

El singular mundo de las levaduras enológicas

Jesús Manuel Cantoral Fernández y María Esther Rodríguez Jiménez

Laboratorio de Microbiología Enológica. Facultades de Ciencias.

Universidad de Cádiz. 11.510 Puerto Real (Cádiz)

jesusmanuel.cantoral@uca.es

mariaesther.rodriguez@uca.es

1. UN POCO DE HISTORIA

Las levaduras han formado parte de la civilización humana desde tiempos remotos. Las evidencias más antiguas datan del Neolítico; se han encontrado restos de hace 7400-7000 años correspondientes a sales tartáricas y resinas en algunos ejemplares de cerámica de aquella época. El ácido tartárico sólo está presente en las uvas en grandes cantidades y se ha postulado que la resina, concretamente del árbol *Pistacia*, se añadía como un conservante antibacteriano, suponiendo este hecho una fuerte evidencia sobre procesos de vinificación en aquel periodo prehistórico.

También se han descubierto evidencias de vinos hechos en Egipto y Fenicia hacia el año 5000 a.C. Investigadores actuales han demostrado que el ADN aislado de un supuesto jarro de vino de Abydos (3150 a.C.), tenía una secuencia estrechamente relacionada con el genoma de levadura modernas (*Sacharomyces cerevisiae*). La revelación del proceso de elaboración se atribuye a Osiris, entre los egipcios, y a Dionisios, entre los griegos. Los hebreos afirman que fue Noé el primero en cultivar la vid, y el vino siempre ha ocupado un lugar preeminente entre sus ritos y costumbres, así como en las fiestas de los primitivos griegos y romanos.

A su vez, los chinos fueron expertos conocedores del arte de fermentar el mosto de la uva y los primeros en reglamentarlo. En el año 2285 a.C. un hombre fue castigado severamente por mezclar vino de uva con licor de arroz. Hacia el año 2000 a.C. el vino empezó a producirse en Grecia y Creta. Más tarde, los romanos extendieron la vinificación por todo el Mediterráneo y en el 500 a.C. el vino empezó a producirse en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y norte de África. Los cultivos de vides también se extendieron por los Balcanes y los romanos los extendieron hacia Alemania y otras partes del norte de Europa hasta alcanzar la Bretaña.

Ya en el siglo XVI, la viticultura se practicaba ampliamente en Francia, siendo uno de los mayores productores mundiales. Pero surgieron problemas: había que buscar la forma de evitar que la fermentación secundaria, producida en el vino de champagne después de embotellado, explotara. El tapón hasta entonces utilizado estaba formado por tejido de lana y lacre. Fue el monje Dom Perignon (1638-1715) quien introdujo la utilización del corcho, técnica que había aprendido de los españoles, junto con una botella de mayor grosor. Con eso, la segunda fermentación pudo desarrollarse normalmente, dando origen al champagne. Fue entonces cuando el monje pronunció

su conocida exclamación: “¡Venid rápido hermanos, estoy bebiendo estrellas!”

Durante el siglo XVI, los exploradores europeos introdujeron la vid en el Nuevo Mundo y en el siglo XVII, los colonizadores alemanes lo implantaron en el sur de África. Posteriormente, en 1697, se extendió la vinificación a California, y más de un siglo después a Australia y Nueva Zelanda. En España, no sabemos con seguridad en qué lugar comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid, ni quienes fueron los introductores de las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral sudoccidental andaluz, constituyendo el punto de entrada y la zona geográfica de las viñas españolas más antiguas.

Esta teoría está avalada por la presencia de los fenicios en la Península hace unos 3000 años aproximadamente. Este pueblo comerciante fundó un puerto en el sudoeste al que llamaron Gades (Cádiz, en la actualidad). Después, se trasladaron hacia el interior, plantando vides en las montañas circundantes. Concretamente, en las Ruinas del Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María) se han encontrado restos de lo que podrían haber sido lagares de elaboración de vino, que datan del siglo IV a.C.

El vino que se producía en esta región llamada de Ceret (Jerez) se elaboraba cociendo el mosto recién fermentado para obtener altas graduaciones alcohólicas y poder así resistir el transporte hacia el Mediterráneo. A estos vinos se les añadía agua para su consumo y presentaban muchas impurezas porque la fermentación era imperfecta, razón por la que se les añadía ámbar, pez, resinas, etc. Hacia el año 138 a.C. comenzó la dominación romana, iniciándose una corriente comercial muy importante de productos de esta región hacia la metrópoli. En el año 711 da comienzo la dominación árabe, que en el sur de España duró más de cinco siglos. Durante todo ese tiempo, la zona sudoccidental siguió siendo un importante centro de elaboración de vinos, a pesar de la prohibición coránica. La producción de pasas y la obtención de alcohol con fines medicinales actuaban en cierta forma como excusas para el mantenimiento del cultivo de la vid y de la elaboración de vinos, hasta que la conquista por Alfonso X el Sabio en 1264 supuso un gran cambio para los vinos de esta región.

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras. Aquellos primitivos viticultores se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y luego dejar el zumo (llamado mosto) fermentar, ya que

Jesús Manuel Cantoral Fernández

(Vega de Monasterio, León, 1955) es licenciado en Biología por la Universidad de León. Realizó la Tesis Doctoral (1988) con el Dr. Juan Francisco Martín en distintos aspectos moleculares del hongo *Penicillium chrysogenum* (1988), completando su formación en las Universidades de Bristol (U.K.), Berlín (Alemania) y Washington (Seattle, EEUU). En el año 1991 se incorpora a la Universidad de Cádiz creando el grupo de "Microbiología Aplicada" centrandose sus trabajos en levaduras enológicas, tanto de vinos jóvenes como sometidos a "crianza biológica", así como en hongos fitopatógenos. En el año 2003 obtiene una cátedra de Microbiología en la Universidad de León y posteriormente en el 2007 en la de Cádiz, donde continúa dirigiendo el grupo de investigación. Desde el año 2008 es Director del Departamento de "Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública", siendo nombrado en el año 2009 Académico Correspondiente de Mérito de la Real Academia de Medicina de Cádiz.



la superficie de las uvas contiene células de levadura preparadas para llevar a cabo la fermentación: **"Me gustaría imaginar el momento, perdido en la noche de los tiempos, cuando un desconocido morador de cuevas, quizás un oscuro benefactor del fructífero reino de Mesopotamia, felizmente descubrió que los zumos de frutas son mucho más sabrosos si se dejan reposar un tiempo. Quizás al mismo tiempo, algunos ancestros fermentadores desconocidos de *Saccharomyces cerevisiae* hicieron que su fortuita supervivencia fuera mejorada por la asociación con el hombre, y decidieron dejar al inseguro medioambiente y convertirse en el primer microorganismo domesticado"** (A. Vaughan y A. Martini, 1995).

Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación, no fue desarrollado hasta 7000 años más tarde, gracias a los trabajos de Pasteur (1872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana. Al saber que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los vinificadores pudieron controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta de embotellamiento.

Con el posterior desarrollo de las técnicas microbiológicas, las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de "fermentación inoculada" empleando cultivos puros de levaduras. Como resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros análisis genéticos de levaduras comenzaron a mediados de la década 1930-1940, con la introducción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos con fines investigadores, ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas estándar (o de referencia) de laboratorio. La gran mayoría deriva de un aislamiento realizado por Emil Mrak a partir de higos en descomposición en Merced, (California, 1938). Dicho aislamiento, conocido como EM93, corresponde a una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C, secuenciado en el año 1996.

2. BIOLOGÍA DE LAS LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetos y levaduras basidiomicetos (en ambos casos se dan las formas teleomórfica y anamórfica). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca.

Saccharomyces cerevisiae posee un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse en estadios haploides o diploides, con la formación de cigotos entre células haploides compatibles. El tipo de reproducción es normalmente por brote ó gemación mediante mitosis (asexual). Sin embargo, bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, una célula diploide genera cuatro esporas haploides encapsuladas en el asca (ascosporas). A su vez, las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un cigoto diploide mediante conjugación.

Existen tres tipos de células vegetativas en función del tipo sexual, llamadas *a*, α (ambas haploides) y *a*/ α (diploides). Las células del tipo *a* y α se conjugan entre sí para dar lugar a cigotos de tipo *a*/ α , cuya eficiencia de apareamiento es mucho más alta que entre las del mismo tipo (que es muy baja o no se da). Los tipos sexuales en *S. cerevisiae* están controlados por un locus en el cromosoma III, llamado MAT (del inglés *mating type*, apareamiento) pudiendo aparecer dos alelos, *a* y α . Las cepas que pueden mantenerse estables durante muchas generaciones como haploides, siendo *a* ó α se llaman heterotálicas. Las cepas homotálicas son aquellas en las que se induce el cambio en el tipo (*a* cambia a α y viceversa) y la unión, para formar un cigoto, se realiza entre células que proceden de una misma espورا, de manera que la célula madre es la que cambia el tipo y se une con una célula hija de tipo opuesto para dar un diploide *a*/ α . La mayoría de las cepas vínicas de *S. cerevisiae* son por lo general diploides y homotálicas y resulta difícil que en ellas se induzca la esporulación y por tanto la reproducción sexual.

El material genético de las levaduras se reparte entre el genoma nuclear, genoma mitocondrial y plásmidos citoplasmáticos. Además, el citoplasma puede contener dos moléculas de ARN bicatenario, que confieren a la levadura el llamado "factor killer". El ADN cromosómico en una célula diploide de *S. cerevisiae* constituye alrededor del 80% del total, con un tamaño estimado de 2×10^4 kilobases (kb) que se reparte entre 32 cromosomas lineales (16 pares de cromosomas), cuyos tamaños oscilan entre 200-2200 kb, aproximadamente. El cromosoma más grande es el XII, siendo además el más variable debido a que contiene el ADN ribosómico; es decir, genes que codifican para las distintas subunidades de ARN ribosómico: 25S, 18S, 5.8S y 5S, que forman parte estructural de los ribosomas. Estos genes ribosómicos, se encuentran repetidos en tándem alrededor de 100 veces en el cromosoma XII.

El ADN mitocondrial está constituido por un sólo cromosoma circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 75-85 kb. Como ocurre con la mayor parte de las mitocondrias, en el caso de las levaduras existen muy pocas proteínas necesarias para las mitocondrias y que sean codificadas por ellas. Existe una clase de mutantes mitocondriales denominados *petite*, en los que la

mayor parte de la síntesis de proteínas mitocondriales está abolida debido a largas delecciones en el ADN mitocondrial. Tales mitocondrias no son funcionales y las levaduras que las contienen son incapaces de realizar la respiración aunque pueden crecer anaeróbicamente (fermentación). En la especie *S. cerevisiae* se ha puesto de manifiesto la existencia de un plásmido de ADN bicatenario circular de 2 mm de tamaño que contiene aproximadamente 6,3 kb y que se presenta en un número de entre 60 y 100 copias en el citoplasma.

Además, en el citoplasma, pueden aparecer dos moléculas lineales de doble cadena de ARN que están relacionadas con una toxina o “factor killer”. Estas dos moléculas de ARN son de diferente peso molecular y se denominan L y M. El tamaño del genoma de L es de 4.5 kb, mientras que el segmento M varía entre 1.3 y 2 kb. M codifica para dos tipos de proteínas, una toxina y un factor inmunitario, y L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas.

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K_1 , K_2 , K_3 , K_{28} y K_{3GR1} , siendo K_1 la de mayor agresividad, aunque no se considera importante en vinificación porque su óptimo de actividad se encuentra a un pH de 4.6-4.8. En cuanto a K_3 y K_{3GR1} , parece ser que son variantes del tipo K_2 . Las cepas killer aisladas de la fermentación son generalmente del tipo K_2 y K_{28} , debido probablemente a que el bajo pH óptimo para la actividad de estas toxinas se encuentra en el mosto (pH 2.8-3.8). Las levaduras vínicas silvestres (indígenas) con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo. La presencia de estas levaduras en el mosto y posteriormente en la fermentación puede significar un problema en las fermentaciones que son inoculadas con levaduras seleccionadas, ya que si el inóculo está preparado con levaduras sensibles, como son muchas de las levaduras comerciales, pueden llegar a ser suprimidas por las cepas killer durante la fermentación. Como consecuencia se pueden producir fermentaciones lentas o incluso paradas, y aumentar la acidez volátil, la producción de H_2S y aromas indeseables.

3. PROCESOS DE VINIFICACIÓN. SELECCIÓN DE LEVADURAS

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto, obtenido tras el prensado de las uvas, se clarifica y se corrige adicionando ácido tartárico. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas distintas especies de levaduras, las cuales metabolizan el azúcar del mosto generando etanol y dióxido de carbono. La reacción química más simple de la fermentación fue la propuesta por Gay-Lussac, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están implicadas al menos 12 reacciones distintas y diversos productos secundarios. Tras la fermentación se obtienen vinos con una graduación de 11° en grado alcohólico (v/v).

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de las distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En la primera fase cuando el grado alcohólico es bajo predominan levaduras de diversos géneros como *Kloeckera*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Rodotorula*, *Kluyveromyces*, etc. Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación pero a medida que ésta avanza y aumenta el grado alcohólico son desplazadas por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo las cepas de la especie *S. cerevisiae* las principales responsables de la fermentación. Es esa diversidad de cepas de levaduras la que aporta al vino la complejidad y tipicidad en las características sensoriales.

María Esther Rodríguez Jiménez

(Puerto de Santa María, Cádiz, 1971) es licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz. Realizó la Tesis Doctoral con los Drs. Jesús Manuel Cantoral y Laureana Rebordinos con el título “Análisis genómico y molecular de levaduras vínicas. Aplicación a la mejora del proceso de fermentación de vinos mediante selección de levaduras autóctonas” (2007). Sus trabajos se han centrado en la caracterización de levaduras enológicas mediante el uso de técnicas moleculares y posterior selección para el uso como levaduras iniciadoras de la fermentación, así como su seguimiento e implantación en el proceso de vinificación, mejorando sustancialmente las propiedades organolépticas del vino y garantizando sus peculiaridades de producción. En la actualidad se encuentra realizando una estancia postdoctoral en el CSIC-IATA de Valencia bajo la supervisión de los Drs. Emilia Matallana y Agustín Aranda.



Las fermentaciones espontáneas pueden aportar alta calidad a los vinos con un carácter típico de la región donde se producen, proporcionándoles así diferenciación y un valor comercial añadido (Fleet, 2008). El inconveniente de estos procesos naturales es que son impredecibles, pudiéndose producir inicios tardíos, paradas o fermentaciones lentas o proliferación de levaduras contaminantes u otras indígenas que no aporten al vino las características deseadas. Aún así, en numerosas bodegas tradicionales europeas se siguen realizando fermentaciones espontáneas utilizando una adecuada combinación de conocimientos artesanales y tecnológicos que aseguran el éxito del proceso. Una alternativa a las fermentaciones espontáneas son las fermentaciones inoculadas a partir de cultivos iniciadores preparados con levaduras seleccionadas. Normalmente estas levaduras están disponibles en el mercado en forma de concentrados secos activos (levaduras secas activas, LSA) y su uso en la mayoría de las bodegas se ha convertido en una práctica habitual para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año. Sin embargo, la utilización de estas levaduras, normalmente foráneas de la zona productora, presenta algunos inconvenientes como es la pérdida en la tipicidad de los vinos.

Todos estos aspectos están proporcionando nuevos retos para mejorar las cualidades y valor de los vinos obtenidos con fermentaciones inoculadas. Uno de estos retos es la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) en una zona productora determinada, y otro es la utilización de cultivos iniciadores mixtos como alternativa al uso de cultivos puros.

En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo la selección de levaduras autóctonas para la mejora de un vino blanco elaborado por Bodegas Barbadillo S.L. en Sanlúcar de Barrameda. El estudio implicó, primero caracterizar la diversidad de cepas presentes en la fermentación espontánea, para tener un mayor conocimiento de las cepas más representativas del proceso y posteriormente evaluar las características enológicas de esas cepas en condiciones de laboratorio.

Las técnicas moleculares que permiten la caracterización de levaduras industriales y discriminan entre las distintas cepas son habitualmente la electroforesis en campo pulsante (PFGE) (Figura 1) y el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial (Figura 2).

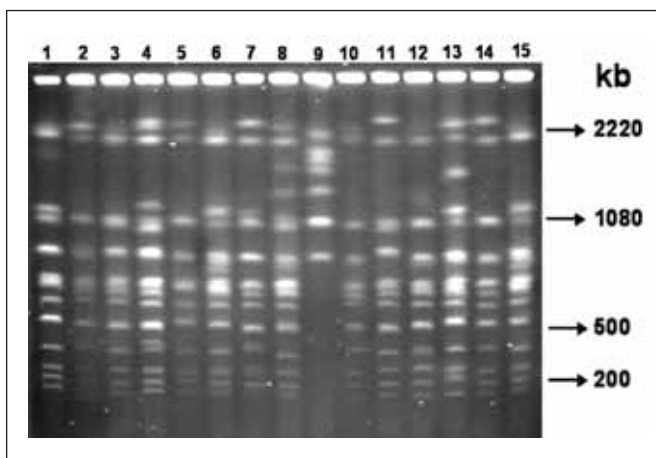


Figura 1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE). Cariotipo electroforético de 15 cepas de levaduras autóctonas aisladas de la fermentación espontánea en la cosecha del año 1999. El aislamiento 9 corresponde a una levadura no-*Saccharomyces*, detectada por no presentar las cuatro bandas típicas de *S. cerevisiae* presentes por debajo de 500 kb en el gel de electroforesis.

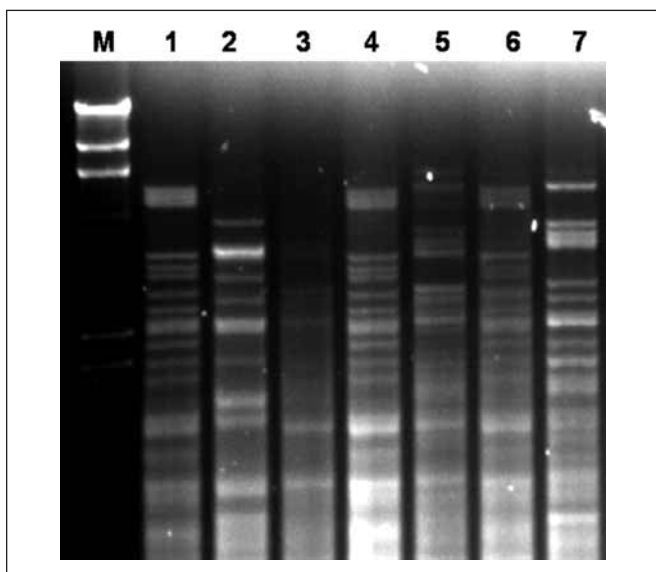


Figura 2. Longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial. Perfiles de restricción del ADN mitocondrial de distintos aislamientos de levaduras (1-7) para la enzima de restricción *HinfI*. M corresponde al marcador λ -*HindIII*.

La primera técnica analiza el número y tamaño de los cromosomas de las levaduras y la segunda mide variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial afectado por los sitios de corte de determinadas endonucleasas de restricción.

Tras seleccionar tres levaduras autóctonas y probarlas en condiciones industriales en varias campañas, comprobamos, mediante cariotipo electroforético, que no todas fueron buenas competidoras en las fermentaciones y sólo una de ellas se encontraba de forma mayoritaria en las fermentaciones, de manera que posteriormente sólo utilizamos esta levadura para inocular las fermentaciones. En los años en los que esta levadura fue predominante, los vinos obtenidos fueron de mejor calidad.

En nuestra opinión, para asegurar el buen desarrollo de la levadura inoculada durante el proceso, es necesario que el cultivo iniciador esté bien adaptado a las condiciones finales de fermentación. Uno de los criterios a tener en cuenta en la preparación del inóculo iniciador sería por ejemplo esperar a que tuviese un contenido en azúcar bajo, de esta forma al adicionarlo al mosto, el medio quedaría parcialmente alcoholizado evitando así el desarrollo de levaduras no deseadas que normalmente están presentes en el mosto (Rodríguez *et al.*, 2010).

4. LAS LEVADURAS DE “VELO DE FLOR” DE LOS VINOS DE “CRIANZA BIOLÓGICA” (FINOS Y MANZANILLAS)

Las levaduras de “velo de flor” son las responsables del proceso de “crianza biológica” (Figura 3) de los vinos producidos en el marco de Jerez y Sanlúcar de Barrameda en la provincia de Cádiz y de Montilla-Moriles en la de Córdoba, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo, como Sudáfrica, California, Cerdeña o Hungría. Estas singulares levaduras, constituyen un caso especial de levaduras vínicas que aparecen al final de la fermentación alcohólica del vino, formando una biopelícula en la superficie que se denomina “velo de flor” ya que aparecen de manera especial en primavera (periodo de la floración). El “velo de flor” surge de forma espontánea como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras desarrollarse en un medio en el que están obligadas a asimilar etanol y glicerol mediante respiración, que son las principales fuentes de carbono una vez agotados los azúcares fermentables. Estas levaduras son las únicas capaces de desarrollarse en el vino tras el proceso de encabezado (adición de alcohol vínico hasta llegar a una concentración de etanol del 15-15.5 %).

La crianza del fino en el Marco de Jerez, tiene un primer periodo de envejecimiento estático en botas o depósitos (sobretablas), a continuación se somete al proceso de envejecimiento dinámico mediante el sistema de criaderas y solera. Este sistema consiste en una serie de filas de botas de roble (600 litros de capacidad), cada una de las cuales contiene vino del mismo tipo y con el mismo grado de crianza (escala). Las botas no se llenan por completo, se deja vacía una sexta parte de su capacidad, lo que genera una amplia superficie y una cámara de aire que permite el desarrollo de estas levaduras filmógenas en dicha superficie. En la fila más próxima al suelo está el vino más viejo (1ª escala o solera), de donde se extrae el vino (saca) para el embotellado. Las botas de la solera se rellenan (rocío) con vino de la fila superior (2ª escala o 1ª criadera), que se rocía a su vez con vino de la siguiente (3ª escala) y así sucesivamente con una serie de escalas hasta llegar a las sobretablas, que se rellenan con vino nuevo (15 % etanol) (Figura 4). Entre las diversas transformaciones de interés enológico que las levaduras de flor producen sobre la composición del vino destaca la liberación de acetaldehído, que es producido directamente mediante oxidación de etanol como primer paso para su asimilación. El acetaldehído aporta al vino el olor punzante y característico del fino, por lo que se considera su concentración en el vino como un índice del grado de crianza. Además, el acetaldehído es punto de partida de numerosas reacciones que se producen durante el envejecimiento y que contribuirán decisivamente al buqué y color que definen a los finos.

Se han realizado múltiples trabajos para caracterizar las levaduras de velo de flor, en los cuales se pone de manifiesto que en las barricas de crianza aparecen casi exclusivamente levaduras de la especie *S. cerevisiae*, aunque se pueden diferenciar cuatro grupos según pruebas de asimilación y fermentación de azúcares

Figura 3. Proceso de Vinificación. Proceso de vinificación representando el conjunto de operaciones que se realizan desde la recogida de la uva en el viñedo hasta la obtención de los distintos tipos de vinos. Tras la fermentación alcohólica, se obtienen vinos jóvenes con 11° alcohólico (v/v). La adición de alcohol a estos vinos hasta obtener 18° permite obtener los vinos olorosos bajo crianza físico-química; mientras que la adición de alcohol hasta 14-15° permite la obtención de finos y manzanillas bajo crianza biológica.

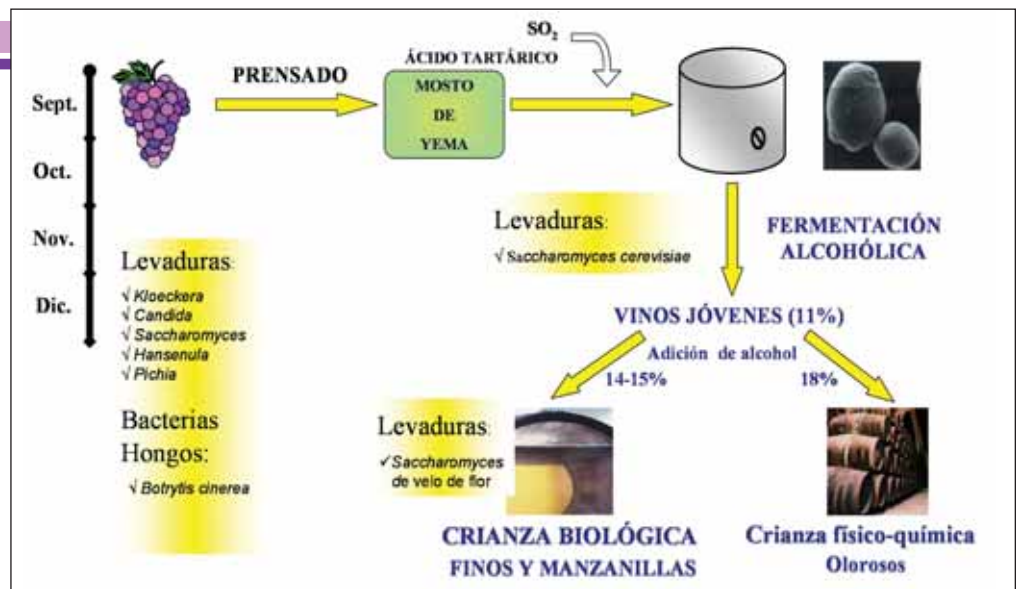


Figura 4. Crianza Biológica
 Izquierda: Dinámica del proceso de envejecimiento del vino fino mediante criaderas y solera (la más cercana al suelo). Derecha: Aspecto de la película (biofilme) de levaduras de velo de flor formada en la superficie del vino durante la crianza biológica. Estas levaduras tienen dos funciones principales: i) contribuir con su metabolismo a las características organolépticas de los finos y manzanillas y ii) aislar al vino del aire evitando así que se oxide.



que se catalogan como razas fisiológicas: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras, concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estos organismos a condiciones industriales tan específicas. Nuestro grupo ha llevado a cabo una amplia caracterización de estas levaduras en un sistema dinámico de envejecimiento del vino de “criaderas y solera” utilizando las técnicas moleculares de PFGE y los RFLP-ADNmt, descritas en el apartado anterior, llegándose a establecer una correspondencia entre un determinado tipo de levaduras presentes en el velo y el estado de envejecimiento del vino (Mesa et al., 1999, 2000)

Las levaduras de velo de flor tienen una presencia constante en la bodega (desde que se comenzó la crianza biológica de vinos hace unos 200 años) y se encuentran sometidas a una fortísima presión de selección que incluye su crecimiento en presencia de grandes cantidades de etanol (15-15,5%) y acetaldehído (200-800 mg/L), dos inhibidores del crecimiento celular con demostrada actividad mutagénica. Por ello, estas levaduras son de especial interés para la realización de estudios de evolución cromosómica. En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio novedoso del polimorfismo cromosómico al comparar dos cepas de levaduras industriales mediante el uso de “chips” de ADN (*microarrays* o *micromatrices*) de *S. cerevisiae*, que ha puesto de manifiesto los mecanismos específicos de recombinación y las secuencias afectadas por éstos, que posibilitan la evolución de estas cepas indus-

triales y su adaptación al ambiente (Infante et al., 2001). La hibridación comparativa del genoma entre estas dos cepas de velo de flor puso de manifiesto que ambas poseen amplificaciones de grandes regiones genómicas. Las amplificaciones responden a fenómenos de reorganización cromosómica mediados por puntos calientes de recombinación estratégicamente situados en el genoma. Además, los “amplicones” contienen genes clave para la adaptación de las levaduras de flor al ambiente extremo en el que se desarrollan, y muchos de ellos se encontraron sobreexpresados al comparar el transcriptoma de dichas cepas con cepas de laboratorio no adaptadas al ambiente industrial.

Estos resultados proporcionaron evidencias de que las reorganizaciones cromosómicas pueden funcionar como un mecanismo general de evolución adaptativa para las levaduras que crecen en ambientes muy selectivos. De manera que los agentes químicos como el etanol y el acetaldehído, presentes en altas concentraciones en el medio, provocan roturas de la doble hélice de ADN en puntos sensibles del genoma de las levaduras. La reparación de dichas roturas por mecanismos alternativos a la recombinación homóloga genera grandes reorganizaciones cromosómicas que dan lugar, tras la división mitótica, a cambios en el genoma que permiten la aparición de cepas mejor adaptadas al ambiente. La caracterización de los mecanismos de evolución adaptativa del genoma de estas levaduras de velo de flor fue la primera vez que se realiza en levaduras industriales y ha proporcionado un modelo de evolución genómico global íntimamente ligado a la influencia ambiental que puede ayudar a comprender los modelos de evolución actuales (Infante et al., 2003).

5. LEVADURAS ENOLÓGICAS, VINO Y SALUD

Hablar de levaduras enológicas conlleva tratar, al menos escuetamente, algunos aspectos más interesantes sobre el vino y la salud. A fin de cuentas como ya dijera el Dr. Gregorio Marañón **“Vivir, es defenderse de la vida que nos va matando. En esta lucha, la eficacia del vino es incalculable”**.

Se podría definir el vino, de manera sencilla, como una solución hidroalcohólica ácida (3, 4 unidades de pH), conteniendo una dispersión coloidal acuosa con más de 500 sustancias, minerales, orgánicas, en estado sólido, líquido y gaseoso, de las cuales más de un centenar son volátiles y olorosas. El contenido de etanol en el vino oscila entre 90 y 150 mL por litro, dependiendo de la variedad de uva, tipo de vinificación y zona de producción, principalmente.

Aunque los beneficios saludables del vino han sido experimentados y reconocidos desde hace siglos, muchas de sus propiedades sólo han sido estudiadas con rigor y desveladas hace relativamente poco tiempo. Cada vez se conocen más efectos beneficiosos del vino en materia de nutrición y salud, especialmente los relacionados con el sistema cardiovascular. Esta actividad de prevención biológica del vino está justificada por su contenido, en concentraciones significativas, de diversos compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, resveratrol, etc.) que tienen una gran capacidad protectora de las lipoproteínas LDL frente a la oxidación.

En 1991 los Drs. Curt Ellison (Boston) y Serge Renaud (Lyon) presentaron un llamativo informe sobre lo que se ha venido llamando **“la paradoja francesa”**. Así, concluyeron que la menor mortalidad cardiovascular de los franceses se debía a su consumo diario de 300 a 400 mL de vino. En efecto, a pesar de tener iguales niveles de colesterol en sangre, la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares en Francia supone un tercio de la observada en EEUU. Esta revelación desencadenó gran interés en todo el mundo por confirmar el papel beneficioso del vino consumido regularmente y con moderación, y por describir su modo de acción en el organismo, por ejemplo, contribuyendo a evitar la aglutinación de las plaquetas sanguíneas. El consumo moderado reduce en un 20% el riesgo de cáncer, infarto de miocardio y accidentes vasculares cerebrales.

La mayoría de las sustancias beneficiosas se acumulan en el hollejo de la uva. El vino tinto es más conveniente que el vino blanco debido a su proceso de elaboración, ya que el mosto se maceira con la piel y las pepitas, permitiendo que las sustancias saludables que contiene la piel de la uva pasen al vino. Además, la uva negra es más rica en taninos. La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles.

En los últimos años, estudios científicos muestran que la ingesta comedida de vino es beneficiosa para nuestra salud, en especial para la prevención de enfermedades coronarias. Por supuesto, los beneficios para la salud derivados del consumo de vino en la dieta sólo se producen si hay un consumo prudente. Hábito que corresponde a un estilo de vida y a una cantidad recomendable por persona.

Asimismo, las bebidas alcohólicas elevan los niveles sanguíneos de colesterol HDL, conocido como “colesterol bueno”, porque remueve el exceso de colesterol del organismo, y disminuyen la tendencia de la sangre a coagular evitando la formación de trombos. Como ya se ha dicho, los compuestos antioxidantes del vino, son los responsables de disminuir la oxidación de las LDL (partículas de lipoproteínas de baja densidad o “colesterol malo”).

Este conjunto de observaciones, implica el redescubrimiento del valor medicinal de las bebidas alcohólicas que existía en la antigüedad, lo que no es una sorpresa para los estudiosos de

la historia del uso de alcohol. Antecedentes históricos y culturales, relacionan vino con salud y longevidad y existen numerosos testimonios que señalan que el vino, en especial en la cultura mediterránea, ha estado siempre asociado con efectos provechosos para la salud.

Recientemente, ha surgido un nuevo término asociado al vino: **“el enoturismo”**. El vino no se vende sólo, sino que, en gran medida, está asociado a la imagen del país o zona que lo produce. El beneficio del turismo se ha comprobado en varias experiencias internacionales, como es el caso del Napa Valley, situado en la costa de California en EEUU. Este valle es conocido mundialmente, no sólo por la excelente calidad de sus vinos, sino por la gran industria paralela dedicada al ocio que se mueve en torno a sus viñedos, no en vano recibe cerca de 8 millones de visitantes cada año. Otro ejemplo ilustrativo proviene de Australia que, gracias a una acertada campaña de promoción turística del país, evoca un ambiente de sol, playas, y ocio. Aquí, en España, numerosas bodegas han recuperado antiguas mansiones, palacios, castillos y edificios históricos, o bien modernos arquitectos diseñan bodegas llamativas por su arquitectura vanguardista, convirtiendo el mundo del vino en un foco de turismo, ocio y bienestar. A fin de cuentas y como certeramente afirmara el ilustre sir Alexander Fleming **“Es la penicilina la que cura a los humanos, pero el vino es el que los hace felices”**. Frase ligeramente modificada con motivo de su visita a las bodegas jerezanas en el año 1948, cuando después de degustar las bondades de estos vinos generosos dijo: **“Si la penicilina salva a los enfermos, el oloroso resucita a los moribundos”**.

AGRADECIMIENTO

A los compañeros que con su trabajo han forjado la pequeña historia del grupo de Microbiología Enológica de la UCA: Laureana Rebordinos, Juan José Mesa, Juan José Infante, Paco Deben, M^a Luisa Espinazo y a las últimas incorporaciones: Eugenia Muñoz y Paula Arместo. También a los Proyectos que lo han sostenido: 1FD97-0820-C04-04, J.A. ATT-03-2003, PETRI 95-0855 OP, así como la valiosa colaboración (OTRI) con las Bodegas Sandeman-Copri-mar y Barbadillo S.L.

BIBLIOGRAFÍA

- Fleet GH. 2008. Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, **8**: 979-995.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2001. Whole genome characterization of flor vellum wine yeast variants of *Saccharomyces cerevisiae* using DNA microarrays. *Yeast*, **18**-S1 (16-09). XXth International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology: Biotechnology and Industrial Applications.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM y Young ET. 2003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, **165**: 1745-1759.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L y Cantoral JM 1999. Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *Food Science and Technology*, **32**: 114-120.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA y Cantoral JM. 2000. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **5**: 15-21.
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Reboordinos L y Cantoral JM. 2010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J Appl Microbiol*, **108**: 1292-1302.
- Vaughan-Martini A y Martini A. 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol*, **14**:514-522.

LEVADURAS ENOLÓGICAS, VINO Y SALUD

Real Academia de Medicina de Zaragoza: 19 de Mayo de 2.011

Jesús Manuel Cantoral Fernández
Laboratorio de Microbiología Enológica. Facultades de Ciencias.
Universidad de Cádiz. 11.510 Puerto Real (Cádiz)
jesusmanuel.cantoral@uca.es

1. Breve historia de las levaduras, la vid y el vino

No existe acuerdo entre los investigadores acerca de los orígenes de la vid; así, para unos están en Asia Central, mientras para otros su origen es europeo, donde existían ya vides en las épocas del terciario y cuaternario. A lo largo de la prehistoria, la uva se consideraba una baya más; sin embargo, a partir del momento en que se empezó a cultivar la viña, la uva se destacó sobre todas las demás frutas productoras de bebidas fermentadas. Esta superioridad radica principalmente en tres propiedades: 1) la peculiar variedad del gusto del vino según las cepas de la vid, el terreno y el clima donde crece la viña, 2) la capacidad de envejecer el vino, modificarse, someterse a una crianza y prestarse a todo tipo de experiencias según las condiciones de conservación y 3) por último, la capacidad para viajar que presentan algunos vinos.

Las levaduras han formado parte de la civilización humana desde hace mucho tiempo. Las evidencias más antiguas datan del Neolítico hace 7.400-7.000 años, ya que se han encontrado restos de sales tartáricas y de resinas en algunos ejemplares de cerámica de aquella época. El ácido tartárico está presente solamente en las uvas en grandes cantidades y se ha postulado que la resina, concretamente del árbol *Pistacia*, se añadía como un conservante antibacteriano, suponiendo este hecho una fuerte evidencia de vinificación en esa época.

Se han encontrado también evidencias de vinos hechos en Egipto y Fenicia hacia el año 5.000 a.C. Investigadores actuales han demostrado que el ADN aislado de un supuesto jarro de vino de Abydos (3.150 a.C.) tenía una secuencia estrechamente relacionada con la secuencia de las levaduras modernas de *Sacharomyces cerevisiae*. La revelación del proceso de elaboración del vino se atribuye a Osiris, entre los egipcios, y a Dionisios, entre los griegos. Los hebreos afirman que fue Noé el primero en cultivar la vid y el vino; ya en el Libro del Eclesiástico se puede leer: **"ve, come alegremente tu pan y bebe con gusto tu vino"**. En todos ellos el vino estuvo presente en sus fiestas, ritos y costumbres.

Los chinos fueron buenos conocedores del arte de fermentar y los primeros en reglamentarlo. En el año 2.285 a.C. un hombre fue castigado severamente por mezclar vino de uva con licor de arroz. Hacia el año 2.000 a.C. el vino empezó a producirse en Grecia y Creta. Mas tarde los romanos extendieron la vinificación por todo el Mediterráneo y en el 500 a.C. el vino empezó a producirse en Sicilia, Italia, Francia, España, Portugal y norte de África. Los cultivos de vides también se extendieron por los Balcanes y los romanos los llevaron hacia Alemania y otras partes del norte de Europa.

Ya en el siglo XVI, la viticultura se practicaba ampliamente en Francia, siendo uno de los mayores productores. Pero tenía problemas, había que buscar la forma de evitar que la fermentación secundaria, producida en el vino de Champagne después de embotellado, explotara. El tapón hasta entonces utilizado estaba formado por tejido de lana y lacre. Fue el monje Dom Perignon (1.638-1.715) quien introdujo la utilización del corcho, técnica que había aprendido de los españoles, y una botella más gruesa. Con eso, la segunda fermentación pudo desarrollarse, dando origen al champagne. Fue entonces cuando el monje pronunció sus famosas palabras: "**¡Venid rápido hermanos, estoy bebiendo estrellas!**".

Los exploradores europeos durante el siglo XVI introdujeron la vid en el Nuevo Mundo y en el siglo XVII los colonizadores alemanes lo hicieron en el sur de África. Más tarde, en 1.697, se extendió la vinificación a California, y más de un siglo después a Australia y Nueva Zelanda.

En España no se sabe con seguridad el lugar en el que comenzaron a realizarse los primeros cultivos de vid y quiénes fueron los que introdujeron las técnicas de elaboración del vino. Diversas fuentes apuntan que los primeros viñedos se habrían asentado en el litoral sudoccidental andaluz constituyendo el punto de entrada y el lugar de las viñas más antiguas de España. Esta teoría está avalada por la presencia de los fenicios en la Península hace unos 3.000 años aproximadamente, quienes fundaron un puerto en el sudoeste al que llamaron Gades (Cádiz, en la actualidad). Posteriormente se trasladaron tierra adentro, en cuyas montañas circundantes plantaron vides. Concretamente en las ruinas del Castillo de Doña Blanca (El Puerto de Santa María) se han encontrado restos de lo que podrían haber sido lagares de elaboración de vino que datan del siglo IV a.C.

El vino que se producía en esta región llamada Ceret (Jerez) tenía una alta graduación alcohólica, así podía resistir mejor el transporte por el Mediterráneo. A estos vinos se les adicionaba agua para su consumo y presentaban muchas impurezas porque la fermentación era imperfecta, razón por la que se les añadía ámbar, pez, resinas, etc. Hacia el año 138 a.C. comenzó la dominación romana, iniciándose una corriente comercial muy importante de productos de esta región hacia la metrópoli. En el año 711 dio comienzo la dominación árabe, que en el sur de España duró más de cinco siglos. Durante todo ese tiempo, la zona sudoccidental siguió siendo un importante centro de elaboración de vinos, a pesar de la prohibición coránica. La producción de pasas y la obtención de alcohol con fines medicinales actuaban en cierta forma como excusas para el mantenimiento del cultivo de la vid y la elaboración de vinos, hasta que la conquista por Alfonso X el Sabio en 1.264 supuso un gran cambio para los vinos de esta región.

La elaboración del vino fue probablemente la primera experiencia del hombre con las levaduras, en la que se dieron cuenta de que solamente era necesario prensar las uvas y dejar el zumo (mosto) fermentar ya que las células de levaduras están supuestamente en la superficie de las uvas, preparadas para llevar a cabo la fermentación. Así lo recogen los Drs. Vaughan y Martini: **«Me gustaría imaginar el momento, perdido en la noche de los tiempos, cuando un desconocido morador de cuevas, quizás un oscuro benefactor del fructífero reino de Mesopotamia, felizmente descubrió que los zumos de frutas son mucho más sabrosos si se dejan reposar un tiempo. Quizás al mismo tiempo, algunos ancestros fermentadores desconocidos de *Saccharomyces cerevisiae* hicieron que su fortuita supervivencia fuera mejorada por la asociación**

con el hombre, y decidieron dejar al inseguro medioambiente y convertirse en el primer microorganismo domesticado (A. Vaughan y A. Martini, 1.995).

Pero el concepto de levadura como microorganismo responsable de llevar a cabo la fermentación no fue desarrollado hasta 7.000 años más tarde con los trabajos de Pasteur (1.872) y otros investigadores, que revelaron por primera vez el mundo oculto de la actividad microbiana durante la fermentación. Con el conocimiento de que las levaduras eran las responsables de la biotransformación del mosto (compuesto principalmente por glucosa y fructosa) en alcohol y dióxido de carbono, los vinificadores pudieron controlar el proceso desde el viñedo hasta la planta de embotellamiento.

Más tarde, con el desarrollo de las técnicas microbiológicas las levaduras con características apropiadas fueron seleccionadas y en 1.890, Müller-Thurgau introdujo el concepto fermentación inoculada con cultivos puros de levaduras. Como resultado, la calidad y la cantidad de vino producido fueron enormemente mejoradas.

Los primeros trabajos de genética con levaduras llegaron a mediados de la década 1.930-1.940, introduciéndose cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el laboratorio. Desde entonces, el mantenimiento de cultivos en los laboratorios de investigación ha dado lugar a lo que hoy conocemos como cepas de laboratorio. La mayoría de ellas derivan de un aislamiento realizado por Emil Mraz a partir de higos en descomposición en Merced, California, en 1.938. Dicho aislamiento, conocido como EM93, es una levadura *S. cerevisiae* diploide, donadora de al menos el 85% del genoma de la cepa haploide S288C secuenciado completamente en el año 1.996.

En el año 1.993 la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino, con su sede en París) en su 73ª Asamblea celebrada en San Francisco creó la Subcomisión Vino, Nutrición y Salud que comprende estos tres grupos de expertos:

- Vino y Salud: para estudiar los aspectos fisiológicos del consumo de vino y salud.
- Aspectos Sociales del Consumo de Vino: para evaluar la conducta del consumo del vino en la sociedad.
- Seguridad Alimentaria: que estudia la seguridad alimentaria para proteger al consumidor.

2. Biología de las levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares. Su nombre procede del verbo latino *levare* (levantar), debido al efecto característico producido en algunos sustratos sobre los que actúan, como por ejemplo la masa del pan. Pueden ser clasificadas dentro de dos grupos filogenéticos: levaduras ascomicetos y levaduras basidiomicetos (en ambos casos se dan las formas teleomórfica y anamórfica). La forma teleomórfica es la forma imperfecta de la levadura o forma asexual, mientras que la forma anamórfica es la forma perfecta o sexual. La especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de los ascomicetos, que se caracterizan por encontrarse las esporas sexuales o ascosporas en el interior de una bolsa o asca.

Las células de *S. cerevisiae* tienen un ciclo de vida complejo, teniendo la capacidad para reproducirse como haploides o diploides y de formar cigotas entre células haploides. El tipo de reproducción es normalmente por brote ó gemación mediante mitosis, que es un

tipo de reproducción asexual. Bajo privación de nutrientes, durante la fase estacionaria, se induce la esporulación o reproducción sexual. Tras la meiosis, en una célula diploide se generan cuatro esporas haploides encapsuladas en el asca (ascosporas). Las esporas libres pueden entrar en un ciclo vegetativo haploide o bien formar un cigoto diploide mediante conjugación.

El material genético de las levaduras se reparte entre el ADN nuclear, mitocondrial y plásmidos. Además, pueden aparecer en el citoplasma dos moléculas de doble cadena de ARN que confieren a la levadura el llamado òfactor killerö. El ADN cromosómico de una célula diploide de *S. cerevisiae* constituye alrededor del 80% del total y tiene un tamaño estimado de 2×10^4 kilobases (kb) que se reparte entre 32 cromosomas lineales (16 pares de cromosomas) de tamaños que oscilan entre aproximadamente 200-2.200 kb. El cromosoma de mayor tamaño es el XII, siendo además el más variable debido a que contiene el ADN ribosómico, es decir, genes que codifican para las distintas subunidades de ARN ribosómico, 25S, 18S, 5.8S y 5S, que forman parte de los ribosomas. Estos genes ribosómicos, se encuentran repetidos en tándem alrededor de 100 veces en dicho cromosoma.

El ADN mitocondrial está constituido por un solo cromosoma circular cerrado de doble cadena de aproximadamente 75-85 kb. Como ocurre con la mayor parte de las mitocondrias, en el caso de las levaduras existen muy pocas proteínas necesarias para las mitocondrias y que sean codificadas por ellas. Existe una clase de mutantes mitocondriales denominados *petite*, en los que la mayor parte de la síntesis de proteínas mitocondriales está abolida debido a largas deleciones en su ADN. Tales mitocondrias no son funcionales y las levaduras que las contienen son incapaces de realizar la respiración aunque pueden crecer anaeróbicamente (fermentación). En la especie *S. cerevisiae* se ha puesto de manifiesto la existencia de un plásmido de ADN bicatenario circular de 2 µm de tamaño que contiene aproximadamente 6,3 kb y que se presenta en un número entre 60 y 100 copias.

En el citoplasma, pueden aparecer dos moléculas lineales de doble cadena de ARN que están relacionadas con una toxina o òfactor killerö. Estas dos moléculas de ARN son de diferente peso molecular y se denominan L y M. El tamaño del genoma de L es de 4.5 kb, mientras que el segmento M varía entre 1.3 y 2 kb. M codifica para dos tipos de proteínas, una toxina y un factor inmunitario, y L está relacionada con la síntesis de la cubierta proteica tipo vírico que envuelve ambas moléculas.

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco tipos de toxinas killer, K_1 , K_2 , K_3 , K_{28} y K_{3GR1} según la agresividad de éstas (K_1 la de mayor agresividad). Las cepas killer aisladas de la fermentación son generalmente del tipo K_2 y K_{28} , debido probablemente a que el bajo pH óptimo para la actividad de estas toxinas se encuentra en el mosto (pH 2.8-3.8). Las levaduras vínicas silvestres (indígenas) con fenotipo killer están muy extendidas por muchas regiones del mundo. La presencia de estas levaduras en el mosto y posteriormente en la fermentación puede significar un problema en las fermentaciones que son inoculadas con levaduras seleccionadas, ya que si el inóculo está preparado con levaduras sensibles, como son muchas de las levaduras comerciales, pueden llegar a ser suprimidas por las cepas killer durante la fermentación. Como consecuencia se pueden producir fermentaciones lentas o incluso paradas, y aumentar la acidez volátil, la producción de H_2S y aromas indeseables.

3. Procesos de vinificación. Selección de levaduras

La fermentación alcohólica comienza en los depósitos de fermentación, una vez que el mosto, obtenido tras el prensado de las uvas, se clarifica y se corrige adicionando ácido tartárico. La transformación del mosto en vino es un proceso microbiológico muy complejo en el que están implicadas distintas especies de levaduras, las cuales metabolizan el azúcar del mosto generando etanol y dióxido de carbono. La reacción química más simple de la fermentación fue la propuesta por Gay-Lussac, aunque el proceso es mucho más complejo y en él están implicadas al menos 12 reacciones distintas y diversos productos secundarios. Tras la fermentación se obtienen vinos con una graduación de 11° en grado alcohólico.

Durante la fermentación espontánea de los mostos se produce una sustitución secuencial de las distintas especies de levaduras, de manera que se pueden diferenciar tres fases durante el proceso. En la primera fase cuando el grado alcohólico es bajo predominan levaduras de diversos géneros como *Kloeckera*, *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*, *Rodotorula*, *Kluyveromyces*, etc. Es esa diversidad de cepas de levaduras la que aporta al vino la complejidad y tipicidad en las características sensoriales. Tales levaduras aseguran el inicio de la fermentación pero a medida que ésta avanza y aumenta el grado alcohólico son desplazadas por otras pertenecientes al género *Saccharomyces*, siendo las cepas de la especie *S. cerevisiae* las principales responsables de la fermentación.

Las fermentaciones espontáneas pueden aportar alta calidad a los vinos con un carácter típico de la región donde se producen, proporcionándoles así diferenciación y un valor comercial añadido (Fleet, 2.008). El inconveniente de estos procesos naturales es que son impredecibles, pudiéndose producir inicios tardíos, paradas o fermentaciones lentas o proliferación de levaduras contaminantes u otras indígenas que no aporten al vino las características deseadas. Aún así, en numerosas bodegas tradicionales europeas se siguen realizando fermentaciones espontáneas utilizando una adecuada combinación de conocimientos artesanales y tecnológicos que aseguran el éxito del proceso. Una alternativa a las fermentaciones espontáneas son las fermentaciones inoculadas a partir de cultivos iniciadores preparados con levaduras seleccionadas. Normalmente estas levaduras están disponibles en el mercado en forma de concentrados secos activos (levaduras secas activas, LSA) y su uso en la mayoría de las bodegas se ha convertido en una práctica habitual para asegurar la reproducibilidad del producto final año tras año. Sin embargo, la utilización de estas levaduras, normalmente foráneas de la zona productora, presenta algunos inconvenientes como es la pérdida en la tipicidad de los vinos.

Todos estos aspectos están proporcionando nuevos retos para mejorar las cualidades y valor de los vinos obtenidos con fermentaciones inoculadas. Uno de estos retos es la utilización de levaduras autóctonas seleccionadas (LAS) en una zona productora determinada, y otro es la utilización de cultivos iniciadores mixtos como alternativa al uso de cultivos puros. En nuestro laboratorio hemos llevado a cabo la selección de levaduras autóctonas para la mejora de un vino blanco elaborado en la Tierra de Cádiz. El estudio implicó, primero caracterizar la diversidad de cepas presentes en las fermentación espontánea, para tener un mayor conocimiento de las cepas más representativas del proceso y posteriormente evaluar las características enológicas de esas cepas en condiciones de laboratorio.

Las técnicas moleculares que permiten la caracterización de levaduras industriales y discriminan entre las distintas cepas son habitualmente la electroforesis en campo pulsante (PFGE) (**Figura 1**) y el análisis del polimorfismo para la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADN mitocondrial. La primera técnica analiza el número y tamaño de los cromosomas de las levaduras y la segunda mide variaciones en la secuencia del ADN mitocondrial afectado por los sitios de corte de determinadas endonucleasas de restricción (Rodríguez *et al.*, 2.011).

Tras seleccionar tres levaduras autóctonas y probarlas en condiciones industriales en varias campañas, comprobamos, mediante cariotipo electroforético, que no todas fueron buenas competidoras en las fermentaciones y solo una de ellas se encontraba de forma mayoritaria en las mismas, de manera que posteriormente solo utilizamos esta levadura para inocular las fermentaciones. En los años en los que esta levadura fue predominante, los vinos obtenidos fueron de mejor calidad. Para asegurar el buen desarrollo de la levadura inoculada durante el proceso, es necesario que el cultivo iniciador esté bien adaptado a las condiciones finales de fermentación. Uno de los criterios a tener en cuenta en la preparación del inóculo iniciador sería, por ejemplo, esperar a que tuviese un contenido en azúcar bajo, de esta forma al adicionarlo al mosto, el medio quedaría parcialmente alcoholizado evitando así el desarrollo de levaduras no deseadas que normalmente están presentes en el mosto (Rodríguez *et al.*, 2.010).

4. Singularidad de las Levaduras de ñvelo de florö de los vinos de õcrianza biológicaö (finos y manzanillas)

Las levaduras de ñvelo de florö son las responsables del proceso de õcrianza biológicaö (**Figura 2**) de los vinos producidos en el marco de Jerez y Sanlúcar de Barrameda en la provincia de Cádiz y de Montilla-Moriles en la de Córdoba, así como en otras regiones vitivinícolas del mundo, como Sudáfrica, California, Cerdeña o Hungría. Estas singulares levaduras, constituyen un caso especial de levaduras vónicas que aparecen al final de la fermentación alcohólica del vino, formando un õbiofilmö en la superficie que se denomina ñvelo de florö ya que aparecen de manera especial en primavera (periodo de la floración). El ñvelo de florö aparece de forma espontánea como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras desarrollarse en un medio en el que están obligadas a asimilar etanol y glicerol mediante respiración, que son las principales fuentes de carbono una vez agotados los azúcares fermentables. Estas levaduras son las únicas capaces de desarrollarse en el vino tras el proceso de encabezado (adición de alcohol vónico hasta llegar a una concentración de etanol del 15-15.5 %). Estas levaduras desempeñan dos funciones principalmente, contribuir con su metabolismo a la peculiar característica de este tipo de vinos, y, aislarlo del aire evitando que se oxide.

La crianza del fino en el Marco de Jerez, tiene un primer periodo de envejecimiento estático en botas o depósitos (sobretablas), tras lo cual se somete al proceso de envejecimiento dinámico mediante el sistema de criaderas y solera. Este sistema consiste en una serie de filas de botas de roble (600 litros de capacidad), cada una de las cuales contiene vino del mismo tipo y con el mismo grado de crianza (escala). Las botas no se llenan por completo, se deja vacía una sexta parte de su capacidad, lo que genera una amplia superficie y una cámara de aire que permite el desarrollo de estas levaduras filmógenas en dicha superficie. En la fila más próxima al suelo está el vino más viejo

(1ª escala o solera), de donde se extrae el vino (saca) para el embotellado. Las botas de la solera se rellenan (rocío) con vino de la fila superior (2ª escala o 1ª criadera), que se rocían a su vez con vino de la siguiente (3ª escala) y así sucesivamente con una serie de escalas hasta llegar a las sobretablas, que se rellenan con vino nuevo (15% etanol) (**Figura 3**). Entre las diversas transformaciones de interés enológico que las levaduras de flor producen sobre la composición del vino destaca la liberación de acetaldehído, que es producido directamente mediante oxidación de etanol como primer paso para su asimilación. El acetaldehído aporta al vino el olor punzante y característico del fino, por lo que se considera su concentración en el vino como un índice del grado de crianza. Además, el acetaldehído es punto de partida de numerosas reacciones que se producen durante el envejecimiento y que contribuirán decisivamente al buqué y color que definen a los finos.

Se han realizado múltiples trabajos para caracterizar las levaduras de velo de flor, en los cuales se pone de manifiesto que en las barricas de crianza aparecen casi exclusivamente levaduras de la especie *S. cerevisiae*, aunque se pueden diferenciar cuatro grupos según pruebas de asimilación y fermentación de azúcares que se catalogan como razas fisiológicas: *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y *rouxii*. El desarrollo de las técnicas de Biología Molecular ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras, concluyendo que estos grupos son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estos organismos a condiciones industriales tan específicas. Nuestro grupo ha llevado a cabo una amplia caracterización de estas levaduras en un sistema dinámico de envejecimiento del vino de òcriaderas y soleraõ utilizando las técnicas moleculares de PFGE y los RFLP-ADNmt, descritas en el apartado anterior, llegándose a establecer una correspondencia entre un determinado tipo de levaduras presentes en el velo y el estado de envejecimiento del vino (Mesa *et al.*, 1.999, 2.000)

Las levaduras de velo de flor tienen una presencia constante en la bodega desde que se comenzó la crianza biológica hace unos 200 años, y se encuentran sometidas a una fortísima presión de selección que incluye su crecimiento en presencia de grandes cantidades de etanol (15-15.5%) y acetaldehído (200-800 mg/L), dos inhibidores del crecimiento celular con demostrada actividad mutagénica. Por ello, estas levaduras son de especial interés para la realización de estudios de evolución cromosómica. En nuestro laboratorio hemos realizado un estudio novedoso del polimorfismo cromosómico al comparar dos cepas de levaduras industriales mediante el uso de òchipsõ de ADN (òmicroarraysõ o micromatrices) de *S. cerevisiae*, que ha puesto de manifiesto los mecanismos específicos de recombinación y las secuencias afectadas por éstos, que posibilitan la evolución de estas cepas industriales y su adaptación al ambiente (Infante *et al.*, 2003). La hibridación comparativa del genoma entre estas dos cepas de velo de flor puso de manifiesto que ambas poseen amplificaciones de grandes regiones genómicas. Las amplificaciones responden a fenómenos de reorganización cromosómica mediados por puntos calientes de recombinación estratégicamente situados en el genoma. Además, los òampliconesõ contienen genes clave para la adaptación de las levaduras de flor al ambiente extremo en el que se desarrollan, y muchos de ellos se encontraron sobreexpresados al comparar el transcriptoma de dichas cepas con cepas de laboratorio no adaptadas al ambiente industrial.

Estos resultados permitieron proponer que la plasticidad del genoma de las levaduras de flor responde al siguiente mecanismo de evolución adaptativa: agentes químicos como el etanol y el acetaldehído presentes en altas concentraciones en el medio provocan roturas de la doble hélice de ADN en puntos sensibles del genoma de las levaduras, la reparación de dichas roturas por mecanismos alternativos a la recombinación homóloga genera grandes reorganizaciones cromosómicas que dan lugar, tras la división mitótica, a los fenómenos de amplificación que permiten la aparición de cepas mejor adaptadas al ambiente. La caracterización de los mecanismos de evolución adaptativa del genoma de estas levaduras de velo de flor fue la primera vez que se realiza en levaduras industriales y ha proporcionado un modelo de evolución genómico global íntimamente ligado a la influencia ambiental que puede ayudar a comprender los modelos de evolución actuales (Infante *et al.*, 2.003).

5. Vino y salud. Enoturismo

Hablar de levaduras enológicas conlleva tratar, al menos escuetamente, algunos aspectos interesantes sobre el vino y la salud. A fin de cuentas como ya dijo el Dr. Gregorio Marañón **“Vivir, es defenderse de la vida que nos va matando. En esta lucha, la eficacia del vino es incalculable.”**

El vino es una bebida alcohólica que se obtiene del zumo de la uva exprimido y fermentado. Entre sus componentes podemos destacar la presencia de sales minerales y oligoelementos de forma asimilables como hierro, cobre, magnesio, zinc, litio, calcio y potasio; así como vitaminas (C, P, B₂ y B₃). La composición química y el balance de elementos en el vino particularmente vitaminas y aminoácidos, es aproximada al balance de los mismos en el cuerpo humano. Así lo recoge el Dr. Boigey: **“El vino natural es la más encomiable de las bebidas alcoholizadas. Contiene un maravilloso complejo de sustancias útiles y bien equilibradas que nada puede reemplazar”**.

Se podría definir el vino, de manera sencilla, como una solución hidroalcohólica ácida (3, 4 unidades de pH), conteniendo una dispersión coloidal acuosa, de más de 500 sustancias, minerales, orgánicas, en estado sólido, líquido y gaseoso, de las cuales más de un centenar son volátiles y olorosas. El contenido de etanol en el vino oscila entre 90 y 150 mL por litro, dependiendo de la variedad de uva, tipo de vinificación y zona de producción, principalmente. El vino puede considerarse como un alimento más dentro de la nutrición, la necesidad energética del hombre es de 10.000 kJ ó 2.500 kcal/día; un litro de vino (12%) aporta 3.500 Kj, (1/3 de su necesidad).

Entre las múltiples propiedades beneficiosas del vino destacamos su acción: tranquilizante, vasodilatadora, tónico, protectora de paredes arteriales, antioxidante, estimulante de la secreción gástrica y jugos biliares, hipolipidémica, estimulante de la producción de calcitonina, efecto beneficioso sobre enfermedades cardiovasculares, reductora del riesgo y la frecuencia de la demencia senil, etc.

Aunque los beneficios saludables del vino han sido experimentados y reconocidos desde hace siglos, tal y como lo expresaba Hipócrates (460-377 a.C.): **“el vino es cosa admirablemente apropiada al hombre, tanto en el estado de salud como en el de enfermedad, si se le administra oportunamente y con justa medida, según la**

constitución individual"; sin embargo, muchas de sus propiedades no han sido estudiadas con rigor y conocidas hasta hace relativamente poco tiempo, y cada vez son más los efectos beneficiosos que conocemos del vino en materia de nutrición y salud, especialmente los relacionados con el sistema cardiovascular. Esta actividad de prevención biológica del vino está justificada por la presencia en él, a concentraciones significativas, de diversos compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, resveratrol, etc.) que tienen una gran capacidad de proteger a las lipoproteínas LDL de la oxidación.

En el año 1.991 los Drs. Curt Ellison (Boston) y Serge Renaud (Lyon) presentaron sus resultados sobre lo que se ha venido llamado **õla paradoja francesaö**. Así, concluyeron que la menor mortalidad cardiovascular de los franceses se debía a su consumo diario de 300 a 400 mL de vino. En efecto, a pesar de tener iguales niveles de colesterol en la sangre, la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares en Francia es un tercio de la observada en EEUU. Esta revelación desencadenó en todo el mundo gran interés por confirmar el papel beneficioso del vino consumido regularmente y con moderación, y por describir el modo de cómo esto ocurre en el organismo, por ejemplo, contribuyendo a evitar que las plaquetas sanguíneas se aglutinen. El consumo moderado reduce en un 20% el riesgo de cáncer, infarto de miocardio y accidentes vasculares cerebrales.

La mayoría de las sustancias beneficiosas se acumulan en el hollejo de la uva. El vino tinto es más beneficioso que el vino blanco debido a su proceso de elaboración, el mosto se macera con la piel y con las pepitas, permitiendo que las sustancias beneficiosas que contiene la piel de la uva pasen al vino. Además, la uva negra es más rica en taninos. La capacidad antioxidante del vino está directamente relacionada con su contenido en polifenoles.

En los últimos años han surgido una serie de estudios científicos que muestran que beber moderadamente es beneficioso para nuestra salud, en especial para la prevención de enfermedades coronarias. Los beneficios para la salud del consumo de vino en la dieta surgen sólo cuando esta bebida es consumida con moderación. Esto corresponde a un estilo de vida y a una cantidad recomendable para cada persona.

Las bebidas alcohólicas, elevan los niveles sanguíneos de colesterol HDL, conocido como el colesterol "bueno" porque remueve el exceso de colesterol del organismo, y disminuyen la tendencia de la sangre a coagular evitando la formación de trombos. Además, los compuestos antioxidantes son los responsables de disminuir la oxidación de las LDL (partículas de lipoproteínas de baja densidad o colesterol "malo").

Esto implica un redescubrimiento del valor medicinal de las bebidas alcohólicas que existía en la antigüedad, lo que no es una sorpresa para los que han estudiado la historia del uso del alcohol. Antecedentes históricos y culturales relacionan vino con salud y longevidad y existen numerosos testimonios que señalan que el vino, en especial en la cultura mediterránea, ha estado siempre asociado con beneficios para la salud.

Pero el vino, tampoco está exento de efectos negativos; así, además de una ingesta no adecuada, que puede terminar en alcoholismo, se han descrito la presencia de varios compuestos perjudiciales, bien por sus características o por la intolerancia que puede provocar en algunos consumidores, como las aminas, las ocratoxinas o los anisoles.

Enología y Enoturismo

Recientemente ha surgido un nuevo término asociado al vino: **õel enoturismoõ**. El vino no se vende solo, sino que en gran medida está asociado a la imagen del país o zona que lo produce. El beneficio del turismo se ha comprobado en varias experiencias internacionales, como es el caso del Napa Valley, en EEUU en la costa de California, conocido mundialmente, no solo por la excelente calidad de sus vinos, sino por la gran industria paralela dedicada al ocio que se mueve en torno a sus viñedos, no en vano recibe cerca de 8 millones de visitantes cada año. Otro ejemplo es Australia que, gracias a una acertada campaña de imagen del país, evoca un ambiente de sol, playas, y ocio. Numerosas bodegas de nuestro país recuperan antiguas mansiones, monasterios, palacios, castillos y edificios históricos, o bien modernos arquitectos diseñan bodegas llamativas por su arquitectura vanguardista convirtiendo el mundo del vino en un foco de turismo, ocio y bienestar. A fin de cuentas como ya dijo sir Alexander Fleming **"Es la penicilina la que cura a los humanos, pero el vino es el que los hace felices"**. Frase ligeramente modificada con motivo de su visita a las bodegas jerezanas en el año 1.948, cuando después de degustar las bondades de estos vinos generosos dijo: **õSi la penicilina salva a los enfermos, el oloroso resucita a los moribundosõ**.

Agradecimiento:

A los compañeros que con su trabajo han forjado la pequeña historia del grupo de Microbiología Enológica: Laureana Rebordinos, Juanjo José Mesa, Juanjo José Infante, M^a Esther Rodríguez, Paco Deben, M^a Luisa Espinazo y Eugenia Muñoz. También a los Proyectos que lo han sostenido: 1FD97-0668-C06-02, 1FD97-0820-C04-04, Junta Andalucía ATT-03-2003, PETRI 95-0855, CDTI IDI-20101408, así como la valiosa colaboración con varias Bodegas a través de proyectos OTRI.

Bibliografía

Fleet, G.H. 2.008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research, 8: 979-995.

Infante, J.J., Dombek, K.M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M., Young, E.T. 2.003. Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. Genetics, 165: 1745-1759.

Mesa, J.J., Infante, J.J., Rebordinos, L., Cantoral, J.M. 1.999. Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. Food Science and Technology, 32: 114-120.

Mesa, J.J., Infante, J.J., Rebordinos, L., Sánchez, J.A., Cantoral, J.M. 2.000. Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. American Journal of Enology and Viticulture, 5: 15-21.

Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Domínguez, M., Reboordinos, L., Cantoral, J.M. 2.010. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial

fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1292-1302.

Rodríguez, M.E., Infante, J.J., Molina, M., Reboordinos, L., Cantoral, J.M. 2011. Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 145: 331-335.

Vaughan-Martini, A.; Martini, A., 1995. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*, 14:514-522.

1. Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

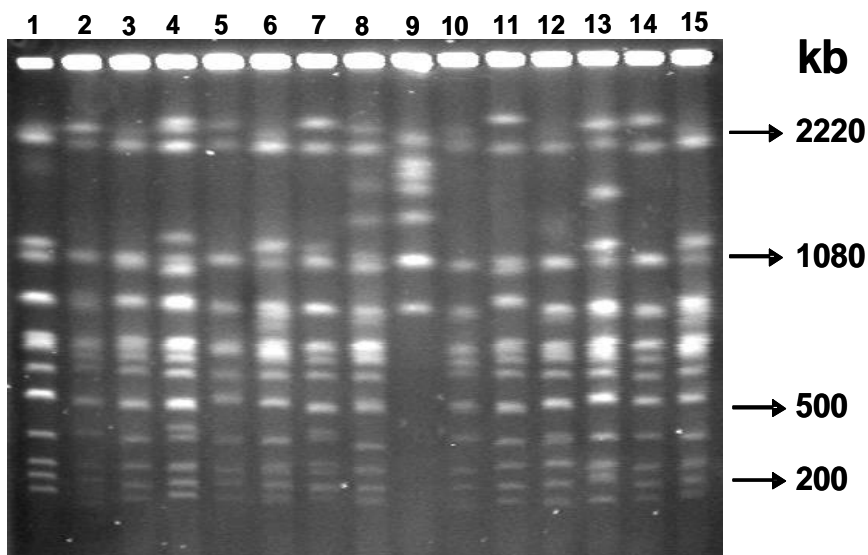


Figura 1. Cariotipo electroforético de 15 cepas de levaduras autóctonas aisladas de la fermentación espontánea en la cosecha del año 1999. El aislamiento 9 corresponde a una levadura no-*Saccharomyces*, detectada por no presentar las cuatro bandas típicas de *S. cerevisiae* presentes por debajo de 500 kb en el gel de electroforesis.

2. Proceso de Vinificación

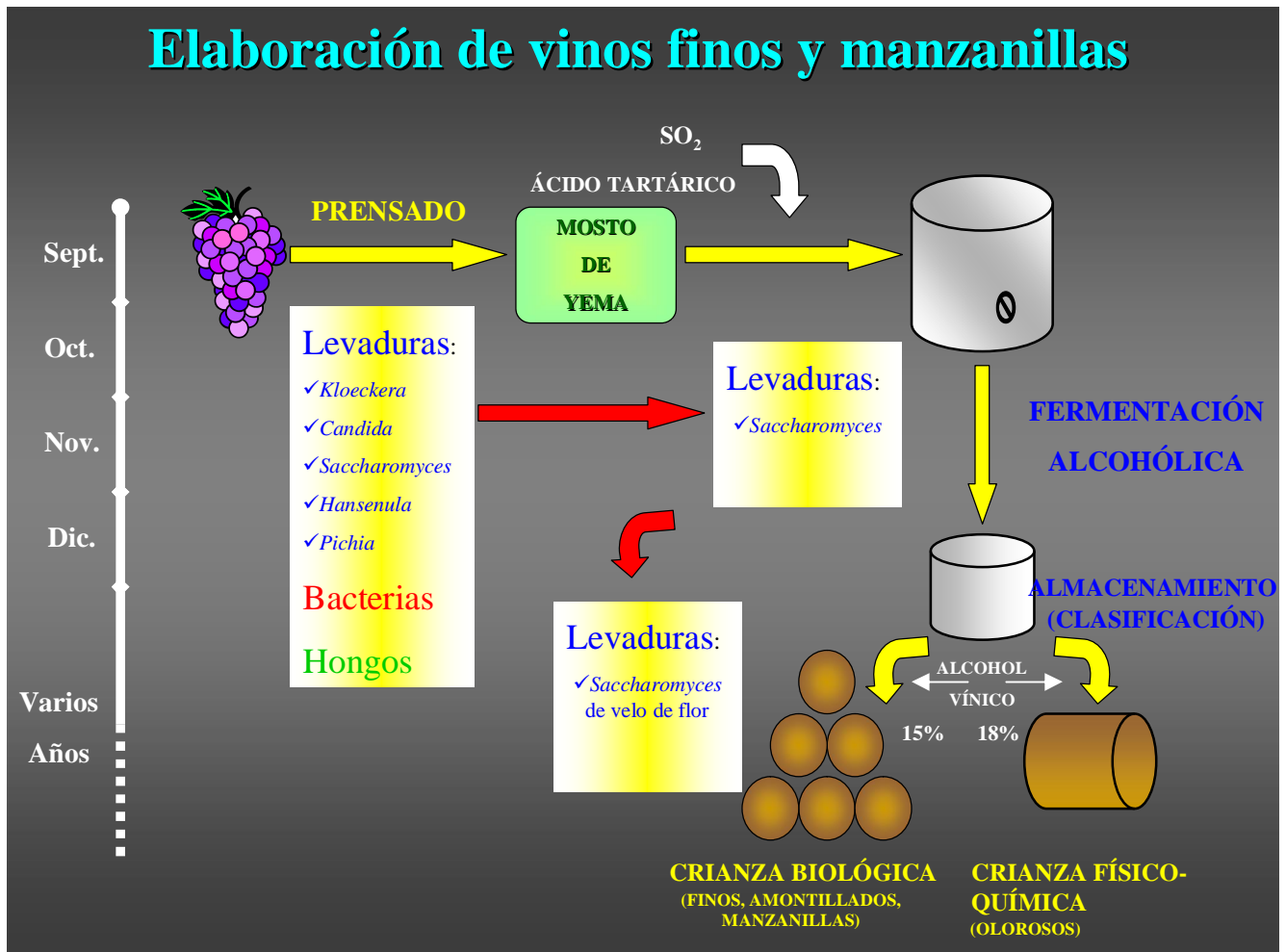


Figura 2. Proceso de vinificación representando el conjunto de operaciones que se realizan desde la recogida de la uva en el viñedo hasta la obtención de los distintos tipos de vinos. Tras la Fermentación Alcohólica, se obtienen vinos jóvenes con 11° alcohólico (v/v). La adición de alcohol a estos vinos hasta obtener 18° permite obtener los vinos olorosos bajo crianza físico-química; mientras que la adición de alcohol hasta 14-15° permite la obtención de finos y manzanillas bajo crianza biológica.

3. Crianza Biológica

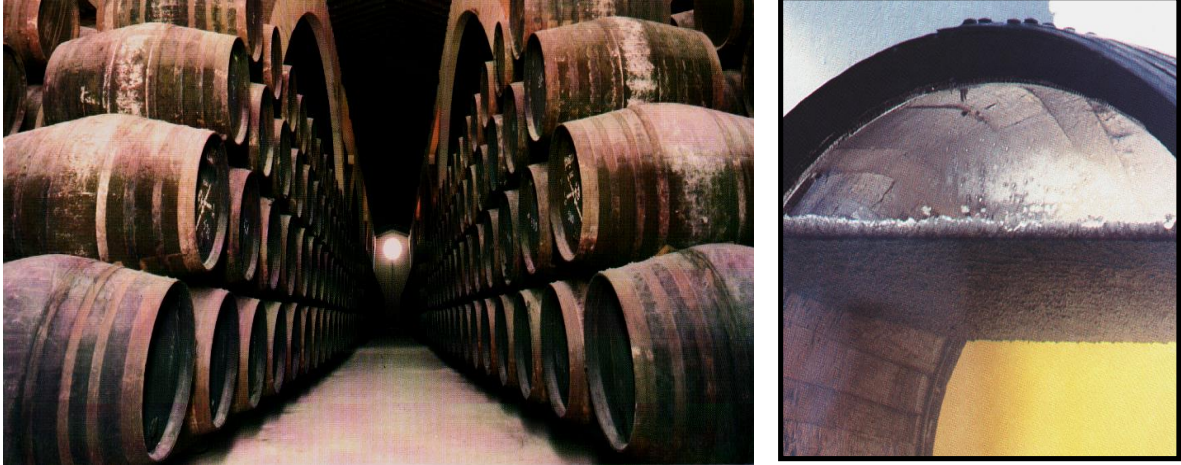


Figura 3. *Izquierda:* Dinámica del proceso de envejecimiento del vino fino mediante criaderas y solera (la más cercana al suelo). *Derecha:* Aspecto de la película (biofilm) de levaduras de velo de flor formada en la superficie del vino durante la crianza biológica. Estas levaduras tienen dos funciones principales: 1) contribuir con su metabolismo a las características organolépticas de los finos y manzanillas y 2) aislar al vino del aire evitando así que se oxide.

Genome-Wide Amplifications Caused by Chromosomal Rearrangements Play a Major Role in the Adaptive Evolution of Natural Yeast

Juan J. Infante,^{*,1} Kenneth M. Dombek,[†] Laureana Rebordinos,^{*} Jesús M. Cantoral^{*} and Elton T. Young^{†,2}

^{*}Laboratorio de Microbiología y Genética, CASEM, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, Spain and

[†]Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington 98195-7350

Manuscript received June 12, 2003

Accepted for publication September 4, 2003

ABSTRACT

The relative importance of gross chromosomal rearrangements to adaptive evolution has not been precisely defined. The *Saccharomyces cerevisiae* *flor* yeast strains offer significant advantages for the study of molecular evolution since they have recently evolved to a high degree of specialization in a very restrictive environment. Using DNA microarray technology, we have compared the genomes of two prominent variants of *S. cerevisiae* *flor* yeast strains. The strains differ from one another in the DNA copy number of 116 genomic regions that comprise 38% of the genome. In most cases, these regions are amplicons flanked by repeated sequences or other recombination hotspots previously described as regions where double-strand breaks occur. The presence of genes that confer specific characteristics to the *flor* yeast within the amplicons supports the role of chromosomal rearrangements as a major mechanism of adaptive evolution in *S. cerevisiae*. We propose that nonallelic interactions are enhanced by ethanol- and acetaldehyde-induced double-strand breaks in the chromosomal DNA, which are repaired by pathways that yield gross chromosomal rearrangements. This mechanism of chromosomal evolution could also account for the sexual isolation shown among the *flor* yeast.

GENETIC research on industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains has yielded data indicating that these yeasts are capable of rapidly adapting to the special environmental conditions that are found in industrial processes (MORTIMER 2000). This characteristic makes industrial yeast particularly useful for genomic studies on adaptive evolution. Moreover, the acquisition of very specialized phenotypes by individual strains as a result of the high selective pressure (ADAMS *et al.* 1992; BENÍTEZ *et al.* 1996) and the extremely low level of both sporulation frequency and fertility described between different strains (GUIJO *et al.* 1997; BUDRONI *et al.* 2000; PUIG *et al.* 2000) indicate that industrial yeast provides an excellent opportunity for studies on processes related to speciation. The characterization of chromosomal translocations in the genomes of laboratory strains that represent six of the seven closely related species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex identified one non-reciprocal and nine reciprocal translocations, involving 13 of the 16 *Saccharomyces* sp. chromosomes (FISCHER *et al.* 2000). The relative importance of such chromosomal rearrangements among the potential mechanisms of genome evolution and speciation has been recently highlighted in a study by DELNERI *et al.* (2003). They

engineered the genome of a *S. cerevisiae* strain to make it colinear with that of two different *S. mikatae* strains, notably increasing the proportion of viable, albeit aneuploid spores after interspecies crosses. The widespread aneuploidy observed in the fertile hybrids, which resulted from these colinear interspecific crosses, has been proposed to enhance the sexual isolation needed for the genetic divergence between different strains. These studies have also shown that the rate of formation of chromosomal rearrangements in *Saccharomyces* is not constant. The authors suggest that bursts of translocations have occurred at given points during yeast genome evolution (FISCHER *et al.* 2000). As an explanation accounting for this observation, they propose that, during adaptation to a new environment, a mutator strain defective in a system controlling the level of ectopic recombination (leading to a high level of chromosomal rearrangements) is selected, as has been observed in the experimental evolution of *Escherichia coli* (SNEGOWSKI *et al.* 1997).

A common characteristic of industrial yeast is highly polymorphic chromosomes (CODÓN *et al.* 1998). Indeed, polymorphisms in electrophoretic chromosomal patterns have been used to classify industrial strains that belong to the same species (MESA *et al.* 1999, 2000). Widespread mutations affecting the genetic constitution of wine, baker's, or brewer's yeasts have been reported (CODÓN *et al.* 1998). These include (i) aneuploidy, (ii) polyploidy, (iii) amplification and deletion of chromosomal regions or single genes, and (iv) the

¹Present address: Department of Biochemistry, Box 357350, University of Washington, Seattle, WA 98195-7350.

²Corresponding author: Department of Biochemistry, Box 357350, 1959 NE Pacific Ave., University of Washington, Seattle, WA 98195-7350. E-mail: ety@u.washington.edu

presence of hybrid chromosomes (ADAMS *et al.* 1992; BIDENNE *et al.* 1992; RACHIDI *et al.* 1999). The maintenance of such mutations is thought to be due to the selective advantages they confer on these yeasts (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). Aneuploidy can increase the number of beneficial genes and protect the cells against lethal or deleterious alleles (PUIG *et al.* 2000). Minor differences, such as point mutations, may also affect strain performance since the presence of certain alleles can cause massive alterations in the global patterns of gene expression affecting metabolic pathways, as have been described for natural vineyard populations of *S. cerevisiae* (CAVALIERI *et al.* 2000). Nevertheless, the exact nature of the modifications in the genome of the industrial yeasts has not been precisely defined and the underlying molecular basis for such phenomena remains unclear (CODÓN *et al.* 1998; RACHIDI *et al.* 1999).

Ectopic recombination between homologous sequences, such as Ty transposons or single transposon-related long terminal repeats (LTRs), has been proposed as the origin of the karyotypic changes observed in both *S. cerevisiae* laboratory and industrial yeasts. These recombinational events can occur outside of meiosis (IBEAS and JIMÉNEZ 1996) and allow karyotypic evolution and subsequent adaptation of the cells to their environment (RACHIDI *et al.* 1999; PUIG *et al.* 2000). The study of the karyotypic changes in six evolved yeast strains after 100–500 generations of growth in glucose-limited chemostats showed the repeated amplification of genomic fragments bound by transposon-related sequences, changes that are presumably responsible for the increase in fitness of the strains (DUNHAM *et al.* 2002). Interestingly, a reciprocal translocation between chromosomes VIII and XVI mediated, in this case, by nonhomologous recombination, has been shown to be present in different *S. cerevisiae* wine yeast strains with diverse geographic origins (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). This recombination affects the promoter region of the gene *SSU1*, which encodes a sulfite transporter implicated in the resistance to sulfite, a preservative widely used in wine making since the Middle Age (PRETORIUS 2000). Therefore, in those particular cases, adaptive evolution of *S. cerevisiae* strains has been attributed to gross chromosomal rearrangements (GCRs) produced by either homologous or nonhomologous recombination.

These observations raise several important questions. First, can GCRs be considered a general model for *S. cerevisiae* evolution? If so, then this might account for the high capacity of industrial yeast to rapidly evolve. This model would be consistent with the fact that selected wine yeast strains display differences in fitness and in phenotypic traits of industrial relevance that are associated with karyotypic variations mediated by GCRs (IBEAS *et al.* 1997; MARTÍNEZ *et al.* 1998; MESA *et al.* 1999, 2000). Second, what are the mechanisms and possible causal factors underlying the apparent bursts of illegiti-

mate recombination events that may be responsible for the repeated chromosomal rearrangements observed when the yeast are exposed to a high selective pressure (FISCHER *et al.* 2000; DUNHAM *et al.* 2002; PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002)?

To gain further insight into these questions we have compared the genomes of two prominent wine yeast strains having different fitness and physiological properties, isolated from the *flor velum* of an aging sherry wine. *Flor velum* is a unique biofilm, which develops on the surface of the wine during the sherry wine making process after the alcoholic fermentation, which is carried out by *S. cerevisiae* fermentation strains, is completed. The *flor velum* is composed of the *flor* yeast and creates an aerobic environment that is conducive to the unique enological properties of these yeasts. Most of the strains isolated from the *flor velum* are classified as *S. cerevisiae* strains (BARNETT *et al.* 1990; KURTZMAN and FELL 1998). The characterization of the *flor* yeast by molecular methods has revealed genetic heterogeneity among the individual strains (IBEAS *et al.* 1997; MARTÍNEZ *et al.* 1998; MESA *et al.* 1999, 2000). This may be the result of adaptations to the unique environmental conditions in which *flor velum* grows, which include a lack of fermentable sugars and a high content of both ethanol and acetaldehyde (MARTÍNEZ *et al.* 1998). Indeed, the production and release of high amounts of acetaldehyde as a consequence of ethanol assimilation is one of the unique properties of the *flor* yeast. Acetaldehyde is a highly reactive compound that has been shown to produce double-strand breaks (DSBs) in yeast DNA. DSBs produced by acetaldehyde are thought to be responsible for the mitochondrial (mt) DNA polymorphisms described in the *flor* yeasts (RISTOW *et al.* 1995; BLASIAK *et al.* 2000; CASTREJÓN *et al.* 2002).

Sequence analysis of the ribosomal internal transcribed (ITS) spacers has grouped together both wine fermentation and *flor* yeast strains as *S. cerevisiae* species, distinct from other representatives of the genus *Saccharomyces*. However, a 24-bp deletion affecting the ITS1 region has been described as fixed in *flor* yeast strains and has never been found in fermentative strains (FERNÁNDEZ-ESPINAR *et al.* 2000; ESTEVE-ZARZOSO *et al.* 2001). The differences in the ribosomal DNA sequences and the finding that the distribution of several phenotypic markers is not random between fermentation and *flor* yeast strains (SANCHO *et al.* 1986) are indicative of the isolation that exists between these two populations of *S. cerevisiae* that participate in the sherry wine making process. In contrast with the fermentation strains, the *flor* yeasts have a permanent presence in the winery, dating from the 19th century in the Jerez region of southern Spain. We think that *flor* yeasts offer significant advantages for the study of molecular evolution since they have evolved under intense but relatively recent selection pressure for different and unique properties.

In this work we performed a comparative genomic

hybridization (CGH) analysis of two *flor* yeast strains using DNA microarray technology to identify the sequences across the whole genome that show copy number variability and might be responsible for the characteristic physiological properties of each strain. The *flor* yeast strains *S. cerevisiae* var. *beticus* 11.3 and *S. cerevisiae* var. *montuliensis* 1.28 were chosen for this study because they differ in both electrophoretic karyotype and physiological properties. Our results show that these strains are aneuploid for whole chromosomes and segments of other chromosomes. Gene copy number changes between the two strains affect 38% of the open reading frames (ORFs), and the majority of them correspond to a widespread amplification of genomic fragments. In most cases, the end points of the amplicons coincide with the positions of either repeated sequences (Ty, single LTRs, and tRNA genes) spread throughout the *S. cerevisiae* sequenced genome (CHERRY *et al.* 2003) or other regions where meiosis-associated DSBs are produced (GERTON *et al.* 2000). This suggests that the amplifications have been produced by GCRs mediated by the hotspots identified. We propose that the mechanism that underlies the large number of chromosomal aberrations detected (up to 116 aneuploid regions) might be bursts of DNA DSBs mainly produced by both acetaldehyde and ethanol, which are processed by pathways that yield GCRs. The presence of several genes, which have been found to be either overexpressed or involved in creating the unique phenotypic character of the *flor* yeast, suggests that such a mechanism is responsible for the adaptive evolution of these yeasts. The nature of the chromosomal modifications described might also account for the sexual isolation shown among the *flor* yeasts (GUIJO *et al.* 1997; BUDRONI *et al.* 2000), indicating that this mechanism of evolution could enhance the speciation process among the *flor* yeast population. The conclusions of our study could also be applied to the adaptive evolution of other industrial *S. cerevisiae* strains.

MATERIALS AND METHODS

Strains: The yeast strains used in the CGH experiment were *S. cerevisiae* 11.3 and *S. cerevisiae* 1.28, classified as belonging to the physiological races *beticus* and *montuliensis*, respectively, on the basis of their patterns of assimilation and fermentation of different carbon and nitrogen sources (BARNETT *et al.* 1990; MARTÍNEZ *et al.* 1995). Both strains were isolated from the velum biofilm developed on a sherry wine produced in the Jerez region of southern Spain and were previously characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE; MESA *et al.* 1999, 2000). The *S. cerevisiae* diploid laboratory strain X2180 (S288C background) was also used in the Southern blot analyses.

Genomic DNA extraction, labeling, and hybridization to microarrays: Genomic DNA (gDNA) was prepared from either 11.3 or 1.28 yeast cells according to the protocol described previously (GUTHRIE and FINK 1991). After digestion with *Hae*III, each gDNA was labeled with Cy3- and Cy5-dCTP in separate random primer reactions using the BioPrime DNA labeling system (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) according

to the manufacturer's recommendations. Labeled cDNAs were purified using a Millipore (Bedford, MA) MAFB NOB 96-well plate. Forty picomoles of Cy3- and Cy5-labeled cDNAs were combined and the volume was reduced to 5 μ l in a Speed Vac (Thermo Savant, Holbrook, NY). Forty-five microliters of preheated (55°) hybridization solution (50% formamide, 5 \times SSC, 0.1% SDS, 5 \times Denhardt's solution, and 100 μ g/ml salmon sperm DNA) was added and the mixture was centrifuged at 12,000 $\times g$ for 5 min. The supernatant was applied to a microarray and the hybridization was allowed to proceed for 16 hr at 42°. The ORF-DNA microarrays used in this study were produced by the Center for Expression Array Analysis in the Department of Microbiology at the University of Washington. Information about the arraying process can be found at the web site: http://ra.microslu.washington.edu/aboutus/about_us.html. PCR products corresponding to 6144 ORFs from *S. cerevisiae* strain S288C were spotted in duplicate onto each of two slides. Slide H1 carried PCR products from the smaller 4608 ORFs and slide H2 had products from the larger 1536 ORFs.

Data acquisition and analysis: The microarrays were scanned with a Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA) generation III slide scanner. The software Dapple was used to find the spots on the image, evaluate their quality, and quantify their fluorescence intensities (BUHLER *et al.* 2000). DNA microarray data processing software designed at the Institute for Systems Biology (Seattle; <http://www.systemsbio.org/ArrayProcess/index.html>) was used for background subtraction, normalization, and calculation of the logarithmic (decimal) value of the ratio of intensities (from both 11.3 and 1.28 labeled cDNAs) for each ORF. Data from spots with either insufficient fluorescence signals (less than threefold higher than average background intensities in the red or green channel) or signals above the scanner saturation level were eliminated from our analyses.

Experiment replicates and controls: gDNA from each strain was obtained from two independent purifications and used in two independent microarray hybridizations. Two sets of slides were hybridized for each experiment, with one set having the fluorochromes reversed. The mean of the normalized log ratio values was computed by using data from four sets of slides yielding eight readings per ORF. Only ORFs with five or more valid replicate measurements were included in the analysis of the CGH experiment. A control experiment was also performed in which gDNA from the strain 1.28 was labeled with both Cy3 and Cy5 fluorochromes as described above and hybridized to a set of H1 and H2 slides. ORFs with two valid measurements for the hybridization intensities were considered to compute the log ratio values in this control experiment.

Southern blotting: Two different Southern blot analyses were performed to confirm the data obtained from the CGH experiment described above. DNA probes corresponding to specific ORFs were hybridized to gDNA digested with *Eco*RI and gDNA separated by PFGE. In the former case, 5, 2.5, and 1.25 μ g of *Eco*RI-digested gDNA from strains X2180, 11.3, and 1.28 were loaded onto a 1% agarose gel. To obtain the electrophoretic karyotype, intact chromosomes from strains X2180, 11.3, and 1.28 were prepared and fractionated by PFGE as described previously (MESA *et al.* 1999, 2000). In both cases, the DNA was transferred to nylon membranes (Hybond-N+, Amersham, Arlington Heights, IL) according to standard procedures (SAMBROOK *et al.* 1989).

DNA probes were obtained by PCR amplification using 80 ng of X2180 gDNA as template. The primers used and probes amplified correspond to fragments of the following ORFs: *YLL027W* (oligonucleotides GAAAGGCGCTGATCACCTG and CTCTCGCCACAACCGCATGT), *YEL035C* (TGGAACAC

GACGATCAACGC and TGGCTGGTATTAGAGCACAGCG), *YEL023C* (GCCGGTGCCAACTTCTAATGC and TTTATCCTCTCGGGCTCCATCC), *YER033C* (ACCATCTAACCTGGAACTGCC and GGTGATGTGGTTTCGGAAGAGG), *YER040W* (AGCCACGCGTACTACTAAGACG and GTTGAAGGAATGGTGGGACTGC), and *YER086W* (TGTACGGTTGTTCCGCAAGG and ATTAACCACCACCGCCGAC). The thermocycler program used for the amplification was as follows: (1) 1 min at 95° for 1 cycle; (2) 30 sec at 95°, 30 sec at Tm-5°, and 1 min at 72° for 35 cycles; and (3) 10 min at 72° for 1 cycle. DIG High Prime DNA labeling and detection starter kit II (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) was used for labeling the probes with digoxigenin, hybridization, and signal detection following the manufacturer's instructions. Relative hybridization intensities displayed by the gDNA samples from the different strains were measured with a Gel Doc 2000 system (Bio-Rad, Richmond, CA) using the Molecular Analyst software provided with the instrument.

RESULTS

Identification of ORFs in strains 11.3 and 1.28 that exhibit gene copy number variability: The chromosomal patterns of *S. cerevisiae flor* yeast strains 11.3 and 1.28 showed 16 and 14 bands, respectively, with some chromosomes displaying differences in their electrophoretic mobilities (Figure 1). Differences in band intensities within each electrophoretic karyotype suggest aneuploidy or the presence of homologous chromosomes of different sizes in both strains (PUIG *et al.* 2000). Such differences are due to DNA copy number changes affecting different genomic regions. To identify the genes affected by the DNA copy number changes between the two *flor* yeast strains, a CGH scheme based on ORF-DNA microarrays was used. The distributions of mean log ratio values for the ORFs included in both the comparative (ratio of intensities = 11.3/1.28) and the control (ratio of intensities = 1.28/1.28) experiments are shown in Figure 2. In the last case the log ratio values were tightly distributed around a mean (*m*) value of -0.0074 [standard deviation (SD) = 0.033]. In contrast, the distribution for the CGH experiment (*m* = 0.0051; SD = 0.083) had a significantly higher SD (at the 99% confidence level; data not shown) and contained more ORFs in both tails. The parameters of the distribution for the control experiment were used to define a threshold for the log ratio values. Log ratio values that differ by at least 2 SD from the control mean were considered significant and indicative of higher copy. Using this cutoff (0.059 and -0.074, for positive and negative log ratio values, respectively), it was estimated that there were 263/5252 (5%) false positives in the CGH experiment. This number could be an underestimate of the true number of false positives. Other sources of error such as that caused by either (i) weaker than expected hybridization due to differences in ORF sequence homologies between each industrial strain and the laboratory strain upon which the ORF-DNA microarrays were based or (ii) cross-hybridization of sequences that are amplified, with microarray spots that correspond to homologous

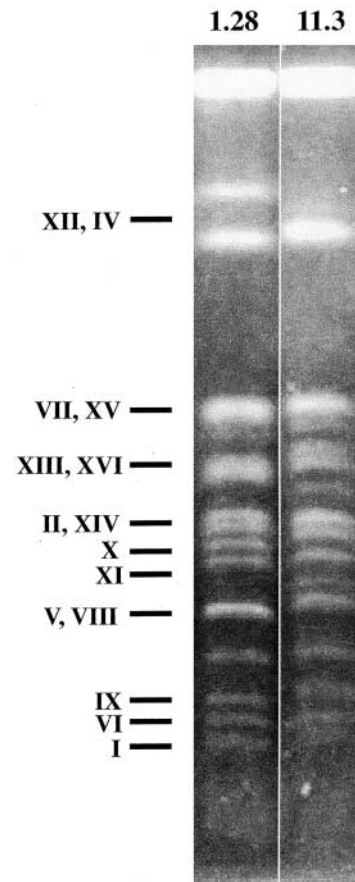


FIGURE 1.—Electrophoretic karyotypes of *S. cerevisiae flor* yeast strains 11.3 and 1.28. Putative chromosomes corresponding to every band according to the pattern obtained in the same electrophoresis for laboratory strain S288C are indicated.

but nonamplified sequences, are not accounted for by the control self-hybridization experiment.

The genomic comparison experiment produced significant log ratio values for 2001 of 5252 ORFs, indicating differences in DNA copy number for 38% of the ORFs across the whole genome. Of these ORFs, 1233 were amplified in strain 11.3 and 768 were amplified in strain 1.28. Although we will speak of these copy number differences as amplifications in strain 1.28 or 11.3 in the remainder of the work, they could equally well be thought of as deletions in 11.3 or 1.28. However, both the analysis of the signal intensities in the array experiment and the Southern blot-based comparative genomic hybridization with laboratory strain X2180 suggest the former characterization (see below).

The complete data set of log ratio values for each gene included in the CGH experiment can be seen in supplementary Table 1 at <http://www.genetics.org/supplemental/>.

Chromosomal amplifications: A plot of the log ratio distribution for each chromosome (Figure 3) revealed a clear bias toward high (positives) or low (negatives) values for some chromosomes. This plot suggests that

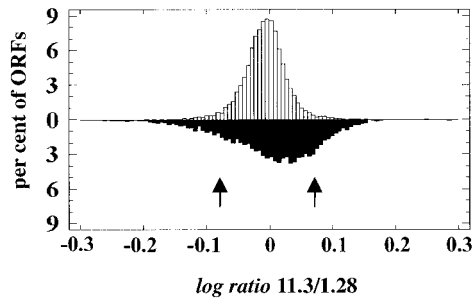


FIGURE 2.—Distribution of log ratio values for the ORFs in both 11.3/1.28 genomic comparison (solid bars) and control self-hybridization (open bars) experiments. Arrows indicate the positions of thresholds for considering a log ratio value as significant.

the copy number of a majority of the genes on chromosomes X and XII is higher in strain 1.28 than in strain 11.3 and that the copy number of a majority of the genes on chromosomes I, III, and VI is higher in strain 11.3 than in strain 1.28.

One method for estimating the level of chromosomal amplification involves plotting the mean signal intensities for Cy3-labeled probes against those for Cy5-labeled probes. A slope of one would indicate copy number equivalence between the two strains. When the data from the control self-hybridization experiment were plotted in this manner, a slope close to one was obtained (see supplementary Figure 1 at <http://www.genetics.org/supplemental/>). In the CGH experiment, the intensities produced by the 11.3 gDNA were plotted against those produced by the 1.28 gDNA for the ORFs on (i) chromosome IV, which is not affected by DNA copy number changes according to its distribution of log ratio values, and (ii) chromosomes X, XII, I, III, and VI, which are amplified in 1.28 or 11.3 according to their distributions of log ratio values (Figure 3). In all cases the data fit a straight line with a confidence level of 99% (see supplementary Figure 1 at <http://www.genetics.org/supplemental/>). The differences between the slopes of the lines for chromosomes I, III, VI, X, XII, and the control experiment were very similar and approximately sixfold higher than the difference between the slopes of the lines for chromosome IV and the control. These results again indicate that (i) both strains have an equal number of copies of chromosome IV and (ii) the level of amplification of chromosomes I, III, and VI in strain 11.3 and of chromosomes X and XII in 1.28 is similar. Regions of the 11.3 and 1.28 chromosomes that have the same copy number, but in which the copy number differs from the diploid X2180 would not be detected because the two *flor*strains are compared to each other, not to the laboratory strain.

To independently confirm the differences in copy number, a fragment corresponding to a gene on one of the putatively amplified chromosomes, *YLL027W*, was used as a probe in a Southern hybridization experiment.

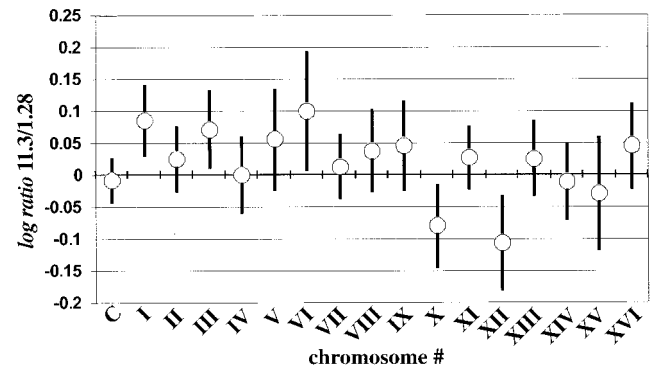


FIGURE 3.—Mean (○) and standard deviation (error bars) of the log ratio distribution for individual chromosomes in the CGH experiment (11.3/1.28). The log ratio distribution for all the ORFs in the control experiment (1.28/1.28) is also plotted (C).

The results obtained are consistent with the amplification of chromosome XII in strain 1.28. For both strains 1.28 and 11.3, the probe hybridized with the slowest migrating band that corresponds to chromosome XII in the sequenced laboratory strain of *S. cerevisiae* (Figure 4A). A band of ~ 1095 kb also displayed a strong hybridization signal in the electrophoretic karyotype of 1.28. Hybridization of the same probe to *Eco*RI-digested genomic DNA from strains X2180, 11.3, and 1.28 and quantitation of the signals confirmed the greater abundance of the probe sequence in 1.28 genomic DNA (Figure 4B). The ratio of Southern signals between 11.3 and the control diploid X2180 was ~ 1 (see Figure 7), while the signal for 1.28 was ~ 1.3 -fold stronger than those corresponding to 11.3 and X2180. Southern analyses with other probes specific for different ORFs (see below) showed that these values are indicative of the presence of two copies of the probe sequence in the genome of 11.3 and more than two copies in 1.28, confirming the DNA microarray hybridization data for chromosome XII. On the basis of these data and the microarray data we propose that strain 1.28 carries an extra copy of the majority of the genes located on chromosomes XII and X and that strain 11.3 carries an extra copy of those genes located on chromosomes I, III, and VI. Thus, the relative amplifications detected in the genomes of both strains 1.28 and 11.3 in the array experiment have been interpreted as the gain of extra copies with respect to a normal diploid genome.

Genomic regions affected by aneuploidy: The regions affected by aneuploidy in both strains were identified with high resolution by plotting the log ratio values of each gene as a function of its chromosomal location, as shown for chromosome II in Figure 5. A similar representation for each chromosome (see supplementary Figure 2 at <http://www.genetics.org/supplemental/>) led to the detection of all the amplified regions across the whole genome in both strains. In most cases, the ORFs with significant log ratio values were grouped into re-

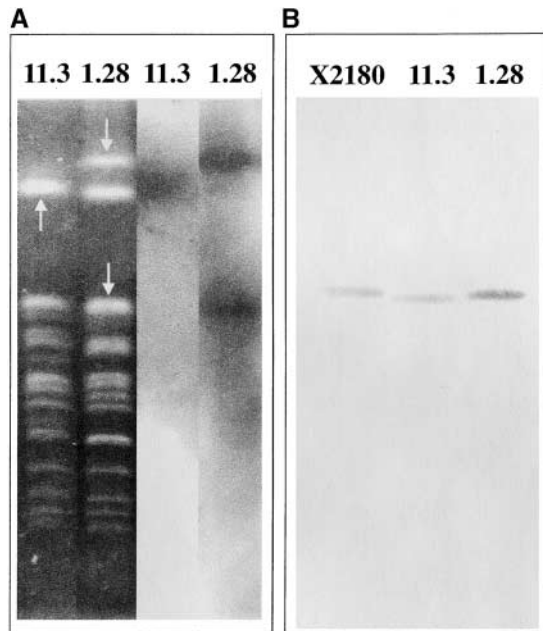


FIGURE 4.—Southern blot analyses with the probe *YLL027W*. (A) Hybridization to 11.3 and 1.28 chromosomes fractionated by PFGE. Arrows indicate the bands that hybridized with the probe. (B) Hybridization to 2.5 μ g of *Eco*RI-digested genomic DNA from the strains X2180 (control diploid), 11.3, and 1.28.

gions with sizes ranging from a single gene to almost complete chromosomes. Regions with three or more significant ORFs located together were considered to be amplified. These are depicted in Figure 6.

Amplification of extensive genomic regions was detected in both strains. Chromosomes XII and X are almost completely amplified in strain 1.28 whereas large regions of chromosomes I, III, VI, the right arms of chromosomes IX and XVI, and the left arm of chromosome V are more highly represented in the genome of strain 11.3. In addition, DNA copy number variations affecting small groups of genes were detected in the different chromosomes. According to our interpretation of the data we estimate that 116 different genomic regions are affected by aneuploidy. Such regions are distributed throughout all the chromosomes and comprise 4086 of \sim 12,120 kb of the *S. cerevisiae* genome.

The level of amplification of a given genomic region that showed copy number variation in the two strains was estimated by analyzing the mean values of the ratio of intensities for all the genes in the region. The similarity of the mean ratios among the different amplicons (see supplementary Figures 3 and 4 at <http://www.genetics.org/supplemental/>) suggests an equal level of amplification of the different regions in both strains, possibly by the gain of one copy in the aneuploid genome. This analysis again indicates that the amplicons detected in the genomes of both strains 1.28 and 11.3 in the array-based CGH experiment are probably not due to

deletions in any of the strains but result from the gain of an extra copy of the fragment with respect to a normal diploid genome. Only five regions (chromosome IV, 527–538 kb; chromosome VI, 0–43 kb and 227–237 kb; and chromosome VIII, 190–195 kb and 208–217 kb; see Figure 6) in strain 11.3 and one region (chromosome IV, 423–428 kb) in strain 1.28 displayed different mean ratios (higher or lower, respectively; see supplementary Figure 3 at <http://www.genetics.org/supplemental/>), indicating a higher level of amplification in the corresponding strain.

Southern analysis of selected ORFs: To confirm the results obtained from the microarray analysis, we performed Southern hybridizations with probes specific for five ORFs situated on chromosome V. We chose this chromosome because it had regions representing a variety of ORF hybridization patterns on the array. The genes analyzed were (i) *YEL035C*, which displayed a high log ratio of intensities (0.14) in the array experiment and is located in a large genomic region (chromosome V, 30–128 kb; see Figure 6) that appears to be amplified in the strain 11.3; (ii) *YEL023C*, which displayed a log ratio close to the cutoff value of 0.059 and is located in the same genomic region as *YEL035C*; (iii) *YER033C*, which, on the basis of the microarray data, is a single amplified gene in strain 1.28 with a log ratio of -0.11 and is located within a nonamplified region of chromosome V (196–313 kb); (iv) *YER040W*, which had a nonsignificant log ratio of 0.017 and is located in the same chromosomal region as *YER033C*; and (v) *YER086W*, which had a very high log ratio (0.63), indicating a possible high level of amplification in 11.3, and is located in a region of chromosome V (313–351 kb) that appears to be amplified in 11.3. This region displayed a mean log ratio considerably lower than that of the ORF. We also probed for the ORF *YLL027W*, which is amplified in 1.28 as we described above.

Three independent hybridizations were performed, probing each ORF fragment on 5, 2.5, and 1.25 μ g of *Eco*RI-digested gDNA from the control diploid strain X2180 and the *flor* strains 1.28 and 11.3 (Figure 7). Hybridization intensities were quantified and the mean ratios between the signals from the different strain samples were computed.

The mean ratio of intensities between the samples corresponding to strains 11.3 and 1.28 could be grouped into three categories (Figure 7). *YLL027W* and *YER033C* hybridizations displayed identical ratios (0.83) below one, whereas the *YEL023C* and *YER086W* hybridizations yielded ratios (1.63 and 1.59, respectively) considerably higher than those of the *YEL035C* and *YER040W* hybridizations (1.05 and 1.23, respectively). These results confirm those obtained by the array hybridization except for the case of *YEL035C*, since they indicate (i) amplification of *YLL027W* and *YER033C* in strain 1.28 relative to strain 11.3, (ii) amplification of *YEL023C* and *YER086W* in strain 11.3 relative to strain 1.28, and (iii)

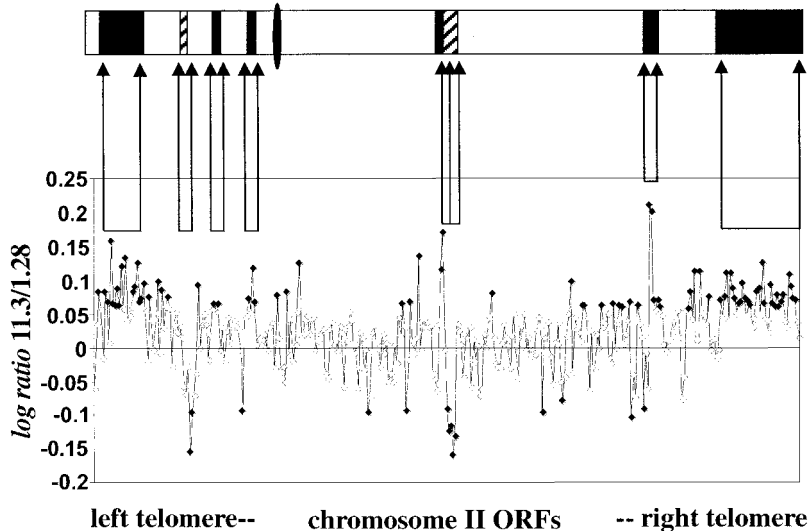


FIGURE 5.—Chromosome II DNA copy number profile. Points correspond to the log ratio of the ORFs, ordered by its position in the chromosome. Those highlighted in black correspond to significant log ratio values that indicate a higher copy number of the ORF in 11.3 (positive values) or in 1.28 (negative values). Arrows flank different broad regions of amplification in each strain. Plot of log ratio values for each ORF against its position in the chromosome led to a map of aneuploidies (top): open bars, regions with equal number of copies in both strains; solid bars, regions amplified in 11.3; striped bars, regions amplified in 1.28. Bar sizes are proportional to the number of ORFs located within the region. The position of the centromere is represented with a solid ellipse.

an equal copy number of *YER040W* in both *flor* strains. The differences in the level of the signal log ratios obtained by the array experiment (as for *YEL023C* and *YER086W*), however, did not reflect the ratios obtained in the Southern analysis. This result could be due to the greater sensitivity of a microarray-based CGH experiment for detecting DNA copy number variation compared to a Southern analysis, as has been previously reported (POLLACK *et al.* 1999).

The ratios obtained by comparing both industrial strains to the control diploid X2180 (Figure 7) are consistent with the interpretation made after the array data analysis. Probes for the genes *YEL023C* and *YER086W* yielded high strain 11.3/X2180 ratios (1.5 and 1.32, respectively), which indicate amplification of the genes with respect to the control diploid strain, while ratios corresponding to the genes not amplified in strain 11.3 are indicative of a DNA content similar to that in X2180. Similarly, probes for *YLL027W* and *YER033C*, which are amplified in strain 1.28 relative to strain 11.3, yielded high strain 1.28/X2180 ratios (1.36 and 1.33, respectively), indicating that both elements are also amplified relative to the control diploid. The ratios corresponding to the genes not amplified in strain 1.28 are indicative of an equal copy number with respect to strain X2180. Therefore, the hypothesis made on the basis of the array data analysis, *i.e.*, a basic diploid constitution of strains 1.28 and 11.3 with the aneuploidies described resulting from the gain of an extra element, is generally supported by the Southern analysis.

DISCUSSION

***S. cerevisiae* DNA microarrays for genomic characterization of wine yeasts:** Previous studies on *S. cerevisiae floryeasts* showed that different strains may differ greatly in their amount of DNA per cell (MARTÍNEZ *et al.* 1995; IBEAS and JIMÉNEZ 1996; GUIJO *et al.* 1997). Most of the

strains tested exhibited a relative DNA content between $2n$ and $3n$ (n being the DNA content of a haploid laboratory strain), although such values do not necessarily reflect a true diploid or triploid constitution. In fact, some genetically characterized strains that exhibited a relative DNA content of $2n$ were reported to have monosomic, disomic, and trisomic chromosomes (IBEAS and JIMÉNEZ 1996). Furthermore, *flor* yeasts have been shown to sporulate poorly and, in most cases, the spores are nonviable (IBEAS and JIMÉNEZ 1996; GUIJO *et al.* 1997; BUDRONI *et al.* 2000). This fact has been explained by the presence of complex aneuploidies leading to unbalanced meiotic progeny. In this work, we have demonstrated the feasibility of using comparative genomic hybridization to *S. cerevisiae* ORF-DNA microarrays to analyze the complexity of the *floryeast* genomes at single gene resolution.

Genomic DNA from the industrial strains used in this study produced relatively high hybridization signals in all the microarray spots, suggesting that the genetic background of the industrial strains is very similar to the sequenced strain used to prepare the probes spotted on the microarrays. This is in agreement with the previous classification of both *flor* wine yeast strains as *S. cerevisiae* (MESA *et al.* 1999, 2000). However, a large part of the *flor* yeast genome shows evidence of genomic rearrangements that are reflected in the DNA copy number changes observed.

Origin of the amplified sequences: In standard laboratory strains, chromosome length polymorphisms are thought to originate mainly from movement of Ty elements in and out of chromosomes and from Ty-associated duplications or deletions (WICKSTEED *et al.* 1994). In addition, telomere-associated Y' and X repeated sequences, whose copy number may vary among different strains (LOUIS and HABER 1990), have been reported to mediate recombination events that lead to gene amplifications and chromosomal polymorphisms in both

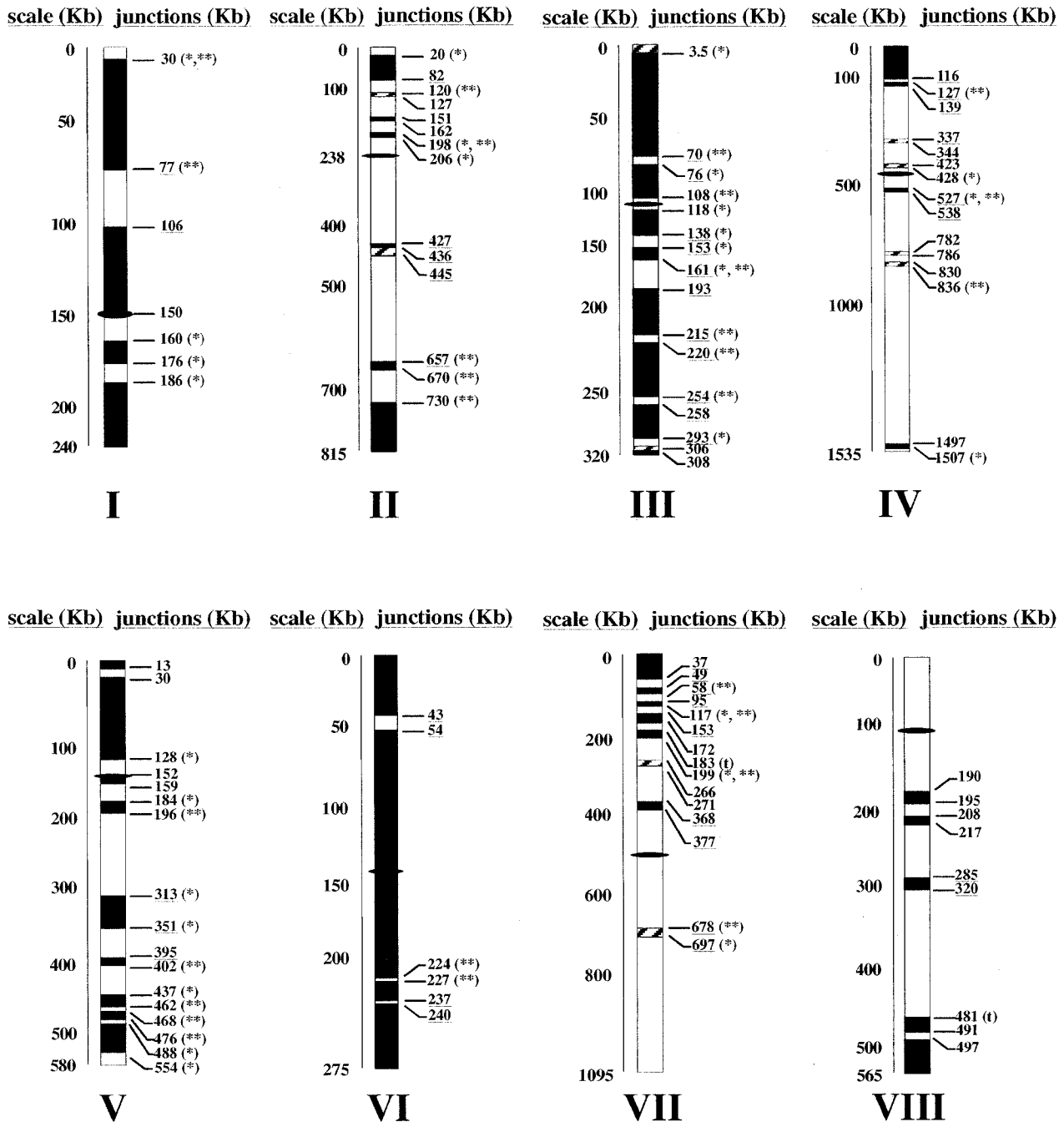


FIGURE 6.—Genomic comparison between *S. cerevisiae flor* yeast strains 11.3 and 1.28. The amplicons detected are represented by the position of their ORFs in the different chromosomes. Open bars, regions with equal number of copies; solid bars, regions amplified in 11.3; striped bars, regions amplified in 1.28. Bar sizes are proportional to the number of ORFs located within the regions. The position of the centromere is represented with a solid ellipse. The positions of the breakpoints between the genomic regions were adjusted by the position of the two ORFs on both sides of each junction. Many of the breakpoints coincide with or are close to (<10 kb) the positions of Ty and single LTR elements (*), hotspots of recombination described by GERTON *et al.* (2000; **), or tRNA genes (t). The positions of end points that fall into one of the cluster homology regions described in the *S. cerevisiae* genome (WOLFE and SHIELDS 1997) are underlined.

laboratory (MOORE *et al.* 2000) and industrial yeasts (CODÓN *et al.* 1998). Recently, chromosomal changes detected in six strains of *S. cerevisiae* in response to selective pressure were associated with ectopic rearrangements between transposons, transposon fragments, or

tRNA genes (DUNHAM *et al.* 2002). On the basis of such results, the authors suggested that transposon and transposon remnants may be the principal source of changes in chromosome structure in yeasts that are growing under strong selective pressure.

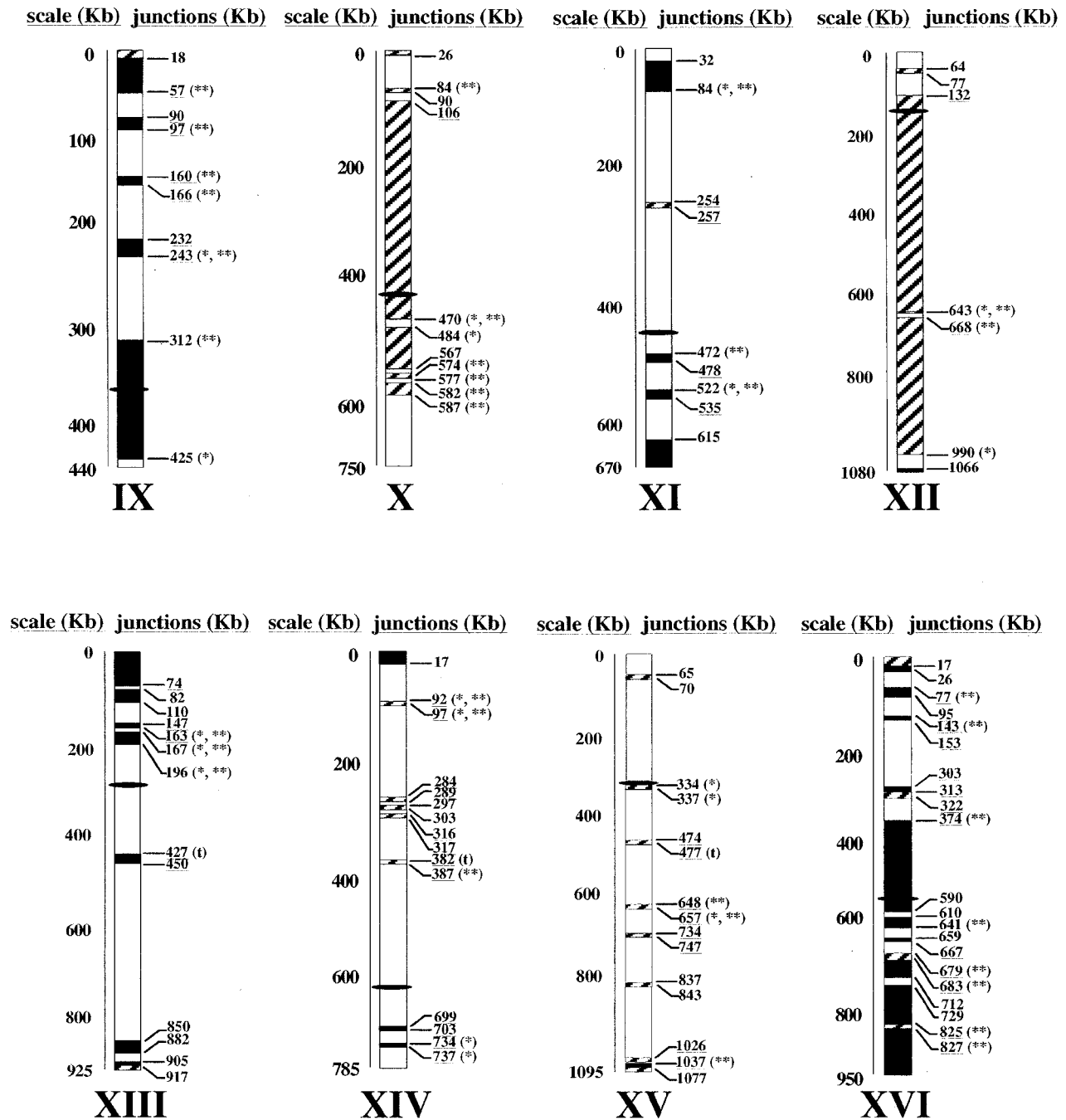


FIGURE 6.—Continued.

To explore whether the genomic polymorphisms observed between the strains 11.3 and 1.28 might involve recombinational hotspots, the position of Ty elements (transposons and single LTRs) and tRNA genes were plotted on the chromosomal maps showing the polymorphisms (Figure 6). Since the extent of chromosome size variation observed in the wine yeasts suggests that more global chromosomal rearrangements might also be involved (RACHIDI *et al.* 1999), we included the position of meiotic recombination hotspots in our analysis (GERTON *et al.* 2000).

The position of 94 of 200 junctions between chromosomal regions affected by aneuploidy was localized within 10 kb of the midpoint of a previously described recombinational hotspot (see Figure 6). Forty-three of these breakpoints coincide almost exactly with the position of transposon-related sequences, described in the *Saccharomyces* Genome Database (CHERRY *et al.* 2003). This observation is in agreement with the correlation previously found between transposon sequences and chromosome breakpoints (RACHIDI *et al.* 1999; CHA and KLECKNER 2002; DUNHAM *et al.* 2002), suggesting that

	X2180	11.3	1.28	R1	R2	R3
1				0.83	1.09	1.36
2				1.05	1.06	1.07
3				1.63	1.5	1.12
4				0.83	0.95	1.33
5				1.23	1.18	1.12
6				1.59	1.32	0.96

FIGURE 7.—Southern blot analysis of the laboratory diploid strain X2180 and the *flor* yeast strains 11.23 and 1.28 with probes of the genes *YLL027W* (1), *YEL035C* (2), *YEL023C* (3), *YER033C* (4), *YER040W* (5), and *YER086W* (6). The signals presented were obtained by probing 2.5 μ g of *Eco*RI-digested genomic DNA after electrophoresis in 1% agarose gel. Numbers correspond to the mean ratio of signal intensities obtained in the Southern experiment (R1, 11.3/1.28; R2, 11.3/X2180; R3, 1.28/X2180).

amplification of the regions bounded by these junctions might be associated with chromosomal rearrangements produced by ectopic recombination between transposon elements. In addition, the coincidence between the end points of the amplicons described in the *flor* yeast strains and the position of Ty elements in the sequenced strain S288C adds depth to the previously reported idea that some of the \sim 300 transposon-related sequences that are found in the sequenced strain of *S. cerevisiae* are in positions that provide a selective advantage at the population level by allowing relatively high-frequency, potentially reversible, and adaptively useful chromosomal rearrangements (DUNHAM *et al.* 2002).

It is noteworthy that 61 of the breakpoints shown in Figure 6 coincide with the positions of hotspots, which were reported to be associated with local DSBs that lead to meiosis-associated recombination in *S. cerevisiae* (GERTON *et al.* 2000). Although the analysis of GERTON *et al.* (2000) was restricted to one specific genetic background, our results suggest that the ORFs listed in Table 1 could be recombination hotspots in the *S. cerevisiae flor* wine yeast strains. Since the chromosomal translocations produced in industrial yeasts have been proposed to be mainly produced during mitosis (IBEAS and JIMÉ-

NEZ 1996; PUIG *et al.* 2000), the ORFs listed in Table 1, which have been described as meiotic recombination hotspots, could also be related to mitotic recombinations.

In yeast, spontaneously generated GCRs are due to either homologous recombination between multicopy repeat sequences or other mechanisms involving little or no homology at the breakpoints (YU AND GABRIEL 2003). It is well established that both mitotic and meiotic recombination in *S. cerevisiae* use common factors and steps such as their initiation by a DSB, which is processed by a recombinational repair mechanism (AGUILERA *et al.* 2000; PRADO *et al.* 2003). Broken or chemically damaged DNAs are normally repaired by homologous recombination, mainly by break-induced replication (BIR) and to a lesser extent by double-strand break repair, rather than by nonhomologous end joining (NHEJ), and this prevents genome rearrangements. However, when BIR is inactivated, these substrates yield genome rearrangements (KOLODNER *et al.* 2002). Indeed, recent research has demonstrated that the frequency and types of repair events depend on the specific genetic context and it is unclear how NHEJ and other rare rearrangements fit into the broader range of yeast DSB repair events (YU AND GABRIEL 2003). The induction of single DSBs in both isogenic *S. cerevisiae* wild-type and *rad52* mutant cells led to the production of GCRs, which showed typical microhomology (0–6 bp) between the joined sequences. Such types of rearrangements were not seen in either *yku80* or *rad52yku80* strains. Rad52p is an essential component in the homologous recombination pathway, while Yku80p is an essential protein for the NHEJ pathway (KRAMER *et al.* 1994; LEWIS AND RESNICK 2000). Thus, the appearance of GCRs is strongly dependent on the presence of Yku80-dependent processes, most likely the NHEJ machinery (YU AND GABRIEL 2003).

We do not know if the *flor* yeast strains 1.28 and 11.3 are defective in any of the DNA repair mechanisms. However, the nature of the amplicon end points and the large number of chromosomal aberrations suggest that the rearrangements have been produced preferentially by NHEJ or other mechanisms that resulted in joining the broken end of different chromosomal segments that have suffered concomitant cleavage. Since only a microhomology between the two joining strands is required for these kinds of events, it is very difficult to determine which homologous regions in the 200 amplicon end points described in this work might play a role in the recombination. In the case of either the Ty- or tRNA-associated end points (see Figure 6), these elements might have mediated the recombination. In the remaining cases, it should be pointed out that up to 75 of the 152 (49%) end points not associated with either a Ty or a tRNA element fall within one of the 55 cluster homology regions (CHRs) found in the yeast genome (WOLFE AND SHIELDS 1997; see Figure 6). CHRs are thought to be traces of the whole-genome duplica-

TABLE 1

ORFs related to meiosis-induced DSBs (GERTON *et al.* 2000) that have been found associated with amplicon end points in *S. cerevisiae flor* yeast strains 1.28 and 11.3

Recombination hotspots	Chr.	Recombination hotspots	Chr.
<i>YAL061W-062W</i>	I	<i>YIL152W, -153W, -154C, -155C</i>	IX
<i>YAL036C, -37W, -38W, -39C</i>	I	<i>YIL136W</i>	IX
<i>YBL055C</i>	II	<i>YIL065C</i>	IX
<i>YBL015W, -016W</i>	II	<i>YIL023C</i>	IX
<i>YBR214W</i>	II	<i>YJR016C, -017C</i>	X
<i>YBR219C, -220C</i>	II	<i>YJR032W</i>	X
<i>YCL009C, -010C</i>	III	<i>YJR072C, -073C, -074W, -075W, -077C, -079W</i>	X
<i>YCR046C, -047C, -48W, -49C, -50C, -51W, -52W</i>	III	<i>YLR255C, -257W</i>	XII
<i>YCR077C, -079W</i>	III	<i>YML053C</i>	XIII
<i>YDL181W, -182W</i>	IV	<i>YML042W, -043C</i>	XIII
<i>YDR037W</i>	IV	<i>YNL289W</i>	XIV
<i>YDR187C, -188W</i>	IV	<i>YNL125C</i>	XIV
<i>YER019C-A</i>	V	<i>YOR173W</i>	XV
<i>YER119C-A</i>	V	<i>YOR374W, -376W</i>	XV
<i>YER145C, -146W, -147C, -149C</i>	V	<i>YPL250C, -252C</i>	XVI
<i>YER152C, -153C, -154W</i>	V	<i>YPL222W, -223C</i>	XVI
<i>YFR033C, -034C, -035C, -036W, -037C</i>	VI	<i>YPL092W</i>	XVI
<i>YGL198W, -199C, -200C</i>	VII	<i>YPR036W, -037C</i>	XVI
<i>YGL165C, -166W</i>	VII	<i>YPR063C</i>	XVI
<i>YGL162W</i>	VII	<i>YPR151C</i>	XVI
<i>YGR096W</i>	VII		

tion that occurred in the ancestral yeast. Thus, it is probable that these regions contain a high frequency of microhomologies that could have been involved in the recombination. The coincidence between 61 amplicon end points and the previously described meiosis-associated hotspots listed in Table 1, however, do not necessarily imply a role of the meiosis-associated protein Spo11p in generating the DSB that led to the recombination. In work describing Spo11p-associated hotspots, GERTON *et al.* (2000) reported that hotspot ORFs were expressed at higher levels than average ORFs in *S. cerevisiae*. Transcriptionally active regions of chromatin could be more accessible to internal cell metabolites or external factors that can produce DSBs. Transcription might also induce DNA repair mechanisms that could mediate recombination events (AGUILERA 2002). When a particular DNA lesion blocks the transcription apparatus, the cell takes advantage of the blocked ternary structure at the site of damage to detect the DNA lesion and to facilitate its repair by recombination (AGUILERA 2002). Thus, Spo11p-independent DSBs produced in the same highly transcribed regions where the Spo11p-associated hotspots have been described (GERTON *et al.* 2000) could be effectively repaired.

Floryeasts develop under high ethanol concentrations (15–15.5% v/v) and grow by metabolizing ethanol via acetaldehyde to acetate and acetyl-CoA (MAURICIO *et al.* 2001). Part of the acetaldehyde produced by yeast is not used in biosynthetic metabolism but is released into the wine, thus producing exogenous acetaldehyde con-

centrations of up to 800 mg/liter (MARTÍNEZ *et al.* 1998). Acetaldehyde has been shown to interact with DNA to produce a variety of adducts that are substrates for DNA repair mechanisms (BLASIAK *et al.* 2000). Indeed, acetaldehyde has been proposed as the carcinogenic agent behind different alcohol-related cancers (BLASIAK *et al.* 2000). In addition, both ethanol and acetaldehyde have been reported to induce severe damage to chromosomal DNA in yeast cells as well as to isolated yeast DNA (RISTOW *et al.* 1995). The effect of exogenous acetaldehyde on yeast chromosomal DNA was reported to be much stronger than that of metabolized alcohol, producing DSBs as well as single-strand breaks (RISTOW *et al.* 1995), which normally are converted into DSBs before repair by recombination (PRADO *et al.* 2003). The active metabolism of ethanol and the release of high amounts of acetaldehyde into the wine (MARTÍNEZ *et al.* 1997; J. J. INFANTE, M. E. RODRÍGUEZ, L. REBORDINOS and J. M. CANTORAL, unpublished results) suggest that acetaldehyde may be present at relatively high concentrations in the *flor* yeasts during the sherry wine biological aging. This situation favors accumulation of DNA DSBs, which might be responsible for the chromosomal rearrangements that lead to the amplifications seen in both strains 1.28 and 11.3 and, by extension, for the high chromosomal polymorphisms detected by PFGE in the *flor* yeasts (MARTÍNEZ *et al.* 1995; IBEAS *et al.* 1997; MESA *et al.* 1999, 2000). Other authors have also reported that both acetaldehyde and ethanol are responsible for mtDNA polymorphisms detected by re-

striction fragment length polymorphism (RFLP) in the *flor* yeasts (CASTREJÓN *et al.* 2002). Although mtDNA RFLPs reflect point mutations in the mtDNA instead of rearrangements, DSBs introduced by both ethanol and acetaldehyde have also been proposed as the initiating event that leads to the mtDNA polymorphisms. Differences in the DNA repair systems between chromosomal and mitochondrial DNAs, such as the lack of proofreading capacity in the mtDNA polymerase, could account for the different nature of the mutations induced (CASTREJÓN *et al.* 2002).

The *S. cerevisiae montuliensis* strain 1.28 was found to be more resistant to relatively high concentrations of acetaldehyde, and variations in its electrophoretic karyotype were not found during a long-term culture under biological aging conditions. In contrast, the *S. cerevisiae beticus* strain 11.3 showed karyotypic instability under the same conditions of growth and was found to be more sensitive to acetaldehyde (MARTÍNEZ *et al.* 1997; J. J. INFANTE, M. E. RODRÍGUEZ, L. REBORDINOS and J. M. CANTORAL, unpublished results). These previous observations are consistent with the fact that strain 11.3 showed a higher number of chromosomal aberrations (76 of 116 amplicons depicted in Figure 6). It is possible that strain 11.3 has a defective DNA repair system, favoring the nonhomologous pathways that can result in karyotypic instability. In contrast, the resistance to acetaldehyde displayed by strain 1.28 might be due to an intact DNA repair system that is able to repair most of the acetaldehyde-induced DSBs by pathways that do not produce GCRs, such as BIR (KOLODNER *et al.* 2002).

Role of the chromosomal rearrangements in adaptive evolution: Several hypotheses have been proposed to explain the gain of a genomic region by a yeast genome. For example, the inactivation of a single gene could lead to the amplification of an entire chromosome that harbors a paralogue of the inactive gene (HUGHES *et al.* 2000). Alternatively, the amplified sequences could confer selective advantages to the aneuploid cells (RACHIDI *et al.* 1999; PUIG *et al.* 2000; HAUSER *et al.* 2001). Recently, a gross chromosomal rearrangement involving the promoter sequence of *SSU1* has been shown to be fixed in different wine yeast strains isolated from different geographical areas. Such strains displayed enhanced sulfite tolerance with respect to *S. cerevisiae* laboratory strains as a consequence of the overexpression of *SSU1*, which encodes a plasma membrane protein with a central role in a network of proteins conferring sulfite tolerance in *S. cerevisiae* (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). This new phenotype was acquired by the selection of the recombinant strains in wineries, since sulfite is a widely used preservative in wine making (PRETORIUS 2000). Thus, such chromosomal rearrangements are involved in the adaptive evolution of *S. cerevisiae* (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). A detailed analysis of translocations involving such repeated chromosomal rearrangements in wine yeast suggested that they are produced by illegitimate recom-

ination mediated by microhomology (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). The authors proposed that the conserved chromosomal aberration was probably generated by a spontaneous reciprocal translocation mediated by the fortuitous appearance of a broken chromosome end, which was produced by a DSB in either of the two sequences involved in the joining (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). This is consistent with our interpretation of the chromosomal evolution in the *flor* yeast, as mainly produced by large numbers of DSBs from mutagens such as acetaldehyde, which are repaired by pathways that yield GCRs. Also relevant is the proposal of DUNHAM *et al.* (2002) that genome rearrangements were the basis for the observed increases in fitness detected in six of eight *S. cerevisiae* strains evolved in continuous culture under glucose limitation. The amplicons contained several genes involved in glucose uptake and metabolism (*e.g.*, *CIT1* or *HXT6* genes).

To explore whether the selection of the chromosomal rearrangements detected in the *flor* yeast strains were an adaptive response to environmental conditions, we analyzed the function of the genes included within the amplicons described in Figure 6. One amplified region in strain 11.3 included a large portion of chromosome XVI, whose breakpoint is located at ~374 kb from the left telomere (see Figure 6), within the *YPL093W-YPL092W (SSU1)* intergenic region. This is consistent with the amplification having adaptive value as proposed by PÉREZ-ORTÍN *et al.* (2002; see above). A comparative study of the transcriptomes between the *flor* yeast strain 11.3 (used in the present study) and the *S. cerevisiae* laboratory strain X2180 (S288C background) during their growth under enological-like conditions revealed that up to 51 ORFs are significantly overexpressed in strain 11.3 (J. J. INFANTE, L. REBORDINOS, J. M. CANTORAL and B. BLONDIN, unpublished results). Among them, 20 genes are included within the amplicons described in strain 11.3 (Table 2). Most of these genes have functions related to specific phenotypes characteristic of *flor* yeast strains. For example, a region of chromosome IX at 312–425 kb amplified in the genome of strain 11.3 (Figure 6) contains two genes, *MUC1 (FLO11)* and *HYR1*, which are overexpressed in the *flor* yeast under enological conditions. *MUC1* encodes a cell surface glycoprotein required in *S. cerevisiae* for biofilm formation (REYNOLDS and FINK 2001), a defining characteristic of *flor* yeast strains. *HYR1* encodes a hydroperoxide glutathione peroxidase considered to be the main line of enzymatic defense against oxidative membrane damage (AVERY and AVERY 2001). The ORF *SSU1* was also found overexpressed in strain 11.3, suggesting that the chromosomal rearrangement whose breakpoint is located at 374 kb from the chromosome XVI left telomere (Figure 6) has had physiological consequences, producing in strain 11.3 the machinery for the sulfite-resistance phenotype, which has previously been described in other wine yeast strains (PÉREZ-ORTÍN *et al.* 2002). Moreover,

TABLE 2

ORFs included in genomic regions amplified in *S. cerevisiae* flor yeast strain 11.3 (Figure 6) that have been found overexpressed in this strain with respect to *S. cerevisiae* X2180 strain during growth under enological-like conditions

ORF	Name	Chromosome	Gene product characteristics
<i>YBL092W</i>	<i>RPL32</i>	II (20–82 kb)	60S large subunit ribosomal protein
<i>YBR089C-A</i>	<i>NHP6B</i>	II (427–436 kb)	Regulation of transcription (chromatin architecture)
<i>YCL018W</i>	<i>LEU2</i>	III (76–105 kb)	3-Isopropylmalate dehydrogenase
<i>YCL050C</i>	<i>APA1</i>	III (3, 5–70 kb)	ATP adenylyltransferase
<i>YDL198C</i>	<i>YHM1</i>	IV (0–116 kb)	Mitochondrial carrier protein (maintenance of mitochondrial genome)
<i>YEL017C-A</i>	<i>PMP2</i>	V (30–128 kb)	Plasma membrane H ⁺ -ATPase regulator
<i>YER044C^a</i>	<i>ERG28</i>	V (196–313 kb)	Involved in ergosterol biosynthesis
<i>YER163C</i>		V (488–554 kb)	Biological process/function unknown
<i>YGR234W^a</i>	<i>YHB1</i>	VII (697–1095 kb)	Flavohemoglobin (cell protection against nitrosilation)
<i>YHR053C</i>	<i>CUP1-1</i>	VIII (208–217 kb)	Copper-binding (metallothionein) protein
<i>YHR055C</i>	<i>CUP1-2</i>	VIII (208–217 kb)	Copper-binding (metallothionein) protein
<i>YHR096C</i>	<i>HXT5</i>	VIII (285–320 kb)	Hexose transporter
<i>YHR162W^a</i>		VIII (320–481 kb)	Biological process/function unknown
<i>YIL065C</i>	<i>FIS1</i>	IX (232–243 kb)	Involved in mitochondrial fission
<i>YIL155C</i>	<i>GUT2</i>	IX (18–57 kb)	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase (mitochondrial)
<i>YIR019C</i>	<i>MUC1</i>	IX (312–425 kb)	Cell surface glycoprotein involved in biofilm formation
<i>YIR037W</i>	<i>HYR1</i>	IX (312–425 kb)	Glutathione peroxidase
<i>YMR009W</i>		XIII (196–427 kb)	Biological process/function unknown
<i>YPL092W</i>	<i>SSU1</i>	XVI (374–590 kb)	Sulphite transport (sulphite resistance)
<i>YPR099C</i>		XVI (729–825 kb)	Biological process/function unknown

Positions of limits of the genomic regions in each chromosome (from left telomere) are indicated.

^a ORFs with significant log ratios, which indicate a higher copy in strain 11.3, but included within a chromosomal region with equal copy number in both 11.3 and 1.28 strains. Therefore these regions are represented with open bars in Figure 6.

copper sulfite has been used extensively during wine making to control the mold growth on grapes and to kill bacteria and stabilize wines. For that reason, overexpression of *CUP1*, which is related to copper resistance (JENSEN *et al.* 1996), may be interpreted as an adaptation of the wine yeast to the relatively high concentrations of this metal in musts and wines. The overexpression of *ERG28*, important in ergosterol biosynthesis (GACHOTTE *et al.* 2001), and *YHM1*, related to maintenance and integrity of the mitochondrial genome (KAO *et al.* 1996; CONTAMINE and PICARD 2000), may counteract the mutagenic effects induced by ethanol on both the plasma membrane and the mitochondrial DNA (JIMÉNEZ and BENÍTEZ 1988; CHI and ARNEBORG 1999). *GUT2* encodes the mitochondrial enzyme that mediates the assimilation of glycerol (RONNOW and KIELLAND-BRANDT 1993), which is a major carbon source in sherry wine. Furthermore, the overexpression of *LEU2* is in agreement with the hypothesis that *floryeasts* use the synthesis of amino acids to balance the internal redox potential (MAURICIO *et al.* 2001). The presence of these genes within amplified chromosomal segments in the genome of strain 11.3 might have been the reason for the selection of the amplification. These results strongly suggest that changes in gene expression detected in the genes

listed in Table 2 are due to an increase in DNA copy number.

In addition, the *ADH2* gene, whose product is the alcohol dehydrogenase isozyme mainly responsible for the assimilation of ethanol (WILLS 1976), is also located within an amplified region in strain 11.3 (chromosome XIII, 850–882 kb; see Figure 6). Three more genes, which encode the alcohol dehydrogenase isozymes ADHIV, ADHIII (mitochondrial), and ADHVI (YOUNG *et al.* 2000; LARROY *et al.* 2002), are also included in amplified regions in chromosomes VII (region 0–37 kb) and XIII (regions 427–450 kb and 905–917 kb). Moreover, the unique genomic region amplified in strain 11.3 that is located on chromosome XV (1037–1077 kb) carries, among others, the *ALD4* gene, which encodes the major mitochondrial isoform of aldehyde dehydrogenase, another enzyme directly implicated in ethanol assimilation (REMIZE *et al.* 2000).

In regard to strain 1.28, we did not find genes within its amplified regions that could directly account for its unique phenotypic characteristics, such as its high tolerance to both ethanol and acetaldehyde or its capacity to release high amounts of acetaldehyde into the wine under enological conditions (MARTÍNEZ *et al.* 1998). However, genes implicated in vesicular protein traffick-

ing and degradation, such as *SEC17*, *VPS15* (required for autophagy), *PEX19*, *ERP3*, *SEC1*, *SEC21*, *SRP1*, or *MRS6* (CHERRY *et al.* 2003) are present in up to eight different small amplified chromosomal segments. Whether these genes play an indirect role in producing the unique phenotypic characteristics is unknown.

In summary, our genomic analysis of two different *flor* yeast strains provides further evidence that GCRs might be a general mechanism for chromosomal evolution in yeasts that are under a strong selective pressure. In the case of *flor* yeast, nonallelic interactions may be stimulated by the production of DSBs in the chromosomal DNA mainly by ethanol and acetaldehyde. Either the large number of DSBs induced or a defect in a system controlling the level of ectopic recombination might induce DNA repair by pathways that yield GCRs. Such rearrangements produce amplified chromosomal segments that result in increased expression of certain genes located within the amplicons, producing the essential physiological characteristics of the *flor* yeast. A generalization of this model of chromosomal evolution might explain the bursts of translocations that apparently occurred at different epochs during yeast genome evolution (FISCHER *et al.* 2000). The same mechanisms might accelerate the speciation process within industrial yeast by enhancing the sexual isolation between different *S. cerevisiae* industrial strains. However, the extremely low level of sporulation and the low fertility described in some industrial strains indicate that the accumulation of GCRs could lead to the incapacity of a given strain to propagate meiotically, becoming a dead end in terms of speciation.

This work was supported by European Regional Development Fund (ERDF) grant 1FD97-0820-C04-04 from the European Union (to J.M.C.) and grant GM-26079 from the National Institutes of Health (to E.T.Y.). J. J. Infante was a recipient of a Formación Profesorado Universitario fellowship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deportes of the Spanish government.

LITERATURE CITED

- ADAMS, J., S. PUSKAS-ROZCA, J. SIMLAR and C. M. WEILKE, 1992 Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cult. Biol.* **22**: 13–19.
- AGUILERA, A., 2002 The connection between transcription and genomic instability. *EMBO J.* **21**: 195–201.
- AGUILERA, A., S. CHÁVEZ and F. MALAGÓN, 2000 Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence. *Yeast* **16**: 731–754.
- AVERY, A. M., and S. V. AVERY, 2001 *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J. Biol. Chem.* **276**: 33730–33735.
- BARNETT, J. A., R. W. PAYNE and D. YARROW, 1990 *Yeast: Characteristics and Identification*, Ed. 2. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- BENÍTEZ, T., P. MARTÍNEZ and A. C. CODÓN, 1996 Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiologia* **12**: 371–384.
- BIDENNE, C., B. BLONDIN, S. DEQUIN and F. VEZINHET, 1992 Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cult. Genet.* **22**: 1–7.
- BLASIAK, J., A. TRZECIAK, E. MAŁECKA-PANAS, J. DRZEWOŚKI and M. WOJEWÓDZKA, 2000 *In vitro* genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. *Toxicol. in Vitro* **14**: 287–295.
- BUDRONI, M., G. GIORDANO, G. PINNA and G. A. FARRIS, 2000 A genetic analysis of natural *flor* strains of *Saccharomyces cerevisiae* isolated during biological ageing from Sardinian wines. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 657–662.
- BUHLER, J., T. IDEKER and D. HAYNOR, 2000 *Dapple: Improved Techniques for Finding Spots on DNA Microarrays*. UW CSE. Technical report UWTR 2000–08–05, University of Washington, Seattle.
- CASTREJÓN, F., A. C. CODÓN, B. CUBERO and T. BENÍTEZ, 2002 Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism in *flor* yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 462–467.
- CAVALIERI, D., J. P. TOWNSEND and D. L. HARTL, 2000 Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12369–12374.
- CHA, R. S., and N. KLECKNER, 2002 ATR homolog *Mec1* promotes fork progression, thus averting breaks in replication slow zones. *Science* **297**: 602–606.
- CHERRY, J. M., C. BALL, K. DOLINSKI, S. DWIGHT, M. HARRIS *et al.*, 2003 *Saccharomyces* Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).
- CHI, Z., and N. ARNEBORG, 1999 Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 1047–1052.
- CODÓN, A. C., T. BENÍTEZ and M. KORHOLA, 1998 Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 154–163.
- CONTAMINE, V., and M. PICARD, 2000 Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 281–315.
- DELNERI, D., I. COLSON, S. GRAMMENOUDI, I. N. ROBERTS, E. J. LOUIS *et al.*, 2003 Engineering evolution to study speciation in yeasts. *Nature* **422**: 68–72.
- DUNHAM, M. J., H. BADRANE, T. FEREA, J. ADAMS, P. O. BROWN *et al.*, 2002 Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16144–16149.
- ESTEVE-ZARZOSO, B., M. J. PERIS-TORÁN, E. GARCÍA-MAIQUEZ, F. URUBURU and A. QUEROL, 2001 Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2056–2061.
- FERNÁNDEZ-ESPINAR, M., B. ESTEVE-ZARZOSO, A. QUEROL and E. BARRIO, 2000 RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of *flor* yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 87–97.
- FISCHER, G., S. A. JAMES, I. N. ROBERTS, S. G. OLIVER and E. J. LOUIS, 2000 Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature* **405**: 451–454.
- GACHOTTE, D., J. ECKSTEIN, R. BARBUCH, T. HUGHES, C. ROBERTS *et al.*, 2001 A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **42**: 150–154.
- GERTON, J. L., J. DERISI, R. SHROFF, M. LICHTEN, P. O. BROWN *et al.*, 2000 Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 11383–11390.
- GUIJO, S., J. C. MAURICIO, J. M. SALMON and J. M. ORTEGA, 1997 Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and *flor* film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast* **13**: 110–117.
- GUTHRIE, C., and G. R. FINK, 1991 *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology* (Methods in Enzymology, Vol. 194). Academic Press, San Diego.
- HAUSER, N. C., K. FELLEBERG, K., R. GIL, S. BASTUCK, J. D. HOHEISEL *et al.* 2001 Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comp. Funct. Genomics* **2**: 69–79.
- HUGHES, T. R., C. J. ROBERTS, H. DAI, R. A. JONES, M. R. MEYER *et al.*, 2000 Widespread aneuploidy revealed by DNA microarray expression profiling. *Nat. Genet.* **25**: 333–337.
- IBEAS, J. I., and J. JIMÉNEZ, 1996 Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. *Curr. Genet.* **30**: 410–416.
- IBEAS, J. I., I. LOZANO, F. PERDIGONES and J. JIMÉNEZ, 1997 Dynamics

- of *flor* yeast populations during the biological aging of sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**: 75–79.
- JENSEN, L. T., W. R. HOWARD, J. J. STRAIN, D. R. WINGE and V. C. CULOTTA, 1996 Enhanced effectiveness of copper ion buffering by *CUP1* metallothionein compared with *CRS5* metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 18514–18519.
- JIMÉNEZ, J., and T. BENÍTEZ, 1988 Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Cult. Genet.* **13**: 461–469.
- KAO, L. R., T. L. MEGRAW and C. B. CHAE, 1996 *SHM1*: a multicopy suppressor of a temperature-sensitive null mutation in the *HMGL1*-like *ABF2* gene. *Yeast* **30**: 1239–1250.
- KOLODNER, R. D., C. D. PUTNAM and K. MYUNG, 2002 Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**: 552–557.
- KRAMER, K. M., J. A. BROCK, K. BLOOM, J. K. MOORE and J. E. HABER, 1994 Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, non-homologous recombination events. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1293–1301.
- KURTZMAN, C. P., and J. W. FELL, 1998 *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Ed. 4. Elsevier Science, Amsterdam.
- LARROY, C., M. R. FERNÁNDEZ, E. GONZÁLEZ, X. PARÉS and J. A. BIOSCA, 2002 Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *YMR318C (ADH6)* gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem. J.* **361**: 163–172.
- LEWIS, L. K., and M. A. RESNICK, 2000 Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* **451**: 71–89.
- LOUIS, E. J., and J. E. HABER, 1990 The subtelomeric *Y'* repeat family in *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental system for repeated sequence evolution. *Genetics* **124**: 533–545.
- MARTÍNEZ, P., A. C. CODÓN, L. PÉREZ and T. BENÍTEZ, 1995 Physiological and molecular characterization of *flor* yeasts: polymorphism of *flor* yeast populations. *Yeast* **11**: 1399–1411.
- MARTÍNEZ, P., L. PÉREZ-RODRÍGUEZ and T. BENÍTEZ, 1997 Evolution of *flor* yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**: 160–168.
- MARTÍNEZ, P., M. J. VALCÁRCEL, L. PÉREZ and T. BENÍTEZ, 1998 Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae flor* yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**: 240–250.
- MAURICIO, J. C., E. VALERO, C. MILLÁN and J. M. ORTEGA, 2001 Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by *flor* yeasts. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 3310–3315.
- MESA, J. J., J. J. INFANTE, L. REBORDINOS and J. M. CANTORAL, 1999 Characterization of yeasts involved in the biological ageing of sherry wines. *Food Sci. Tech.* **32**: 114–120.
- MESA, J. J., J. J. INFANTE, L. REBORDINOS, J. A. SÁNCHEZ and J. M. CANTORAL, 2000 Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **51**: 15–21.
- MOORE, I. K., M. P. MARTIN and C. E. PAQUIN, 2000 Telomere sequences at the novel joints of four independent amplifications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Mol. Mutagen.* **36**: 105–112.
- MORTIMER, R. K., 2000 Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Res.* **10**: 403–409.
- PÉREZ-ORTÍN, J. E., A. QUEROL, S. PUIG and E. BARRIO, 2002 Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* **12**: 1533–1539.
- POLLACK, J. R., C. M. PEROU, A. A. ALIZADEH, M. B. EISEN, A. PERGAMENSCHIKOV *et al.*, 1999 Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **23**: 41–46.
- PRADO, F., F. CORTÉS-LEDESMA, P. HUERTAS and A. AGUILERA, 2003 Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cult. Genet.* **42**: 185–198.
- PRETORIUS, I. S., 2000 Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675–729.
- PUIG, S., A. QUEROL, E. BARRIO and J. E. PÉREZ-ORTÍN, 2000 Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2057–2061.
- RACHIDI, N., P. BARRE and B. BLONDIN, 1999 Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 841–850.
- REMIZE, F., E. ANDRIEU and S. DEQUIN, 2000 Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3151–3159.
- REYNOLDS, T. B., and G. R. FINK, 2001 Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* **291**: 878–881.
- RISTOW, H., A. SEYFARTH and E. R. LOCHMANN, 1995 Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat. Res.* **326**: 165–170.
- RONNOW, B., and M. C. KIELLAND-BRANDT, 1993 *GUT2*, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 1121–1130.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SANCHO, E. D., E. HERNÁNDEZ and A. RODRÍGUEZ-NAVARRO, 1986 Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherrylike wine. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 395–397.
- SNIEGOWSKI, P., P. GERRISH and R. LENSKI, 1997 Evolution of high mutation rates in experimental populations of *Escherichia coli*. *Nature* **387**: 703–705.
- WICKSTEED, B. L., I. COLLINS, A. DERSHOWITZ, L. I. STATEVA, R. P. GREEN *et al.*, 1994 A physical comparison of chromosome III in six strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 39–57.
- WILLS, C., 1976 Production of yeast alcohol dehydrogenase isoenzymes by selection. *Nature* **261**: 26–29.
- WOLFE, K. H., and D. C. SHIELDS, 1997 Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708–713.
- YOUNG, E. T., J. SLOAN, B. MILLER, K. VAN RIPER, N. LI *et al.*, 2000 Evolution of a glucose-regulated *ADH* gene in the genus *Saccharomyces*. *Gene* **245**: 299–309.
- YU, X., and A. GABRIEL, 2003 Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 843–856.

Communicating editor: L. S. SYMINGTON

