo (comentadas en apartado 3.3.2.2).

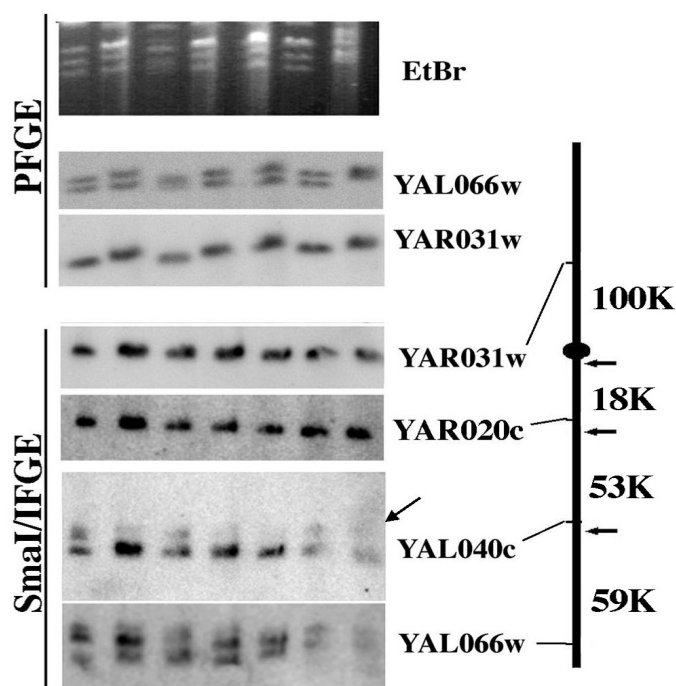


Figura 3-13. Caracterización estructural de variantes del cromosoma I. En la parte superior del gel aparece el PFGE de los clones analizados y la identificación por hibridación de las dos variantes del cromosoma I con las sondas subteloméricas YAL066W y YAR031W. En la parte inferior de la figura aparecen los diferentes fragmentos de los cromosomas I, procedentes de la digestión del DNA de los anteriores clones con *SmaI*. El diagrama de la derecha esquematiza los puntos de corte de *SmaI* y los fragmentos esperados. Obsérvese como el caso de la hibridación de YAL040C aparece marcada una hibridación cruzada que no es considerada.

Sondas	Tamaños calculados (Kb)	Tamaños esperados (bp)
YAR031W	75.2	99791
YAR015W		
YAR023C		
YAL020C	19,3	17679
YAL040C	57.5	53501
YAL066W	68-58 (v)	59232
	53-45 (v)	

(v) bandas con variación clonal.

Tabla 3-5. Tamaños esperados para la restricción con *SmaI* del cromosoma I de la cepa DC5 (columna derecha, obtenidos de www.yeastgenome.org), y tamaños inferidos a partir de la hidridación de la membrana obtenida de un gel de inversor de campo (IFGE, figura 3-13), en el que se realizó la electroforesis para los fragmentos de restricción del cromosoma I. Puede observarse las diferencias de tamaño calculadas y las esperadas.

3.3.2.1 Análisis del brazo derecho

El patrón de hibridación para las sondas *YAR031W*, *YAR023C* y *YAR015W* (todas ellas correspondientes al brazo derecho) mostró una banda única de 75.2 Kb para todos los clones de DC5 analizados (tabla 3-5, figura 3-13). Esto implica que no existen diferencias de tamaño entre las variantes S y L y que la pérdida de hibridación de *YAR031W* en las variantes S (figura 3-13) se debe bien a una divergencia importante de secuencia o bien a un proceso recombinatorio con pérdida como mínimo de este ORF, pero sin representar una alteración significativa respecto al tamaño original.

3.3.2.2 Análisis del brazo izquierdo

El patrón de hibridación obtenido con la sonda *YAL066W* mostró un polimorfismo de tamaño en el brazo izquierdo entre las variantes S y L. Las variantes de mayor movilidad electroforética (S) mostraron bandas variables de entre 53 y 45 Kb, dependiendo del clon, mientras que con las variantes de menor movilidad electroforética (L) se obtuvieron bandas, también polimórficas, de entre 58 y 68 Kb (figura 3-13). La banda esperada para el fragmento identificado con *YAL066W* es de 59 Kb. El hecho de que el resto de sondas utilizadas no detectaran diferencias de tamaño entre variantes S y L, ni entre bandas de diferente movilidad sugiere que la variación clonal del cromosoma I en DC5 se debe fundamentalmente a variaciones de tamaño en el brazo izquierdo (figura 3-13).

3.3.3 Análisis de los ORFs presentes en el cromosoma I de la cepa DC5

Para aislar físicamente variantes L y S pertenecientes al cromosoma I de DC5 se partió de una electroforesis de inversor de campo (IFGE) con diversos clones de DC5. Las bandas correspondientes se recortaron y purificaron para ser utilizadas como sondas de hibridación (figura 3-14). La hibridación de cada una de estas variantes por separado se realizó sobre un microfiltro de *nylon* con secuencias de DNA correspondientes a 14 ORFs del cromosoma I de una cepa estándar de laboratorio (véase materiales y métodos) (figura 3-15A y 3-15B). También se hibridó un cromosoma I control perteneciente a la cepa w303d aislado del mismo gel de IFGE. En el patrón de hibridación obtenido para el cromosoma I control, las 14 secuencias presentaron señal de hibridación, como corresponde a una cepa de laboratorio. Por el contrario, las variantes S y L de DC5 no dieron señal para los ORFs *YAR053W* y *YAR071W* (Figura 3-15 C); además, no se obtuvo señal de hibridación con el ORF *YAR031W* para ninguna de las variantes S (Figura 3-15C).

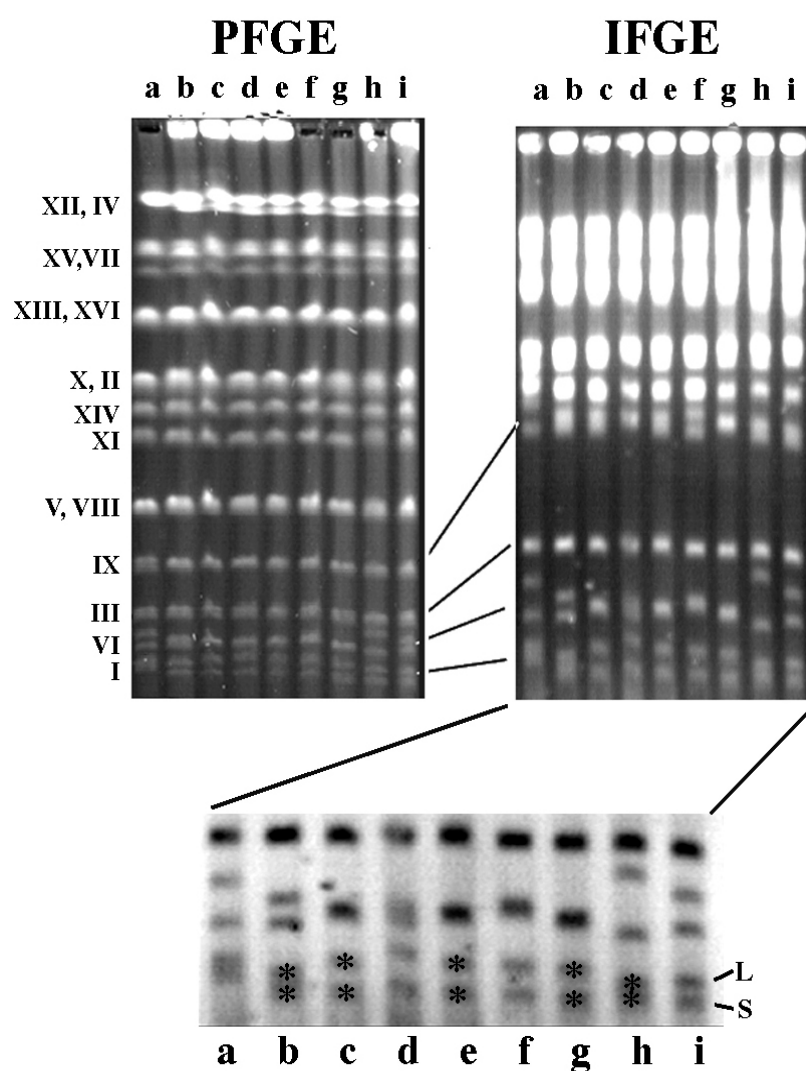


Figura 3-14. Aislamiento de las variantes de tamaño del cromosoma I de la cepa DC5. En la parte superior de la figura se muestra la correspondencia entre un gel de PFGE y un gel de IFGE. Las barras muestran la correspondencia de los cromosomas en cada caso. En la parte inferior se muestra una ampliación de la zona baja del gel de IFGE, en la que aparecen las variantes polimórficas del cromosoma I designadas como L y S (variantes grandes y pequeñas respectivamente). Las variantes polimórficas marcadas por un asterisco fueron las que se aislaron para su posterior análisis.

El resto de ORFs presentaron un patrón de intensidad semejante tanto entre las diferentes variantes L y S, como con respecto al DNA control (figura 3-15 D), lo que indicaba que estas secuencias se hallaban presentes en todas las variantes analizadas. Sin embargo el ORF *YAL066W* presentó un cierto grado de variabilidad tanto entre diferentes clones como entre variantes S y L de un mismo clon. Esta variabilidad podría ser un artefacto debido a la pequeña longitud de la secuencia de este ORF, que origina una señal de hibridación muy débil.

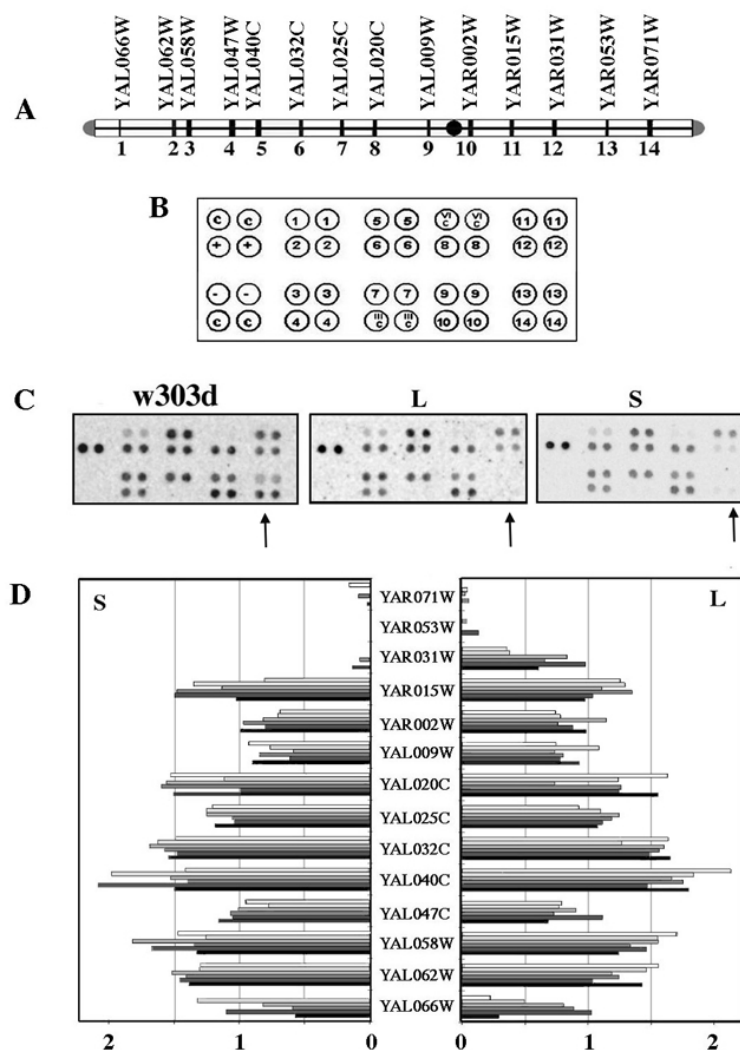


Figura 3-15. Análisis de la composición de ORFs de las diferentes variantes polimórficas del cromosoma I de la cepa DC5. (A) Muestra un esquema del cromosoma I estándar y la distribución de los ORFs utilizados en los chips de DNA. El centrómero se representa por un círculo negro. (B) Diagrama del minichip utilizado en esta caracterización. Los números del 1 al 14 corresponden a los ORFs impresos y esquematizados en el apartado A. Los puntos marcados con + y – corresponden a los controles positivo (DNA total de *S.cerevisiae*) y negativo (DNA de *E.coli*). Los puntos marcados por una c corresponden a puntos printados sin DNA. Complementariamente se incluyen controles de purificación de cromosomas adyacentes (puntos VI C y III C). (C) Muestra la hibridación de los minichips con un cromosoma I purificado de los geles de IFGE, para la cepa w303d, para un variante grande (L) y una pequeña (S) de la cepa DC5. Las imágenes corresponden a la obtenida del escáner *Phosphoimager*. (D) Resultados cuantitativos de la hibridación obtenida con seis pares de variantes L y S del cromosoma I de DC5 tal y como se mostraba en C. Las barras representan la cuantificación obtenida para cada uno de los clones y variantes estandarizadas por los valores obtenidos para w303d. Valores próximos a 1 son considerados como una dotación igual a la de la cepa de laboratorio, estando el rango de error experimental comprendido entre los valores 0.5-1.5. Las barras se corresponden (desde su base hacia arriba) con las variantes b,c,e,g,h marcadas en la figura 3-14.

3.3.4 Caracterización de los brazos cromosómicos de DC5

El brazo derecho del cromosoma I de la cepa DC5 presentaba pérdidas de ORFs (detectados por hibridación de PFGE y de chips de DNA) así como diferencias entre el patrón de hibridación de las variantes L y S. A pesar de que estas diferencias no contribuían a la variabilidad clonal observada, se realizó un análisis de las secuencias de DNA comprendidas en las zonas de diferente patrón de hibridación entre las variantes L y S, y las variantes L y w303d respectivamente.

3.3.4.1 Análisis de secuencia del brazo derecho del cromosoma I

3.3.4.1.1 Análisis de las secuencias entre *YAR023C* y *YAR031W*

Tomando como referencia la secuencia estándar depositada en el *SGD* (www.yeastgenome.org), solamente 7.6 Kb separan al ORF *YAR023C*, presente en las variantes L y S de DC5, del ORF *YAR031W*, que tan sólo se encuentra en las variantes alélicas L (Figura 3-12B). Dentro de estas 7.6 Kb encontramos secuencias de DNA repetidas tales como los Ty1 Δ y Ty3 δ y dos genes de tRNA (*SUP56* y *ts(AGA)A*). La presencia de estas secuencias sugieren que las variantes pequeñas del cromosoma I de dicha cepa DC5 pueden haberse originado por algún proceso recombinatorio o un truncamiento precisamente en esta zona analizada.

3.3.4.1.2 Análisis de las secuencias entre *YAR031W* y *YAR053W*

Entre el ORF *YAR031W* (presente en variantes DC5 y w303d) y el *YAR053W* (presente solamente en w303d) median unas 20 kb. Dentro de dicha secuencia se localiza el ORF *YAR048W*, que codifica para la lectina de membrana *FLO1* (Figura 3-16A). Este ORF incluye de 7 a 10 copias de una región repetida de 135 pb (algunas imperfectas) en su región codificante. Se caracterizaron estas regiones repetidas en distintas variantes del cromosoma I de DC5 mediante PCR, usando tres oligonucleótidos: FLO1UP, FLO1LO y FLO135 (Figura 3-16B).

Los oligonucleótidos FLO1UP y LO son complementarios a una zona del gen cuyo producto de amplificación comprende la región repetida de 135 pb, mientras que el oligonucleótido FLO135 es complementario al conjunto de repeticiones de 135 pb (Figura 3-16A). La amplificación con el par de oligonucleótidos FLO1UP y FLO1LO de DNA genómico de la cepa w303d dio como resultado la banda esperada de 2999 pb (Figura 3-15B). En cambio, estos mismos oligonucleótidos no dieron ningún producto de amplificación cuando se usó DNA genómico procedente de la cepa DC5, ni cuando se usaron como patrón DNAs correspondientes a dos variantes L del cromosoma I, extraído de un gel de

IFGE (Figura 3-16B). Cuando el ensayo de amplificación se realizó con los oligonucleótidos FLO1UP y FLO135 sobre los mismos DNA moldes, se obtuvieron productos de amplificación tanto para la cepa DC5 como para la cepa control w303d, aunque con distintos tamaños de bandas (Figura 3-16 B). En el caso de la cepa w303d se obtuvo una serie de bandas de tamaños comprendidos entre 380 pb y 1400 pb (Figura 3-16B). Esta colección de bandas se origina al primar el oligo FLO135 en cada una de las repeticiones de 135 pb; los tamaños observados son consistentes con la presencia de hasta unas 7 repeticiones de la unidad de 135 pb en el gen *FLO1* de w303d. En el caso de la cepa DC5 también se obtuvieron diversas bandas de amplificación, aunque en este caso la banda mayor mostró un tamaño de unas 735 pb, correspondiente a unas 4 repeticiones de la secuencia repetida de 135 pb (Figura 3-16B). La banda menor obtenida con DC5, y supuestamente originada por hibridación con la repetición N-terminal de *FLO1*, fue también menor que la correspondiente banda en w303d (280 bp frente 380 bp) (Figura 3-16B). Estos resultados sugieren que el ORF correspondiente a *FLO1* ha sufrido variaciones importantes de estructura en DC5, probablemente por recombinación o truncamiento.

3.3.4.2 Análisis de secuencia del brazo izquierdo del cromosoma I

En el brazo izquierdo del cromosoma I encontramos el gen *FLO9* perteneciente a la misma familia multigénica que *FLO1*, con el que presenta una alta homología de secuencia (Figura 3-17A). Este ORF dista unas 25 Kb del telómero izquierdo del cromosoma I y adyacente a este ORF se encuentra una secuencia δ (*YALWdelta1*). A unas 20 kb del telómero encontramos una secuencia de alta homología con *FLO9* (Figura 3-12C y 3-17A). Entre los ORFs propios de la zona terminal de este brazo izquierdo, se analizó el ORF *FLO9* (YAL063C). El análisis se realizó también por PCR con los oligonucleótidos FLO9UP y FLO9LO (Figura 3-17B). La amplificación del DNA genómico de la cepa w303d dio como resultado las dos bandas esperadas, de 2500 y unos 850 pb (Figura 3-17B). En cambio, la misma amplificación realizada con el DNA genómico de la cepa DC5 dio como resultado un patrón de bandas complejo, con tamaños aproximados de 1400, 1200 y 1000 pb, además de otras bandas de menor tamaño (Figura 3-17B). La amplificación de DNA de variantes L del cromosoma I de DC5 purificadas de geles IFGE dio como resultado una única banda de 1400 pb, mientras que cuando se utilizó DNA de variantes S no se obtuvo ningún producto de amplificación (Figura 3-17A y 3-17B). Estos polimorfismos detectados en el locus *FLO9* de la cepa DC5 indican una clara divergencia de secuencia y estructura con respecto a la secuencia publicada. Consideramos que las alteraciones estructurales detectadas en este locus, y en otros loci adyacentes, podrían ser responsables, al menos en parte, de la variabilidad de tamaño detectada en el brazo izquierdo del cromosoma I.

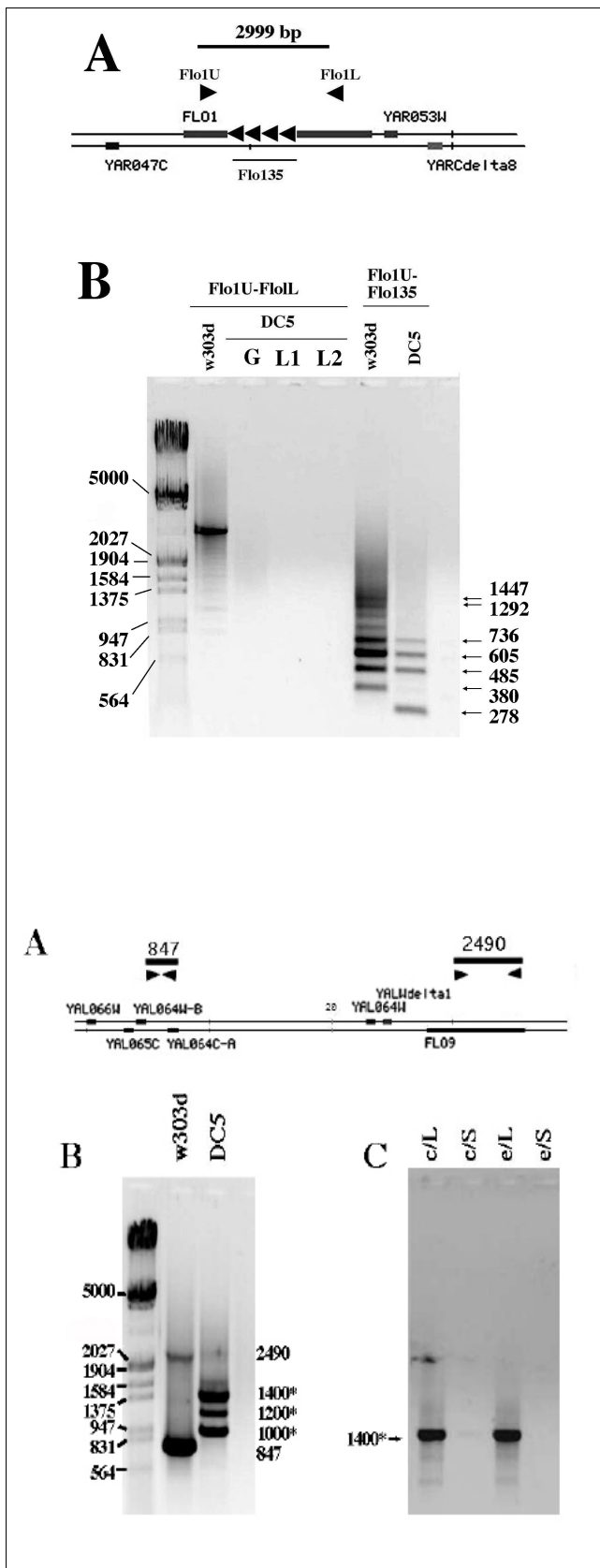


Figura 3-16. Mapeado fino del brazo derecho del cromosoma I de DC5. A) Mapa de la estructura del ORF *FLO1*, localizado entre el centrómero y el telómero derecho del cromosoma I. *FLO1* contiene de 7 a 10 repeticiones internas de 135 pb (exactas y aproximadas). Se muestran la posición de los cebadores empleados para el mapeado de dicho ORF (indicadas como triángulos negros) B) Productos de amplificación para la combinación de cebadores FLO1U+FLO1L y el DNA genómico de W303d y de DC5 y para el DNA de dos variantes grandes L1 y L2 del cromosoma I de DC5. Productos de amplificación para la combinación de cebadores Flo1U- Flo135 y el DNA genómico de w303d y DC5. El marcador empleado fue λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*.

Figura 3-17. Mapeo fino del brazo izquierdo del cromosoma I. A) Estructura de la región mapeada. Los cebadores de FLO9 aparecen esquematizados como triángulos negros, debajo de los tamaños de los productos amplificados. La región cromosómica esquematizada se encuentra entre el centrómero y el telómero izquierdo del cromosoma I. B) Productos de amplificación con los cebadores FLO9Up y Lo y los DNAs genómicos de w303d y DC5 respectivamente. Los tamaños inferidos de las bandas aparecen marcados por asteriscos. El marcador utilizado fue λ digerido con *EcoRI* y *HindIII*. C) Productos de amplificación obtenidos a partir de variantes grandes (L) y pequeñas (S) del cromosoma I de los clones c y e de la cepa DC5, con los mismos cebadores anteriores. El tamaño de la banda obtenida aparece marcada con un asterisco.

3.4 Genotipado molecular de cepas silvestres y enológicas de *S. cerevisiae*.

El genotipado molecular de cepas de *S. cerevisiae*, provenientes de nuestra propia colección y de otras (tabla 3-6), se realizó mediante la hibridación del DNA genómico de cada una de las cepas sobre macrochips de *nylon* que contienen 6144 ORFS impresos (ver material y métodos). Previamente al genotipado se realizó, para cada una de las cepas, un análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) con *Hinf*I de sus DNA mitocondriales (mtDNA) (Querol *et al.*, 1992; Nadal *et al.*, 1999) (figura 3-18).

Para el genotipado de las 17 cepas (tabla 3-6) se usaron dos membranas diferentes, a las que denominaremos A y B, realizándose hibridaciones cruzadas entre ellas como control (tabla 3-6). Los patrones de hibridación (figura 3-19) fueron cuantificados, normalizados y posteriormente analizados (materiales y métodos).

Cepas genotipadas	Origen	Genotipada en Chip
W303d	Yeast Stock Center, Berkeley, CA, USA	A
FY1679	Yeast Stock Center, Berkeley, CA, USA	A+B
DC50	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A+B
DC55C	Derivado mono esporídico DC50	B
DC52D	Derivado mono esporídico DC50	A
NC1	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A
NC2	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	B
NC3	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A
NC7	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	B
NC8	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A
NC9	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A
XC1.2	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	B
XC1.3	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	A
MC1.1	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	B
MC1.4	Aislado silvestre D.O Penedès-IBMB (CSIC)	B
P29	Aislado Penedès. INCAVI	A
T73	Aislado D.O Alicante- Lallemand	A
F1	Clon de cepa comercial IOC	B
Y9	Cepa comercial japonesa	B

Tabla 3-6. Listado de las cepas genotipadas, origen de éstas, y chip sobre el que se genotiparon. Las cepas w303d y FY1679 son las cepas de laboratorio empleadas como control. El resto de cepas son aislados naturales de la D.O Penedès, D.O Alicante y de cepas comerciales. En los genotipados se utilizaron dos chips (designados A y B). Las cepas designadas como A corresponden a cepas genotipadas con el chip A y análogamente para B. Las cepas A+B corresponden a cepas genotipadas con ambos chips.

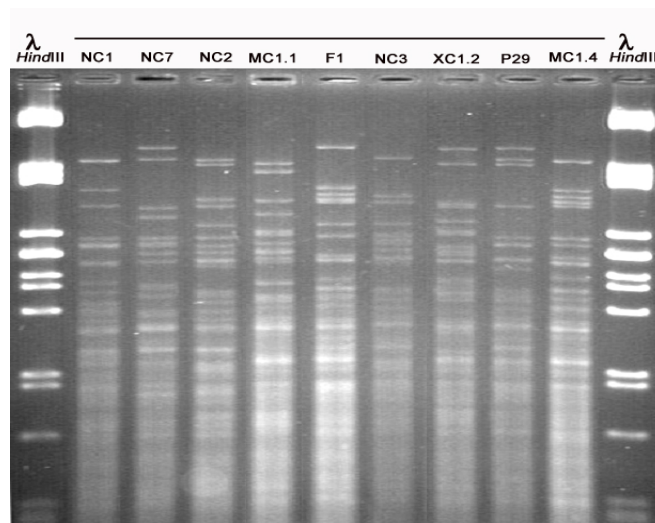


Figura 3-18. Patrón de restricción del DNA mitocondrial (RFLP de *mtDNA*) de algunas de las cepas genotipadas. El RFLP mostrado para cada una de las cepas corresponde al DNA total digerido con *HinfI*. El marcador de tamaño corresponde a DNA λ digerido con *HindIII*.

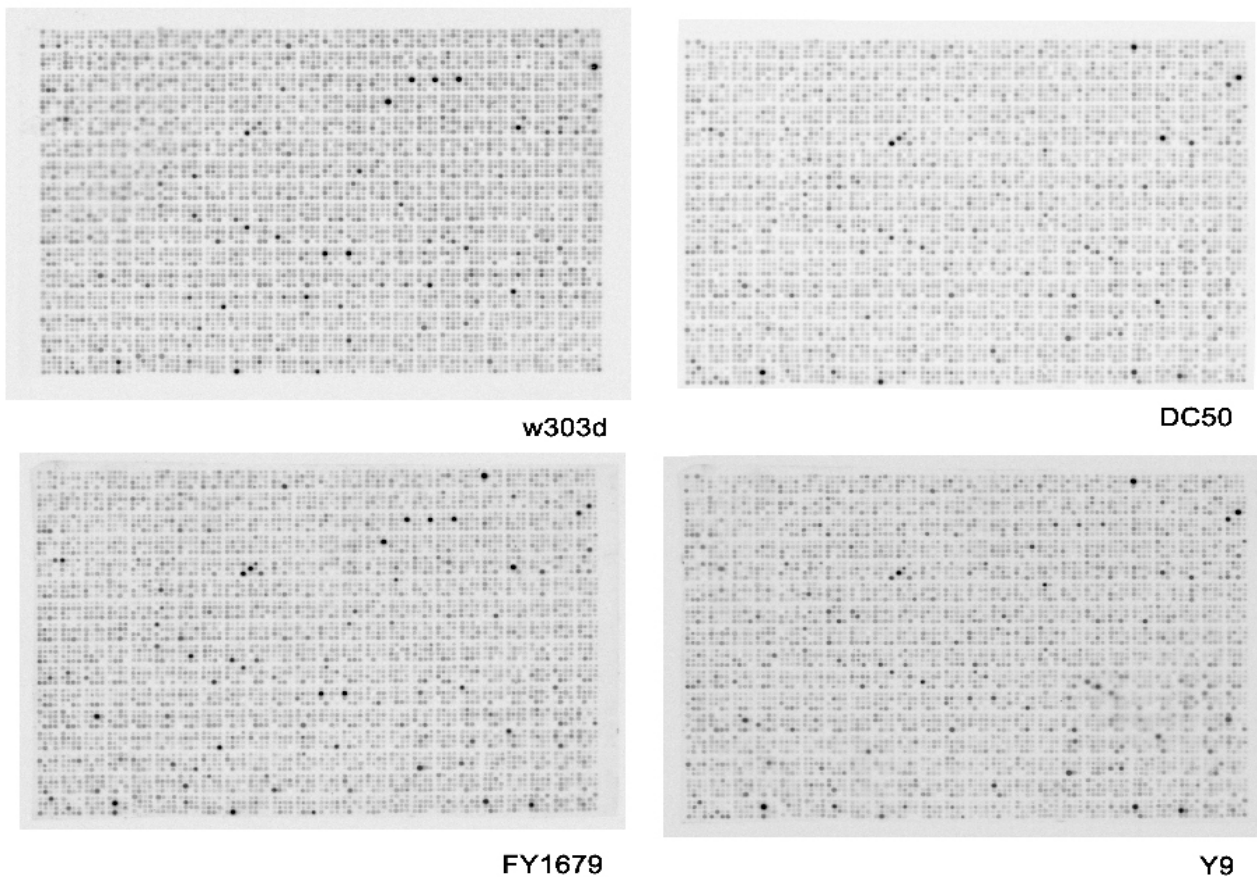


Figura 3-19. Genotipado de cepas. Se muestra el genotipado de cuatro cepas sobre los dos chips; la cepa w303d genotipada en el chip A, la cepa DC50 genotipada en este caso en el chip A; la cepa FY1679 genotipada en este caso en el chip B y la cepa Y9 genotipada en el chip B.

3.4.1 Análisis de variabilidad de familias multigénicas

El parámetro numérico escogido para cuantificar la variabilidad de los distintos ORFs entre las cepas analizadas fue el del coeficiente de variación (desviación típica partida por promedio). La distribución de estos datos se analizó por cuartiles, de menor (1er cuartil, Q1) a mayor (4º cuartil, Q4) variabilidad. La tabla 3-7 y la figura 3-20 muestran el número de ORFs pertenecientes a cada cuartil para diferentes familias multigénicas. Las familias cuyos genes se agruparon mayoritariamente en el Q1 presentaron una baja variabilidad entre cepas, mientras que aquellas con mayor proporción de genes agrupados en Q4 presentaron una mayor variabilidad (tabla 3-7, Figura 3-20). En función del número de ORFs presentes en cada uno de los cuatro grupos, se calculó un coeficiente de variabilidad para cada una de las familias multigénicas (tabla 3-7). Este coeficiente de variabilidad presentaba una distribución continua, con un rango comprendido entre el 30 % y casi el 80 % (tabla 3-7).

Familia	Nº de ORFs analizados	Índice de variabilidad						Variabilidad Porcentaje
		Grupo 1 0 – 10 10 – 25		Grupo 2 25 – 50	Grupo 3 50 – 75	Grupo 4 75 – 90 90 – 100		
HXT	18	0	0	0	7	6	5	78,19
FLO	5	0	0	0	2	3	0	74,5
ASP	5	0	0	1	2	0	2	70,5
CUP	5	0	1	0	1	1	2	69,5
RAD	22	0	0	6	8	4	4	65,23
FUN	24	0	0	9	5	7	3	63,02
PDR	8	0	1	3	1	0	3	59,06
PHO	14	0	1	4	6	0	3	58,75
NUP	16	0	3	3	5	2	3	57,03
CDC	45	1	7	11	15	7	4	53,33
ERG	14	0	3	4	3	2	2	52,14
PMT	7	0	1	2	3	1	0	51,07
COX	14	2	2	1	7	2	0	48,21
GAL	9	1	1	3	2	1	1	48,06
PET	17	1	2	6	5	3	0	47,94
PAU	7	1	1	2	1	1	1	47,5
ATP	13	0	2	6	3	2	0	46,35
SEC	34	3	6	10	10	4	1	44,56
PRP	20	2	4	7	2	3	2	44,25
RPL	52	6	7	18	13	6	2	44,04
MAL	5	0	2	1	1	0	1	44
URA	11	1	2	5	1	0	2	42,73
ACT	5	0	2	0	3	0	0	42,5
ADH	4	1	1	0	1	1	0	40,63
MRP	32	3	9	12	4	4	0	36,17
RPS	33	5	9	11	4	1	3	35,38
CCT	8	2	2	1	2	1	0	35
ILV	6	1	1	3	1	0	0	32,08
SRB	7	2	1	2	2	0	0	31,79

Tabla 3-7. Familias multigénicas analizadas. Se muestra el número de ORFs analizados para cada familia y la agrupación de éstos en cuatro grupos de variabilidad inferidos del cálculo de los cuartiles correspondientes. Complementariamente se calculó un coeficiente de variabilidad global (en %) para cada familia.

Familias multigénicas como la de transporte de azúcares (*HXT*), la de floculación (*FLO*), de actividad asparaginasa (*ASP*) o de resistencia a cobre (*CUP*), presentaron un alto grado de variabilidad entre las diferentes cepas analizadas (incluyendo las cepas de laboratorio). Contrariamente, familias como algunas relacionadas con biosíntesis de aminoácidos (*ILV*), cofactores de transcripción de la RNA Pol II (*SRB*), y constituyentes estructurales de los ribosomas (*RPS*), presentaron una baja variabilidad. Otra serie de familias presentan un grado de variabilidad intermedio como los citocromos oxidasa (nucleares y mitocondriales) *COX* (tabla 3-7).

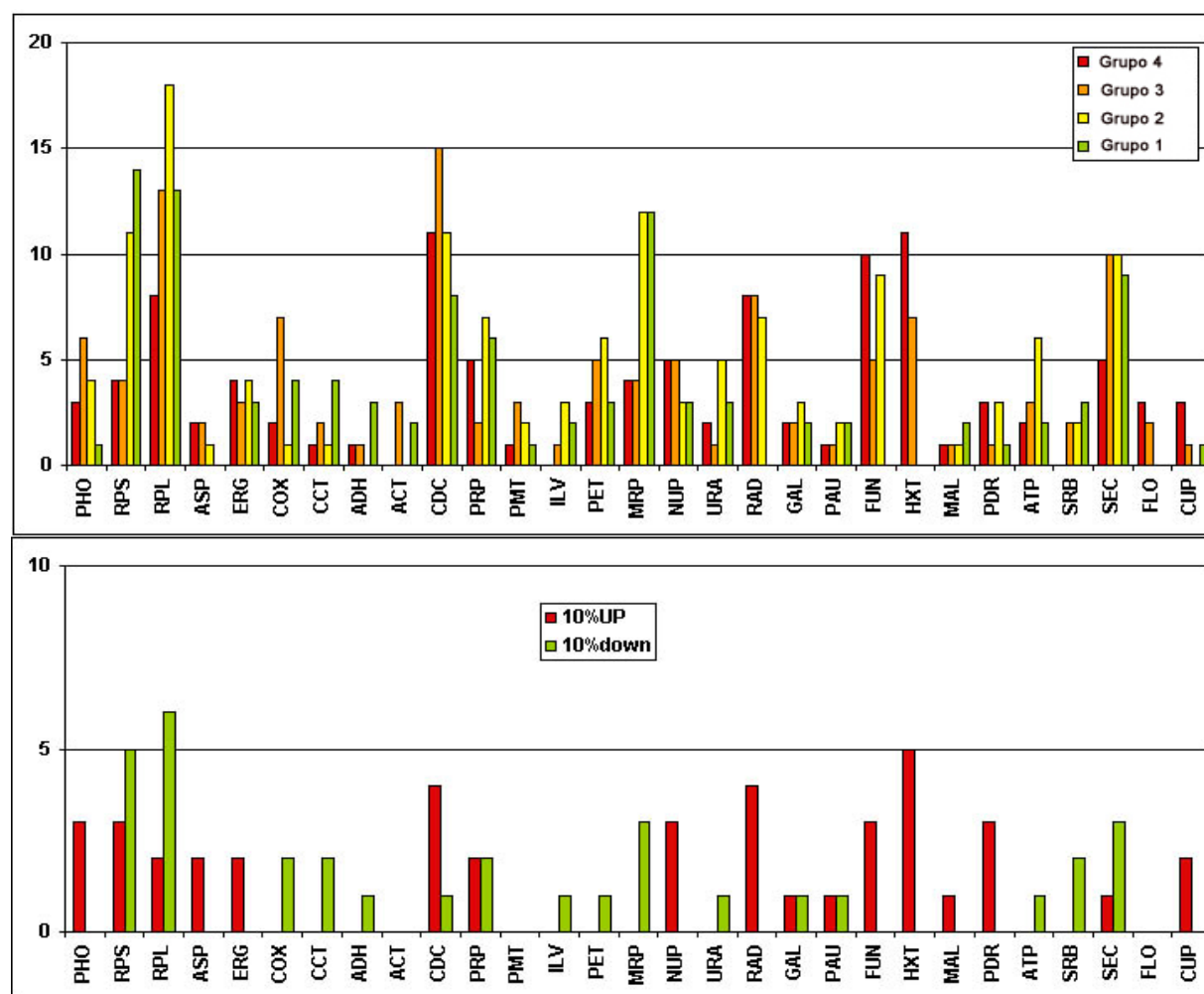


Figura 3-20. Grupos de variabilidad entre cepas para las familias multigénicas analizadas, derivados de calcular los cuartiles correspondientes. Los grupos muestran el número de ORFs de variabilidad baja (cuartil 1, Q1), media-baja (cuartil 2, Q2), media-alta (cuartil 3, Q3) y alta (cuartil 4, Q4) (ver tabla 3-7). La parte inferior de la figura muestra el número de ORFs de cada una de las familias multigénicas en dos grupos de variabilidad máxima (10 % UP) y mínima (10% DOWN), desprendidos del calcular los deciles correspondientes.

El coeficiente de variabilidad detectado para cada familia multigénica se puede considerar como el reflejo de la variación de los patrones de intensidad para cada uno de los ORFs y para cada una de las cepas. En el caso del gen *HXT1* perteneciente a la familia *HXT* presentó diferencias de hasta un 350 % entre las cepas w303d y DC50 (Figura 3-21). La familia *CUP* presentó diferencias muy manifiestas entre las cepas DC5, DC52D, DC55C, T73 y F1 y el resto de cepas analizadas, ya que las primeras presentaban bajas intensidades de hibridación para los ORFs *CUP1A* y *CUP1B* (Figura 3-21). La familia *FLO* presentó diferencias entre las cepas analizadas para dos ORFs; *FLO1* y *FLO8*, que corresponden al ORF fenotípicamente dominante y al regulador del proceso, respectivamente, dándose además la circunstancia de que los dos ORFs varían correlativamente en la mayoría de las cepas (Figura 3-21B). En el resto de ORFs de la familia *FLO* la variabilidad entre cepas fue mucho menor.

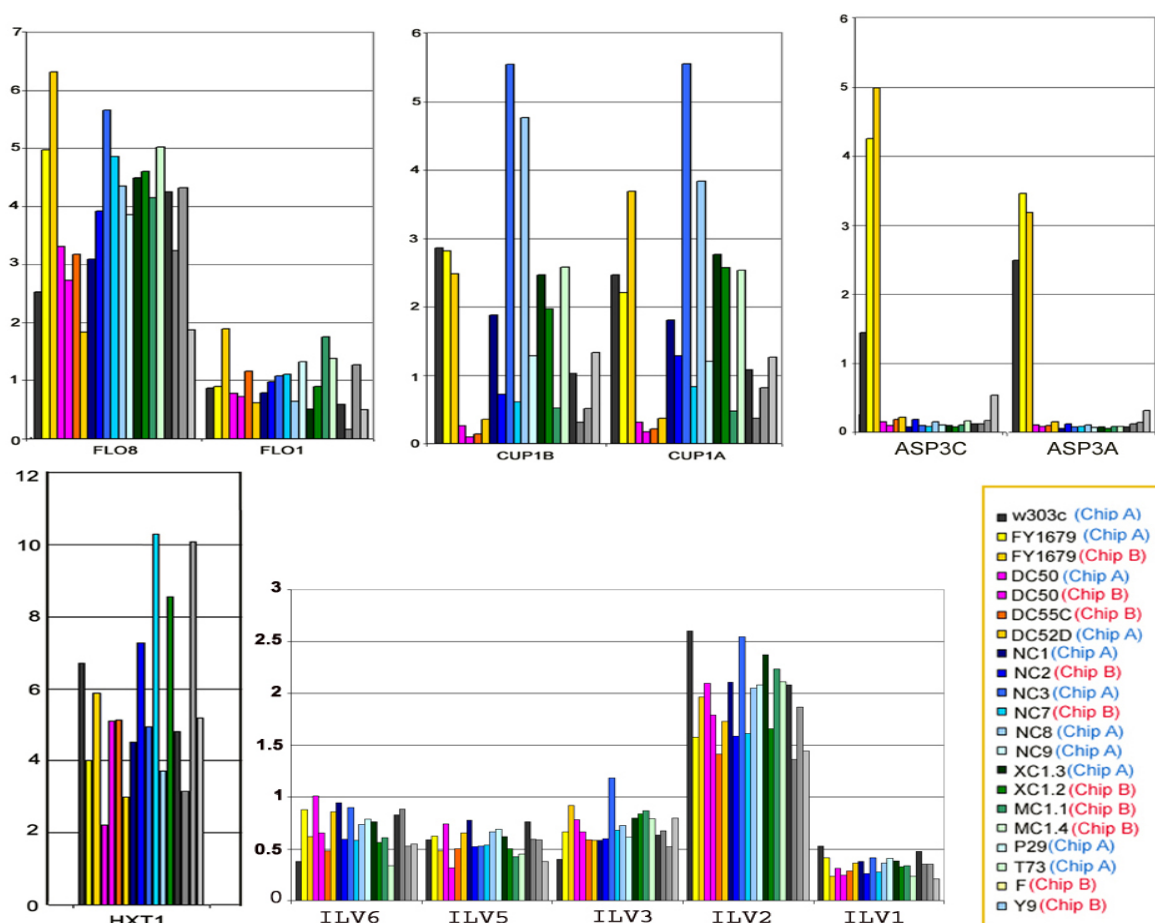


Figura 3-21. Patrones de intensidades para algunas familias multigénicas y las diferentes cepas analizadas. En cada una de las representaciones se muestra el patrón de intensidad de uno o varios ORFs para cada una de las cepas analizadas. Las familias multigénicas *FLO*, *CUP*, *ASP* y *HXT* corresponden a aquellas de alta variabilidad, mientras que la *ILV* es de baja variabilidad.

En el caso de la familia *ASP*, la variabilidad detectada fue debida a la inexistencia de esta secuencia en las cepas silvestres y/o enológicas, ya que sólo se detectó una hibridación significativa con las cepas de laboratorio w303d y FY1679 (Figura 3-21).

El coeficiente de variabilidad estaba correlacionado en un alto número de casos con la localización física de algunos de los ORFs de las diferentes familias multigénicas y con la función molecular. Familias de localización subtelo mérica (*FUN*, *FLO*) o de interacción con el medio (*HXT*) presentaban un grado de variabilidad mayor, mientras que algunas familias de localización no subtelo mérica y con funciones celulares tales como cofactores de transcripción (*SRB*), chaperonas (*CCT*) o genes relacionados con proteínas ribosomales (*RPS*, *MRP*) presentaban una variabilidad mucho menor entre cepas.

3.4.2 Análisis de las secuencias de transposones

Aún antes del análisis numérico, la simple inspección visual de los patrones de hibridación revelaron grandes diferencias entre la cepa vínica DC5 y la cepa de laboratorio w303d (Figura 3-22). Estas diferencias se debían, entre otros, a *spots* correspondientes a ORFs de Tys.

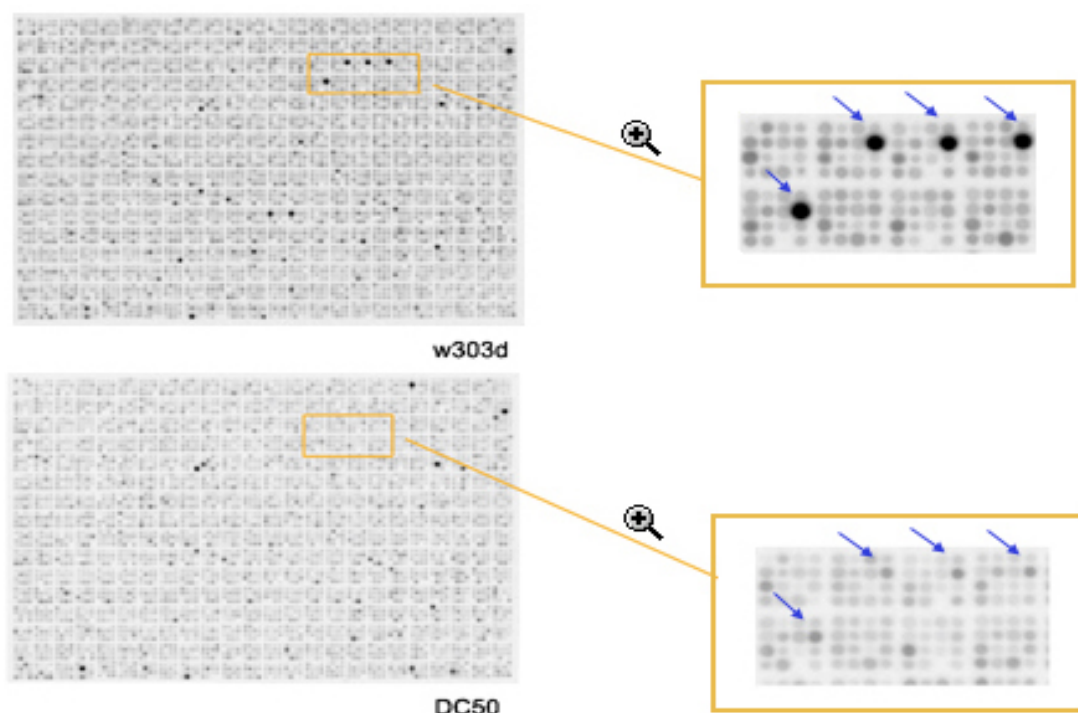


Figura 3-22. Diferencias macroscópicas en el genotipado de dos cepas; cepa w303d (sobre Chip A) y cepa DC50 (sobre Chip B). Puede apreciarse diferencias de intensidad en los puntos correspondientes a los Tys (indicados por flechas azules) previamente a la cuantificación.

El análisis de los ORFs de Tys, reveló que las mayores diferencias entre cepas correspondían a un conjunto de 12 ORFs localizados en los cromosomas XIII, X, V, III y I (listados en la tabla 3-8).

Las mayores diferencias detectadas correspondieron a dos grupos de cepas: un primer grupo con valores de hibridación altos, formado por las cepas de laboratorio w303d y FY1679, y un segundo grupo formado por el resto de cepas vínicas (figura 3-23), salvo para el ORF YCL020C en los que dichos valores de hibridación son mayores en un subgrupo de cepas vínicas que en el grupo de cepas de laboratorio. Dentro de este segundo grupo podían apreciarse diferencias significativas entre diversas cepas (Figura 3-23), independientemente de su origen geográfico o fenotipo característico. Cabe destacar que para cada una de las cepas analizadas existe una correlación entre los valores de intensidad de los ORFs analizados.

Cromosoma	ORF de Tys.	Codifica	Coordenadas
I	YAR010C	TyA	165866 - 164544
III	YCL020W	TyA	85101 - 86417
V	YER138C	TyB	449020 - 443752
V	YER160C	TyB	498119 - 492851
X	YJR026W	TyA	472454 - 473776
X	YJR027W	TyB	472454 - 477722
X	YJR028W	Ty ORF	478038 - 479360
X	YJR029W	TyB	478038 - 483306
XIII	YML040W	TyA	196628 - 197950
XIII	YML045W	TyB	184461 - 189729
XIII	YMR046C	TyA	362626 - 361304
XIII	YMR051C	TyA	378324 - 377002

Tabla 3-8. ORFs de Tys con mayores diferencias en el conjunto de cepas genotipadas. En esta tabla se muestra la localización cromosómica y coordenadas de dichos ORFs.

3.4.3 Análisis de la variabilidad del cromosoma I.

El análisis de los ORFs del cromosoma I mediante el cálculo del coeficiente de variación y agrupación en cuartiles, mostró como aproximadamente un 25% de los ORFs analizados presentaban una variabilidad alta, otro 25% una variabilidad baja y aproximadamente la mitad (50%) una variación media (grupo medio-bajo y medio-alto, tabla 3-9).

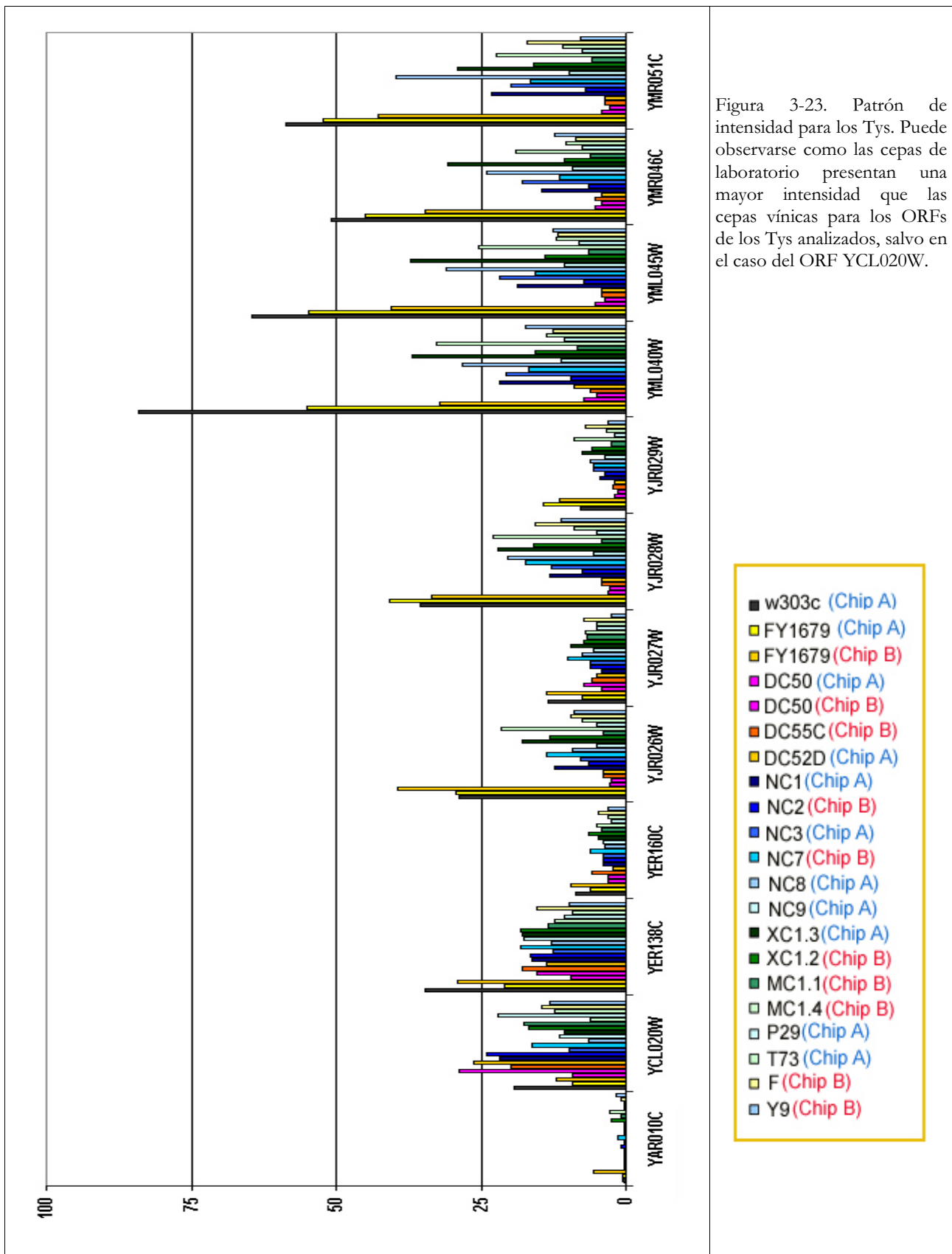
Dentro de los ORFs de mayor variabilidad encontramos el ORF *YAR010C*, que codifica para la proteína gag del Ty1-1 (Tabla 3-9, Figura 3-24). En el mismo grupo de variabilidad se encontraron otros ORFs como el *YAL025C*, el cual está relacionado con factores killer.

El análisis de las regiones en las que se encontraban algunos de los ORFs de variabilidad media y alta (grupos 3 y 4) comprenden secuencias δ , por lo que dichas secuencias podrían jugar un papel en la generación de dicha variabilidad. De los 8 elementos δ del cromosoma I encontramos que 3 se encuentran asociados a la zona de mayor variabilidad del cromosoma I, el *YAR010C*, mientras que de los 5 elementos restantes, 4 se asocian a zonas de variabilidad media alta y tan sólo uno a una zona de variabilidad media-baja.

Rango del coeficiente de variabilidad: 0.18 – 1.32					
Cálculo de cuartiles					
	Q1	Q2	Q3		
VALORES	0.28	0.37	0.46		
Grupos derivados de los cuartiles					
	Grupo Q1	Grupo Q2	Grupo Q3	Grupo Q4	Total
Variación	0-25%	25%-50%	50%-75%	75%-100%	
Nº DE ORFs	28	26	24	24	102

Tabla 3-9. Análisis de la variabilidad del cromosoma I entre cepas. La tabla muestra el rango de variabilidad (cada punto del rango se calculó como SD/X) en el conjunto de ORFs del cromosoma I para las cepas analizadas, el cálculo de los cuartiles para los 102 valores analizados y la agrupación de dichos valores en cuatro grupos de variabilidad (de menor Q1, a mayor Q4).

Las zonas subteloméricas presentaban grados de variabilidad mayores que las zonas centrales de los cromosomas I analizados, en los que la variabilidad detectada era media baja, en especial en la zona centromérica (salvo en el caso del ORF *YAR010C*) (figura 3-24). Los datos correspondientes a las zonas subteloméricas podrían verse subestimados en el caso de que algunas de las cepas analizadas tuviesen alteraciones estructurales del cromosoma I (como en el caso de la cepa DC5), o interferidos por la alta homología del brazo derecho del cromosoma I y del VIII. A pesar de estas consideraciones, podemos concluir que la variabilidad en el cromosoma I afecta a las zonas subteloméricas, mientras que las las regiones más centroméricas se muestran más uniformes.



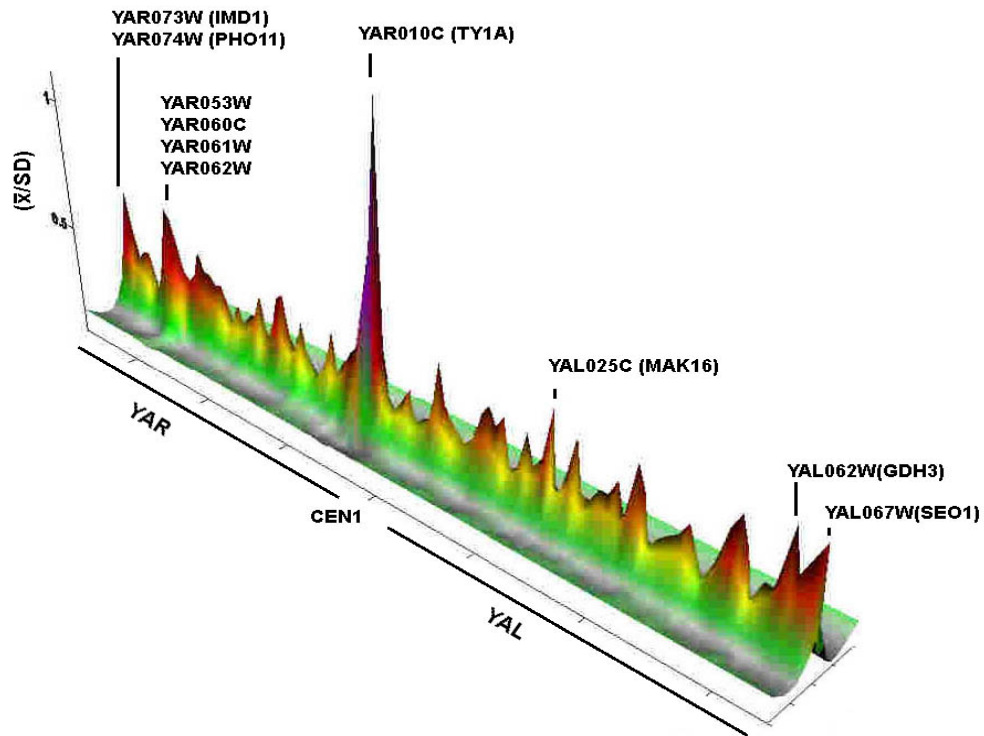


Figura 3-24. Variabilidad de los ORFs del cromosoma I en las cepas analizadas. A) En el eje Y aparecen todos los ORFs del cromosoma I (en el sentido que muestra el esquema). El eje X muestra un grado de variabilidad relativo para el conjunto de ORFs. B) En el eje Y aparece la variabilidad de cada uno de los ORFs del cromosoma I (\bar{X}/SD), mientras que el eje X muestra la disposición de los ORFs.

4 Discusión

4.1 Constitución genética de DC5

4.1.1 Constitución genética

La inestabilidad cariotípica es una característica muy común en cepas silvestres o industriales, pero que en cepas de laboratorio sólo ocurre en determinados mutantes o en condiciones muy especiales (Adams *et al.*, 1992; Longo y Vezinhet, 1993; Miklos *et al.*, 1997; Nadal *et al.*, 1999). Por tanto, nos decidimos abordar el estudio genético de este fenómeno, aprovechando las características de una cepa (DC5), aislada a partir de colecciones de cepas silvestres del Penedès descritas en un proyecto anterior.

El estudio de la constitución genética de DC5 reveló un genoma complejo y con varios niveles de diversidad endógena: un alto nivel de heterocigosis, múltiples polimorfismos cromosómicos y una probable aneuploidía. Estas características son usuales en cepas silvestres (Bakalinsky y Snow, 1990; Benítez y Codón, 1995; Gasent-Ramírez *et al.*, 1999; Querol *et al.*, 2003) o de uso industrial (vínicas, panaderas y cerveceras) y probablemente forman parte del mecanismo de variabilidad cariotípica, e influyen en las bajas tasas de esporulación y viabilidad de estas cepas (Benítez *et al.*, 1996; Pérez-Ortín *et al.*, 2002b; Querol *et al.*, 2003). Esta circunstancia ha complicado notablemente cualquier estudio genético de la mayoría de cepas silvestres e industriales; en nuestro caso fue necesaria una optimización de las condiciones de esporulación en cuanto al medio y las temperaturas empleadas (Bilinski y Casey, 1989; Codón *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 2000), para obtener un número suficiente de esporas para realizar un análisis de segregación genética del fenómeno de la inestabilidad cariotípica.

La presencia de polimorfismos cromosómicos como los detectados en el caso de DC5 es un factor ampliamente extendido entre las cepas salvajes y refleja las diferencias de tamaño entre cromosomas homólogos de la misma cepa (Bidenne *et al.*, 1992; Longo y Vezinhet, 1993; Benítez y Codón, 1995; Benítez *et al.*, 1996). Se ha sugerido que la presencia de polimorfismos cromosómicos podrían constituir por sí mismos una fuente de inestabilidad genética (Miklos *et al.*, 1997). Aunque esta hipótesis es plausible, cabe destacar que algunos de nuestros derivados monosporídicos (y por tanto esencialmente libres de polimorfismos cromosómicos en el clon inicial) siguen manteniendo altas tasas de inestabilidad cariotípica, con la aparición de nuevos polimorfismos. Por consiguiente, nuestros datos indican que la presencia de cromosomas homólogos de diferente tamaño es la consecuencia, y no el origen, de la inestabilidad cariotípica.

4.1.1.1 Análisis del contenido de DNA

El contenido de DNA en DC5 es muy cercano al que correspondería a una cepa diploide de *S. cerevisiae*, aunque alguna de sus características genéticas sugiere una cierta aneuploidía. Esta característica es similar a la situación descrita para otras cepas vínicas de similar contenido de DNA (Bakalinsky y Snow, 1990; Guijo *et al.*, 1997; Codón *et al.*, 1998). La aneuploidía ha sido propuesta como una ventaja selectiva al incrementar el número de copias de determinados genes que aumentan el vigor de cepas industriales (Benítez y Codón, 1995; Guijo *et al.*, 1997). La existencia de amplias variaciones en el contenido de DNA de cepas pertenecientes al mismo grupo (ej, cepas vínicas) indica que el contenido total de DNA de una cepa no reflejaría una adaptación al medio industrial (Benítez y Codón, 1995). El análisis del contenido de DNA de los derivados monosporídicos de la cepa DC5 mostró un número significativo de derivados con dotación haploide. La explicación más sencilla (aunque no única) consiste en suponer un cierto grado de heterozigosis para los genes relacionados con el homotalismo en DC5. Esta circunstancia es relativamente común en cepas vínicas, donde se han descrito cepas heterozigotas para el gen *HO* (Johnston *et al.*, 2000). La cepa DC5 podría ser, por tanto, heterocigota para este locus u otros loci (*MAT*, por ejemplo) relacionados con el homotalismo. De todos modos, la precisión del análisis genético que muestra frecuencias de segregación 1:1 queda limitada por la baja viabilidad esporídica mostrada (62 % de viabilidad).

4.1.1.2 Análisis de segregación fenotípica

El análisis de la segregación fenotípica para los marcadores ensayados en los derivados de DC5 corroboró la complejidad genética de dicha cepa y el alto grado de heterocigosis presente en ésta. La práctica imposibilidad de obtener tétradas completas, unido a posibles fenómenos de conversión génica durante la meiosis, dificultan enormemente el establecimiento de frecuencias de segregación correctas. La heterocigosis es muy común en cepas de levaduras vínicas (Mortimer *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2000; Gimren-Alcaniz y Matallana, 2001). En nuestro caso los cuatro fenotipos ensayados son heterocigóticos para la cepa DC5.

4.2 Análisis de la inestabilidad cariotípica

4.2.1 Inestabilidad cariotípica de DC5 y derivados.

Existen numerosas descripciones de cepas silvestres e industriales con un alto grado de

inestabilidad cariotípica (Bidenne *et al.* 1992; Zolan MA, 1995), tanto en crecimiento mitótico (Bidenne *et al.*, 1992; Longo y Venzinhet, 1993; Ibeas y Jiménez, 1996; Miklos *et al.*, 1997) como en meiosis (Codon *et al.*, 1997; Loidl y Nairz, 1997; Gasent-Ramírez *et al.*, 1999). Sin embargo, bajo nuestro conocimiento, el nuestro es el primer estudio de segregación genética de la inestabilidad cariotípica.

El análisis de la segregación de la inestabilidad a partir de DC5 mostró como dicho fenotipo se comporta como un carácter dominante que depende de muy pocos elementos genéticos. Una proporción importante (9/14) de derivados monoesporídicos (F1) aparentemente han perdido la inestabilidad cariotípica de manera irreversible, ya que todos los derivados monoesporídicos de estas cepas estables (F2) fueron también cariotípicamente estables. Aunque la baja tasa de viabilidad de los derivados F1 dificulta extraer conclusiones definitivas, nuestros datos de segregación son difícilmente compatibles con modelos pleiotrópicos y/o multigénicos de herencia de la inestabilidad cariotípica.

Otro aspecto interesante de nuestro estudio de segregación es la estabilidad cromosómica observada en algunos de los derivados F2 procedentes de derivados F1 inestables. Los derivados F1 son monoesporídicos, por lo que en principio tendrían que ser completamente homocigóticos. Estos datos se podrían explicar según tres modelos:

- dependencia de cromosomas aneuploides presentes en la cepa DC5, que fuesen segregados a un número limitado de derivados meióticos, los cuales fuesen por tanto también inestables o,
- dependencia de pocos genes, presentes en heterocigosis en DC5 (como por ejemplo de dos genes AB presentes en forma heterocigota ABab, y cualquiera de las formas dominantes de ambos genes pudiese ocasionar inestabilidad cariotípica).
- dependencia de un elemento extracromosómico, de carácter dominante, de segregación no mendeliana y con posible pérdida del elemento en crecimiento mitótico.

Si la inestabilidad dependiese de la primera hipótesis, implicaría que el número de cromosomas implicados debería de ser como mínimo de dos (por ejemplo dos cromosomas trisómicos) y que la presencia de cualquiera de ambas trisomías confriese inestabilidad cariotípica al derivado en cuestión. La explicación sería análoga a la explicada a continuación para la segunda hipótesis.

Si el fenómeno de la inestabilidad dependiese de la segunda hipótesis, implicaría que el 25 % de los derivados F1 fuesen estables genéticamente. Experimentalmente se obtuvo que el porcentaje de derivados estables era del 64 % (9/14 derivados lo eran) aunque si se incluyen las esporas no germinadas o no viables, esta proporción era de 9/36, es decir, justamente un 25 %, por lo que la inestabilidad cariotípica podría quizás ser entendida en su máximo grado de expresión como una forma letal y no viable para la célula, aunque esto introduciría una mayor complejidad en el modelo de la

segregación de la inestabilidad en los derivados F2.

Si el fenómeno dependiese de la tercera hipótesis, estaría a su vez en consonancia con los resultados obtenidos. Si este elemento extracromosómico pudiese perderse en crecimiento mitótico, podría explicar el hecho de que en cada uno de nuestros ensayos de inestabilidad, algunos clones de una determinada cepa inestable poseyeron un alto número de reordenaciones cromosómicas y otros no.

Cualquiera de los tres modelos de segregación descritos estaría en consonancia con la fijación del fenotipo estable y con la no reversión del fenotipo inestable. También explicarían la correlación existente entre inestabilidad genética mitótica y meiótica, es decir, con el hecho de que las cepas estables durante crecimiento vegetativo también resultaron estables en meiosis.

4.2.1.1 Inestabilidad del cromosoma XII

La aparición de múltiples variantes polimórficas del cromosoma XII durante el crecimiento vegetativo es muy usual en cepas de *Saccharomyces* de diferentes orígenes. Este fenómeno se ha relacionado con amplificaciones o pérdida de número de copias de los *clusters* de rDNA presentes en este cromosoma (Pasero *et al.*, 1993; Chimdamporn *et al.*, 1993; Rustchenko *et al.*, 1993). Este modelo es muy probablemente aplicable a la cepa DC5 y a sus derivados, donde el tamaño de las diferentes variantes del cromosoma XII se corresponden con el tamaño de los *clústers* de rDNA. Este modelo es, posiblemente muy general, ya que se ha aplicado no sólo para explicar las variaciones de tamaño del cromosoma XII de *S.cerevisiae*, sino también para las del cromosoma III de *S.pombe*, que también incluye los clústers de rDNA (Pasero *et al.*, 1993).

Nuestros datos indican que la variabilidad clonal del cromosoma XII en la cepa DC5 y sus derivados es genéticamente independiente de la inestabilidad cromosómica del resto de cromosomas. Estos resultados están en consonancia con los encontrados por Chindaporn y colaboradores, que caracterizando los dos cromosomas XII de una cepa diploide (X2180-2D) observaron como se producía una variación clonal de tamaño de dicho cromosoma mientras que el resto de cromosomas permanecía sin cambios de tamaño.

En *S.cerevisiae* las reorganizaciones del cromosoma XII no están ligadas a ninguna manifestación fenotípica aparente. En cambio, las reorganizaciones de los *clústers* de rDNA sí están asociadas a cambios fenotípicos en otras especies de levaduras, como *Candida albicans*. En esta levadura patógena, los cambios en los tamaños de los *clústers* de rDNA están ligados a reordenaciones en el resto de cromosomas y a cambios en la morfología de la colonia (Asakura *et al.*, 1991). Estos eventos simultáneos se relacionan con la alteración de la capacidad patogénica de dichas cepas (Rustchemko *et*

al. 1993; Soll, 1997; Pérez-Martín *et al.*, 1999).

4.2.2 Mecanismo de la inestabilidad cariotípica

El modelo más común para explicar la inestabilidad cariotípica de las cepas salvajes e industriales, tanto en meiosis como en mitosis, implica procesos de recombinación desigual entre secuencias homólogas dispersas por todo el genoma, tales como los elementos Ty, los elementos δ o los elementos subteloméricos Y' (Benítez y Codón, 1995; Codón *et al.*, 1997; Rachidi *et al.*, 1999; Neuveglise *et al.*, 2000). Estas secuencias son comunes a la práctica totalidad de cepas de *S.cerevisiae*, tanto de laboratorio como salvajes o industriales, independientemente de su grado de estabilidad cariotípica (Gasent- Ramírez *et al.*, 1999). Por tanto, debe de haber algún condicionante genético adicional que confiera inestabilidad cariotípica a una cepa determinada.

Una predicción directa de esta hipótesis es que el proceso debe requerir la función del gen *RAD52*, ya que este gen es clave para cualquier proceso de recombinación homóloga, igual o desigual, alélica o ectópica (Haber, 1999). Es por esta razón que abordamos la construcción y ensayo de inestabilidad de mutantes *DC5 Δ rad52*. Los resultados obtenidos con estos mutantes pusieron de manifiesto que la inestabilidad cariotípica durante el crecimiento vegetativo era sólo parcialmente dependiente de *RAD52*, ya que la cepa *DC5 Δ rad52* presentó una tasa de reorganización unas cinco veces mayor que la de las cepas consideradas como cariotípicamente estables, aunque significativamente menor que la cepa parental DC5.

Aunque los efectos de la delección de *RAD52* en la tasa de inestabilidad cariotípica de DC5 fueran hipotéticamente poco importantes desde un punto de vista cuantitativo, si encontramos importantes efectos cualitativos. El efecto cualitativo más importante encontrado fue la virtual supresión de la recombinación entre las secuencias subteloméricas Y'. Estas secuencias son de longitud muy variable, y ha sido descrita como partícipes en la generación de polimorfismos cromosómicos, tanto en mitosis como en meiosis (Benítez, 1995; Codón *et al.*, 1997; Rachidi *et al.*, 1999; Neuveglise *et al.*, 2000). Por tanto, del conjunto de resultados obtenidos hemos formulado la hipótesis de que en el proceso de inestabilidad cariotípica intervendrían, al menos, tres tipos de mecanismos diferentes:

- Un mecanismo dependiente de *RAD52*, que originaría parte de la inestabilidad descrita por procesos de recombinación homóloga; este mecanismo sería absolutamente responsable de la variabilidad en los tamaños de las secuencias Y' y probablemente entre otros procesos similares.
- Un mecanismo independiente de *RAD52* funcional, que originaría una importante parte de la inestabilidad cariotípica observada. No podemos excluir que este mecanismo sea sólo

cuantitativamente importante en ausencia de *RAD52*.

–Un tercer mecanismo que origina la inestabilidad del cromosoma XII, por reorganizaciones de los *clusters* de rDNA, y que sería genéticamente independiente de la del resto del genoma. De hecho, se ha descrito que las reordenaciones dentro de los *clusters* de rDNA son independientes de *RAD52* en *S. cerevisiae* (Ozenberger *et al.*, 1991).

4.2.3 Remediación genética de la inestabilidad cariotípica

Desde una perspectiva industrial, la razón última del estudio de los determinantes genéticos de la inestabilidad cromosómica es desarrollar mecanismos para remediarla o, como mínimo, para identificar cepas que sean lo más estables posible.

La estabilidad cariotípica de una cepa es un factor muy importante, puesto que una cepa inestable puede comprometer la reproducibilidad de las características del producto final en un proceso industrial (Gasent-Ramírez *et al.*, 1999). Bajo este aspecto, nos propusimos ensayar tanto algunos de los derivados monoesporídicos estables como los mutantes *DC5Δrad52* para procesos enológicos. La estrategia empleada para la disrupción secuencial de los alelos *RAD52* de DC5, con el requerimiento de una mayor homología para la disrupción del segundo alelo, puede ser empleada en general como un método de disrupción en cepas salvajes e industriales. Tanto el derivado monoesporídico de DC5 (DC52B) como los mutantes *DC5Δrad52* mostraron una eficiencia de fermentación igual a la presentada por la cepa parental DC5, con una alta estabilidad cariotípica o con una tasa de inestabilidad inferior a la cepa DC5, respectivamente. Se ha descrito en alguna cepa que algunos sus derivados monoesporídicos presentan cualidades industriales inferiores a su cepa parental (Gimren-Alcañiz y Matallana, 2001), por lo que el método de obtención de cepas estables mediante programas de esporulación implicaría en determinados casos un posterior programa de *screening*. No obstante nuestros resultados indican que ambos tipos de estrategia podrían aplicarse, de forma general, como método de reducción de la inestabilidad cariotípica de una cepa sin afectar a su *fitness* industrial. El método a aplicar preferentemente sería el de la obtención de derivados monoesporídicos estables por un programa de esporulación, mientras que la disrupción alélica sería indicada en cepas difícilmente esporulables o con derivados monoesporídicos que a pesar de su estabilidad, presenten una pérdida de su *fitness* industrial.

4.3 Caracterización estructural del cromosoma I de la cepa DC5

El cromosoma I de DC5 presentó una alta variabilidad clonal de tamaño en prácticamente todos los ensayos de inestabilidad cariotípica efectuados. Esta circunstancia, añadida a su facilidad de identificación y aislamiento, nos llevó a proceder al análisis estructural de algunas de sus variantes de tamaño. Nuestros datos indican que todas las variantes cromosómicas analizadas presentaron una alta similitud con la secuencia publicada, conservando un número idéntico de secuencias de restricción para *SmaI* (www.yeastgenome.org). Todas las variantes analizadas conservaron el cuerpo central del cromosoma, unas 150 Kb que comprenden las secuencias desde el ORFs *YAL062W* hasta el *YAR023C*. Según nuestras observaciones, la conservación del cuerpo central se debe que los procesos recombinatorios en el cromosoma I se producen esencialmente en las zonas subteloméricas, concretamente a unas 20 a 30 Kb de cada telómero. En estas las subteloméricas se localizan genes pertenecientes a familias multigénicas dispersas por el genoma, tales como las familias *FLO*, *PAU* (presentes en el cromosoma I) o *COS* (no presentes en el cromosoma I), junto con algunos ORFs incompletos y/o truncados llamados *disabled* ORFs (André 1995; Goffeau *et al.*, 1996; Delneri *et al.*, 2000). Al estar presentes en diferentes cromosomas, este conjunto de secuencias son candidatas a actuar como substratos en procesos de recombinación homóloga ectópica, originando así inestabilidad cariotípica y dando pie a la aparición de polimorfismos cromosómicos.

Complementariamente, los ORFs *FLO1/FLO9* presentes en los dos extremos del cromosoma I, presentan repeticiones internas que también podrían ser substratos de recombinación homóloga ectópica. Proponemos que este mecanismo puede ser responsable de la variación mitótica observada entre las diferentes variantes de tamaño del cromosoma I para la cepa DC5. El origen de la generación de las variantes pequeñas del cromosoma I (variantes S) probablemente fue un proceso recombinatorio entre elementos Υ y δ , presentes entre los ORFs *YAR023C* y *YAR031W*. Existen descripciones de procesos de recombinación meiótica para dichas secuencias entre los cromosomas I y III en diversas cepas (Camasses, 1996; Casaregola *et al.*, 1998; Neuveglise *et al.*, 2000). Por los datos que tenemos, proponemos que han ocurrido una translocación y no una truncación.

4.4 Genotipado de cepas

Los datos obtenidos de la hibridización de diferentes cepas vínicas en *macroarrays*, conteniendo todos los ORFs de *S.cerevisiae*, no mostraron importantes divergencias de secuencia de estas cepas con respecto a una cepa estándar de laboratorio, ya que se obtuvo señal para casi todos los ORFs printados.

Este resultado es análogo al obtenido para el genotipado de otras cepas vínicas (Hauser *et al.*, 2001).

Las diferencias encontradas tras el análisis de diferentes familias multigénicas, entre las diferentes cepas vínicas, se correspondieron con ORFs de interacción con el medio y/o de localización subtelomérica. Esta variabilidad refuerza la hipótesis de que las cepas salvajes presentan un cierto grado de plasticidad genética como mecanismo de adaptación al medio industrial (Pretorius, 2000), aunque en algunos de los casos (como el de la cepa DC5 y posiblemente otros) esta variabilidad podría ser un indicador, o tal vez un promotor, de inestabilidad cariotípica. Los ORFs pertenecientes a familias multigénicas relacionadas con funciones celulares esenciales presentaron, en general, una variabilidad muy baja o nula.

El análisis de variabilidad de los Tys demostró una baja presencia de TY1 en las cepas vínicas salvajes e industriales, confirmando los resultados obtenidos (con otras metodologías o con esta propia) anteriormente para un amplio abanico de cepas vínicas (Codón *et al.*, 1998; Hauser *et al.*, 2001).

Los ORFs de resistencia al cobre *CUP1-1* y *CUP1-2* mostraron un alto grado de variabilidad entre cepas. En algunas de las cepas genotipadas el patrón de intensidad fue bajo, hecho descrito para la cepa vínica T73 en un anterior genotipado (Hauser *et al.*, 2001). Contrariamente las cepas de laboratorio mostraron un patrón de intensidad alto, quizás relacionado con el origen silvestre de éstas.

El análisis pormenorizado de la variabilidad relativa a lo largo del cromosoma I reveló diferencias en uno de los ORF de Ty, así como en las zonas subteloméricas. Complementariamente se detectó una variabilidad en algunas regiones que contenían secuencias δ , sugiriendo que dichas secuencias pudieron tener un papel esencial en la generación de la variabilidad detectada en estas zonas. La participación de las secuencias repetidas en el genoma en el proceso de inestabilidad cariotípica ha sido propuesta en un amplio número de trabajos (Benítez *et al.*, 1995; Codon *et al.*, 1997; Rachidi *et al.*, 1999).

Las diferencias detectadas ponen de manifiesto la necesidad de cariotipar cepas de origen silvestre o industrial como paso previo a la realización de estudios de expresión con este tipo de cepas. Esta conclusión está en consonancia con otros autores que concluyen que la sobreexpresión de algunos genes se debe a su número de copias en el genoma, y que este fenómeno está relacionado con las prestaciones industriales de las cepas (Cavaliere *et al.*, 2000, Infante *et al.*, 2003). Además debe de tenerse en cuenta que algunos ORFs que se encuentran en alto número de copias en cepas vínicas, poseen pocas copias o son inexistentes en cepas de laboratorio, tales como los *SUC*, *MEL*, *MAL* (Naumov *et al.*, 1996b; Naumova *et al.*, 1996; Hauser *et al.*, 2001).

Por último y debido a la variabilidad existente en determinados ORFs y/o regiones cromosómicas, el genotipado debería de emplearse como paso previo a cualquier programa de mejora genética que implique clonaje de genes.

4.5 Consideraciones finales: ventaja evolutiva de la inestabilidad cariotípica

La inestabilidad cariotípica puede poseer una cierta ventaja evolutiva en cepas que poseen un ciclo de vida esencialmente asexual. Sin embargo, una tasa excesiva de reordenaciones cromosómicas puede representar un peligro de frecuentes deleciones substanciales del genoma o una pobre viabilidad esporádica. Las tasas encontradas en las cepas estudiadas (del orden de 10^{-2} a 10^{-4} cambios/clon/generación) sugieren que dicha inestabilidad cariotípica puede suponer que dicho mecanismo sea más eficiente que el de mutación espontánea (estimada en 10^{-5} por generación para cada alelo) en cuanto a la introducción de variabilidad genética.

Aunque la mayoría de procesos de reorganización genética sean probablemente neutrales o incluso deletéreos (Gasent-Ramírez *et al.*, 1999), en algunos casos pueden suponer una cierta ventaja selectiva para el clon en cuestión, como en el caso del derivado de DC5-6C o los descritos en diferentes estudios (Adams *et al.*, 1992; , Pérez-Ortín *et al.*, 2002b). Si esta inestabilidad se produce en las zonas subteloméricas, dejando el cuerpo central de los cromosomas intacto como en el caso del cromosoma I, la probabilidad de que el proceso sea perjudicial disminuye notablemente, dada la acumulación de miembros de familias multigénicas presentes en estas regiones. Este proceso puede explicar como determinadas cepas pueden tolerar altos grados de cambios cromosómicos sin comprometer las funciones celulares esenciales. En estas regiones subteloméricas se localizan principalmente familias relacionadas con la interacción con el medio, tal como lectinas (Familia *FLO*), transportadores de azúcares (familia *HXT*, algunos miembros), proteínas de fusión célula-célula (familia *PRM*) así como otra serie de miembros de *GAL*, *MAL* y *PHO* relacionados con asimilación y utilización de nutrientes. Muchos de estos genes se relacionan con procesos de uso biotecnológico, tales como uso de fuentes de carbono alternativas, como sacarosa, galactosa, maltosa o resistencia a compuestos tóxicos presentes en melazas, por lo que cambios rápidos en la composición de los genes de dichas familias puede suponer una adquisición de una ventaja selectiva de una cepa frente a un proceso industrial. Estos hechos deben de ser considerados y evaluados desde un punto de vista positivo, pudiendo hablar de una cierta plasticidad genética de adaptación. Sin embargo, una vez optimizada la cepa, la inestabilidad cariotípica o genética en general, puede comprometer la reproducibilidad del producto final, pasando a constituir

un problema industrial. Así sólo una cepa con un cierto grado de estabilidad genética asegura una reproducibilidad en el producto final (Gasent-Ramírez *et al.*, 1999). Complementariamente una cepa industrial inestable puede comprometer un programa de mejora genética que implique clonaje de genes heterólogos, ya que estos podrían ser perdidos a las pocas generaciones.

5. CONCLUSIONES

1. La cepa DC5 presenta un alto grado de complejidad genética; presencia de polimorfismos cromosómicos, aneuploidías, heterocigosis y el fenómeno de inestabilidad cariotípica. Estas características genéticas parecen estar relacionadas con una baja tasa de esporulación y de viabilidad esporídica.
2. La inestabilidad cariotípica en DC5, descrita como la aparición de variantes cromosómicas de tamaño durante el crecimiento vegetativo y/o meiosis, es un fenómeno segregable, no reversible y depende de pocos elementos genéticos de carácter dominante. Es posible obtener por esporulación cepas estables a partir de cepas inestables, cuyos descendientes siguen siendo a su vez estables.
3. La inestabilidad del cromosoma XII en DC5 es genéticamente independiente de la del resto de cromosomas y se debe a la reordenación de los elementos de rDNA, pudiéndose establecer una clara correlación entre tamaño de los *clusters* de rDNA y el tamaño del cromosoma XII.
4. La inestabilidad cariotípica mitótica y meiótica están ligadas genéticamente en la cepa estudiada, puesto ninguno de los derivados estables en mitosis fueron inestables en meiosis, ni viceversa.
5. La estrategia empleada en la disrupción secuencial de las dos copias de *RAD52* en la cepa DC5, demostró la compatibilidad de los marcadores *kan^r* y *nat1*, así como la necesidad de aumentar el grado de homología entre las construcciones empleadas y las secuencias a disrumpir en el caso de los clones heterocigotos (*RAD52/rad52*).
6. Los mutantes DC5 Δ *rad52* presentan una inestabilidad mitótica menor que la cepa DC5, puesto que su tasa de inestabilidad cariotípica es menor que la de dicha cepa (unas 3,2 veces), aunque dicha tasa es mayor (unas 7,6 veces) a la presentada por las cepas estables.
7. La remediación de la inestabilidad cariotípica es posible mediante dos estrategias: por disrupción genética de las dos copias de *RAD52* (remediación parcial) y por la obtención de derivados monoesporídicos con alta estabilidad mitótica. En ambos casos estos tipos de cepas conservan su *fitness* industrial, puesto que son capaces de llevar a cabo la segunda fermentación del cava de forma

análoga a la cepa DC5 y a otras cepas industriales.

8. La caracterización de la inestabilidad cariotípica en la cepa DC5, en sus derivados meióticos y en el mutante DC5 Δ *rad52*, nos permite establecer la hipótesis de que depende de tres mecanismos básicos; un primer mecanismo dependiente de *RAD52*, un segundo mecanismo independiente de *RAD52* y un tercer mecanismo para el cromosoma XII, que sería a su vez independiente del resto del genoma. Cabe la posibilidad de que el segundo mecanismo se magnifique en ausencia del primero.
9. El cromosoma I presenta alteraciones estructurales en las zonas subteloméricas de los brazos derecho e izquierdo, en las que se han dado procesos recombinatorios responsables del polimorfismo de tamaño detectado en las variantes (L y S) del cromosoma I. Contrariamente la zona centromérica del cromosoma I es una zona conservada tanto en tamaño, como en composición de los ORFs analizados, para todos los derivados mitóticos de DC5 estudiados.
10. El cromosoma I de diversas variantes de DC5 presenta importantes divergencias estructurales en los ORFs *FLO1* y *FLO9*, situados en el brazo derecho e izquierdo del cromosoma I respectivamente, y pertenecientes a la familia de floculación. Los resultados obtenidos sugieren que ambos ORFs han participado tanto en los procesos recombinatorios del brazo derecho de las variantes grandes (L) del cromosoma I, como en la generación de polimorfismos cromosómicos de tamaño en el brazo izquierdo de las diversas variantes analizadas.
11. El genotipado del conjunto de cepas de *S. cerevisiae* revela una gran variabilidad en ORFs pertenecientes a diversas familias multigénicas de localización subtelomérica y/o de interacción con el medio. Contrariamente los ORFs de familias multigénicas relacionadas con funciones celulares esenciales presentan un bajo grado de variabilidad.
12. Las divergencias de abundancia de diversos ORFs hacen necesaria la caracterización genética de una cepa como paso previo a estudios de expresión genética, así como en el caso de emprender determinados programas de mejora genética.

Anexo I. Materiales y métodos

AI.1 Cepas empleadas

La cepa DC5 fue aislada y caracterizada de una colección de cepas vínicas del Penedès. El resto de cepas empleadas en esta tesis corresponden a derivados monoesporídicos de dicha cepa (F1) o a derivados de éstos (F2) (tabla 3-2) o bien son cepas de la misma colección o de colecciones industriales (tabla 3-6).

Las cepas w303a y w303d, cepas haploide y diploide, de genotipo MATa y MATa/ α respectivamente, ura3, leu2, his3, trp1, ade1, fueron obtenidas del Yeast Stock Center, Berkely, California, USA.

AI.2 Medios de propagación y condiciones

AI.2.1 Medio YPD/YPS

Todas las cepas fueron crecidas en medio YEP (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona) suplementado con 20 g/l de glucosa (YPD) o 20 g/l de sacarosa (YPS) a 30 °C con agitación continua (250 rpm). El YPD/YPS en placa contiene además 20 g/l de agar.

AI.3 Medios de esporulación y condiciones

La esporulación se realizó en medio líquido (Kassir *et al.* 1991). Tras crecer las células toda la noche en el medio PSP2 [1.7 g/l de *yeast nitrogen base* (YNB) sin aminoácidos o sulfato de amonio, 5 g/l de sulfato de amonio, 1 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de acetato potásico, 50 mM de ftalato potásico) suplementado con 0.1 % de casaaminoácidos (CAAs), triptófano, adenina y uracilo (0,1 g/l de cada uno)], fueron lavadas en agua destilada estéril, y resuspendidas en 3 g/l de acetato de potasio más 0.1 % de casaaminoácidos (CAAs) y triptófano, adenina y uracilo (0.1 g/l de cada uno).

AI.4 Disección de tétradas

Las tétradas aparecieron típicamente tras 1 a 3 semanas de incubación a 25°C (temperatura ambiente). Las esporas fueron aisladas en un Microscopio de Disección de Tétradas (*Micro Video Instruments, INC., m Avon, MA*) tras digerir la pared de la asca con liticasa (*Sigma*) (Sherman *et al.*, 1991).

AI.5 Test metabólicos

AI.5.1 Medio YPS-BTB

La fermentación de sacarosa fue monitorizada en placas de YPS que contenían 20 mg/l de azul de bromotimol (BTB) ajustadas a un pH de 7.5 (Mortimer *et al.*, 1994).

AI.5.2 Medio YEPE

El crecimiento en etanol fue testado en medio líquido YEP suplementado con 2 % de etanol.

AI.5.3 Medio mínimo (MM)

El crecimiento en medio mínimo fue testado en placas de medio mínimo (MM) que contenían 1.7 g/l de YNB sin aminoácidos o sulfato de amonio, 5 g/l de sulfato amónico y 2 g/l de glucosa.

AI.5.4 Medio completo sintético (SC)

El medio completo (SC) es idéntico al MM, pero con la adición de 0.1 % de casaaminoácidos y 0.1 % de triptófano, adenina y uracilo.

AI.5.5 Medio BIGGY

La producción de sulfuro fue testada en placas BIGGY (*Difco*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Contiene los siguientes compuestos: 1 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de glicina, 10 g/l de glucosa, 5 g/l de citrato doble de bismuto y amonio, 3 g/l de sulfito sódico y 16 g/l de agar.

AI.6 Fermentaciones experimentales

Las cepas fueron propagadas en mosto tratado a 110 °C durante 15 minutos y posteriormente adaptadas en vino base según los estándares. El vino base era una mezcla de vinos jóvenes elaborados con las variedades Chardonnay, Macabeu y Perellada cuya composición fue determinada por análisis vínicos. La segunda fermentación se realizó en botellas de cava de 750 ml. Estas botellas fueron llenadas con una mezcla del anterior vino base, sacarosa y *pie de cup* conteniendo 10% de etanol, 24 g de sacarosa/l y 10⁶ células viables por ml. La fermentación fue seguida mediante el aumento de presión en botella. Estas fermentaciones experimentales fueron realizadas por Enric Bartra en el *Institut Català*

de la *Vinya i el Vi* (INCAVI, Vilafranca del Penedès, Barcelona).

AI.7 Cultivos seriados

Se realizaron en tubos de 15 ml con 5 ml de YPS, a 30°C. Tras 24 horas de incubación en un *roller*, y cuando los cultivos estaban prácticamente saturados (en nuestras cepas a una A_{600} de aproximadamente 15 unidades de densidad óptica), se resembraron en medio fresco ajustando la A_{600} inicial a 0.05. Este proceso se repitió hasta completar 100 divisiones (generaciones), calculadas como;

$$\text{Número de generaciones} = \text{ld} (A_{600} \text{ Final} / A_{600} \text{ Inicial})$$

Una vez completadas las 100 generaciones se procedió a realizar una estría del tubo final en YPD, aislando clones independientes y congelándolos con 50% de glicerol para su posterior análisis.

AI.8 Cálculo de tasa de reorganización

La tasa de reorganización cromosómica por generación (R) se calculó como la fracción de clones analizados que tienen un cariotipo idéntico al clon original después de 100 generaciones, P_i , aplicando la siguiente fórmula:

$$R = 1 - P_i^{0.01}$$

AI.9 Análisis del cariotipo

Las células correspondientes a la fase exponencial de un cultivo, fueron lavadas en agua autoclavada y atrapadas en agarosa de bajo punto de fusión (LMP-Agarosa). Estos bloques de agarosa fueron tratados con liticasa y posteriormente con proteinasa K (24 y 48 horas, a 25 °C y 50 °C respectivamente), con el objeto de digerir la pared celular y las proteínas, tal y como está descrito en Gerring *et al.*,1991.

Los cromosomas fueron separados por electroforesis de campo pulsante (PFGE) en un gel de agarosa al 1.2 % en un aparato Hula-Gel (Hoefler), a 200 V usando una rampa de pulsos de 60s a 150s durante 50 horas en 0.5x de tampón TBE (TBE: 100 mM Tris-hidroximetilaminometano borato, 5 mM EDTA, ph 8.4) a 12 °C.

AI.10 Digestión *in situ*

Para realizar restricciones de DNA se sometieron los bloques de agarosa a un proceso de diálisis de 4 horas en agua MilliQ autoclavada con cambios de este agua cada hora. Posteriormente se realizó una incubación en el tampón de restricción adecuado durante una hora. Se añadió tampón de restricción y la enzima de restricción deseada (unas 120 UE) y se incubó toda la noche a la temperatura indicada para cada enzima.

AI.11 Electroforesis de inversor de campo (IPFGE)

El DNA utilizado en este tipo de electroforesis fue preparado como se detalla en el análisis del cariotipo y en el caso de geles RFLP-IFGE digerido como se detalla en el apartado anterior. Los cromosomas o fragmentos de DNA se separaron por electroforesis de inversor de campo (IPFGE) en un gel de agarosa al 1 % en un aparato Hoefer. El programa utilizado en la separación de fragmentos de 5 a 250 Kb consistió en dos electroforesis, ambas a 200 V y a 4 °C. La primera electroforesis consistió en 10 minutos sin pulsos, seguidos de 12 horas con pulsos en rampa que fueron desde 1 a 20 segundos con un ratio F:R (pulso directo/reverso) de 3:1. La segunda electroforesis tuvo una duración de 12 horas con pulsos en rampa que fueron desde 0.8 a 1.5 segundos con un ratio F:R de 3:1.

AI.12 Southern blot

AI.12.1 Transferencia

Los geles de las electroforesis convencionales o de campo pulsante (PFGE) o inversor de campo (IPFGE), fueron depurinizados en 0.25M de HCl durante 15 minutos, lavados con agua destilada, incubados 30 minutos en agitación con solución de desnaturalización (1.5 M de NaCl, 0.5M NaOH), lavados de nuevo con agua destilada e incubados 15 minutos en solución de neutralización (1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.2, 0.001M EDTA). Posteriormente fueron transferidos a membranas Hybond-N+ (Amersham) según las instrucciones del fabricante y sometidos a un *crosslinking* UV en el aparato Stratalinker (Stratagene). Posteriormente fueron hibridados con sondas radiactivas y/o quimioluminiscentes.

AI.12.2 Obtención de sondas para southern

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas fueron amplificados a partir de DNA de la cepa w303a mediante PCR (con los cebadores detallados en el correspondiente apartado) y posteriormente purificados mediante electroforesis de agarosa y el kit Elu-Quick (Schleicher&Scuell).

AI.12.3 Southern radiactivo

Las sondas fueron marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, mediante el protocolo de *random primer* con el kit Ready-to-go (Roche). Se realizó una prehibridación de una hora aproximadamente a 65 °C en tampón 5xSSC (cloruro sódico y citrato sódico), 5xDerhard't y 0.5% SDS (docecil sulfato sódico), añadiéndose a continuación la sonda marcada y procediéndose a hibridar toda la noche. Posteriormente se realizaron tres lavados en los tampones, 2xSSC, 0.1% SDS a 65°C durante 20 minutos y por duplicado en 0.2xSSC, 0.1 % SDS a 65°C durante 30 minutos. Finalmente se realizó una exposición de 2 a 24 horas en pantallas de Phosphorimager, que posteriormente fueron escaneadas con el *hardware* y *software* de Biorad.

AI.12.4 Southern quimioluminiscente

Las sondas fueron marcadas con Fluoresceína 12-dUTP (Roche) mediante el protocolo de *random primer* (Ready-to-go, Roche).

La prehibridación se realizó en 50 % de formamida, 0.25 M de tampón de fosfato de sodio (pH 7.2), 7 % SDS, 1mM EDTA, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de esperma de salmón (ssDNA), a 42°C durante 4 horas. La hibridación se realizó toda la noche a 42°C en el tampón de hibridación junto con la sonda. Posteriormente a los lavados, la sonda marcada con fluoresceína fue detectada con un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (Fluor-AP, Tropix), siguiendo las indicaciones del fabricante, y usando el substrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche) en 0.1 M de dietanolamina (pH 10), 1 mM MgCl_2 . Posteriormente estas membranas fueron expuestas con películas Kodak X-OMAT AR de 2 a 15 minutos a temperatura ambiente.

AI.13 Medidas de contenido de DNA

La cantidad relativa de DNA de nuestras cepas fue medida tal y como se describe en Nadal *et al.*, 1999. Un ml de células de un cultivo en fase exponencial tardía fueron lavadas con agua destilada autoclavada y fijadas en etanol al 70% durante 30 minutos a -20°C. Alrededor de 2×10^6 células fueron

centrifugadas y resuspendidas en 0.5 ml de citrato sódico estéril 50mM. El RNA fue digerido con la adición de 5 μ l de un vial de 10 mg/ml de RNAsa A (Sigma) por incubación a 37°C durante 2 horas. Posteriormente las células fueron teñidas por la adición de un volumen de una solución conteniendo 50 mM de citrato sódico y 10 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma), incubándolas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras teñidas fueron guardadas a 4°C en la oscuridad. Las muestras teñidas fueron analizadas con un citómetro de flujo (FACs); Coulter Epics Elite (Serveis Tècnics, Universitat de Barcelona) con un láser azul de argón (488 nm, 15 mW). La fluorescencia fue detectada a 665-685 nm. Las cepas W303a y W303d (haploide y diploide respectivamente) fueron las cepas empleadas como control de contenido de DNA.

AI.14 Análisis estadístico

El test de significancia entre ensayos fue realizado como una tabla de contingencia de 2x2. La significancia fue calculada por la función χ^2 (chi cuadrado)

AI.15 Protocolos de PCR

AI.15.1 Programas

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada usando una unidad enzimática de DyNzyme Ext DNA polymerase (Finnzymes) o la Biotools DNA Polimerasa (Biotols B&M), 0.1 ng de DNA (en el caso de plásmidos) o 10 ng de DNA genómico y 10 pmol de cada cebador. Después de la fase inicial de desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguida de una de 1 minuto, los cebadores se anillaron durante 20 segundos a la temperatura óptima, procediendo posteriormente a la extensión a 72°C y con la relación de 1 minuto de extensión/Kb de longitud del fragmento. Tras la extensión se realizó 29 veces más el ciclo descrito. Finalmente se realizó una extensión final de 10 minutos a 72°C.

AI.15.2 Cebadores empleados

En la siguiente tabla aparece la secuencia en el sentido 5' a 3' de los cebadores empleados en esta tesis. Los cebadores fueron diseñados *on line* <http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/SGD/web-primer>

AI.15.2.1 Cebadores empleados caracterización ORFs FLO1 y FLO9

FLo1Up 5'-AAGGAACCGTCTATATGTACGCTG-3'

FLo1Lo 5'-TGATGAAGAAGAATATGTAGGAGA-3'

FLo135 5'-GTTCCATGGCTGAGTTGTAGTCAT-3'

FLo9Up 5'-TGAAGACGAATATGTAGACTTTGG-3'

FLo9Lo 5'-GACTCTGCAATTCTATCAGTCGGT-3'

AI.15.2.2 Cebadores empleados para la obtención de sondas

El nombre de los cebadores hace referencia al ORF amplificado

YAL020C-Up 5'-TTGTGTGTATGCGTTTGGGT-3'

YAL020C-Lo 5'-CGGCTACTTTACCTTTGAGA-3'

YAL040C-Up 5'-CAATCTATCGACCTCGACTT-3'

YAL040C-Lo 5'-CTTGGCCAAAAGATGCTTGA-3'

YAL066W-Up 5'-TGCATTTGTGAGTTGGTTGCT-3'

YAL066W-Lo 5'-TATCCAGCCCTGTGTTTTCA-3'

YAR015W-Up 5'-TTACGAAGACTGAACTGGACG-3'

YAR015W-Lo 5'-TGAGACCATTTAGACCCTGT-3'

YAR023C-Up 5'-TTGAGGTTTGAAATGTTTCGAC-3'

YAR023C-Lo 5'-CGCAGATTATTTTCGAATTTG-3'

YAR031W-Up 5'-CGTGACTTTATATAGTGGG-3'

YAR031W-Lo 5'-GTGGTGTTTTTGGGGCAA-3'

YAR053W-Up 5'-AGTGTCTTCATTTGCGTCCTT-3'

YAR053W-Lo 5'-GCAAGAAATGAATAACCACCA-3'

AI.15.2.3 Cebadores quimeras amplificación cassetes resistencia KAN/NAT y disrupción RAD52

RAD52-Up 5'-GAAGTTGCAGCCTTAGCTGTAACAAAGGTgcataggccactagtgatctg-3'

RAD52-Lo 5'-TAGGACCTGAGTATATCTCCAAGAGAGTTGGGTTTGGAcagctgaagcttcgtacgc-3'

(En mayúsculas aparecen las bases complementarias al gen *RAD52* y en minúsculas al *MCS* de los módulos *KanMX4* y *NatMX4* - pFA6a-*kanMX4* y pGA25, respectivamente-).

AI.15.2.4 Cebadores empleados en amplificación de *hbRAD52-nat*, *high homology RAD52-nat*

rad52b-Up 5'-TTACGCGACCGGTATCGA-3'

rad52b-Lo 5'-TATTGTTCGGCCAGGAAG-3'

AI.16 Análisis de secuencias de DNA, diseños de primers, blast

Los análisis de secuencia, el diseño de primers y la aplicación del programa BLAST fueron realizados *on line* en el SGD www.yeastgenome.org

AI.17 Plásmidos empleados

Los plásmidos empleados, su uso y su referencia aparecen en la siguiente tabla.

Plásmido	Uso	Referencia
pFA6a- <i>kan</i> MX4	Disrupción de <i>RAD52</i> por resistencia a <i>Kan</i> ^r	Wach <i>et al.</i> , 1994
PGA25(<i>nat1</i> MX4)	Disrupción de <i>RAD52</i> por resistencia a <i>ClonNat</i> ®	Wach <i>et al.</i> , 1994
prDNA	Sonda rDNA para hibridación de cromosoma XII	Antonio Rodríguez-Campos (CID-CSIC)
pEL42H10+7.4	Sonda Y' para hibridación de estas secuencias	Louis <i>et al.</i> , 1995

AI.18 MinichipsAI.18.1 Diseño e impresión

El minichip empleado para la caracterización de las variantes del cromosoma I, posee un tamaño de 2x6 cm. Contiene 14 ORFs por duplicado que abarcan el cromosoma I cada 5 a 15 Kb (figura 2-15).

Estas secuencias fueron generadas por amplificación por PCR de una colección de clones. Alrededor de 50 ng de cada fragmento de PCR fue printado en una membrana de Nylon-N+ (Amersham), utilizando el *BioGrid Arrayer* (de Biorobotics Ltd). Los fragmentos utilizados para printar corresponden a los siguientes ORFs del cromosoma I estándar: YAL066W, YAL062W, YAL058W, YAL047C, YAL040C, YAL032C, YAL025C, YAL020C, YAL009W, YAR002W, YAR015W, YAR031W, YAR053W, YAR015W, YAR031W, YAR053W, YAR071W. La membrana posee además dos ORFs, los YFL016C y YCL043C, de los cromosomas VI y III, respectivamente, como controles de purificación del cromosoma I, junto con los controles positivos (Genómico de *S.cerevisiae*) y negativo (Genómico de *E.coli*). Los puntos marcados como C incluyen solamente solvente. Todos los ORFs y

controles fueron printados por duplicado.

El diseño y printado de estos minichips fue realizado por el Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València.

AI.18.2 Hibridación y análisis

Las bandas correspondientes al cromosoma I fueron extraídas y recuperadas de los geles de inversor de campo (IPFGE) con el kit Elu-Quick (Schleicher&Schuell). La cantidad de DNA recuperada, inferior a 100 ng, fue marcada con $\alpha^{33}\text{P}$ -dCTP con el kit Ready-to-go (RTG, Roche).

La prehibridación fue llevada a cabo en 2 ml de 5xSSC (citrato sódico), 5x Denhardt y 0.5% SDS (sodio-docecil-sulfato) a 65°C durante 1 hora. La hibridación se realizó a 65°C durante toda la noche en la solución de hibridación junto con la sonda de la variante del cromosoma I marcada. Posteriormente se realizaron los lavados en 2xSSC, 0.1% SDS a 65°C durante 20 minutos y por duplicado en 0.2xSSC, 0.1 SDS a 65°C durante 30 minutos. Los filtros fueron expuestos ON en una pantalla Phosphoimager (BioRad) y posteriormente escaneados con el *hardware* y *software* de Biorad.

AI.18.3 Procesado de los datos

Los valores de intensidad obtenidos (R_i) fueron corregidos por el ruido de fondo (controles negativos, N) y por los valores positivos (P) según la fórmula:

$$I=(R_i-N)/(P-N)$$

AI.19 Chips de DNA

AI.19.1 Diseño e impresión

El chip de DNA empleado para el genotipado de diversas cepas, posee un tamaño de 12x8 cm. Contiene 6144 ORFs, prácticamente todo el genoma de *S.cerevisiae*, junto con sus respectivos controles. Estas secuencias fueron generadas por amplificación por PCR de una colección de clones. Alrededor de 50 ng de cada fragmento de PCR fue printado en una membrana de Nylon-N+ (Amersham), utilizando el *BioGrid Arrayer* (Biorobotics Ltd). El diseño y printado de estos chips fue realizado por el Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València.

AI.19.2 Hibridación y análisis

Unos 50 ng del DNA total de cada una de las cepas, fue marcado con $\alpha^{33}\text{P}$ -dATP utilizando el kit de marcaje Strip-EZ DNA (Ambion). Este kit se caracteriza por contener un dCTP modificado, que permite posteriormente realizar una deshibridación de la membrana (*stripping*) a temperaturas menos agresivas que en condiciones habituales. Antes de utilizar cada una de las membranas la primera vez, eran lavadas 30 minutos en 0.5 % SDS a 80°C, con el objeto de eliminar las partículas depositadas durante el proceso de printado.

La hibridación se realizó a 50°C durante toda la noche (de 14 a 16 horas) en 5 ml de la solución de hibridación comercial ULTRArray™ (Ambion) junto con la sonda (DNA total de cada cepa) marcada. Posteriormente se realizaron dos lavados de treinta minutos (2x30 min.) en 2X SSC, 0.5% SDS y dos lavados más de treinta minutos (2x30 min.) en 0.5XSSC, 0.5%SDS. Seguidamente la membrana fue expuesta ON y escaneada con el sistema Phosphorimager (BioRad).

AI.19.3 Procesado de los datos

Los valores de intensidad obtenidos (R_i) fueron corregidos por la media global de todos los valores (x) según la fórmula para cada cepa y membrana:

$$I = R_i / x$$

Con el objeto de poder comparar los valores de intensidad corregidos (I) entre las membranas A - B, y obtener un valor comparativo (valor IA/B) se realizó la siguiente corrección adicional para cada uno de los valores:

$$IA/B = I (\text{Membrana B}) \times (I \text{ de DC5 en Membrana A} / I \text{ de DC5 en Membrana B})$$

AI.19.4 Coeficiente de variación

El coeficiente de variación (CV) de un gen X en el conjunto de todas las cepas analizadas se calcula mediante la fórmula:

$$CV = \text{Desviación estándar (SD)} / \text{media (X)}$$