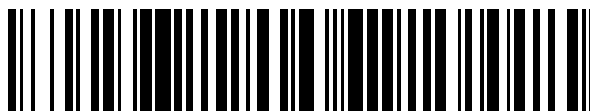


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 628**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/36** (2006.01)  
**C12Q 1/6895** (2008.01)  
**C12N 9/90** (2006.01)  
**C12N 15/01** (2006.01)  
**C12N 1/16** (2006.01)  
**C12N 1/18** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2013 PCT/EP2013/075045**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2013 E 13799018 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2925854**

54 Título: **Procedimiento de mejora de cepas de levadura**

30 Prioridad:

**30.11.2012 FR 1261456**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.05.2020**

73 Titular/es:

**INSTITUT CURIE (20.0%)**  
**26, rue d'Ulm**  
**75248 Paris Cedex 05, FR;**  
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE**  
**SCIENTIFIQUE (20.0%);**  
**SORBONNE UNIVERSITÉ (20.0%);**  
**UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS (20.0%) y**  
**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET**  
**DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (20.0%)**

72 Inventor/es:

**NICOLAS, ALAIN y**  
**LITI, GIANNI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 759 628 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento de mejora de cepas de levadura

5 La presente invención se refiere al campo de la microbiología, más particularmente al campo de las levaduras. Se refiere principalmente a un procedimiento para mejorar o modificar una cepa de levadura híbrida de interés industrial, en particular a una cepa híbrida incapaz de esporular, sin haber recurrido a técnicas de ADN recombinante.

**Antecedentes tecnológicos de la invención**

10 Las levaduras encuentran su aplicación en campos industriales extremadamente variados. Debido a la inocuidad de un gran número de especies, las levaduras se usan principalmente en la industria alimentaria como agente de fermentación en panadería, fabricación de cerveza, vinificación o destilería, o en forma de extractos como elementos nutricionales o agentes de sazón. Igualmente pueden encontrar su uso en la producción industrial de bioetanol o de moléculas de interés, tales como vitaminas, antibióticos, vacunas, enzimas u hormonas esteroideas o también en los procedimientos de degradación de materias celulósicas.

15 La diversidad de aplicaciones industriales de levaduras, y en particular de *Saccharomyces cerevisiae*, implica que existe una demanda constante de cepas de levadura que presenten características mejoradas o al menos adaptadas a una nueva utilización o a nuevas condiciones de cultivo.

20 Con el fin de obtener una cepa que presente una característica particular, el experto dispone de una variedad de herramientas y métodos. Puede proceder principalmente a la modificación genética de la cepa introduciendo en ella uno o varios genes heterólogos, modificando o suprimiendo la expresión de genes endógenos. Sin embargo, la modificación genética de una cepa por una técnica de ADN recombinante puede constituir un freno a su explotación, ya sea por razones reguladoras, sanitarias o medioambientales.

La reproducción sexual se puede utilizar igualmente para la mejora de levaduras cruzando dos cepas parentales que presenten características interesantes y seleccionando una cepa híbrida que aporte la combinación deseada de las características parentales. Las células haploides obtenidas de productos de esporulación también se pueden cribar para identificar aquellas en las que la recombinación meiótica permitía obtener la característica deseada.

25 Sin embargo, las cepas de levadura utilizadas en la industria son con frecuencia células híbridas obtenidas por el cruzamiento de cepas genéticamente distintas y pueden ser estériles debido a su incapacidad para producir esporas viables. Para estas células híbridas que son de gran interés económico, es por tanto imposible generar la diversidad genética por reproducción sexual y la selección de productos de esporulación.

**Sumario de la invención**

30 El objeto de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

El objetivo de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento para mejorar cepas de levadura de interés industrial, incluidas las levaduras híbridas estériles, sin recurrir a técnicas de ADN recombinante, y para obtener levaduras, preferiblemente con un grado de ploidía superior o igual a 2, y en particular diploides, de genotipo recombinado que permita el análisis rápido de caracteres cuantitativos de interés.

35 Según un primer aspecto, la presente invención se refiere, por tanto, a un procedimiento para mejorar una cepa de levadura híbrida de interés industrial, que comprende:

- a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;
- 40 b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir la formación de roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;
- c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;
- d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y
- 45 e) el cribado o la selección de las levaduras recombinadas con el fin de identificar las que presentan la mejora deseada,

siendo la cepa de levadura de interés industrial un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por la transgénesis y/o siendo las levaduras mejoradas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,

repetiéndose las etapas a) a d) o a) a e) al menos una vez a partir de una o más levaduras recombinadas.

El procedimiento puede comprender además la obtención de una o más levaduras recombinadas que presenten la mejora deseada a partir del cribado o de la selección de la etapa e).

5 La presente solicitud describe igualmente el uso del proceso de RTG de la levadura para mejorar una cepa de levadura de interés industrial, siendo inducido dicho proceso de RTG por la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir la formación de roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis.

Preferiblemente, la levadura de interés industrial presenta un grado de ploidía superior o igual a 2.

10 La cepa de levadura de interés industrial es una levadura híbrida.

Puede ser haploide, aneuploide, diploide o poliploide, preferiblemente diploide, aneuploide o poliploide, y más particularmente preferida diploide.

Preferiblemente, la levadura de interés industrial es una levadura híbrida diploide.

La cepa de levadura de interés industrial puede ser una cepa híbrida estéril.

15 Según un modo preferido, la cepa de levadura de interés industrial es una cepa híbrida diploide estéril.

La cepa es un organismo no modificado genéticamente.

Las levaduras recombinadas presentan uno o varios episodios de recombinación por célula, preferiblemente varios episodios de recombinación. Preferiblemente, dichos episodios de recombinación inducen una disminución en la tasa de heterocigosidad.

20 Las etapas a) a d) o a) a e) se repiten al menos una vez a partir de una o varias levaduras recombinadas.

Las levaduras recombinadas recuperadas en la etapa d) se pueden conservar en forma de bancos de levaduras antes de ser cribadas o seleccionadas en la etapa e).

Las levaduras recombinadas o mejoradas obtenidas por el procedimiento según la invención no son organismos genéticamente modificados (OGM).

25 La cepa de levadura de interés industrial está destinada preferiblemente a la industria alimentaria, a la producción de biocarburantes, en particular bioetanol, a la producción de moléculas de interés, tales como vitaminas, antibióticos, vacunas, enzimas u hormonas esteroideas, o a la degradación de celulosa o biomasa lignocelulósica y/o pertenece preferiblemente a la especie *Saccharomyces cerevisiae* o es un híbrido obtenido a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 La mejora deseada se puede referir a una o varias características seleccionadas del grupo constituido por la velocidad de crecimiento, la termotolerancia, la criotolerancia, la sensibilidad al pH, la capacidad de fermentación, la rapidez de fermentación, la resistencia al etanol, la resistencia a un compuesto particular presente en el medio de fermentación o excretado por el cultivo celular, la morfología celular, el carácter de floculación, la sensibilidad a una molécula particular, la eficacia de esporulación, los perfiles aromáticos, las exigencias nutricionales, la resistencia al secado y la fermentación de un azúcar particular.

35 Según un segundo aspecto no reivindicado, la presente solicitud describe igualmente un procedimiento para generar un banco de levaduras recombinadas a partir de una levadura, que comprende:

a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;

40 b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;

c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;

d) la recuperación de levaduras recombinadas con el fin de formar un banco de levaduras recombinadas.

45 La levadura puede ser haploide, aneuploide, diploide o poliploide, preferiblemente diploide, aneuploide o poliploide, y más particularmente preferida diploide.

Preferiblemente, la levadura presenta un grado de ploidía superior o igual a 2.

La solicitud describe igualmente un banco de levaduras recombinadas obtenidas según dicho procedimiento.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere también a un procedimiento para identificar o localizar información genética que codifica una característica de interés, preferiblemente un carácter cuantitativo de interés (QTL), en una levadura híbrida, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, que comprende:

- 5 a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;
  - b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;
  - 10 c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;
  - d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y
  - e) el análisis de los genotipos y fenotipos de las levaduras recombinadas con el fin de identificar o localizar la información genética que codifica las características de interés,
  - 15 siendo la cepa de levadura híbrida un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis y/o siendo las levaduras recombinadas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,
- repetiéndose las etapas a) a d) o a) a c) al menos una vez a partir de una o varias levaduras recombinadas.

En particular, la característica de interés se puede seleccionar del grupo constituido por la velocidad de crecimiento, la termotolerancia, la criotolerancia, la sensibilidad al pH, la capacidad de fermentación, la rapidez de fermentación, la resistencia al etanol, la resistencia a un compuesto particular presente en el medio de fermentación o excretado por el cultivo celular, la morfología celular, el carácter de floculación, la sensibilidad a una molécula particular, la eficacia de esporulación, los perfiles aromáticos, las exigencias nutricionales, la resistencia al secado y la fermentación de un azúcar particular.

#### Breve descripción de los dibujos

- 25 **Figura 1:** Mapeo de los SNP en células RTG obtenido por el protocolo 2 de «*return-to-growth*», es decir depositando las células tomadas durante la esporulación en un medio selectivo de DO-arginina con el fin de seleccionar las células recombinantes portadoras de un alelo ARG4. Para cada diploide RTG, se representa el genotipo de los dos cromosomas homólogos: heteroalélico (gris claro), mono-alélico (gris oscuro), si es de origen SK1, o mono-alélico (negro), si es de origen S288C. **Fig. 1A:** Genotipo de la célula RTG AND1708 (21 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 34 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 691 kb). **Fig. 1B:** Genotipo de la célula RTG AND1709 (29 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 53 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 264 kb). **Fig. 1C:** Genotipo de la célula RTG AND1710 (11 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 15 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 431 kb). **Fig. 1D:** Genotipo de la célula RTG AND1711 (25 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 38 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 398 kb). **Fig. 1E:** Genotipo de la célula RTG AND1712 (7 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 7 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 415 kb). **Fig. 1F:** Genotipo de la célula RTG AND1720 (13 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 18 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 537 kb).
- 45 **Figura 2:** Mapeo de los SNP en las parejas madre/hijas resultantes del protocolo 3 de «*return-to-growth*», es decir, por aislamiento de las células RTG por micromanipulación. Para cada diploide RTG, están reagrupadas las dos células madre e hija que provienen del mismo episodio de RTG. **Fig. 2A:** Genotipo de las células RTG AND1733 (célula madre) y AND1734 (célula hija) (29 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 45 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 300 kb). **Fig. 2B:** Genotipo de las células RTG AND1735 (célula madre) y AND1736 (célula hija) (5 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 6 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 361 kb). **Fig. 2C:** Genotipo de las células RTG AND1737 (célula madre) y AND1738 (célula hija) (3 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 3 uniones entre regiones mono-alélicas y regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 393 kb). **Fig. 2D:** Genotipo de las células RTG AND1739 (célula madre) y AND1740 (célula hija) (8 regiones mono-alélicas de más de 20 kb; 10 uniones entre regiones mono-alélicas y

regiones bi-alélicas o entre regiones mono-alélicas de alelos diferentes; tamaño de la mayor región de pérdida de heterocigosidad: aproximadamente 357 kb).

**Figura 3.** Genotipo de las cuatro esporas de la tétrada procedente de la célula RTG AND1710. Para cada uno de los 16 cromosomas, el genotipo de las esporas A, B, C y D de la tétrada está representado uno debajo de otro.

5 **Figura 4.** Mapeo de los SNP de las células resultantes de la reiteración del proceso de RTG. La célula RTG AND1735 (Figura 2B y Figura 4A) ha experimentado un segundo ciclo de RTG que genera la célula diploide recombinada AND2711 (Figura 4B) y luego un tercer ciclo de RTG que genera la célula diploide recombinada AND2907 (Figura 4C). Se muestra el porcentaje de heterocigosidad y el porcentaje relativo a los alelos de fondo genético S288c o SK1 calculados entre las regiones de pérdida de heterocigosidad (Fig. 4 A-C). La reiteración del  
10 proceso de RTG conduce a recombinaciones adicionales, una disminución gradual en el grado de heterocigosidad y variaciones en la proporción de regiones mono-alélicas del genotipo puramente S288C y SK1 (Fig. 4 A-C).

**Figura 5.** Mapeo de los SNP de células RTG procedentes de la cepa AND2248 deficiente en esporulación. Estas tres células AND2642 (**Fig. 5A**), AND2652 (**Fig. 5B**) y AND2658 (**Fig. 5C**) resultantes de un ciclo de RTG son diploides y de genotipo recombinado. Su genotipo es diferente. En los tres casos, se redujo el grado de heterocigosidad con relación a la célula parental (84,4%, 79,3% y 93,1%) y las regiones mono-alélicas S288C o SK1 aparecen en proporciones variables.  
15

**Figura 6.** Análisis comparativo del genotipo alélico de 19 células RTG procedente de las células diploides AND1702, AND1735, AND2907 y AND2248. Para cada célula RTG, están representados el porcentaje de los SNP bi-alélicos (heterocigotos), mono-alélicos si son de origen 288C o mono-alélicos si son de origen SK1. Sus proporciones varían de una célula RTG a otra.  
20

**Figura 7.** Mapeo de las posiciones de polimorfismo SNP asociadas a fenotipos simples. La longitud de cada cromosoma está representada por una delgada línea negra horizontal. El estudio de varias células resultantes de RTG tiene por efecto reducir el número de regiones candidatas y mejorar la resolución del mapeo en las regiones restantes. Debido al pequeño número de muestras analizadas, varias regiones candidatas se encuentran asociadas al fenotipo de auxotrofia para la metionina o la leucina. **Fig. 7A:** Mapeo de las posiciones de polimorfismo SNP asociadas al fenotipo de auxotrofia para la metionina. El locus MET15 (triángulo) se encuentra asociado al fenotipo de auxotrofia para la metionina. **Fig. 7B:** Mapeo de las posiciones de polimorfismo SNP asociadas al fenotipo de auxotrofia para la leucina. El locus LEU2 (triángulo) se encuentra asociado al fenotipo de auxotrofia para la leucina.  
25

**Figura 8.** Ensayos de crecimiento de las células parentales y RTG. Crecimiento a 30°C, 40°C en medio YPD y a 30°C en medio YPD que contiene arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub> 1,5 mM). Para cada cepa, se han depositado 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup> y 10<sup>1</sup> células en medio YPD y se han incubado durante 2 días a 30°C con y sin NaAsO<sub>2</sub> o a 40°C (sin NaAsO<sub>2</sub>).  
30

### Descripción detallada de la invención

Entre las diferentes especies de levadura explotadas en la industria, se utiliza con frecuencia *Saccharomyces cerevisiae*. La *S. cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular haplodiplobióntico, es decir, un organismo que presenta un ciclo de reproducción a lo largo del cual la multiplicación celular tiene lugar tanto en un estado haploide como en un estado diploide.  
35

Las células se pueden reproducir de manera clonal por divisiones mitóticas. La célula hija aparece entonces en forma de un brote de la fase S de replicación del genoma, luego crece y se separa de la célula madre. Durante las divisiones mitóticas, el conjunto del genoma (12.071.326 nucleótidos para el genoma nuclear) se replica y transmite fielmente de la célula madre a la célula hija. Pueden existir fenómenos de recombinación homóloga, pero esencialmente para asegurar la reparación de las roturas accidentales de las dobles cadenas del ADN que se pueden producir durante el bloqueo de la replicación o durante la exposición de las células a agentes genotóxicos. En este caso, la cromátida hermana se utiliza preferiblemente como matriz. Durante la mitosis, es rara la recombinación entre los cromosomas homólogos, lo que permite que las células en crecimiento vegetativo mantengan el mismo patrimonio genético.  
40  
45

Las levaduras se pueden reproducir igualmente por reproducción sexual a través de la meiosis y la esporulación. Por una parte, dos células haploides de tipos sexuales opuestos (MAT $\alpha$  y MATa) se pueden fusionar para formar una célula diploide MAT $\alpha$ /MATa que se reproduce idénticamente por mitosis. Por otra parte, en condiciones de carencia nutricional, las células diploides comienzan la esporulación pasando por un proceso meiótico que genera, para cada célula diploide, cuatro esporas haploides empaquetadas en una tétrada. La germinación de estas esporas produce células haploides que a su vez serán capaces de fusionarse para formar una nueva célula diploide.  
50

La iniciación del ciclo meiótico depende de varias señales transmitidas simultáneamente a la célula: una señal genética de diploide indicada por la presencia de dos alelos de tipo sexual MAT $\alpha$  y MATa, y señales nutricionales de ausencia de fuente de nitrógeno y de carbono fermentable y de la presencia de una fuente de carbono que puede ser metabolizada por la respiración (Honigberg and Purnapatre, 2003).  
55

Durante la meiosis, contrariamente a lo que pasa durante las divisiones mitóticas, la información genética de las células diploides parentales no es transmitida idénticamente a las células haploides. En efecto, esta se reduce a la mitad y durante la profase I de la meiosis tienen lugar numerosos intercambios genéticos entre los cromosomas homólogos. La recombinación meiótica que se produce durante la profase I implica (i) la formación de roturas de  
 5 dobles cadenas por la proteína Spo11, (ii) la resección de nucleótidos en el extremo 5' de las roturas, (iii) la invasión del extremo 3'-saliente de una cadena al nivel de una cromátida del cromosoma homólogo y (iv) la reparación de la rotura produciendo un entrecruzamiento (intercambio recíproco entre los cromosomas homólogos), una conversión  
 génica (copia de un segmento de ADN sin intercambio recíproco entre los cromosomas homólogos) o ambas (conversión génica asociada a un entrecruzamiento).

Una particularidad de la levadura *S. cerevisiae* es que la inducción del comienzo de la profase I de la meiosis es reversible. Este proceso, denominado en inglés "*Return to Growth*" (RTG), se produce cuando las células diploides que han comenzado la meiosis en respuesta a una carencia nutricional son puestas de nuevo en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno después de la formación de las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11, pero antes de la primera división de la meiosis (Honigberg and Esposito, 1994). En estas condiciones,  
 10 interrumpen su progresión en las etapas de diferenciación meiótica para reanudar un modo de crecimiento mitótico mientras inducen recombinaciones durante la reparación de las roturas de las dobles cadenas provocadas por Spo11 (Sherman and Roman, 1963; Esposito and Esposito, 1974; Zenvirth et al., 1997). Durante el proceso de RTG, se ha observado que las roturas de las dobles cadenas se reparan muy rápidamente después de la transferencia de las células a un medio rico (Zenvirth et al., 1997). Aunque los mecanismos implicados para estas reparaciones aún  
 15 no están aclarados, se ha demostrado que son distintos de los establecidos durante la meiosis y parecen minimizar la producción de entrecruzamientos con el fin de preservar la integridad del genoma y limitar las pérdidas de heterocigosidad (Dayani et al., 2011).

Con el fin de establecer un mapa preciso de los intercambios genéticos entre cromosomas homólogos durante el proceso de RTG, los inventores procedieron a la secuenciación completa de los dieciséis cromosomas de catorce  
 25 células diploides obtenidas por RTG a partir de una levadura diploide híbrida cuyos cromosomas homólogos diferían en 63.901 marcadores de polimorfismo nucleotídico (SNP) (es decir, un marcador cada 187 pb de media). Así se pudo determinar el número y la naturaleza (entrecruzamiento o conversión génica) de los episodios de recombinación que se producen en cada una de las células durante este proceso.

De este modo se observó, de manera bastante inesperada, que las células resultantes de RTG estaban altamente recombinadas (a razón de 3 a 51 episodios de recombinación por célula) y se caracterizaban por una diversidad genética muy alta de los cromosomas homólogos, no presentando ninguna de las células el mismo perfil de recombinación. Además, los inventores han demostrado que las células resultantes de RTG presentaban recombinaciones asociadas a pérdidas de heterocigosidad de longitud variable implicando a uno o varios SNP. El tamaño físico de la pérdida de heterocigosidad variaba entre 2 pb y 700 kb. Gracias a esta visión global de los episodios de recombinación a escala del genoma, los inventores han demostrado que, al contrario de lo que se  
 30 había descrito anteriormente, los mecanismos de reparación de las roturas de las dobles cadenas durante el proceso de RTG no limitaban las pérdidas de heterocigosidad sin que por el contrario generaban una diversificación masiva de la información genética del genoma de la célula híbrida parental.

Así pues, de manera sorprendente el proceso de RTG podía utilizarse para generar una gran diversidad genética. Por tanto, este proceso es particularmente interesante para la mejora o modificación de levaduras híbridas, principalmente levaduras híbridas estériles, para las cuales es imposible obtener genotipos recombinantes a partir de esporas.

Por tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar una cepa de levadura híbrida de interés industrial, que comprende:

45 a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;

b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;

50 c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;

d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y

e) el cribado o la selección de las levaduras recombinadas con el fin de identificar las que presentan la mejora deseada

siendo la cepa de levadura de interés industrial un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis y/o siendo las levaduras mejoradas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,

repetiéndose las etapas a) a d) o a) a e) al menos una vez a partir de una o varias levaduras recombinadas.

Preferiblemente, la cepa de levadura de interés industrial presenta un grado de ploidía superior o igual a 2.

La presente solicitud describe igualmente la utilización del proceso de RTG de la levadura para mejorar una cepa de levadura de interés industrial, siendo inducido dicho proceso de RTG por la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis. Preferiblemente, la cepa de levadura de interés industrial presenta un grado de ploidía superior o igual a 2.

El proceso de RTG implica que la levadura inicia un ciclo meiótico y las roturas de las dobles cadenas antes de reanudar un modelo de crecimiento mitótico. La iniciación del ciclo meiótico depende de varias señales: la presencia de los dos alelos de tipo sexual MAT $\alpha$  y MAT $\alpha$ , la ausencia de una fuente de nitrógeno y de carbono fermentable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «medio rico» se refiere a un medio de cultivo que comprende una fuente de carbono fermentable y una fuente de nitrógeno, así como todos los elementos nutritivos necesarios para que las levaduras se multipliquen por división mitótica. Este medio puede ser fácilmente elegido por el experto en la técnica y puede, por ejemplo, ser seleccionado entre el grupo constituido por medio YPD (1% de extracto de levaduras, 2% de bacto-peptona y 2% de glucosa), medio YPG (1% de extracto levaduras, 2% de bacto-peptona y 3% de glicerol) (Trecó and Lundblad, 2001) y un medio sintético completo (o medio SC).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «medio de esporulación» se refiere a cualquier medio que induzca el comienzo de la profase de meiosis de células de levadura sin crecimiento vegetativo, particularmente en un medio de cultivo que no comprenda fuente de carbono fermentable ni fuente de nitrógeno pero que comprenda una fuente de carbono metabolizable por respiración, tal como acetato. Este medio puede ser fácilmente elegido por el experto en la técnica y puede, por ejemplo, ser seleccionado entre el grupo constituido por 1% de medio KAC (Wu and Lichten, 1994), medio SPM (Kassir and Simchen, 1991) y medios de esporulación descritos en el artículo de Sherman (Sherman, 1991).

Según un modo de realización preferido, antes de ser incubadas en el medio de esporulación, las células se cultivan durante algunos ciclos de división en un medio de pre-esporulación para obtener una esporulación eficaz y sincrónica. El medio de pre-esporulación puede ser elegido fácilmente por el experto en la técnica. Este medio puede ser, por ejemplo, el medio SPS (Wu and Lichten, 1994).

La elección de los medios (medio rico, medio de pre-esporulación, medio de esporulación) depende de las características fisiológicas y genéticas de la cepa de levadura que se ha de mejorar, principalmente si esta cepa es auxótrofa para uno o varios compuestos.

La reversibilidad de la profase de meiosis es transitoria. De hecho, si las células se vuelven a incubar en un medio rico antes de la formación de las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11, estas reanudarán rápidamente su división mitótica sin modificación del genoma. A la inversa, si las células se vuelven a cultivar en un medio rico después de una etapa de unión que se sitúa justo antes de la segregación reductora de los cromosomas durante la primera división meiótica (MI), la esporulación prosigue normalmente y genera esporas recombinadas. Por tanto, el proceso de RTG, que crea genotipos recombinados, se puede producir en un intervalo de tiempo entre la formación de las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y la etapa de unión antes de la segregación reductora de los cromosomas en MI.

La duración de incubación en el medio de esporulación puede variar según las cepas de levaduras. De hecho, para ciertas cepas que responden más lentamente a las señales de carencia nutricional, se puede aumentar la duración de incubación en este medio.

La duración de incubación en el medio de esporulación puede ser determinada por los expertos en la técnica para cada cepa de interés determinando (i) el período de formación de las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11, (ii) el período de segregación reductora de los cromosomas y (iii) la etapa de unión antes de la segregación reductora de los cromosomas. Alternativamente, la duración de incubación en el medio de esporulación puede ser determinada por un experto en la técnica para cada cepa de interés determinando únicamente la etapa de unión. La adición de una fuente de carbono y de nitrógeno puede considerarse, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 horas, preferiblemente 1 o 2 horas, antes de la etapa de unión.

La formación de roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 puede ir seguida de técnicas clásicas de biología molecular, tales como la transferencia de Southern. Del mismo modo, es posible observar la segregación reductora de los cromosomas por un simple marcaje del ADN, por ejemplo, por marcaje con DAPI. La etapa de unión antes de la cual las células deben ser puestas de nuevo en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno, se sitúa justo antes de la segregación reductora de los cromosomas. Esta etapa se puede determinar llevando a cabo experiencias de RTG durante las que las células se vuelven a poner en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno en diferentes tiempos de incubación. Por tanto, es posible definir el intervalo de tiempo durante el cual el

- 5 porcentaje de células que reanudan una división mitótica (que se puede visualizar por el nacimiento de un brote celular) es el más importante (y, en consecuencia, durante el cual el porcentaje de células que prosiguen el proceso de esporulación es el más bajo). Como ejemplo, para las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de fondo genético S288C o SK1, tales como las utilizadas en la parte experimental, este intervalo de tiempo es de 5 a 7 horas después de la transferencia de las células al medio de esporulación.
- Con el fin de volver a ponerlas en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno, las levaduras pueden ser transferidas a un medio rico, tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, se pueden añadir directamente al medio de esporulación una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno.
- 10 La fuente de carbono puede ser cualquier fuente de carbono fermentable y se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo constituido por glucosa, galactosa, glicerol, sacarosa, fructosa y maltosa. La fuente de nitrógeno se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo constituido por nitrógeno inorgánico, tal como sulfato de amonio, fosfato de amonio, nitrato de sodio, nitrato de amonio o nitrato de potasio, y nitrógeno orgánico, por ejemplo, en forma de aminoácidos (glutamato, glutamina) o extractos de levadura (Albers et al., 1996).
- 15 Las levaduras puestas de nuevo en contacto con una fuente de carbono fermentable y de nitrógeno reanudan una división mitótica después de un tiempo de adaptación durante el cual se reparan las roturas de las dobles cadenas. Los muy numerosos episodios de recombinación observados por los inventores tienen lugar en este período durante la reparación de estas roturas. La duración de este período de adaptación puede ser variable según las especies y es fácilmente ajustable por los expertos en la técnica. En general, puede durar de 1 a 3 horas, preferiblemente alrededor de 1 hora 30 minutos.
- 20 Después de este período de adaptación, las levaduras recombinadas pueden ser recuperadas (etapa (d) del procedimiento) para efectuar un cribado o una selección. Opcionalmente, antes del cribado o la selección, se pueden conservar en forma de bancos de levaduras recombinadas.
- 25 La cepa de levadura de interés industrial puede ser haploide ( $n$  cromosomas), diploide ( $2n$  cromosomas) o poliploide ( $2n$ ,  $3n$ ,  $4n$  o más cromosomas). La cepa de levadura de interés industrial puede ser igualmente aneuploide, es decir, tener una ploidía que no es un múltiplo exacto del número haploide. En este caso, la levadura puede comprender, por ejemplo,  $n+x$ ,  $2n+x$  o  $3n+x$  cromosomas, donde  $x$  es el número de cromosomas adicionales con relación al múltiplo exacto del número haploide. La levadura puede presentar, por ejemplo, una o más disomías, es decir, tener dos copias de uno o varios cromosomas (por ejemplo,  $n+1$ ,  $n+2$  o  $n+3$  cromosomas) o una o más trisomías, es decir, tener tres copias de uno o varios cromosomas (por ejemplo,  $n+2$ ,  $2n+1$  o  $2n+2$  cromosomas).
- 30 Según un modo de realización particular, la cepa de levadura de interés industrial comprende como mínimo una disomía.
- Preferiblemente, la cepa de levadura de interés industrial presenta un grado de ploidía superior o igual a 2. En particular, puede ser diploide ( $2n$ ), aneuploide (por ejemplo,  $2n+x$  o  $3n+x$ ) o poliploide (por ejemplo,  $3n$ ,  $4n$  o  $5n$ ), preferiblemente diploide.
- 35 Con el fin de ser sometida al proceso de RTG, la cepa de levadura de interés es capaz de comenzar la esporulación y proseguir hasta la etapa de formación de roturas de las dobles cadenas. En cambio, puede ser deficiente para las etapas posteriores e incapaz de formar esporas maduras y/o viables. El comienzo de la esporulación depende principalmente de una señal sexual compuesta por los dos alelos  $a$  y  $\alpha$ . En el caso de que la levadura sea haploide o aneuploide y no comprenda más que uno solo de estos alelos, es posible inducir mutaciones que conduzcan a la expresión de los dos tipos sexuales (por ejemplo, mutaciones en los genes *sir* que regulan la expresión de los loci sexuales HMR y HML) o introducir en el genoma un gen sexual que porta el alelo que falta. Dichas modificaciones han sido descritas, por ejemplo, en *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de inducir el comienzo de la meiosis de cepas haploides (De Assy et al., 1994).
- 40 La cepa de levadura de interés industrial es una levadura híbrida, preferiblemente una levadura diploide híbrida. En particular, la cepa de levadura de interés industrial se puede obtener por el cruzamiento de una cepa de interés con otra cepa genéticamente distinta y que presente una característica de interés. La célula híbrida así obtenida se transfiere luego al medio de esporulación (etapa (a) del procedimiento). Por tanto, el procedimiento según la invención puede comprender, además, antes de la etapa a), las etapas de (i) selección de una cepa de levadura genéticamente distinta de una cepa de levadura de interés industrial y que presenta una característica de interés
- 50 destinada a mejorar esta última, y (ii) el cruzamiento de la cepa de interés y de la cepa genéticamente distinta con el fin de obtener una cepa híbrida. Las características genéticas de las dos cepas parentales se recombinan luego con ayuda del procedimiento según la invención.
- 55 El término «levadura híbrida» o «cepa híbrida», tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una levadura obtenida por cruzamiento de dos cepas genéticamente distintas, es decir, de dos cepas que presentan una diferencia al nivel de su genotipo o de al menos un rasgo genético. Preferiblemente, las cepas parentales difieren al nivel de al menos una característica fenotípica, tal como, por ejemplo, la velocidad de crecimiento, la termotolerancia, la criotolerancia, la sensibilidad al pH, la capacidad y rapidez de fermentación, la resistencia al etanol o a cualquier otro compuesto presente en el medio de fermentación o excretado por el cultivo celular, la



morfología celular, el carácter de floculación, la sensibilidad a una molécula particular, la eficacia de esporulación, los perfiles aromáticos, las exigencias nutricionales, la resistencia al secado o incluso la fermentación de un azúcar particular. Las levaduras híbridas pueden ser diploides, aneuploidías, poliploides y en particular aloploidías, es decir, que comprenden varios conjuntos de cromosomas procedentes de diferentes especies. Preferiblemente, la levadura híbrida es diploide. La naturaleza híbrida puede ser intra o entre especies, preferiblemente entre especies. Los híbridos entre especies suelen ser estériles. Las levaduras híbridas pueden obtenerse por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, especialmente por fusión de dos esporas o dos protoplastos (hibridación somática).

Las levaduras resultantes de hibridaciones intra o entre especies se utilizan con frecuencia en la industria. La hibridación se puede utilizar en efecto para crear nuevas cepas de levadura que presenten una combinación de las características procedentes de las cepas parentales. Para la industria enológica, por ejemplo, puede ser interesante cruzar una cepa que presente una buena resistencia al etanol con una cepa resistente a temperaturas elevadas. A continuación, se seleccionan los híbridos que presentan la combinación de las características de interés de las cepas parentales.

Uno de los principales inconvenientes en la utilización de cepas híbridas proviene de que estas cepas son frecuentemente estériles. La esterilidad de una cepa puede provenir principalmente de su incapacidad para producir esporas maduras o de la no viabilidad de las esporas. A modo de ejemplo, las levaduras híbridas diploides obtenidas por la fusión de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus* y utilizadas en la producción de vino tinto, pueden multiplicarse por crecimiento mitótico, pero son incapaces de producir gametos haploides viables (Greig, 2007). Por tanto, estas cepas híbridas estériles no pueden ser modificadas posteriormente por cruzamiento entre descendientes o por fusión con otras cepas de interés.

En cambio, estas cepas pueden ser recombinadas según el procedimiento de la invención. Por tanto, según un modo de realización preferido, la cepa de levadura de interés industrial es una cepa híbrida estéril, y en particular una cepa híbrida diploide estéril. En efecto, los inventores han demostrado que el proceso de RTG permitía obtener cepas altamente recombinadas sin que fuera necesario completar el proceso de esporulación. El procedimiento según la invención permite por tanto obtener células altamente recombinadas a partir de híbridos estériles y así mejorar una cepa híbrida sin que por ello haya que recurrir a técnicas de ADN recombinante.

El término «levadura estéril» tal como se usa en la presente memoria se refiere a una levadura incapaz, o que tiene una capacidad reducida, de producir esporas maduras y/o una levadura cuyas esporas no son viables o tienen una viabilidad reducida. La levadura estéril es en cambio capaz de iniciar la esporulación y progresar hasta la etapa de formación de las roturas de las dobles cadenas. La levadura estéril puede tener una capacidad para producir esporas maduras reducida de 50, 60, 70, 80, 90, 95 o 99% con relación a una cepa de referencia de la misma especie o, en el caso de una levadura híbrida, con relación a una de las cepas parentales. La levadura estéril puede producir igualmente esporas con viabilidad reducida. En particular, entre las esporas producidas por esta levadura, al menos 25, 50 o 75% de las esporas pueden no ser viables. Preferiblemente, la cepa estéril es incapaz de producir esporas maduras o no produce esporas viables.

La cepa de levadura de interés industrial puede estar destinada, o puede ser utilizada, en cualquier procedimiento industrial, en particular en los procedimientos agro-alimentarios, tales como vinificación, industria cervecera, destilería o panificación, en la producción de biocarburantes, en la producción de moléculas de interés o incluso en la degradación de la celulosa.

La cepa de interés industrial puede ser cualquier cepa de levadura que, cuando se vuelve a poner en presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno, es capaz de reanudar una división mitótica después de la inducción de las roturas de las dobles cadenas en la profase de la meiosis.

La cepa de levadura de interés industrial es un organismo no modificado genéticamente. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «organismo no modificado genéticamente» se refiere a levaduras cuyo patrimonio genético no ha sido modificada por transgénesis.

Las levaduras recombinadas obtenidas por el procedimiento según la invención no son consideradas organismos genéticamente modificados (OGM).

Según un modo de realización particular, la cepa de levadura de interés industrial pertenece al género *Saccharomyces sensu stricto* o es un híbrido obtenido a partir de una cepa perteneciente al género *Saccharomyces sensu stricto*. Preferiblemente, la cepa de levadura de interés industrial pertenece a una especie seleccionada del grupo constituido por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces astelli*, *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces mikatae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces paradoxus* y *Saccharomyces pastorianus* (también denominada *Saccharomyces carlsbergensis*) o es un híbrido obtenido a partir de una cepa perteneciente a una de estas especies. Más particularmente preferida, la cepa de levadura de interés industrial pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* o es un híbrido obtenido a partir de una cepa perteneciente a la especie *Saccharomyces*

*cerevisiae*, tal como, por ejemplo, un híbrido *S. cerevisiae/S. paradoxus* o un híbrido *S. cerevisiae/S. uvarum* (Rainieri et al., 1999).

Según un modo de realización, las células recombinadas obtenidas después del proceso de RTG (en la etapa (d) del procedimiento según la invención) están altamente recombinadas y presentan varios episodios de recombinación por célula, preferiblemente más de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 episodios de recombinación por célula. Cada episodio puede traducirse como un entrecruzamiento, una conversión génica o una conversión génica asociada a un entrecruzamiento dependiendo del mecanismo implicado en la reparación de la rotura de las dobles cadenas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término «episodio de recombinación» se refiere a una unión recombinante observada en el genotipo de una célula resultante de RTG (i) entre una región mono-alélica, preferiblemente de al menos 20 kb, y una región bi-alélica o (ii) entre dos regiones mono-alélicas de alelos diferentes, teniendo preferiblemente una de estas regiones un tamaño de cómo mínimo 20 kb.

Según un modo de realización particular, los episodios de recombinación inducen una disminución de la tasa de heterocigosidad. Esto significa que los episodios de recombinación se traducen como pérdidas de heterocigosidad. La creación de regiones homocigotas es particularmente interesante en los procedimientos de mejora de las cepas ya que permite la expresión de rasgos recesivos potencialmente interesantes. La disminución de la tasa de heterocigosidad se puede evaluar, por ejemplo, por el seguimiento de marcadores de polimorfismo genético, en particular de polimorfismo nucleotídico.

Otra ventaja del procedimiento según la invención es que las células recombinadas pueden tener un grado de ploidía superior o igual a 2, preferiblemente igual a 2. Por tanto, los caracteres cuantitativos que se expresan en el estado heterocigoto (fenómeno de heterosis) pueden ser analizados fácilmente y las células recombinadas pueden ser utilizadas directamente a su vez en el procedimiento según la invención para soportar otras recombinaciones.

Las levaduras recombinadas pueden ser transferidas de nuevo a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, con el fin de inducir en las levaduras el comienzo de la profase de la meiosis, ser incubadas en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y puestas en contacto con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis antes de ser recuperadas. El o la selección de las levaduras recombinadas puede tener lugar al final de cada ciclo o después de varios ciclos. Cuando el cribado o la selección de las levaduras recombinadas tiene lugar al final de cada ciclo, solo las levaduras seleccionadas pueden ser sometidas de nuevo al procedimiento de mejora. Las etapas a) a d) o a) a e) del procedimiento según la invención se repiten así una o varias veces. Las etapas a) a d) o a) a e) del procedimiento según la invención se repiten al menos 1, 2, 3, 4 o 5 veces. Preferiblemente, las etapas a) a d) del procedimiento según la invención se pueden repetir al menos 1, 2, 3, 4 o 5 veces, antes de proceder al cribado o la selección de las levaduras recombinadas que presentan la mejora deseada.

Opcionalmente, las levaduras recombinadas recuperadas en la etapa d) o seleccionadas en la etapa e) pueden ser inducidas a esporulación para obtener esporas haploides. Las esporas de una tétrada obtenida a partir de una célula recombinada pueden ser secuenciadas con el fin de determinar el haplotipo de los cromosomas de dicha célula recombinada. Alternativamente, las levaduras recombinadas recuperadas en la etapa d) o seleccionadas en la etapa e) se pueden dejar que broten para obtener parejas de células «madre/hija». Estas células madre/hija procedentes de una célula recombinada se pueden secuenciar con el fin de determinar el haplotipo de los cromosomas de dicha célula recombinada.

Según un aspecto descrito, pero no reivindicado, el procedimiento según la invención puede comprender además otras etapas que permitan aumentar o determinar los episodios de recombinación en las levaduras durante el proceso de RTG. Según un modo de realización, cuando las levaduras están en el medio de esporulación (etapa a) del procedimiento), están expuestas a uno o varios agentes mutagénicos químicos, tales como el metanosulfonato de metilo (MMS), o físicos, tales como radiaciones ultravioletas o radiaciones ionizantes. Esta exposición permite así realizar una doble diversificación genética por recombinación de los marcadores polimórficos y mutagénesis aleatoria.

Según un aspecto descrito, pero no reivindicado, una construcción de ácido nucleico tal como se describe en la patente europea EP 1523564 se introduce en la levadura que se ha de mejorar antes de que sea transferida al medio de esporulación. Este ácido nucleico codifica una proteína de fusión, bajo el control de un promotor específico o no específico, preferiblemente específico, de la meiosis, que comprende un dominio de unión al ADN (por ejemplo, Gal4BD) unido operativamente a una proteína Spo11 y permite aumentar la frecuencia de roturas de las dobles cadenas en ciertas regiones cromosómicas en la profase de la meiosis o modificar la distribución de dichas roturas en el conjunto del genoma. Alternativamente, la proteína de fusión comprende, bajo el control de un promotor específico de la meiosis, un dominio de unión al ADN operativamente unido a una proteína pareja de Spo11, implicada en la formación de roturas de las dobles cadenas y capaces de reclutar Spo11. La proteína pareja de Spo11 se puede elegir principalmente de las descritas en el artículo de Keeney (2001), Smith et Nicolas (1998), Acquaviva et al., (2012). En particular, se puede seleccionar del grupo constituido por ME14, MER2/REC107, REC102, REC104, REC114, REC103/SK18, MRE2/NAM8, MRE11, RAD50, XRS2/NBS1, HOP1, RED1, MER1, MEK1, SET1 y SPP1.

El cribado o la selección de las levaduras recombinadas que presentan la mejora deseada se puede efectuar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica y depende de la característica deseada. Debido a la gran variedad de aplicaciones industriales de las levaduras, y en particular de las levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden mejorar numerosas características con ayuda del procedimiento según la invención. Estas características pueden ser, por ejemplo, la velocidad de crecimiento, en particular en condiciones particulares, la resistencia a temperaturas elevadas (termotolerancia) o, por el contrario, a bajas temperaturas (criotolerancia), la sensibilidad al pH, la capacidad y la rapidez de fermentación, la resistencia al etanol o a cualquier otro compuesto presente en el medio de fermentación o excretado por el cultivo celular, la morfología celular, el carácter de floculación, la sensibilidad a una molécula particular, la eficacia de esporulación, los perfiles aromáticos, las exigencias nutricionales, la resistencia al secado o incluso la fermentación de un azúcar particular.

La presente solicitud describe igualmente una levadura recombinada obtenida según el procedimiento de mejora según la invención, o una levadura derivada de ella.

Los inventores han demostrado por secuenciación completa del genoma de las células resultantes del proceso de RTG, que este procedimiento permitía generar una gran diversidad genética y que ninguna de las células resultantes de este proceso presentaba el mismo perfil de recombinación.

Por tanto, según otro aspecto, la presente solicitud describe la utilización del proceso de RTG de la levadura para generar un banco de levaduras recombinadas a partir de una levadura, siendo inducido dicho proceso de RTG por la transferencia de dicha levadura desde un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, la incubación en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis.

Preferiblemente, la levadura presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, y más particularmente preferida es diploide. Preferiblemente, dicha levadura es una cepa híbrida, en particular una cepa híbrida estéril.

Describe igualmente un procedimiento para generar un banco de levaduras recombinadas a partir de una levadura, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, que comprende:

a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;

b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;

c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;

d) la recuperación de las levaduras recombinadas con el fin de formar un banco de levaduras recombinadas.

Los modos de realización descritos anteriormente para el proceso de mejora según la invención se aplican igualmente a este aspecto.

Las levaduras diploides recombinadas pueden presentar varios episodios de recombinación por célula, preferiblemente más de 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 episodios de recombinación por célula.

El procedimiento puede comprender además, antes de la etapa a), la etapa que consisten en obtener la levadura que presenta preferiblemente un grado de ploidía superior o igual a 2, por cruzamiento de dos levaduras de interés.

Preferiblemente, la levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2 es diploide. Preferiblemente, dicha levadura es una cepa híbrida, en particular una cepa híbrida estéril. La levadura es una cepa de interés industrial, en particular una cepa diploide de interés industrial. Más particularmente preferida, la levadura pertenece al género *Saccharomyces sensu stricto*, y más particularmente a la especie *S. cerevisiae*, o es un híbrido obtenido a partir de una cepa perteneciente al género *Saccharomyces sensu stricto*, y más particularmente a la especie *S. cerevisiae*.

El banco de levaduras así generado puede ser utilizado principalmente para seleccionar cepas de levadura que presenten características particulares o incluso para localizar un carácter genético de interés, en particular un carácter cuantitativo de interés (o QTL), por comparación de los genotipos y fenotipos de levaduras recombinadas

La presente solicitud describe igualmente un banco de levaduras recombinadas obtenido según el procedimiento para generar un banco de levaduras según la invención.

La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento para identificar o localizar la información genética que codifica una característica de interés en una levadura híbrida, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, que comprende:

a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;

b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;

5 c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;

d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y

e) el análisis de los genotipos y fenotipos de las levaduras recombinadas para identificar o localizar la información genética que codifica la característica de interés

10 siendo la cepa de levadura de interés industrial un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis y/o siendo las levaduras mejoradas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,

repetiéndose las etapas a) a d) o a) a e) al menos una vez a partir de una o varias levaduras recombinadas.

15 También describe la utilización del proceso de RTG de la levadura para identificar o localizar la información genética que codifica una característica de interés en una levadura, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, siendo inducido dicho proceso de RTG por la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, la incubación de la levadura en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11 y la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis.

20 Preferiblemente, la característica de interés es un carácter cuantitativo de interés (o QTL).

Los modos de realización descritos anteriormente para el proceso de mejora según la invención se aplican igualmente a este aspecto.

25 Los inventores han demostrado igualmente que de los 63.901 marcadores de polimorfismo de nucleótidos (SNP) analizados, una media del 27% de ellos presentaba una pérdida de heterocigosidad en las células resultantes de RTG. Esta observación es aún más sorprendente ya que va en contra de las enseñanzas de la técnica anterior que indicaban que los mecanismos de reparación de las roturas de las dobles cadenas establecidas durante el RTG parecían minimizar la resolución de las roturas por fenómenos de entrecruzamiento con el fin de preservar la integridad del genoma y limitar las pérdidas de heterocigosidad.

30 De este modo, la presente solicitud describe igualmente la utilización del proceso de RTG para disminuir la tasa de heterocigosidad de una levadura, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, en particular de una levadura diploide híbrida, siendo inducido dicho proceso de RTG por la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno, la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las cadenas dobles dependientes de Spo11 y la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis.

35 Describe igualmente un procedimiento para disminuir la tasa de heterocigosidad de una levadura, preferiblemente una levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, en particular una levadura diploide híbrida, que comprende:

40 a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;

b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir las roturas de las dobles cadenas dependientes de Spo11;

45 c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;

d) la recuperación de las levaduras recombinadas, presentando dichas levaduras recombinadas una tasa de heterocigosidad inferior a la de la levadura de la etapa a).

Los modos de realización descritos anteriormente para el proceso de mejora según la invención se aplican igualmente a este aspecto.

50 Preferiblemente, la levadura que presenta un grado de ploidía superior o igual a 2 es diploide. Preferiblemente, dicha levadura es una cepa híbrida, en particular una cepa híbrida estéril, preferiblemente de interés industrial. Más

particularmente preferida, la levadura pertenece al género *Saccharomyces sensu stricto*, y más particularmente a la especie *S. cerevisiae*, o es un híbrido obtenido a partir de una cepa perteneciente al género *Saccharomyces sensu stricto*, y más particularmente a la especie *S. cerevisiae*.

Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no limitativos.

5 **Ejemplos**

*Material y métodos:*

Cepas de levadura

Las informaciones referentes a las cepas utilizadas, su origen y su genotipo, se indican en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Información referente a las cepas utilizadas

Nombre	Origen	Fondo genético	Genotipo
ORT3805	A. Nicolas	S288C	MAT $\alpha$ , his1
ORT3806	A. Nicolas	S288C	MAT $\alpha$ , his1
Y00981	(a)	S288C	MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, arg4 $\Delta$ ::KanMX
ORT7204	Y00981	S288C	MAT $\alpha$ , his3 $\Delta$ 1, leu2 $\Delta$ 0, met15 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, arg4 $\Delta$ ::URA3

10

ORT7219	(b)	S288C	MAT $\alpha$ , ho, lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, leu2 $\Delta$ 0, his3 $\Delta$ 200, met15 $\Delta$ 0, trp1 $\Delta$ 63
ORT7205	ORT7219	S288C	MAT $\alpha$ , ho, lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, arg4 $\Delta$ ::URA3, leu2 $\Delta$ 0, his3 $\Delta$ 200, met15 $\Delta$ 0, trp1 $\Delta$ 63
ORT7235	ORT7205	S288C	MAT $\alpha$ , ho, lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0, arg4-Bgl, leu2 $\Delta$ 0, his3 $\Delta$ 200, met15 $\Delta$ 0, trp1 $\Delta$ 63
ORT7221	(c)	SK1	MAT $\alpha$ , ho, lys2, ura3(PstI-SmaI)::hisG, leu2::hisG, his4B::LEU2, trp1::hisG
ORT7217	ORT7221	SK1	MAT $\alpha$ , ho, lys2, ura3(PstI-SmaI)::hisG, arg4::URA3, leu2::hisG, his4B::LEU2, trp1::hisG
ORT7236	ORT7217	SK1	MAT $\alpha$ , ho, lys2, ura3(PstI-SmaI)::hisG, arg4-RV, leu2::hisG, his4B::LEU2, trp1::hisG
AND1702	ORT7235 x ORT7236	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3(PstI-SmaI)::hisG/ura3 $\Delta$ 0, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, his3 $\Delta$ 200/HIS3, met15 $\Delta$ 0/MET15, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, his4B::LEU2/HIS4
AND1708	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, ARG4/arg4-Bgl, lys2 $\Delta$ 0/lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, his4B::LEU2/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1709	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, lys2 $\Delta$ 0/lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0/ura3(recombinant $\Delta$ 0-(PstI-SmaI)::hisG), trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, HIS4/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200
AND1710	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, lys2 $\Delta$ 0/lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0/ura3(recombinant $\Delta$ 0-(PstI-SmaI)::hisG), trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, HIS4/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200,
AND1711	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, ARG4/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2 $\Delta$ 0, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, HIS4/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200
AND1712	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, ARG4/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, HIS4/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1720	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, ARG4/arg4-Bgl, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, HIS4/his4B::LEU2, his3 $\Delta$ 200/HIS3, met15 $\Delta$ 0/met15 $\Delta$ 0
AND1733(M)	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, ARG4/arg4-Bgl, lys2 $\Delta$ 0/lys2; ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2::hisG/leu2::hisG, his4B::LEU2/his4B::LEU2, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1734(F)	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1735(M)	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG; his3 $\Delta$ 200/his3 $\Delta$ 200, his4B::LEU2/HIS4, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1736(F)	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2::hisG, his4B::LEU2/HIS4, MET15/met15 $\Delta$ 0
AND1737(M)	AND1702	Híbrido S288C- SK1	MAT $\alpha$ /MAT $\alpha$ , ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2 $\Delta$ 0/lys2, ura3 $\Delta$ 0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1 $\Delta$ 63/trp1::hisG, leu2 $\Delta$ 0/leu2 $\Delta$ 0, HIS3/his3 $\Delta$ 200, MET15/met15 $\Delta$ 0

AND1738(F)	AND1702	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2Δ0/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1Δ63/trp1::hisG, leu2::hisG/leu2::hisG, his3Δ200/HIS3, his4B::LEU2/his4B::LEU2, MET15/met15Δ0
AND1739(M)	AND1702	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2Δ0/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1Δ63/trp1::hisG, leu2Δ0/leu2::hisG ; HIS4/his4B::LEU2 , MET15/met15Δ0
AND1740(F)	AND1702	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2Δ0/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, trp1Δ63/trp1::hisG, leu2Δ0/leu2::hisG , his3Δ200/his3Δ200, HIS4/his4B::LEU2, MET15/met15Δ0
AND1710-1A	AND1710	Híbrido S288C-SK1	MATa, ho, ARG4, lys2Δ0, ura3Δ0, trp1::hisG, leu2::hisG , his3Δ200,
AND1710-1B	AND1710	S288C-SK1	MATa, ho, ARG4, lys2Δ0, ura3(recombinant Δ0-(PstI-SmaI)::hisG), trp1Δ63, leu2Δ0, his3Δ200, his4B::LEU2
AND1710-1C	AND1710	Híbrido S288C-SK1	MATa, ho, ARG4, lys2Δ0, ura3Δ0, trp1::hisG, leu2::hisG, his3Δ200, his4B::LEU2
AND1710-1D	AND1710	Híbrido S288C-SK1	MATa, ho, ARG4, lys2Δ0, ura3(recombinant Δ0-(PstI-SmaI)::hisG), trp1Δ63, leu2Δ0, his3Δ200
AND2711	AND1735	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, leu2Δ0/leu2::hisG, trp1Δ63/trp1::hisG, his3Δ200/his3Δ200, HIS4/his4B::LEU2
AND2907	AND2711	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, leu2Δ0/leu2::hisG, trp1Δ63/trp1::hisG, his3Δ200/his3Δ200, HIS4/his4B::LEU2
ORT7469	ORT7235	S288C-	MATa, ho, lys2Δ0, ura3Δ0, arg4-Bgl, leu2Δ0, his3Δ200, met15Δ0, trp1Δ63, ndt80::KanMX
ORT7477	ORT7237	SK1	MATa, ho, lys2, ura3(PstI-SmaI)::hisG, arg4-RV, leu2::hisG, his4B::LEU2,, trp1::hisG, ndt80::KanMX
AND2248	ORT7469 X ORT7477	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, lys2/lys2Δ0, ura3(PstI-SmaI)::hisG/ura3Δ0, arg4-RV/arg4-Bgl, leu2::hisG/leu2Δ0, HIS3/his3Δ200, his4B::LEU2/HIS4, MET15/met15Δ0, trp1::hisG/trp1Δ63, ndt80::KanMX/ndt80::KanMX
AND2642	AND2248	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa, ho/ho, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2/lys2, ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG, leu2Δ0/leu2::hisG, his3Δ200/HIS3, met15Δ0/met15Δ0, trp1Δ63/trp1::hisG, HIS4/his4B::LEU2, ndt80Δ::kanMX/ndt80Δ::kanMX
AND2652	AND2248	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa ; ho/ho ; arg4-Bgl/arg4-RV ; lys2Δ0/lys2 ; ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG ; leu2Δ0/leu2::hisG ; his3Δ200/HIS3 ; met15Δ0/MET15 ; trp1Δ63/trp1::hisG ; his4B::LEU2/his4B::LEU2 ; ndt80Δ::kanMX/ndt80Δ::kanMX
AND2658	AND2248	Híbrido S288C-SK1	MATa/MATa ; ho/ho ; arg4-Bgl,RV/arg4-RV ; lys2Δ0/lys2 ; ura3Δ0/ura3(PstI-SmaI)::hisG ; leu2Δ0/leu2::hisG ; his3Δ200/his3Δ200 ; met15Δ0/MET15 ; trp1Δ63/trp1::hisG ; HIS4/his4B::LEU2 ; ndt80Δ::kanMX/ndt80Δ::kanMX

(a) EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YHR018c.html>)

(b) Ben-Ari et al., 2006, cepa FY1338

(c) Kane and Roth, 1974, cepa derivada de SK-1

(M) Célula madre

(F) Célula hija

Se trata de cepas de levadura del género *Saccharomyces cerevisiae* de fondo genético S288C (*Mortimer and Johnston*, 1986) o SK1 (Kane and Roth, 1974). Las cepas ORT7235 y ORT7236, portadoras respectivamente de las mutaciones arg4-Bgl y arg4-RV se obtuvieron en dos etapas de transformación.

- 5 Previamente, la cepa Y00981 de la colección de deleciones EUROSCARF (<http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/data/YHR018c.html>), donde el gen ARG4 se reemplazó por KanMX, y se transformó por el método de electroporación (Becker and Guarente, 1991) con el plásmido M4758 (Voth et al., 2003) con el fin de reemplazar KanMX por el gen URA3 en el locus ARG4. Los cebadores RL1 y RL2 (descritos en la Tabla 2) se usaron para amplificar el fragmento arg4Δ::URA3.

Tabla 2: Descripción de los cebadores utilizados para amplificar el locus ARG4

Nombre	Descripción	Secuencia	Coordenadas
RL1	fwd-arg4-220	3'-TACTCATTGGCAGAATCCCG-5'(SEQ ID NO: 1)	Crom. VIII: 141604-141623
RL2	rev-arg4-240	3'-CGCTTGAGAGGAAGATTAGC-5'(SEQ ID NO: 2)	Crom. VIII: 139771-139790

- 10 Para obtener la cepa ORT7235, la cepa ORT7219 [ARG + ura-] se transformó por el método de electroporación integrando el producto de PCR arg4Δ::URA3 en el locus ARG4. El transformante obtenido, ORT7205 [arg- URA +], seleccionado en medio DO-Uracilo, se transformó luego por el método de electroporación con el fragmento arg4-Bgl, obtenido por digestión del plásmido pMY232 (Rocco et al., 1992) por la enzima de restricción *Pst*I. El transformante  
15 obtenido, ORT7235 [arg- ura-] se seleccionó en medio 5-FOA.

- 20 Para obtener la cepa ORT7236, la cepa ORT7221 [ARG + ura-] se transformó por el método de electroporación integrando el producto de PCR arg4Δ::URA3 en el locus ARG4. El transformante obtenido, ORT7217 [arg- URA+], seleccionado en medio DO-Uracilo, se transformó luego por el método de acetato de litio (Schiestl and Gietz, 1989) con el fragmento arg4-RV, obtenido por digestión del plásmido pNPS308 (Rocco et al., 1992) por la enzima de restricción *Pst*I. El transformante obtenido, ORT7236 [arg- ura-] se seleccionó en medio 5-FOA.

- 25 La cepa diploide AND1702 se obtuvo por cruzamiento de las cepas haploides ORT7235 y ORT7236. Las dos cepas parentales, del genotipo his3Δ200 y his4::LEU2 respectivamente, son auxótrofas para la histidina, pero el diploide resultante es protótrofo para la histidina por complementación funcional y, por lo tanto, puede ser seleccionado en medio DO-Histidina. Por lo tanto, la cepa AND1702 está constituida por un fondo genético híbrido S288C-SK1 y es heterocigótica para los marcadores genéticos MATa/MATα, arg4-Bgl/arg4-RV, lys2Δ0/lys2, ura3(*Pst*I-SmaI)::hisG/ura3Δ0, leu2Δ0/leu2::hisG, his3Δ200/HIS3, met15Δ0/MET15, trp1Δ63/trp1::hisG, his4B::LEU2/HIS4, y para todos los marcadores de polimorfismo que diferencian el genoma de las dos cepas parentales.

- 30 Para obtener la cepa AND2248, las cepas ORT7235 y ORT7236 se transformaron por el método de electroporación integrando el producto de PCR *ndt80*Δ::KanMX en el locus NDT80. Las dos cepas resultantes ORT7469 y ORT7477 se cruzaron para crear la cepa diploide AND2248.

#### Composición de los medios de cultivo utilizados

- 35 El medio de crecimiento YPD es un medio rico compuesto por: 1% de extractos de levadura, 2% de bacto-peptona, 2% de glucosa, (2% de bacto-agar si es un medio sólido), pH 5,5, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Trecó and Lundblad, 2001). El medio YPD que contiene arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>) está complementado con una concentración final de 1,5 mM.

- El medio de crecimiento YPG es un medio de selección de células capaces de respiración, compuesto por: 1% de extractos de levadura, 2% de bacto-peptona, 3% de glicerol, 2% de bacto-agar, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Trecó and Lundblad, 2001). El medio YPG+geneticina (200 mg/L) permite la selección de las cepas resistentes a la geneticina que resultan de la expresión del gen KanMX.

- 40 Los medios «drop-out» -X, o DO-X, son medios sintéticos completos desprovistos de un nutriente (X), estando presentes todos los demás (por ejemplo, DO-arginina, están presentes todos los nutrientes excepto la arginina). Permiten la selección de cepas protótrofas para el nutriente X y están constituidos por: 0,17% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 0,5% de sulfato de amonio, 2% de glucosa, 2% de bacto-agar, suplementado con nutrientes excepto uno, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro. Los nutrientes se añaden en las siguientes proporciones: 0,002% de arginina / histidina / metionina / uracilo, 0,003% de lisina/tirosina, 0,004% de adenina / triptófano, 0,005% de fenilalanina, 0,006% de leucina, 0,01% de ácido aspártico / ácido glutámico, 0,015 % de valina, 0,02% de treonina, 0,0375% de serina. Los aminoácidos no citados se pueden añadir al 0,004% (Trecó and Lundblad, 2001). El medio de crecimiento sintético completo o SC es equivalente al medio drop-out sin omisión de nutrientes.



5 El medio DOBA es un medio mínimo, en el que solo pueden crecer células protótrofas. Se compone de 0,17% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 0,5% de sulfato de amonio, 2% de glucosa, 2% de bacto-agar, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Trecó and Lundblad, 2001). Permite la selección de diploides resultantes del cruzamiento de cualquier cepa HIS1 con una u otra de las cepas de ensayo MATa his1 (ORT3805) o MATα his1 (ORT3806) por complementación funcional.

El medio 5-FOA es un medio de selección de cepa ura3- compuesto de 2% de DO-TRP, 0,17% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 0,5% de sulfato de amonio, 0,00204% de triptófano, 0,003% de uracilo, 0,15% de ácido 5-fluoro-orótico, 2% de glucosa, 2% de bacto-agar, pH 4,5, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Trecó and Lundblad, 2001).

10 El medio de crecimiento SPS es un medio empobrecido de pre-esporulación compuesto por: 0,5% de extractos de levadura, 1% de bacto-peptona, 0,17% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos y sin sulfato de amonio, 0,5% de sulfato de amonio, 1% de acetato de potasio, 1,02% de biftalato de potasio, pH 5,5, H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Wu and Lichten, 1994).

15 El medio KAc al 1% es un medio pobre de esporulación compuesto por 1% de acetato de potasio (suplementado o no con aminoácidos al 0,001% de acuerdo con las auxotrofías portadas por las cepas y en PPG 2000 al 0,001%), H<sub>2</sub>O ajustada a 1 litro (Wu and Lichten, 1994).

*Protocolo de esporulación*

20 La cepa diploide se sembró en bandas en una placa YPD a partir de una reserva conservada a -80°C. Después de tres días de crecimiento a 30°C, las células de una colonia individual se depositaron en una placa que contenía medio sólido YPG. Después de aproximadamente 6 horas de incubación a 30°C, las células se pusieron en suspensión en 5 mL de YPD líquido y se incubaron 24 horas a 30°C con agitación (250 rpm). Este pre-cultivo se usó para inocular 50 mL de medio SPS a una concentración de 10<sup>5</sup> células/mL que luego se incubaron durante aproximadamente 18 horas a 30°C hasta alcanzar 2-4.10<sup>7</sup> células/mL. Las células se lavaron en 50 mL de medio KAc al 1% precalentado a 30°C, luego se centrifugaron y se volvieron a poner en suspensión en 100 mL de medio de esporulación KAc al 1% precalentado. Los cultivos se incubaron a 30°C con agitación (250 rpm) durante tiempos variables según las necesidades del experimento. Se tomaron muestras en diferentes momentos durante la esporulación (Wu and Lichten, 1994).

*Protocolos de «return-to-growth»*

*Protocolo 1: Aislamiento por esparcimiento de las células resultantes de RTG.*

30 Después de la incubación durante un tiempo dado en el medio de esporulación, se tomó 1 mL de cultivo. Las células se lavaron en 1 mL de H<sub>2</sub>O (centrifugación 3 minutos a 8000 g), y se volvieron a poner en suspensión en un volumen final de 500 µL de H<sub>2</sub>O. En esta etapa, las células se depositaron en medio YPD (aproximadamente 100 células/placa, incubación a 30°C) para dar lugar a colonias individuales resultantes del proceso de RTG.

*Protocolo 2: Aislamiento por esparcimiento de las células recombinantes resultantes de RTG.*

35 De manera alternativa al protocolo 1, las células tomadas durante la esporulación se depositaron en un medio selectivo de DO-Arginina (aproximadamente 10<sup>4</sup> células/placa) con el fin de seleccionar las células recombinantes portadoras de un alelo ARG4, que permite el crecimiento de las células en ausencia de arginina.

*Protocolo 3: Aislamiento por micromanipulación de células RTG.*

40 Se depositaron en la parte superior de una placa de medio YPD 10µL de la suspensión de las células tomadas durante la esporulación. Se desplazaron al micromanipulador 44 células individuales que no han brotado sobre la rejilla de un microscopio de disección (Singer MSM System). Las placas se incubaron a 30°C y se observaron regularmente con el fin de seguir la aparición de la 1ª célula hija y proceder a la separación física de la célula madre y la célula hija, es decir, aproximadamente 4 horas después de su extracción del medio de esporulación. Las placas se incubaron a 30°C para obtener pares de colonias individuales denominadas «madre/hija».

45 *Análisis fenotípico de células resultantes de RTG*

*Ensayo fenotípico del signo sexual.*

50 Para analizar el signo sexual de las células resultantes de RTG (cepas AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739, AND1740, AND2711, AND2907, AND2642, AND2652, AND2658), las células se depositaron en un medio YPD sólido y se colocaron en presencia de células de ensayo haploides MATa his1 (ORT3805) o MATα his1 (ORT3806). La mezcla de células se incubó 24 h a 30°C y luego se replicó en un medio DOBA. La ausencia de crecimiento de las células en este medio refleja la incapacidad para cruzarse de las cepas resultantes de RTG y las células de ensayo. Este es un indicador fenotípico del carácter diploide MATa/MATα de las células resultantes de RTG.

*Ensayo fenotípico de recombinación.*

Para caracterizar fenotípicamente la naturaleza recombinante de las células resultantes de RTG, se examinó el crecimiento de las células en diversos medios selectivos, informadores del genotipo de marcadores portados por la cepa parental AND1702 (DO-Arginina, DO-Histidina, OD-Leucina, DO-Metionina). Siendo esta cepa heterocigótica para los marcadores *arg4-RV* y *arg4-Bgl* que impiden el crecimiento de células en un medio desprovisto de arginina (DO-Arginina), la formación por recombinación de células RTG portadoras de un alelo ARG4 permite a las células crecer en este medio. La cepa AND1702 que porta igualmente en estado heterocigótico los alelos *his3Δ200/HIS3*, *his4B::LEU2/HIS4* y *met15Δ0/MET15* en, es entre otras de fenotipo [HIS+ LEU+ MET+]. El carácter recombinante de las células RTG se puede revelar por la pérdida de una de estas prototrofías ([his-]=*his3Δ200/his3Δ200* o *his4B::LEU2/his4B::LEU2*, [leu -]= *HIS4/ HIS4*, [met-]= *met15Δ0/met15Δ0*).

*Ensayo fenotípico en las tétradas obtenidas por esporulación de diploides RTG*

El carácter recombinante de las células RTG puede implicar igualmente la pérdida de heterocigosidad de un marcador genético sin cambio de fenotipo, por ejemplo, una célula RTG puede convertirse en MET15/MET15 por recombinación, y permanecerá protótrofa para la metionina como la cepa diploide parental AND1702. Con el fin de detectar estos episodios, se analizó el fenotipo de las tétradas resultantes de diploides RTG en los medios DO-Arginina, DO-Histidina, DO-Leucina y DO-Metionina con el fin de observar la segregación de marcadores genéticos. El tipo sexual de las células también se determinó según el método descrito anteriormente.

*Análisis del genotipo de células resultantes de RTG por secuenciación NGS*

Los genomas de levaduras parentales ORT7219, ORT7221 y AND1702, y las células resultantes de RTG AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739, AND1740, AND2711, AND2907, AND2642, AND2652 y AND2658, se secuenciaron por el método de secuenciación NGS (*Next Generation Sequencing*) (Plateforme NGS Institut Curie, París, Francia). Para las cepas haploides ORT7219 y ORT7221, se un banco de fragmentos de ADN genómico y se secuenció por la metodología «*paired-end*» (50 + 35 nt) en los secuenciadores SOLiD v4 siguiendo los protocolos del proveedor «Life Technologies». Para las cepas haploides AND 1710-1A, AND 1710-1B, AND 1710-1C y AND1710-1D, se preparó un banco de fragmentos de ADN genómico y se secuenció la metodología de «*paired-end*» (50 + 35 nt) en los secuenciadores SOLiD v5500 siguiendo los protocolos del proveedor «Life Technologies». Para las cepas diploides (AND1702, AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739 y AND1740) se prepararon bancos «*Mate-pair*» (50 + 50 nt) a partir de preparaciones de ADN genómicos y se secuenciaron en la plataforma de los secuenciadores SOLiD v4 de la plataforma NGS del Institut Curie, siguiendo los protocolos del proveedor «Life Technologies». Las cepas AND2711, AND2907, AND2642, AND2652 y AND2658 de los bancos «*paired-end*» (100 + 100 nt) se prepararon a partir de las preparaciones de ADN genómicos y se secuenciaron en la plataforma NGS del Institut Curie en el secuenciador HiSeq 2500, siguiendo los protocolos del proveedor «Illumina».

*Análisis bioinformático de los datos de secuenciación NGS*

Para determinar los polimorfismos proporcionados por las cepas haploides parentales ORT7219 y ORT7221, las secuencias resultantes del NGS se alinearon sobre la secuencia del genoma de referencia S288C con el programa informático Bioscope (Life Technologies). La versión de la secuencia de referencia utilizada (R64) está disponible en el sitio de Internet: «*Saccharomyces Genome Database (SGD)*» ([http://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C\\_reference/genome\\_releases/S288C\\_reference\\_genome\\_R64-1-1\\_20110203.tgz](http://downloads.yeastgenome.org/sequence/S288C_reference/genome_releases/S288C_reference_genome_R64-1-1_20110203.tgz) ). Los números de entrada para los 16 cromosomas y el genoma mitocondrial son: cromosoma (Chr.) I: NC\_001133; Chr. II: NC\_001134; Chr. III: NC\_001135; Chr. IV: NC\_001136; Chr. V: NC\_001137; Chr. VI: NC\_001138; Chr. VII: NC\_001139; Chr. VIII: NC\_001140; Chr. IX: NC\_001141; Chr. X: NC\_001142; Chr. XI: NC\_001143; Chr. XII: NC\_001144; Chr. XIII: NC\_001145; Chr. XIV: NC\_001146; Chr. XV: NC\_001147; Chr. XVI: NC\_001148, y Chr. mitocondrial: NC\_001224. La lista y las coordenadas de los polimorfismos SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*) entre las cepas parentales ORT7219 (S288C) y ORT7221 (SK1) se establecieron con la herramienta «*Find SNP*» de Bioscope. Las secuencias NGS de la célula diploide AND1702, de las células resultantes de RTG y de cuatro esporas de la tétrada AND1710-1 se alinearon con el programa informático Lifescope (Life Technologies) con la secuencia del genoma de referencia SGD. Con el fin de determinar el genotipo de cada una de las cepas secuenciadas, las lecturas que se superponen a las posiciones polimórficas que pertenecen a la lista los SNP establecida se seleccionaron con la herramienta «*IntersectBED*» del programa informático BEDTools (Quinlan et al., 2010). Luego, cada lectura se asoció con el (o los) polimorfismo(s) que cubre y se calculó la posición del (o los) polimorfismo(s) en la lectura. Luego se extrajo la base en esta posición y se comparó con las bases encontradas en esta posición en las cepas parentales ORT7219 y ORT7221. En cada posición polimórfica, se contaron las lecturas que poseen el alelo S288C, el alelo SK1 u otro alelo. El SNP se denominó mono-alélico de origen S288C si el alelo S288C está representado en más del 82% de las lecturas. Se denominó mono-alélico de origen SK1 si el alelo SK1 está representado en más del 68% de las lecturas y se denominó bi-alélico si el alelo SK1 está representado en una proporción de 18 a 68% de las lecturas o si el alelo S288C está representado en una proporción de 32 a 82% de las lecturas. Luego se trazó el mapa de las posiciones polimórficas utilizando el programa informáticos R (<http://www.r-project.org>) para cada muestra analizada. El

genotipo de cada posición polimórfica se indicó con un color: negro para S288C mono-alélico, gris medio para SK1 mono-alélico y gris claro para bi-alélico. Para todas las muestras secuenciadas, la cobertura por posición se calculó utilizando la herramienta «*genomeCoverageBed*» de BEDTools. Las lecturas 100 nt + 100 nt resultantes del secuenciador Illumina se alinearon sobre genoma de referencia (SGD) con el programa informático BWA.

5 **Resultados**

**Análisis fenotípicos.**

**Selección de células RTG recombinantes**

10 Para el genotipado se apartaron seis colonias independientes (cepas AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720) resultantes de RTG (precursora AND1702, protocolo 2 para la selección de células protótrofas para arginina), así como cuatro parejas de RTG «madre (M) e hija (F)» (AND1733 (M)-AND1734 (F), AND1735 (M)-AND1736 (F), AND1737 (M)-AND1738 (F) y AND1739 (M)-AND1740 (F)) resultantes de RTG (precursora AND1702, protocolo 3 de aislamiento por micromanipulación de células madres/hijas después de la primera división celular). La naturaleza diploide de estas cepas fue confirmada por dos ensayos fenotípicos: la ausencia de cruzamiento con células haploides de ensayo de signo sexual MAT $\alpha$  (ORT3805) y MAT $\alpha$  (ORT3806), y su capacidad de comenzar la esporulación y formar tétradas de cuatro esporas viables (a continuación). El fenotipo de las células RTG para marcadores heterocigotos (ARG, HIS, LEU, MET) se muestra en la Tabla 3 a continuación.

15

Tabla 3: Fenotipo de células RTG

Cepa	DO-ARG	DO-HIS	DO-LEU	DO-MET	MAT $\alpha$ de ensayo	MAT $\alpha$ de ensayo
AND1702	-	+	+	+	-	-
AND1708	+	-	+	+	-	-
AND1709	+	+	+	-	-	-
AND1710	+	-	+	+	-	-
AND1711	+	-	+	+	-	-
AND1712	+	-	+	+	-	-
AND1720	+	+	+	-	-	-
AND1733	+	-	+	+	-	-
AND1734	-	-	-	+	-	-
AND1735	-	-	+	+	-	-
AND1736	-	+	+	+	-	-
AND1737	-	+	-	+	-	-
AND1738	-	-	+	+	-	-
AND1739	-	+	+	+	-	-
AND1740	-	-	+	+	-	-
AND2711	-	-	+	+	-	-
AND2907	-	-	+	+	-	+

Cepa	DO-ARG	DO-HIS	DO-LEU	DO-MET	MATa de ensayo	MATα de ensayo
AND2642	-	+	+	-	-	-
AND2652	-	-	+	+	-	-
AND2658	-	-	+	+	-	-

5 Ninguna de las células se cruza con las MATa y MATα de ensayo, por lo que permanecen diploides. En el conjunto de las células resultantes de RTG secuenciadas, siete se volvieron protótrofos para la arginina (AND1708, AND1709, AND 1710, AND1711, AND1712, AND1720 y AND1733), nueve se volvieron auxótrofos para la histidina (AND1708, AND1710, AND1711, AND1712, AND1733, AND1734, AND1735, AND1738, AND1740), dos se volvieron auxótrofos para la leucina (AND1734 y AND1737) y dos se volvieron auxótrofos para la metionina (AND1709, AND1720). Esto ilustra la diversidad fenotípica de las células resultantes de RTG y es el resultado de episodios de recombinación.

**Identificación del genotipo de células RTG por análisis de tétradas**

10 Para observar la segregación de los marcadores genéticos de las células RTG, estas se hicieron esporular y diez tétradas se diseccionaron y analizaron. En 13 casos de 14 (AND1708, AND1709, AND1710, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739 y AND1740), se obtuvieron tétradas de cuatro esporas viables, confirmando la naturaleza diploide. de estas células RTG e indicando la ausencia de mutaciones letales en el genoma de estos diploides RTG. Para AND1711, las tétradas diseccionadas no tenían más  
15 que dos esporas viables que reflejan la presencia de una aneuploidía detectada por análisis de profundidad de cobertura de lecturas de secuencia y confirmada por transferencia de Southern. Esta aneuploidía implica la pérdida de una copia de 170 kb de uno de los extremos del cromosoma XVI, asociada con una ganancia de una copia de 110 kb del cromosoma V. La segregación de marcadores genéticos en tétradas diseccionadas permitió precisar el genotipo de los marcadores de cada diploide como se indica en la Tabla 1.

20 **Análisis bioinformático.**

El genoma de los haploides parentales ORT7219 y ORT7221, el genoma del diploide híbrido AND1702 y el genoma de las células RTG AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739 y AND1740, se secuenciaron en NGS y las lecturas se analizaron de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

25 **Análisis primario de datos de secuenciación**

Para cada muestra, se obtuvieron más de 60 millones de lecturas de NGS con una cobertura (número de lecturas por posición) homogénea en todo el conjunto del genoma superior a 100X. La cobertura media por muestra se da en la Tabla 4.

30 **Tabla 4: Índice medio de cobertura obtenido para cada muestra secuenciada, después de la retirada de duplicados de PCR**

Muestra	Método de alineación	Índice medio de cobertura
ORT7219	Bioscope	192X
ORT7221	Bioscope	141X
AND1702	Lifescop	43X
AND1708	Lifescop	95X
AND1709	Lifescop	174X
AND1710	Lifescop	181X
AND1711	Lifescop	186X

Muestra	Método de alineación	Índice medio de cobertura
AND1712	Lifescop	189X
AND1720	Lifescop	179X
AND1733	Lifescop	16X
AND1734	Lifescop	27X
AND1735	Lifescop	80X
AND1736	Lifescop	69X
AND1737	Lifescop	53X
AND1738	Lifescop	28X
AND1739	Lifescop	15X
AND1740	Lifescop	21X
AND1710-1A	Lifescop	124X
AND1710-1B	Lifescop	111X
AND1710-1C	Lifescop	90X
AND1710-1D	Lifescop	120X
AND2711	BWA	90X
AND2907	BWA	89X
AND2642	BWA	89X
AND2652	BWA	90X
AND2658	BWA	91X

#### **Identificación de polimorfismos que diferencian haploides parentales**

5 El análisis de las secuencias NGS de la cepa ORT7219 frente a la secuencia de referencia SGD condujo a la identificación de 115 SNP. El análisis de las secuencias NGS de la cepa ORT7221 frente a la secuencia de referencia SGD condujo a la identificación de 65.134 SNP. Entre estos, 63.901 SNP fueron apartados para el genotipado de las lecturas de NGS del diploide híbrido AND1702 y las células resultantes de RTG. La distancia física entre los SNP varía entre 2 y 38.036 nucleótidos con una mediana de 96 nucleótidos y una media de 187 nucleótidos.

#### **Genotipo de células RTG**

10 Todos los polimorfismos parentales se encontraron en las células secuenciadas. Se reveló que cada cepa RTG era portadora de SNP mono-alélicos y SNP bi-alélicos en número variable. Los resultados recogidos en la Tabla 5 a continuación muestran que de 61 a 89% de los SNP son bi-alélicos, lo que confirma el carácter diploide de estas células resultantes de RTG. Los otros SNP son mono-alélicos, que corresponden en 6 a 26% de los casos al alelo S288C y que corresponden en 1 a 18% de los casos al alelo SK1, es decir que una media del 17% de los SNP se encuentra en estado mono-alélico.

15 La presencia de un solo alelo en estas posiciones mono-alélicas indica una pérdida de heterocigosidad (*Loss of heterozygosity* o LOH) que puede reflejar bien la presencia de dos cromosomas

homólogos portadores del mismo alelo o bien una pérdida de la región cromosómica en uno de los cromosomas homólogos. El análisis de la cobertura media en 1 kb de cada cromosoma muestra que las regiones mono-alélicas y las regiones heteroalélicas tienen un índice de cobertura homogéneo, lo que está en favor de la hipótesis de dos cromosomas homólogos homocigóticos.

5 *Tabla 5: Porcentaje de pérdida de heterocigosidad en las diferentes cepas RTG*

Cepa	Duración de incubación en KAc	Proporción de posiciones mono-alélicas S288C (%)	Proporción de posiciones mono-alélicas SK1 (%)	Proporción de posiciones bi-alélicas (%)
AND1708	6h	25,1	2,9	71,8
AND1709	5h	13,3	13,4	73,1
AND1710	5h	13,4	12,0	74,3
AND1711	5h	14,5	13,7	71,6
AND1712	5h	8,9	6,7	84,3
AND1720	5h	12,5	9,2	78,1
AND1733	5h	17,7	8,8	73,5
AND1734	5h	9,5	16,6	73,9
AND1735	5h	5,4	4,4	90,2
AND1736	5h	4,1	5,4	90,6
AND1737	8h	6,5	0,2	93,3
AND1738	8h	0,2	6,4	93,3
AND1739	8h	8,6	3,7	87,6
AND1740	8h	4,0	8,2	87,8
AND2711	4h	21,5	10,9	67,6
AND2907	6h	26,8	19,7	53,5
AND2642	8h	8,7	6,9	84,4
AND2652	8h	11,6	9,0	79,3
AND2658	8h	5,5	1,2	93,1

El mapeo del estado de los SNP (bi-alélico, mono-alélico de origen S288C o mono-alélico de origen SK1) de las células RTG analizadas se ilustra en las Figuras 1 y 2. Las células aisladas según el protocolo 2 anterior se ilustran en la Figura 1. Las células aisladas según el protocolo 3 anterior se ilustran en la Figura 2 (donde las dos células madre e hija que provienen del mismo episodio RTG se agrupan en la misma figura, con el fin de facilitar la comparación de genotipos dos a dos).

10

El genotipo de estas células es muy diferente. En la mayoría de los casos, cada cromosoma está compuesto por regiones bi-alélicas y mono-alélicas de tamaños variables que implican una o gran número de posiciones de los SNP (que van desde 1 nucleótido a casi 700 kb), de origen S288C y/o SK1. La disposición de las regiones bi-alélicas y

mono-alélicas, que revela la existencia de una recombinación localizada en los puntos de unión, es diferente según las células. Teniendo en cuenta solo las regiones mono-alélicas de al menos 20 kb, el número de uniones recombinantes por cromosoma varía de 0 a 7 y el número total estimado por célula es 34, 53, 15, 38, 7, 18, en las cepas RTG AND1708 (Figura 1A), AND1709 (Figura 1B), AND1710 (Figura 1C), AND1711 (Figura 1D), AND1712 (Figura 1E), AND1720 (Figura 1F), y 45, 6, 3, 11 en los pares madre-hija AND1733-AND1734 (Fig. 2A), AND1735-AND1736 (Fig. 2B), AND1737-AND1738 (Fig. 2C) y AND1739-AND1740 (Fig. 2D). Se observa que: (i) los SNP localizados cerca de los centrómeros permanecen bi-alélicos, lo que confirma la segregación mitótica de las cromátidas hermanas en RTG, y (ii) el genotipo de las células madre e hija es complementario, siendo idéntico en las regiones bi-alélicas, y de alelos opuestos en regiones mono-alélicas. Contrariamente al aislamiento de células RTG individuales (protocolos 1 y 2), el método de aislamiento de pares madre e hija (protocolo 3) tiene la ventaja de permitir el análisis de los fenotipos en un contexto homogéneo para los SNP bi-alélicos.

#### *Confirmación del genotipo de la cepa AND1710 por secuenciación de una tétrada*

Se secuenciaron cuatro esporas procedentes de una tétrada resultante de la esporulación del diploide RTG AND1710 y se determinó el genotipo de las posiciones de polimorfismo. El genotipo del polimorfismo de 4 esporas (A, B, C, D) de la tétrada se muestra en la Figura 3.

Para las regiones mono-alélicas del diploide AND1710, se observa que las cuatro esporas tienen el mismo alelo de origen S288C o SK1. Las regiones bi-alélicas del diploide segregan en 2 esporas que llevan el alelo S288C y 2 esporas que llevan el alelo SK1, lo que confirma la naturaleza heterocigótica del diploide en estas regiones. Se confirman las 15 uniones recombinantes de diploide RTG AND1710. Además, a nivel de 4 regiones mono-alélicas cortas del diploide AND1710, se pudieron identificar episodios de recombinación suplementarios (Cromosoma VII, Cromosoma VIII y Cromosoma IX (2 casos)) asociados a conversiones génicas. Los otros episodios de recombinación ocurrieron durante la meiosis que condujo a la formación de esta tétrada y el genotipo recombinante no estaba presente en el diploide RTG parental.

#### *Reiteración del proceso de RTG*

Con el fin de evaluar si el proceso RTG podría ser reiterado para acrecentar la diversificación genética, los inventores llevaron a cabo dos ciclos sucesivos de RTG a partir de la cepa AND1735 (Fig. 4A) ya obtenida de un primer ciclo de RTG del diploide parental AND1702 y luego analizada por secuenciación la evolución de los marcadores SNP. Durante el segundo ciclo RTG, la célula AND2711 experimentó otro ciclo de recombinación, que se manifestó por una disminución de la tasa global de heterocigosidad (67,6% en lugar de 90,2%) y la aparición de nuevas regiones mono-alélicas del fondo genético S288C o SK1 (Fig. 4B). Luego, durante el tercer ciclo de RTG, la célula AND2907 se sometió a otro ciclo de recombinación que se manifiesta por una disminución suplementaria de la tasa global de heterocigosidad (53,5% en lugar de 67,6%) y la aparición de nuevas regiones mono-alélicas del fondo genético S288C o SK1 (Fig. 4C, Tablas 5 y 6). Por lo tanto, el proceso de RTG se puede reiterar para aumentar secuencialmente la diversificación genética de las células diploides.

#### *RTG en las células diploides AND2248 deficientes en esporulación*

Con el fin de evaluar si el proceso de RTG se podría utilizar para recombinar el genoma de las células diploides estériles, los inventores construyeron una cepa diploide (AND2248) de fondo genético híbrido S288C/SK1, pero portadora en estado homocigótico de una delección del gen NDT80. La inactivación del gen NDT80 condujo a la ausencia de formación de esporas (y por ello el fenotipo de esterilidad) pero no impidió la entrada de células diploides en la profase de la meiosis. Estas células detienen su progresión en la meiosis en una etapa posterior a la formación de roturas de dobles cadenas de ADN dependientes de Spo11, pero antes de la etapa de división reductora de los cromosomas (M1) (Chu & Herskowitz, 1998). Las células diploides *ndt80Δ/ndt80Δ* así detenidas en la profase de la meiosis permanecen viables y son capaces de volver al crecimiento vegetativo a través del proceso de RTG (Dayani et al., 2011). Se secuenciaron tres cepas aisladas después de RTG (protocolo 3) de la cepa mutante AND2248. El mapeo de los SNP de estas cepas (AND2642, AND2652 y AND2658) se ilustra respectivamente en las Fig. 5A-C. Sus genotipos son recombinados y distintos (Tabla 5). Respectivamente, los grados de heterocigosidad son 84,4%, 79,3% y 93,1%, y el resto del genoma lleva posiciones mono-alélicas de origen S288C o SK1 y el número total de uniones recombinantes es 12, 24 y 5 por célula. Por lo tanto, el método RTG es aplicable a cepas estériles capaces de formar las roturas de dobles cadenas naturales dependientes de Spo11.

#### *Análisis de la variabilidad del genotipo de las células RTG*

Puesto que las células RTG son generalmente diploides (excepto AND1711), la disminución del porcentaje de heterocigosidad por célula va acompañada por la aparición de regiones homocigotas del genotipo S288C o SK1. La variación del porcentaje de heterocigosidad y homocigosidad de las 19 cepas resultantes de un proceso de RTG (Tabla 5) se ilustra en la Figura 6. El porcentaje de heterocigosidad (genotipo bi-alélico S288C + SK1) varía entre 93,3% (AND1738 y AND1739 resultantes del protocolo 3) y 53,5% (AND2907) resultantes de tres ciclos de RTG. La proporción de regiones homocigóticas S288c varía entre 0,2% (AND1738) y 26,8% (AND2907). La proporción de regiones homocigóticas SK1 varía entre 0,2% (AND 1737) y 19,7% (AND2907). El tamaño de estas regiones

homocigóticas puede ser corto al no implicar más que algunos marcadores SNP adyacentes o muy grandes al implicar grandes regiones cromosómicas. El número total de uniones recombinantes por célula RTG, estimado no teniendo en cuenta más que las regiones recombinadas cuya longitud es al menos 20 kb, varía entre 3 (AND1737) y 53 (AND 1709). El método RTG permite así crear una población de células diversamente recombinadas, siendo simultáneamente portadoras de regiones heterocigóticas y homocigóticas para uno u otro de los genotipos del precursor híbrido y de tamaños variables, y esto también en las células fértiles y estériles.

#### *Ejemplo de mapeo del carácter de auxotrofia para metionina y leucina*

Con el fin de evaluar los rendimientos del método de RTG para identificar y localizar un solo carácter fenotípico, los inventores analizaron el genotipo y el fenotipo de las células RTG para el carácter de crecimiento en ausencia de metionina. La cepa S288C tiene una deleición del gen MET15 (*met15Δ0*). Así, el diploide parental lleva el carácter bi-alélico MET15/*met15Δ0*. Un diploide recombinante auxótrofo para la metionina debe tener marcadores mono-alélicos del alelo S288C en los alrededores del locus MET15 (Cromosoma XII). A la inversa, los diploides protótrofos para la metionina pueden llevar marcadores mono-alélicos del alelo SK1 o bi-alélicos en los alrededores del locus MET15, pero jamás marcadores mono-alélicos del alelo S288C. Por lo tanto, es posible mapear las regiones cromosómicas asociadas al fenotipo buscando las posiciones de los SNP donde se encuentra(n) uno o dos alelos entre {S288C-SK1-bi-alélico}, específica y exclusivamente, asociado(s) a uno u otro de los fenotipos. Para esto, los inventores examinaron el crecimiento de las células parentales haploides ORT7219 y ORT7221, las células diploides híbridas AND1702 y las células RTG AND1708, AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739 y AND1740 en el medio DO-metionina. Conforme a sus genotipos (Tabla 1), las células diploides bi-alélicas *MET15/met15Δ0* (precursor híbrido AND1702, RTG AND1708, AND1712, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739, AND1740) y los diploides mono-alélicos MET15/MET15 (RTG AND1710 y AND1711) eran capaces de crecer en ausencia de metionina, mientras que las células diploides mono-alélicas *15Δ0/met15A0* (RTG AND1709 y AND1720) eran incapaces de crecer en ausencia de metionina. Para determinar la región del genoma que porta este carácter, los inventores reagruparon las células RTG en dos categorías: protótrofos (RTG AND1708, AND1710, AND1711, AND1712, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739, AND1740) y auxótrofos (RTG AND1709 y AND 1720), y después compararon sus genotipos con el fin de identificar las regiones del genoma para las cuales los alelos encontrados en los individuos protótrofos se encuentran exclusivamente en esta categoría, así como los alelos encontrados en los individuos auxótrofos se encuentran exclusivamente en esta categoría. Con solo 2 muestras en la categoría auxótrofa, este método identifica el carácter en un número muy restringido de regiones candidatas (6 regiones y algunos SNP aislados) (**Fig. 7A**) incluyendo la región buscada del gen MET15. Con la ayuda de una simulación bioinformática, donde las dos muestras homocigóticas MET15/MET15 (AND1710 y AND1711) fueron convertidas artificialmente en homocigóticas *met15Δ0/met15Δ0* por inversión de los alelos de los locus mono-alélicos, los inventores pudieron demostrar que, equilibrando el número de muestras en las dos categorías, se podía reducir fácilmente el número de regiones candidatas a 1, incluyendo el gen MET15. En este ejemplo, la región identificada es de aproximadamente 40 kb. El estudio de un número mucho mayor de células RTG tiene por efecto reducir el tamaño de la región candidata.

Del mismo modo, los inventores analizaron el genotipo y el fenotipo de las células RTG para el carácter de crecimiento en ausencia de leucina. Las dos cepas parentales poseen una mutación del locus LEU2 (*leu2Δ0* para el precursor S288c y *leu2::HisG* para el precursor SK1, Cromosoma III). Sin embargo, el precursor SK1 tiene una copia de tipo natural del gen LEU2 insertada en un locus vecino (marcador *his4B::LEU2* en el cromosoma III). Esto lleva a la obtención, después de RTG, de diploides mono-alélicos *his4B::LEU2/his4B::LEU2* (AND1708, AND1733, AND1738), de diploides bi-alélicos *his4B::LEU2/HIS4* (AND1709, AND1710, AND1711, AND1712, AND1720, AND1735, AND1736, AND1739, AND1740), que constituyen el grupo de células RTG protótrofos para leucina, y diploides mono-alélicos *HIS4/HIS4* (AND1734, AND1737), que constituyen el grupo de los auxótrofos para leucina. Aquí, con solo 2 muestras en la categoría auxotrófica, el mapeo del fenotipo de crecimiento en el medio DO-leucina conduce a la identificación de solo dos regiones candidatas (**Fig. 7B**), incluyendo la región buscada de los genes LEU2 y HIS4.

Estos son ejemplos de mapeo de un carácter mendeliano por la secuenciación de un pequeño número de células RTG, aplicable para los híbridos estériles.

#### *Ejemplo de mejora de un carácter cuantitativo por el método RTG*

Con el fin de evaluar los rendimientos del método RTG para identificar y localizar caracteres cuantitativos, los inventores examinaron el crecimiento a las temperaturas de 30°C y 40°C de las células parentales haploides ORT7219 y ORT7221, la diploide híbrida AND1702 y las células RTG AND1708, AND1709, AND1710, AND1712, AND1720, AND1733, AND1734, AND1735, AND1736, AND1737, AND1738, AND1739 y AND1740. Los resultados recogidos en la Figura 8 muestran que las células parentales haploides ORT7235 y ORT7236 crecen poco a la temperatura de 40°C. Por el contrario, la célula híbrida AND1702 manifiesta el fenómeno de vigor híbrido (heterosis) porque crece mejor a esta temperatura que cualquiera de las precursoras. Las células resultantes de RTG manifiestan un fenotipo variable, que crece más o menos bien a 40°C. En particular, las células RTG AND1708, AND1710, AND 1712, AND1735, AND1736 y AND1737 son más termotolerantes que las células parentales y al menos tan termotolerantes como la célula diploide híbrida AND1702. Además, los inventores examinaron el



crecimiento de células en presencia de arsenito de sodio ( $\text{NaAsO}_2$  1,5 mM). El crecimiento de las células RTG es variable. Por ejemplo, las células AND1736 y AND1737 son más resistentes que la célula diploide parental AND1702, mientras que las células AND1735 y AND1738 son más sensibles.

5 Estos son dos ejemplos de mejora de un carácter cuantitativo de interés. El número y la localización de los marcadores polimórficos causales se pueden deducir del análisis comparativo del genotipo de las células obtenido por secuenciación.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acquaviva L., et al., (2013). *Science*, 339, 215-218
- Albers et al., (1996). *Applied and Environmental Biology*, 62:3187-3195
- Becker and Guarente, *Methods Enzymol.*, (1991)194,182-7.
- Ben-Ari et al., (2006). *PLoS Genet.* 2(11): e195.
- Chu and Herskowitz (1998) *Mol. Cell* 1, 685-696.
- Dayani et al., (2011). *PloS Genet.* 7(5):e1002083
- De Massy et al., (1994). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 91, 11929-11933
- Esposito and Esposito (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*,71 (8), 3172-3176
- Greig (2007). *PLoS Genet.*, 3(2): e21.
- Herman and Roman (1963). *Genetics*, 48,255-261
- Honigberg and Esposito (1994). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 91, 6559-6563.
- Honigberg and Purnapatre (2003). *J. Cell Sci.* 116, 2137-2147
- Kane and Roth (1974). *Bacteriol.* 1 18(1), 8-14.
- Kassir and Simchen (1991). *Meth. Enzymol.* 194, 94-110.
- Keeney (2001). *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1-53.
- Mortimer and Johnston (1986). *Genetics*, 113(1), 35-43.
- Nicolas et al., (1989). *Nature*, 338, 35-39
- Quinlan et al., (2010). *Bioinformatics*, 15;26(6), 841-2.
- Rainieri et al., (1999). *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 20, No.2
- Rocco et al., (1992). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 89, 12068-72.
- Smith and Nicolas (1998). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8(2), 200-211
- Sherman (1991). *Meth. Enzymol.* 194, 3-21
- Treco and Lundblad (2001) *Current Protocol in Molecular Biology Chapter 13:Unit13.1.*
- Voth et al., (2003). *YEAST*, 20(11), 985-93.
- Wu and Lichten (1994). *Science* 263, 515-518.
- Zenvirth et al. (1997). *Genes to Cells* 2, 487-498

**LISTA DE SECUENCIAS**

- <110> Institut Curie INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale) Centre National de la Recherche Scientifique Université Nice Sophia Antipolis Université Pierre et Marie Curie (PARIS 6)
- 5 <120> PROCEDIMIENTO DE MEJORA DE CEPAS DE LEVADURA
- <130> B1507PC
- 10 <160> 2
- <170> PatentIn versión 3.3
- 15 <210> 1  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 20 <220>  
<223> Cebador sentido ARG4
- <400> 1  
tactcattgg cagaatcccg            20
- 25 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial
- 30 <220>  
<223> Cebador antisentido ARG4
- <400> 2  
cgcttgagag gaagattagc            20
- 35

**REIVINDICACIONES**

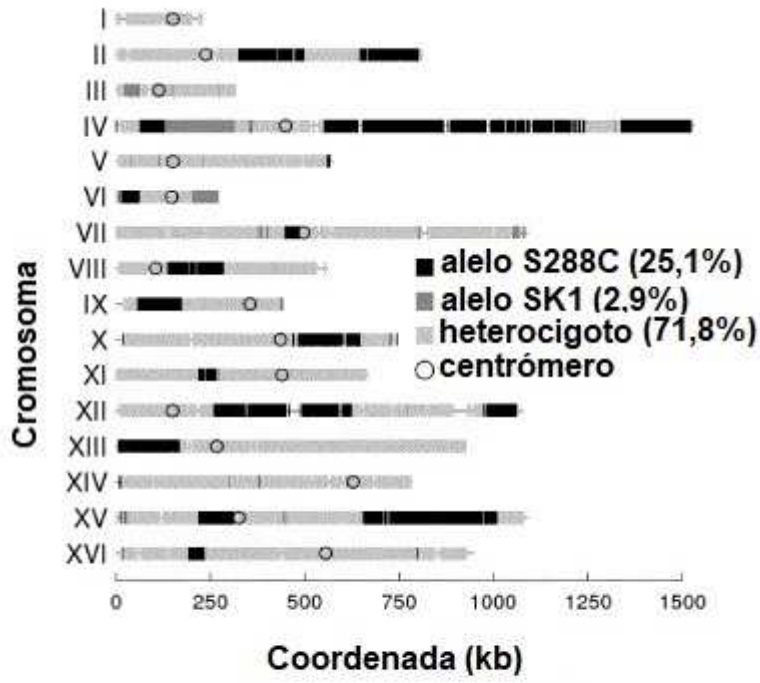
1. Procedimiento para mejorar una cepa de levadura híbrida de interés industrial, que comprende:
- a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;
  - 5 b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir la formación de roturas de dobles cadenas dependientes de Spo11;
  - c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y de nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener las levaduras recombinadas;
  - d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y
  - 10 e) el cribado o la selección de las levaduras recombinadas con el fin de identificar las que presentan la mejora deseada,
- siendo la cepa de levadura de interés industrial un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis y/o siendo las levaduras mejoradas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,
- 15 repitiéndose las etapas a) a d) o a) a e) al menos una vez a partir de una o más levaduras recombinadas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la obtención de una o varias levaduras recombinadas que presentan la mejora buscada, a partir del cribado o la selección de la etapa e).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que dicha cepa de levadura de interés industrial presenta un grado de ploidía superior o igual a 2, preferiblemente es una levadura diploide.
- 20 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha cepa de levadura de interés industrial es una cepa híbrida estéril.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que las levaduras recombinadas presentan varios episodios de recombinación por célula, induciendo preferiblemente dichos eventos de recombinación una disminución de la tasa de heterocigosidad.
- 25 6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la cepa de levadura de interés industrial pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* o es un híbrido obtenido a partir de *Saccharomyces cerevisiae*.
7. Procedimiento para identificar o localizar la información genética que codifica una característica de interés, preferiblemente un carácter cuantitativo de interés (QTL) en una cepa de levadura híbrida, que comprende:
- 30 a) la transferencia de la levadura de un medio rico a un medio de esporulación, preferiblemente sin fuente de carbono fermentable ni de nitrógeno;
  - b) la incubación de las levaduras en el medio de esporulación durante un tiempo suficiente para inducir roturas de dobles cadenas dependientes de Spo11;
  - c) la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis con el fin de obtener levaduras recombinadas;
  - 35 d) la recuperación de las levaduras recombinadas; y
  - e) el análisis de los genotipos y fenotipos de las levaduras recombinadas con el fin de identificar o localizar la información genética que codifica la característica de interés,
- 40 siendo la cepa de levadura híbrida un organismo cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis y/o siendo las levaduras recombinadas organismos cuyo patrimonio genético no ha sido modificado por transgénesis,
- repitiéndose las etapas a) a d) o a) a e) al menos una vez a partir de una o más levaduras recombinadas.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que la levadura tiene un grado de ploidía superior o igual a 2.
- 45 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que la característica de interés, o la característica que se ha de mejorar, se selecciona del grupo constituido por la velocidad de crecimiento, la termotolerancia, la criotolerancia, la sensibilidad al pH, la capacidad de fermentación, la rapidez de fermentación,

la resistencia al etanol, la resistencia a un compuesto particular presente en el medio de fermentación o excretado por el cultivo celular, la morfología celular, el carácter de floculación, la sensibilidad a una molécula particular, la eficacia de esporulación, los perfiles aromáticos, las exigencias nutricionales, la resistencia al secado y la fermentación de un azúcar particular.

- 5 10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la puesta en contacto de las levaduras con una fuente de carbono y nitrógeno antes de la segregación reductora de los cromosomas de la primera división de la meiosis se realiza transfiriendo las levaduras a un medio rico.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acquaviva L., et al., (2013). *Science*, 339, 215-218
- Albers et al., (1996). *Applied and Environmental Biology*, 62:3187-3195
- Becker and Guarente, *Methods Enzymol.*, (1991)194,182-7.
- Ben-Ari et al., (2006). *PLoS Genet.* 2(11): e195.
- Chu and Herskowitz (1998) *Mol. Cell* 1, 685-696.
- Dayani et al., (2011). *PloS Genet.* 7(5):e1002083
- De Massy et al., (1994). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 91, 11929-11933
- Esposito and Esposito (1974). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*,71 (8), 3172-3176
- Greig (2007). *PLoS Genet.*, 3(2): e21.
- Herman and Roman (1963). *Genetics*, 48,255-261
- Honigberg and Esposito (1994). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 91, 6559-6563.
- Honigberg and Purnapatre (2003). *J. Cell Sci.* 116, 2137-2147
- Kane and Roth (1974). *Bacteriol.* 1 18(1), 8-14.
- Kassir and Simchen (1991). *Meth. Enzymol.* 194, 94-110.
- Keeney (2001). *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1-53.
- Mortimer and Johnston (1986). *Genetics*, 113(1), 35-43.
- Nicolas et al., (1989). *Nature*, 338, 35-39
- Quinlan et al., (2010). *Bioinformatics*, 15;26(6), 841-2.
- Rainieri et al., (1999). *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 20, No.2
- Rocco et al., (1992). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 89, 12068-72.
- Smith and Nicolas (1998). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8(2), 200-211
- Sherman (1991). *Meth. Enzymol.* 194, 3-21
- Treco and Lundblad (2001) *Current Protocol in Molecular Biology Chapter 13:Unit13.1.*
- Voth et al., (2003). *YEAST*, 20(11), 985-93.
- Wu and Lichten (1994). *Science* 263, 515-518.
- Zenvirth et al. (1997). *Genes to Cells* 2, 487-498



**Figura 1A**

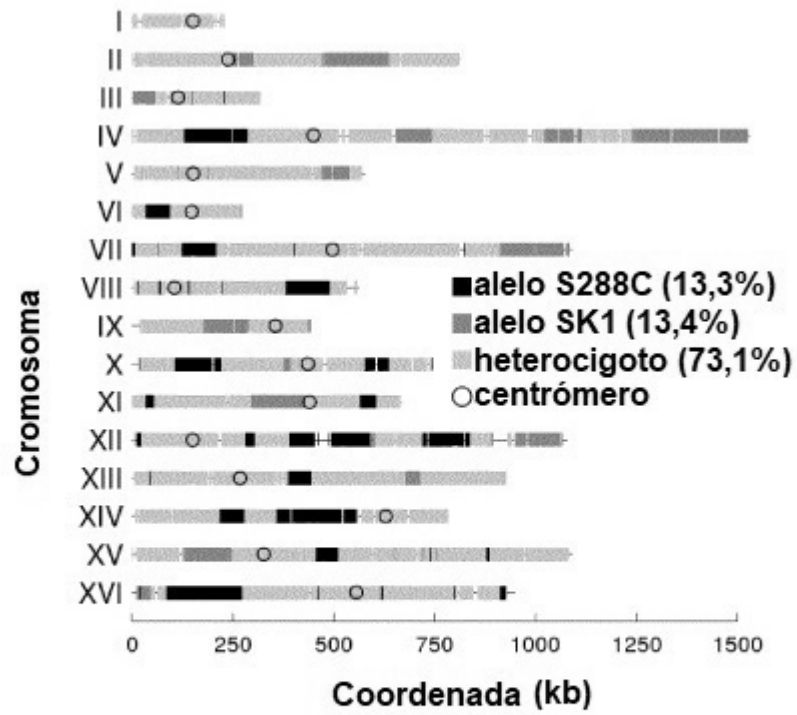
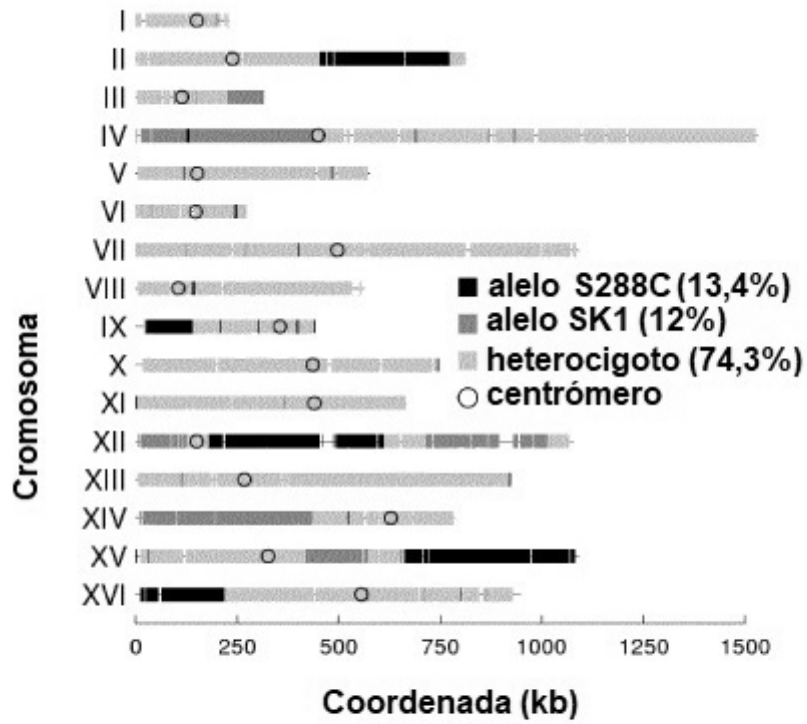


Figura 1B





**Figura 1C**

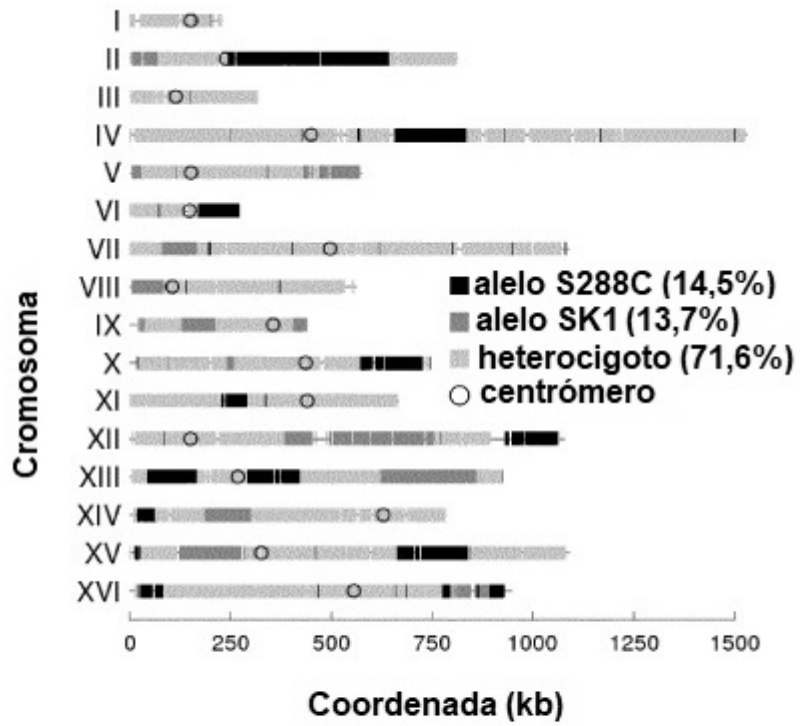


Figura 1D

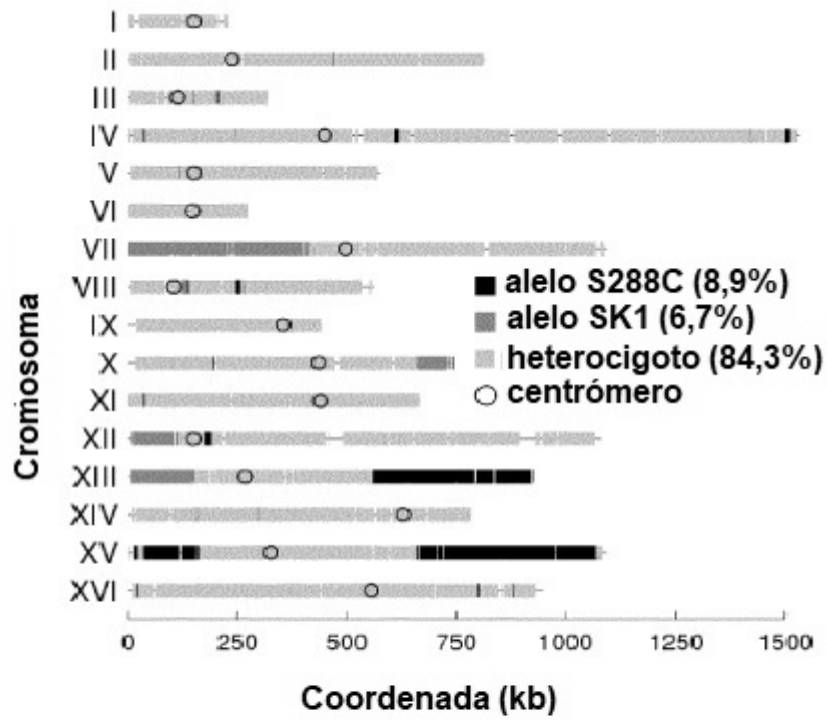


Figura 1E

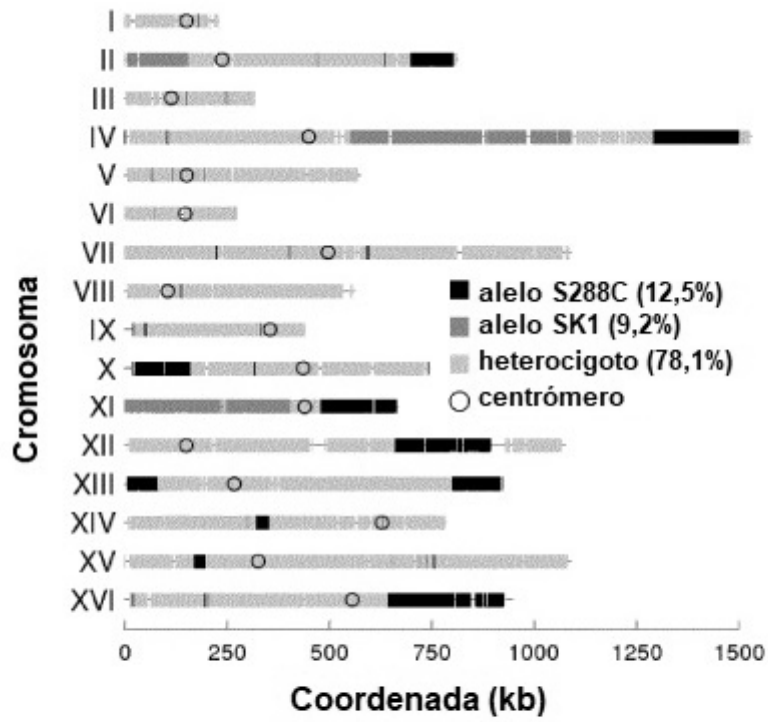
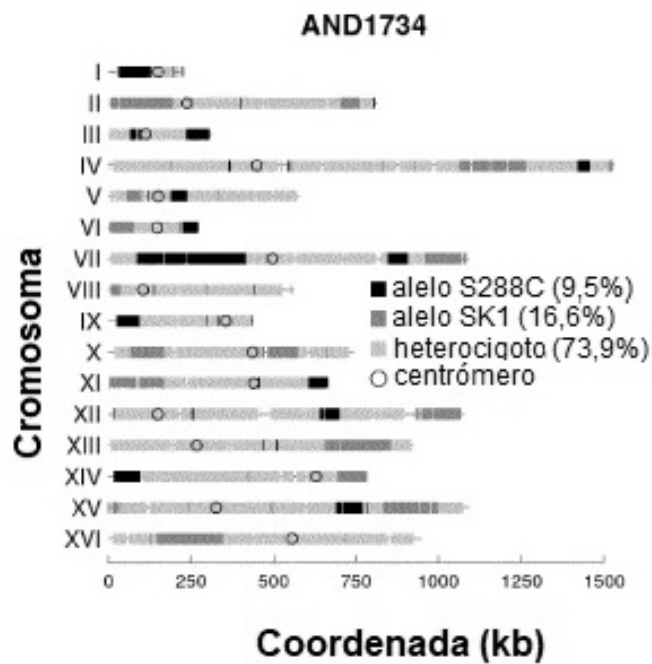
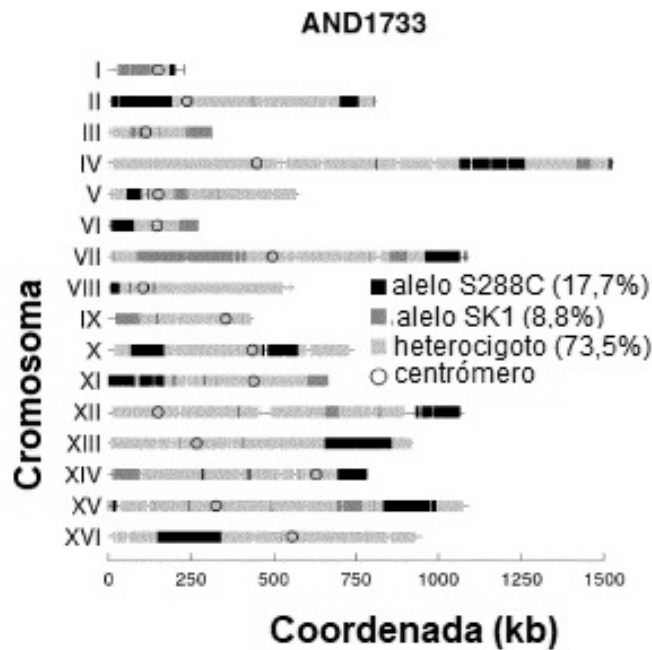
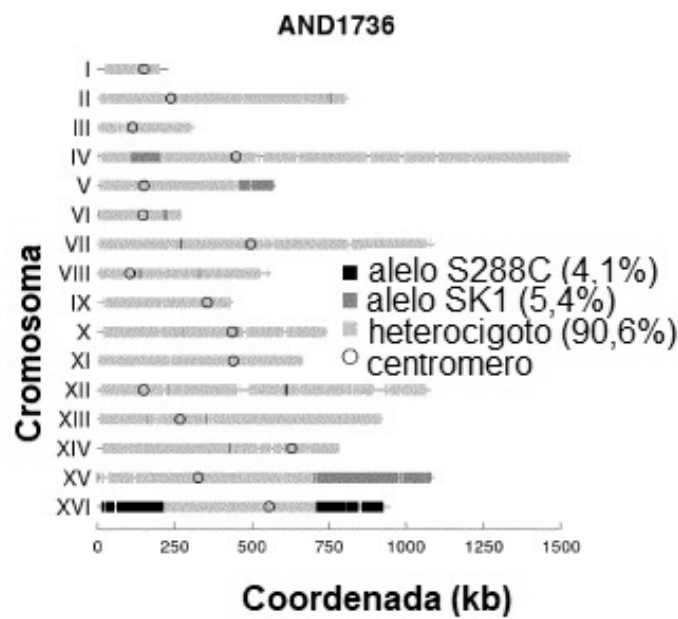
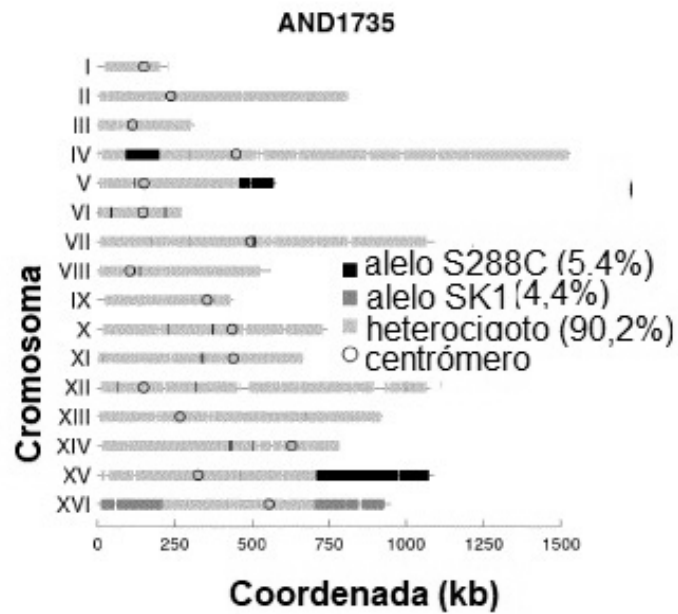


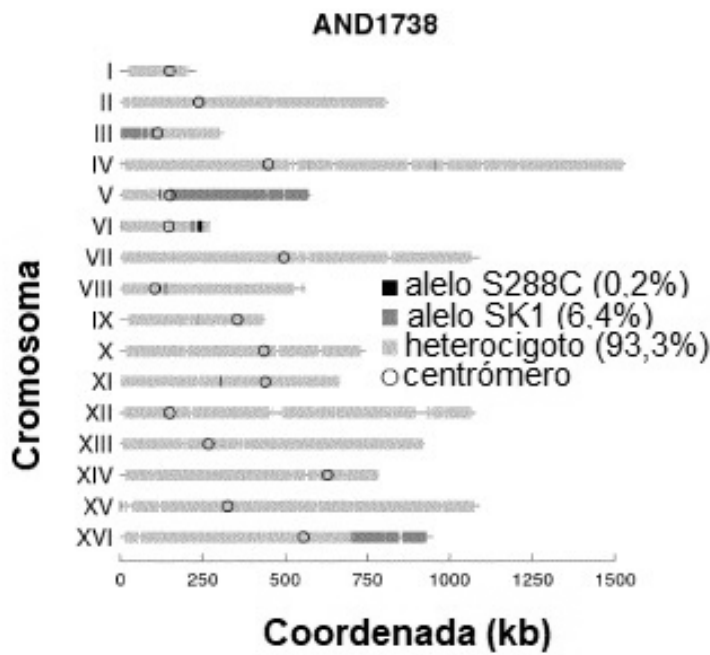
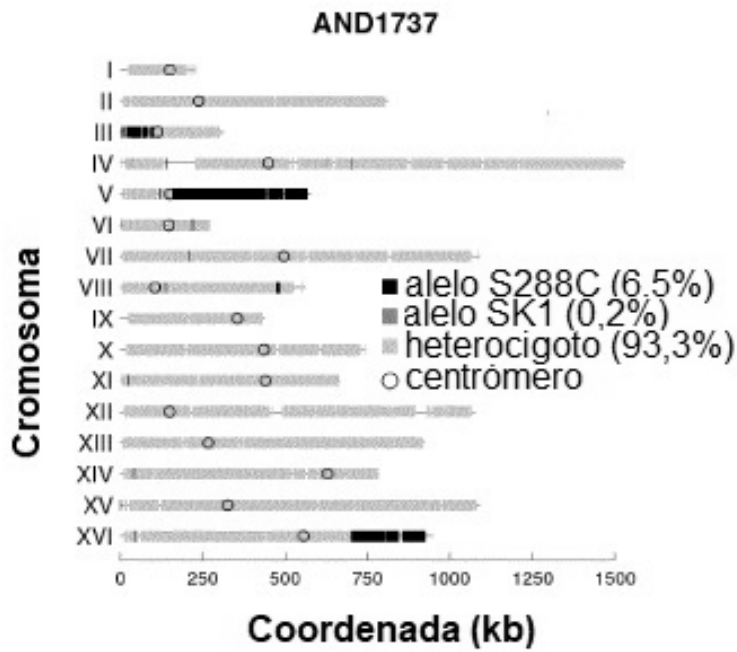
Figura 1F



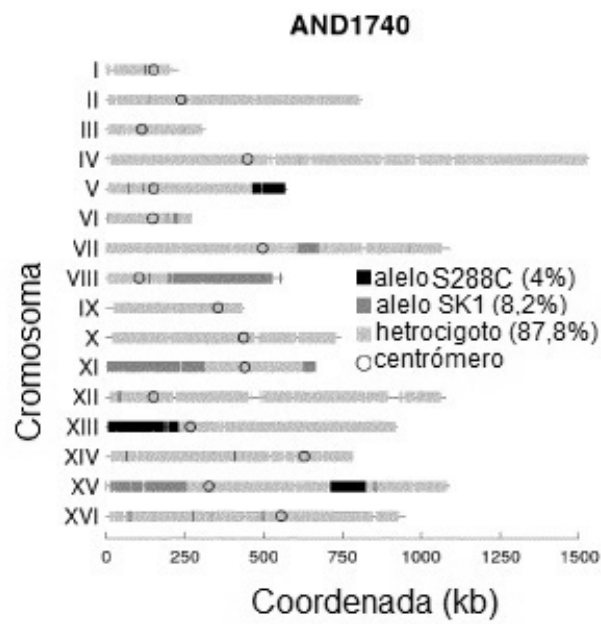
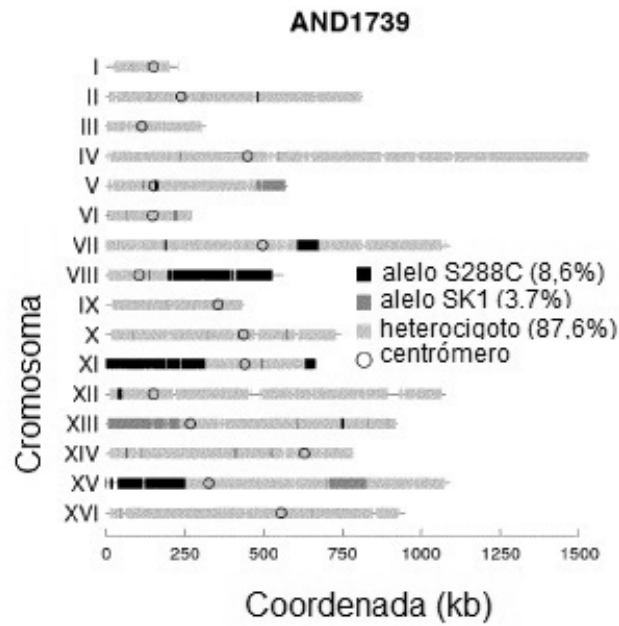
**Figura 2A**



**Figura 2B**



**Figura 2C**



**Figura 2D**



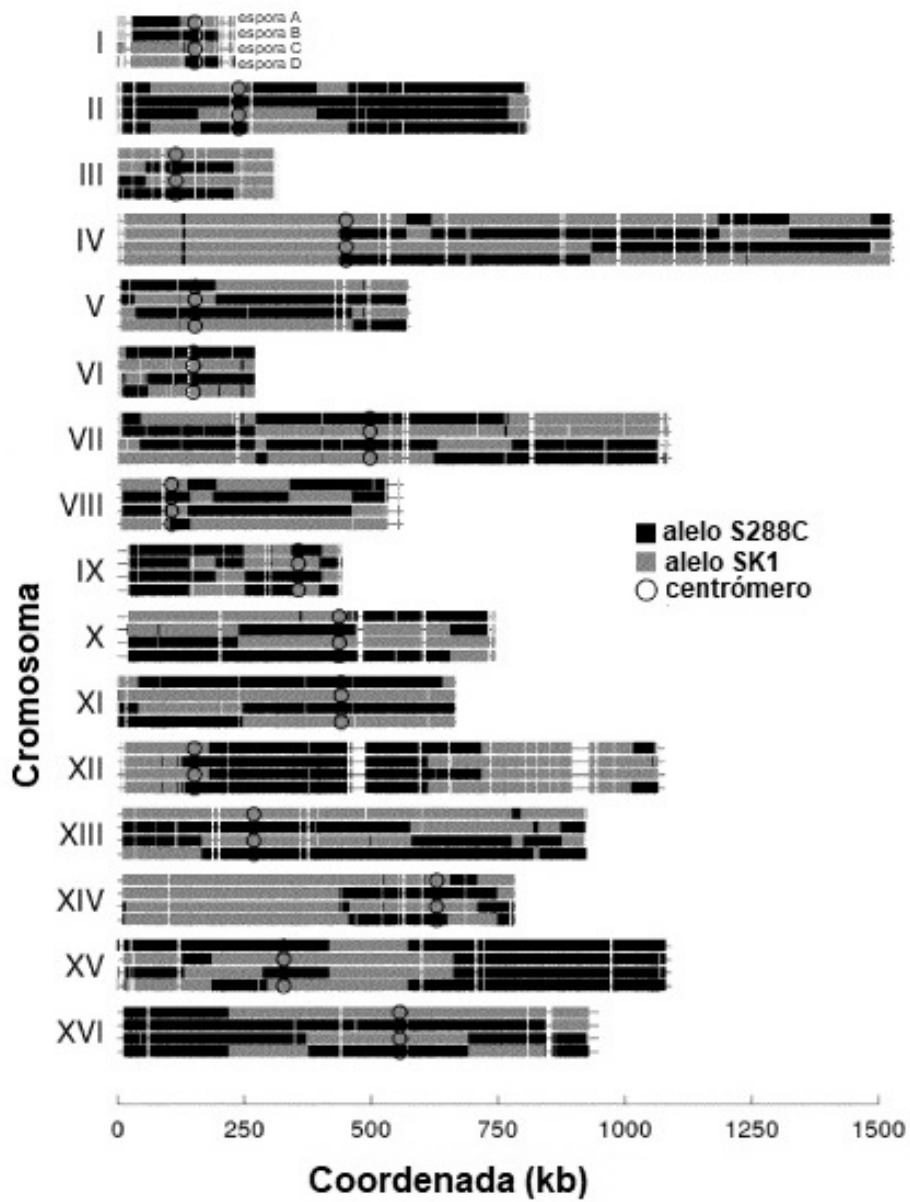
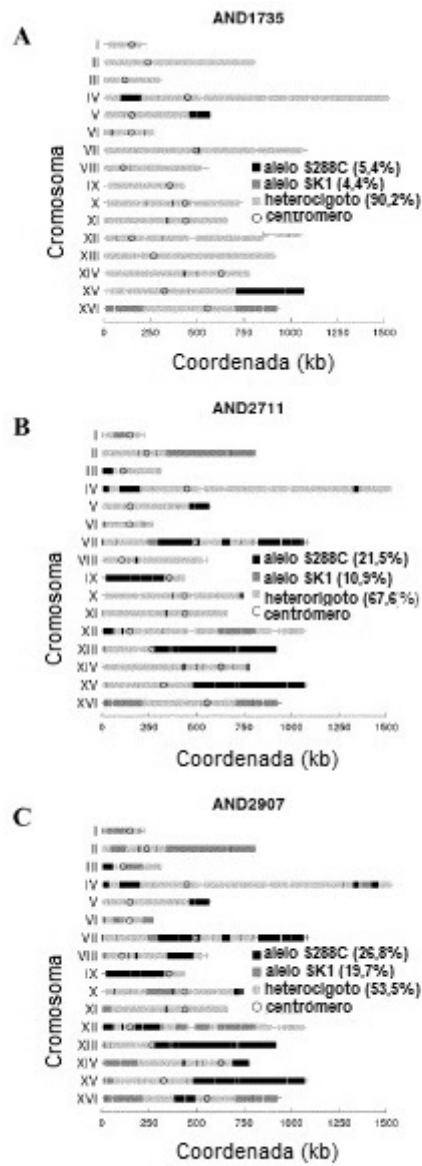
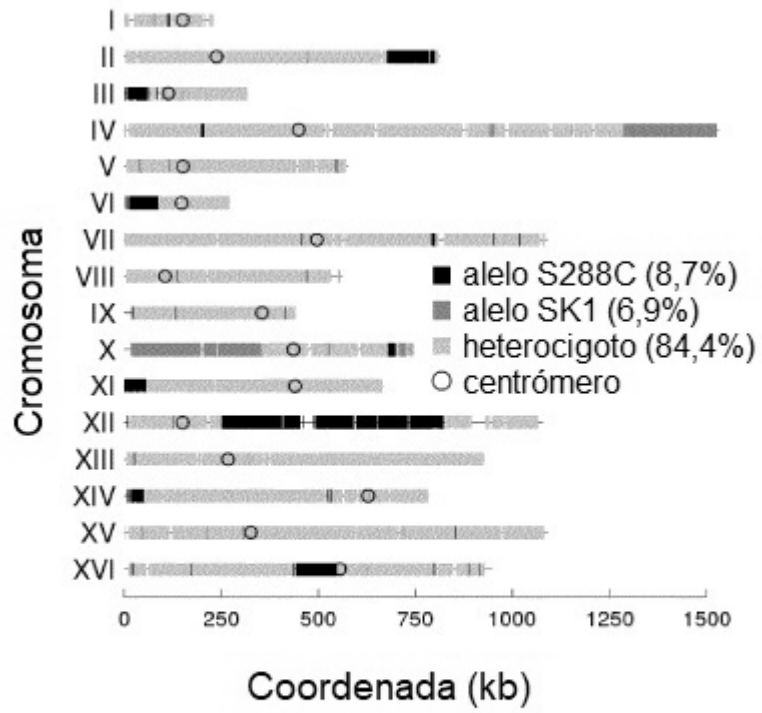


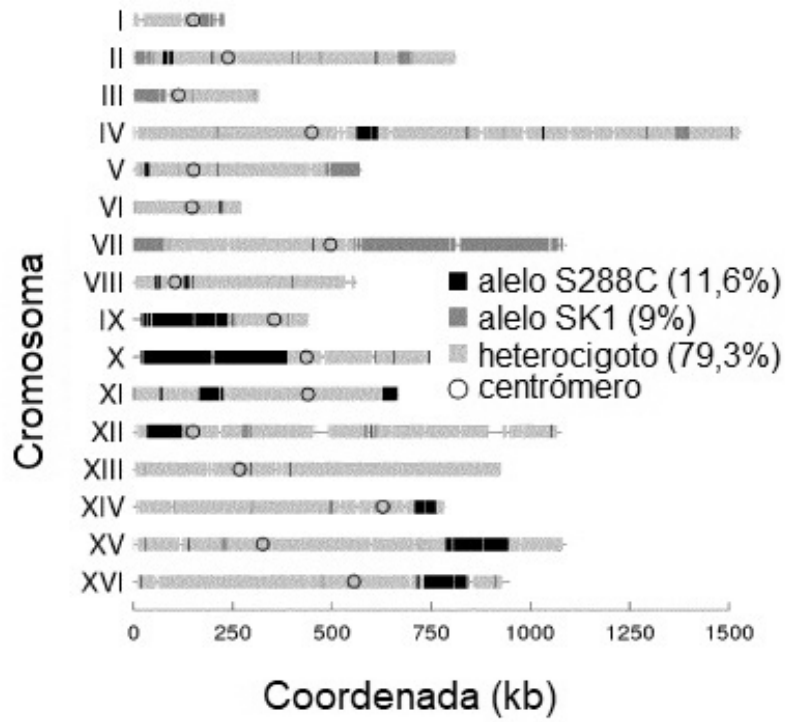
Figura 3



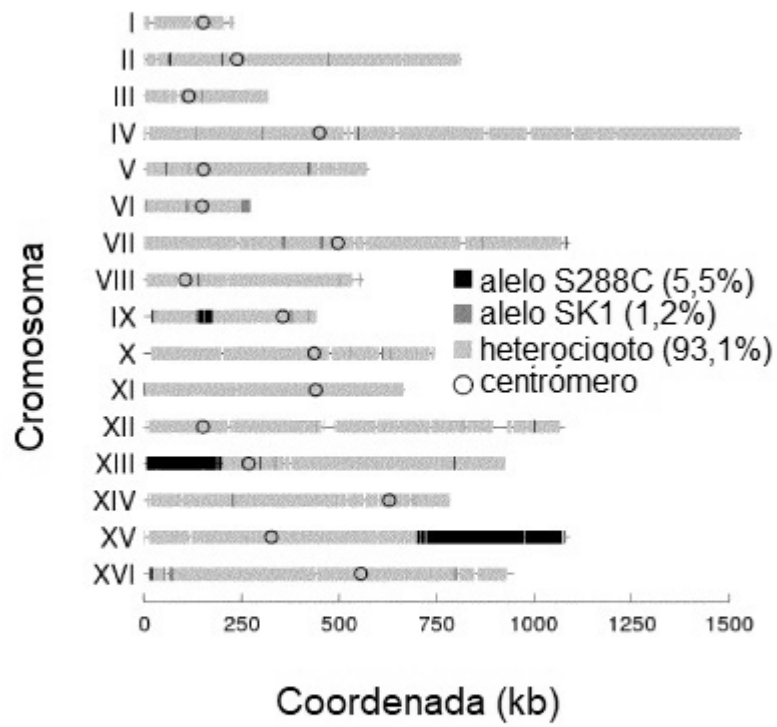
**Figura 4**



**Figura 5A**

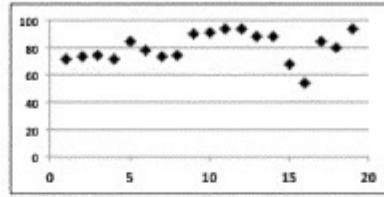


**Figura 5B**

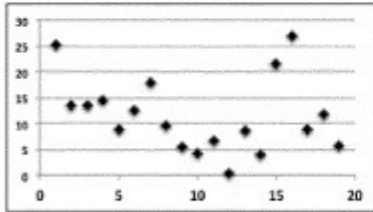


**Figura 5 C**

% de alelos heterocigóticos (S288C+SK1)



% de alelos monoalélicos S288C



% de alelos monoalélicos SK1

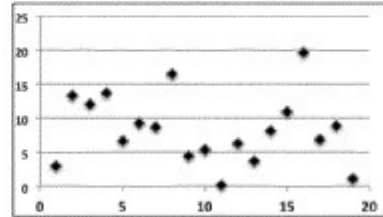


Figura 6

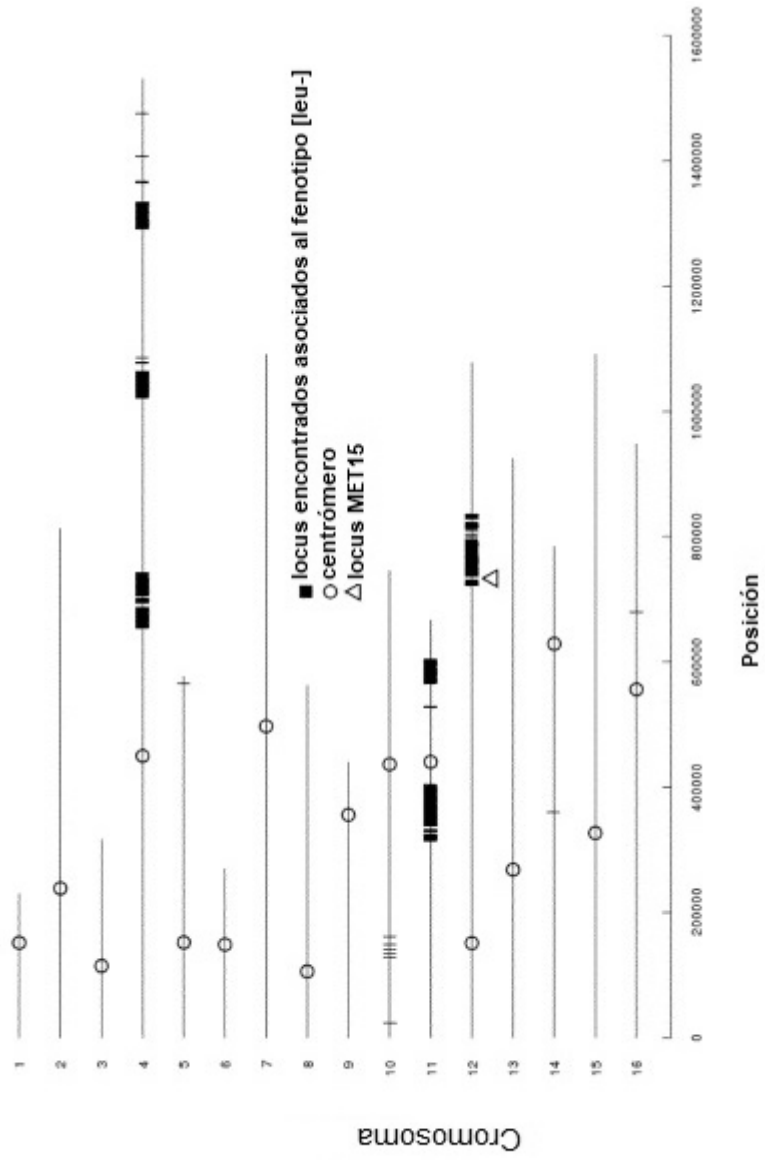


Figura 7A

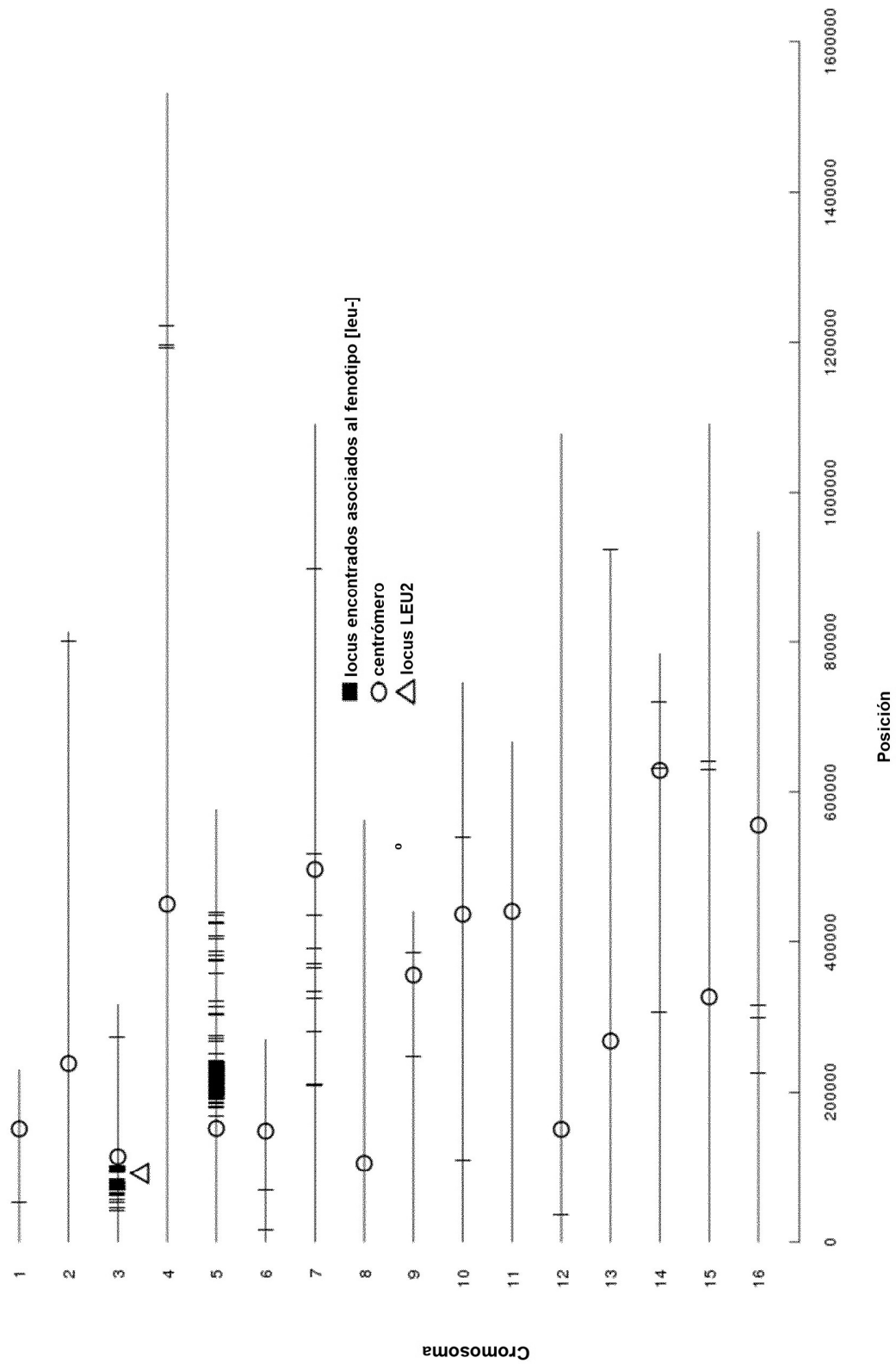


Figura 7B



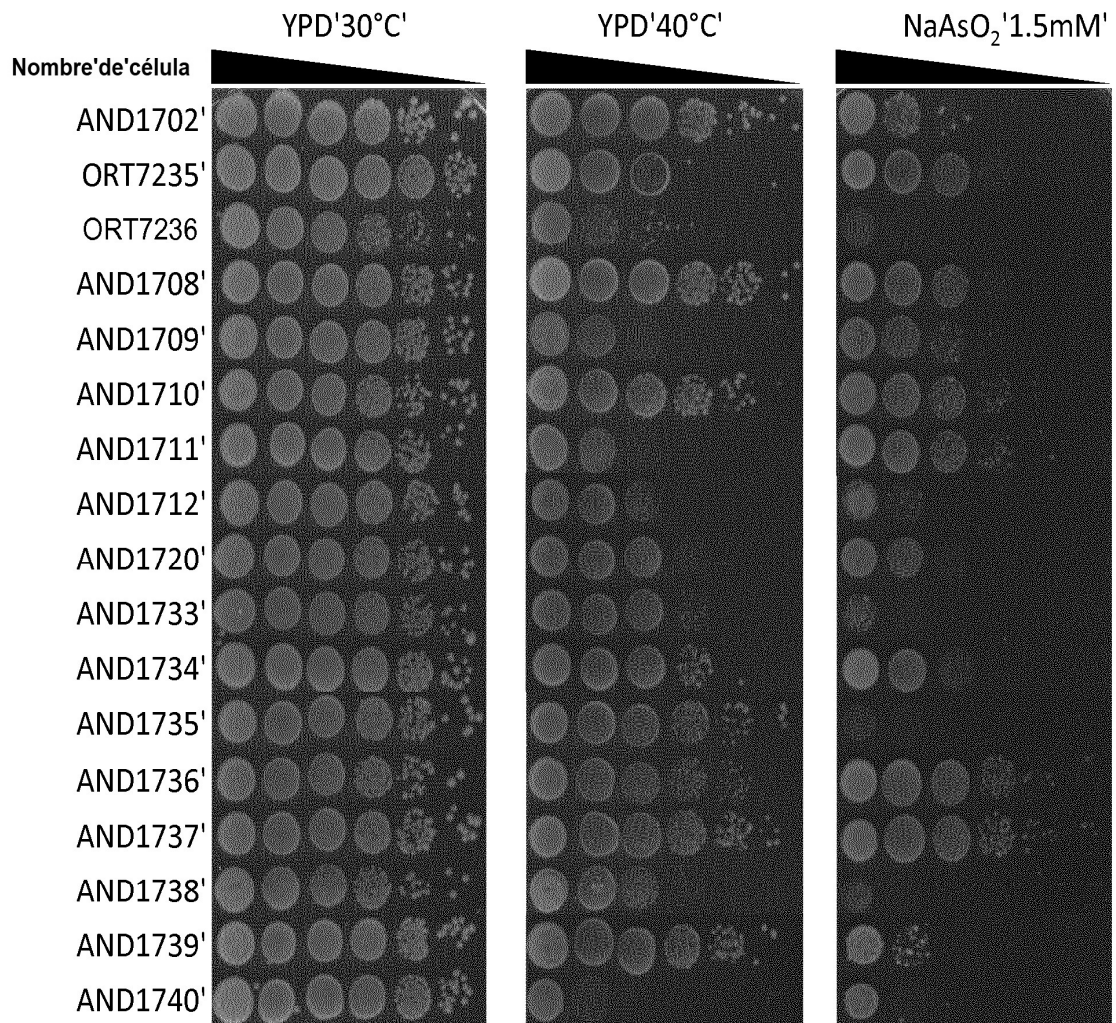


Figura 8