

Anna Misiewicz<sup>1\*</sup>, Sylwia Wróblewska-Kabba<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego, Zakład Mikrobiologii,  
Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, 02-532 Warszawa, Rakowiecka 36  
<sup>2</sup>Centrum Badań DNA sp. z o.o., ul. Mickiewicza 31, 60-688 Poznań

Wpłynęło w marcu 2014 r.

1. Wstęp. 2. Historia badań. 3. Występowanie winorośli i drożdży 4. Różnicowanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 5. Wyodrębnianie gatunków w grupie *Saccharomyces sensu stricto*. 6. Budowa hybrydowa. 6.1. Drożdże piwowarskie *lager*. 6.2. Drożdże piwowarskie *ale*. 6.3. Drożdże winiarskie. 6.4. Drożdże do produkcji cydru. 7. Zmiany w budowie genomu. 7.1. Duże rearanżacje chromosomalne. 7.2. Zmienna liczba kopii genów. 7.3. Polimorfizm sekwencji. 7.4. Transfer DNA. Introgresje. 7.5. Sekwencje powtórzone. 8. Pangenom drożdży *Saccharomyces sensu stricto*. Różnorodność szczepów w obrębie grupy

#### Adaptive evolution of yeasts genomes from *Saccharomyces cerevisiae sensu stricto* group

**Abstract:** *Saccharomyces sensu stricto* yeasts includes important strains for many biotechnological processes, specially in wine and brewery fermentation. Their plasticity and adaptation to different industrial niches may be result of complex genomic construction, polyploidy, chromosomal rearrangements, DNA transfer, SNP occurrence. “Mixed” genetic lines known as hybrids, have more adaptation “abilities” than “pure” lines. Genomic data from the first strain yeast S288c, sequencing in 1996, and from many others sequencing strains from different origins and applications was obtained. Adaptive evolution of industrial yeast using different molecular tools became an important area to research in last few years.

1. Introduction. 2. History of investigation. 3. Biogeography of grape and yeasts. 4. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. 5. Identification of yeasts in *Saccharomyces cerevisiae* group. 6. Hybrids. 6.1. *Lager* brewers yeasts. 6.2. *Ale* brewers yeasts. 6.3. Wine yeasts. 6.4. Cider yeasts. 7. Changes in genome construction. 7.1. Gross chromosomal rearrangements. 7.2. Variable number of gene copies. 7.3. Sequence polymorphism. 7.4. DNA transfer. Introgressions. 7.5. Repeated sequences. 8. Pangenom of *Saccharomyces sensu stricto* yeasts. Biodiversity of strains in this group

**Słowa kluczowe:** adaptacja molekularna, hybrydy, wpływ czynników technologicznych, *Saccharomyces cerevisiae*  
**Key words:** hybrids, influence of technological factors, molecular adaptation, *Saccharomyces cerevisiae*

## 1. Wstęp

Drożdże są jednokomórkowymi mikroorganizmami, należącymi do różnych grup taksonomicznych. Znanych jest ponad 700 gatunków drożdży, najszerszej użytkowane są drożdże z rodzaju *Saccharomyces*, szczególnie *Saccharomyces cerevisiae*. Drożdże z grupy *Saccharomyces sensu stricto* są wykorzystywane przez człowieka od dawna [87]. Wiele tysięcy lat temu w Egipcie stosowano drożdże do wypieku chleba. Molekularne dowody archeologiczne na wytwarzanie fermentowanych napoi datuje się na 7000 lat p.n.e. [63], choć proces fermentacji cukrów z udziałem drożdży został naukowo udowodniony dopiero w 1860 r. [76]. Ich zdolność do przekształcania cukru do etanolu z wytworzeniem dwutlenku węgla podczas fermentacji używana jest w procesach biotechnologicznych przy produkcji wina, piwa i sake. Te zadziwiające cechy przynoszące znaczne korzyści ekonomiczne traktowane jako naturalne właściwości drożdży, mimo różnych badań, wciąż nie są do końca wyjaśnione. Niezwykła plastyczność, a także

stabilność cech genotypowych i fenotypowych szczepów winiarskich, piwowarskich i piekarskich jest wciąż wyjaśniania. Niewątpliwie związana jest ze specyficzną budową tych drożdży.

## 2. Historia badań

Badania nad rodzajem *Saccharomyces* rozpoczęły się w 1838 r. *Saccharomyces cerevisiae* był pierwszym opisanym gatunkiem drożdży. W 1870 r. Reess pierwszy raz wymienił, wśród grzybów zdolnych do fermentacji alkoholowej dwie grupy drożdży. Drożdże fermentujące soki owocowe nazwał *Saccharomyces ellipsoideus*, a drożdże piwowarskie – *Saccharomyces pastorianus*. W 1912 r. Guilliermond podał pierwszy system klasyfikacji drożdży, bazujący na morfologii i kilku fizjologicznych testach oceniających zdolność drożdży do fermentacji monosacharydów. W swojej monografii „Les Levures” opisał już 20 gatunków *Saccharomyces* [76]. Prowadzono wiele badań dotyczących taksonomii

\* Autor korespondencyjny: Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Waława Dąbrowskiego, Zakład Mikrobiologii, Kolekcja Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa, tel. 22 6063691, e-mail: anna.misiewicz@ibpr.p.l

Tabela I  
Zmiany taksonomiczne w rodzaju *Saccharomyces* w latach 1912–2011

Rok							
1912	1952	1970	1984	1998	2000	2008	2011
<i>S. cerevisiae</i> <i>S. ellipsoideus</i> <i>S. turbidans</i> <i>S. ilicis</i> <i>S. vordermanni</i> <i>S. sake</i> <i>S. cartilaginosus</i> <i>S. batatae</i> <i>S. tokyo</i> <i>S. yeddo</i>			<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
						<i>S. arboricolus</i>	<i>S. arboricolus</i>
<i>S. wiliamus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. validus</i>	<i>S. wiliamus</i>			<i>S. paradoxus</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>S. paradoxus</i>
<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>	<i>S. coreanus</i>					
<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. monacensis</i>	<i>S. carlsbergensis</i> <i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i>	<i>S. uvarum</i>		<i>S. pastorianus</i>	<i>S. pastorianus</i>	<i>S. pastorianus</i>	<i>S. pastorianus</i>
<i>S. uvarum</i> <i>S. logos</i> <i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i>	<i>S. bayanus</i> <i>S. pastorianus</i> <i>S. oviformis</i> <i>S. beticus</i>	<i>S. bayanus</i>		<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>
	<i>S. heterogenicus</i>	<i>S. heterogenicus</i>			<i>S. cariocanus</i>	<i>S. cariocanus</i>	<i>S. cariocanus</i>
	<i>S. chevalieri</i> <i>S. fructuum</i>	<i>S. chevalieri</i>			<i>S. mikatae</i>	<i>S. mikatae</i>	<i>S. mikatae</i>
	<i>S. italicus</i> <i>S. steineri</i>	<i>S. italicus</i>			<i>S. kudriavzevii</i>	<i>S. kudriavzevii</i>	<i>S. kudriavzevii</i>
	<i>S. globosus</i>	<i>S. globosus</i>					<i>S. eubayanus</i>
		<i>S. acetii</i> <i>S. prostoserdovi</i> <i>S. oleaginosus</i> <i>S. olaceus</i> <i>S. capensis</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. hispaniensis</i> <i>S. inusitatus</i> <i>S. norbensis</i> <i>S. abuliensis</i> <i>S. cordubensis</i> <i>S. gaditensis</i> <i>S. hispalensis</i>					

drożdży [6, 7, 50, 51, 60]. W tabeli I pokazano zróżnicowanie i zmiany nazw drożdży w grupie *Saccharomyces sensu stricto* między 1912 a 2011 r.

Rodzaj *Saccharomyces* zawierał dwie grupy gatunków: *Saccharomyces sensu stricto* i *Saccharomyces sensu lato*. Grupa *Saccharomyces sensu stricto* zaproponowana przez van der Walt [86] z 21 gatunków zmniejszyła się w 1998 do czterech różnych taksonów. Ta klasyfikacja nie została ostatecznie zakończona, przede wszystkim w stosunku do drożdży *S. bayanus* i *S. pastorianus*. Ostatnio, postulowano utworzenie gatunku *S. eubayanus* [56].

### 3. Występowanie winorośli i drożdży

Występowanie szczepów drożdży biorących udział w procesach biotechnologicznych, w tym w fermentacji, obserwowane jest tylko w miejscach, które są związane z obecnością człowieka. Potwierdzono tylko jeden przypadek obecności drożdży fermentujących nektar z palmy w dzikich lasach Malezji, co sugerowało, że drożdże te występują niezależnie od bliskości człowieka [93]. Większość scharakteryzowanych szczepów *S. cerevisiae* izolowano z napojów lub żywności, tylko

nieliczne z ziemi lub drzew. Porównanie „naturalnych” i udomowionych szczepów ujawniło, że naturalnie występujące w środowisku mikroorganizmy charakteryzują się większą różnorodnością genomową, podczas gdy u udomowionych drożdży występuje mniejsze zróżnicowanie genetyczne. Udomowienie drożdży winiarskich związane jest z udomowieniem szczepów winorośli w latach 5400 a 5000 r. p.n.e., na obszarze położonym między Morzem Czarnym a Iranem. Kolebką uprawy winorośli i produkcji wina były tereny w górach Zagros, na Taurusie i na Kaukazie, stopniowo uprawy rozszerzały się o następne regiony w kierunku Mezopotamii, doliny Jordanu i dalej do Egiptu, Fenicji, na Kretę i do Grecji [98]. Ok 500 lat p.n.e. wino produkowano we Włoszech, na Sycylii, w południowej Francji i na Półwyspie Iberyjskim. Północna granica uprawy winorośli stanowiła północną granicę imperium rzymskiego (100 lat p.n.e.). Kolonizacja Ameryki w XVI w., południowej Afryki w XVII w., w Australii i Nowej Zelandii w XVIII i XIX w. [72] wpłynęła na opanowanie przez winorośle i drożdże winiarskie nowych terenów. Większość drożdży winiarskich pochodzi z Mezopotamii, drożdże sake z Azji, a analiza markerów mikrosatelitarnych w badaniu populacji drożdży z Nowej Zelandii [38] dowodzi, że drożdże te tworzą odrębną grupę i nie pochodzą ani z Mezopotamii ani z Azji. Nie jest jasne, kiedy zostały tam przyniesione przez człowieka, ptaki lub owady. Z badań L e g r a s a, w których porównywał ze sobą kilkaset szczepów drożdży różnego pochodzenia wynika, że ich historia ewolucyjna jest odbiciem historii/działalności człowieka [55].

#### 4. Różnicowanie drożdży *Saccharomyces sensu stricto*

W konwencjonalnej taksonomii do identyfikacji drożdży stosowano testy morfologiczne i fizjologiczne. Fenotypowe charakterystyki mikroorganizmu zależne od warunków hodowli i stosowanego substratu często prowadziły do niewłaściwych wyników [85]. Różnicę między dwoma taksonami często określano na podstawie jednej lub dwóch charakterystycznych cech, a większość właściwości typowych mogła być zmieniona przez mutację w pojedynczym genie. Do wczesnych metod molekularnych, dzięki którym udoskonalono zróżnicowanie gatunków i określono między nimi pokrewieństwo należały ocena zawartości GC, hybrydyzacja DNA [87], kariotyping, RFLP mitochondrialnego DNA [82], ITS PCR-RFLP, przypadkowo amplifikowane polimorficzne DNA RAPD [33]; AFLP [5], powtórzenia sekwencji [44], DGGE [62], SSCP [15], analiza sekwencji regionów ITS i domeny D1/D2, analiza multigenowa sekwencji MLSA [52]. Prowadzono też analizy porównawcze sekwencji mikrosatelitarnych [25, 36, 79], mini i mega satelitarnych [78, 80],

zróżnicowanie liczby kopii przy zastosowaniu sCGH [16, 31, 46, 53, 70, 94] i polimorfizm wykryty podczas analizy macierzy [81], a także stosowanie wielogatunkowych mikromacierzy taksonomicznych [64] i typowanie MLST [4, 90].

#### 5. Wyodrębnianie gatunków w grupie *Saccharomyces sensu stricto*

Natura poliploidalna, zdolność do wymiany materiału genetycznego, wysoka zmienność genomowa drożdży *Saccharomyces sensu stricto* utrudnia standardową identyfikację gatunku. Można przyjąć, że grupa ta reprezentuje ciągłą genomową strukturę [24], w której gatunki nie są wyraźnie rozróżnialne przy zastosowanie metod obecnie stosowanych do ustanowienia gatunków biologicznych.

Podstawą definicji biologicznego gatunku jest zdolność do łączenia się i wytwarzania płodnego potomstwa. Drożdże *S. cerevisiae sensu stricto* są zdolne do procesu płciowego, ale w wielu przypadkach, drożdże selekcionowane z powodu swoich unikalnych cech i stosowane przemysłowo nie wytwarzają zarodników lub wykazują anomalie ploidalności tzn. są często poliploidami lub aneuploidami. Następuje więc nieprawidłowa lub błędna mejoza. Mimo, iż definicja gatunków oparta na płodności jest obecnie jedynym wiarygodnym kryterium rozróżniania gatunków, na podstawie której ustanowiono gatunki w rodzaju *Saccharomyces* nie może być zawsze bezwzględnie stosowana. Identyfikacja może być spełniona także przez porównanie zgodności gatunkowej szczepów wyrażonej stopniem hybrydyzacji, np. *S. cerevisiae* i *S. bayanus* były długo uznawane za najbardziej odległe gatunki w grupie *Saccharomyces sensu stricto*, ich molekularne pokrewieństwo (wyrażone związkiem DNA/DNA) wynosi 20% [87].

Testy konwencjonalne i molekularne, takie jak kariotyping, sekwencjonowanie domeny D1/D2 i PCR-RFLP rejonu ITS rDNA, wyraźnie oddzielają grupę drożdży *S. uvarum* od *S. bayanus*, ale po badaniach hybrydyzacyjnych ustalono, że *S. uvarum* może być zdefiniowany jako gatunek, zgodnie z pojęciem biologicznego gatunku, ponieważ hybrydy między *S. bayanus* i *S. uvarum* mogą wytwarzać żywe i płodne komórki, chociaż o bardzo niskim stopniu płodności (9–39%).

Drożdże *Saccharomyces sensu stricto* są zwykle diploidami, w dobrych warunkach rozmnażającymi się przez pączkowanie. Podczas mejozy generują 4 askospory w workach. Do sporulacji najczęściej dochodzi przy hodowli w ubogich podłożach w nieobecności źródeł węgla wykorzystywanych podczas fermentacji i przy niedostatku azotu. Ich częsta aneuploidalność wpływa na różny wynik procesu mejozy.

Tabela II

Zmiany genomu drożdży z grupy *Saccharomyces sensu stricto* pod wpływem różnych czynników technologicznych

Zastosowanie drożdży	Czynnik	Gen	Zmiany	Piśmienictwo
Biopaliwo		<i>SNO, SNZ</i>	Elementy subtelomerowe	[82]
Do produkcji win	Siarkowane moszcze	<i>SSU1</i>	Rearanżacja	[42, 71]
Do produkcji win	Wysoka temperatura	<i>FOT 11</i>		[22]
Do produkcji win		<i>HXT3</i> , zdolność do fermentacji fruktozy		[43]
Drożdże flor		<i>FLO11</i>		[34, 46]

Drożdże różnych gatunków biorą udział w spontanicznej fermentacji, lecz gatunki rodzaju *Saccharomyces* włączając w szczególności *Saccharomyces cerevisiae*, grają główną rolę w fermentowaniu żywności i napojów. Jednak niektóre winiarskie kultury starterowe mogą należeć do innych gatunków tej grupy takich jak *S. bayanus* i *S. paradoxus* znaleziony w winach chorwackich. *S. bayanus* var. *uvarum* jest wykorzystywany do produkcji wina i cydru w regionach Europy o chłodniejszym klimacie [25]. Szczepy *S. pastorianus* są odpowiedzialne za wytwarzanie piwa *lager*.

W trakcie procesów technologicznych występują różne czynniki, które mogą mieć wpływ na strukturę genomu. Do czynników tych należą czynniki stresujące m.in.: siarka używana do siarkowania moszczy, wysokie stężenie alkoholu, wysoka temperatura fermentacji, wysokie ciśnienie osmotyczne [3] (tab. II)

## 6. Budowa hybrydowa

Przemysłowe szczepy drożdży *Saccharomyces* są w większości hybrydami międzygatunkowymi. Powszechnie akceptowany jest pogląd, że budowa hybrydowa i wynikające z niej cechy obojga rodziców mogą mieć szersze zastosowanie technologiczne niż szczepu niehybrydowego. Tworzenie wewnątrzgatunkowych hybryd jest prawdopodobnie sposobem adaptacji drożdży do różnych środowisk. Hybrydyzacja różnych gatunków *Saccharomyces* następuje przez koniugację spor haploidalnych lub komórek [74], przez łączenie się wegetatywnych komórek diploidalnych i haploidalnych zarodników lub komórek albo przez łączenie się wegetatywnych komórek diploidalnych [24]. Genom hybrydowy zawiera różne kopie genomu rodzicielskiego. Hybrydy diploidalne są sterylne i mogą być utrzymywane tylko przez rozmnażanie bezpłciowe. Tylko allotetraploidalne lub amfiploidalne hybrydy są płodne, wytwarzając diploidalne hybrydowe spory, lecz winiarskie hybrydy *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* są prawie zawsze diploidalne i sterylne. Segregacja w wyniku mejozy diploidalnych hybryd jest nieefek-

tywna, a powstające spory nie są żywe z powodu występowania częstej aneuploidalności.

### 6.1. Drożdże piwowarskie *lager*

Naturalna hybryda drożdży piwowarskich *lager* (fermentacja dolna) *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*) była najczęściej badanym typem drożdży hybrydowych. Vaughan-Martini i Kurtzman pierwsi określili, że typowy szczep *S. carlsbergensis* obecnie nazywany *S. pastorianus*, reprezentant drożdży *lager*, częściowy allotetraploid, był wynikiem międzygatunkowej hybrydyzacji między *S. cerevisiae* i *S. bayanus* [87]. W późniejszych badaniach wykazano, że kolejnym rodzicielskim szczepem był *S. monacensis* (syn. *S. pastorianus*) [49]. Następnie stwierdzono w wyniku analizy profili białkowych, że *S. monacensis* jest własną hybrydą. Potwierdził to Casaregola i wsp. [19] po analizie sekwencji kilku specyficznych genów i PCR-RFLP. Liczne badania chromosomów i składu genetycznego drożdży *lager* ujawniły obecność w tych drożdżach materiału genetycznego z *S. cerevisiae* i nie-*S. cerevisiae* [19]. Najnowsze badania Rainieri i wsp. [75] potwierdziły obecność w drożdżach piwowarskich materiału genetycznego pochodzącego z *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, a właściwie *S. eubayanus* [56]. De Barros Lopes i wsp. [24] wykazali, że przemysłowe drożdże piwowarskie są wynikiem wielokrotnej interspecyficznej hybrydyzacji i prawdziwa jest hipoteza, że pierwsze zdarzenie hybrydyzacyjne wystąpiło przy tworzeniu się szczepu *S. carlsbergensis* i następnie hybrydyzacji ze szczepem *ale S. cerevisiae* występującym w środowisku piwowarskim.

Rainieri określiła badane drożdże jako linie czyste i mieszane w różnym stopniu zapożyczenia [75].

Genomy drożdży piwowarskich są aneupoliploidalne, z dużymi rearanżacjami i ze zwiększoną lub zmniejszoną liczbą chromosomów lub ich części, dlatego też wykazują zadziwiającą intraspecyficzną zmienność. Analizy CGH (Chromosomal Gross Hybridization) potwierdziły te obserwacje. W hybrydowym

szczepie drożdży piwowarskich Weihenstephan 34/70 po zsekwencjonowaniu [66] potwierdzono allopoliploidną budowę genomu *S. pastorianus*. Szczepy rodzicielskie zbliżone były bardziej do *S. bayanus* var. *bayanus* niż do var. *uvarum* i *S. cerevisiae*.

Te wyniki pozwoliły Pulvurentiemu i wsp. [73] na utrzymanie epitetu *S. bayanus* dla szczepów hybrydowych i odzyskanie taksonu *S. uvarum* dla szczepów nie-hybrydowych. Jednak Naumow [67] sugerował rozważenie tych dwóch subgrup, jako odmian (varietes) *S. bayanus* (var. *bayanus* i var. *uvarum*) zgodnie z ich częściową izolacją reprodukcyjną wskazaną przez partialną sterylność ich hybryd.

## 6.2. Drożdże piwowarskie ale

Wydawało się, że szczepy ale (górnego fermentacji) nie są tak zróżnicowane jak drożdże fermentacji dolnej i należą do jednego gatunku *S. cerevisiae*. W miarę doświadczeń, niektóre także opisano jako hybrydy *S. cerevisiae*/*S. kudriavzevii*. Analiza RFLP zamplifikowanych markerów jądrowych ujawniła, że wiele tych szczepów było diploidami ze złożoną strukturą. Budowa taka może prowadzić do niestabilności genomowej. Przyczyną tej niestabilności jest CGH (Chromosomal Gross Hybridization) przypadku *S. pastorianus*, u którego prawdopodobnie fermentacja wysoko stężonej brzeczki w wysokich temperaturach indukowała zmiany chromosomalne [47].

## 6.3. Drożdże winiarskie

Niedawno odkryte hybrydy drożdży *S. cerevisiae* i *S. kudriavzevii* występują w grupie technologicznej drożdży winiarskich [61] i piwowarskich [41], identyfikowane są nawet potrójne hybrydy *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *S. kudriavzevii* [95]. Naturalne hybrydy *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* związane z procesem fermentacji znaleziono do tej pory w regionach Europy klimatu oceanicznego i klimatu kontynentalnego, takiego jak występuje w Anglii [41].

Genetyczna charakterystyka drożdży winiarskich, hybryd *S. cerevisiae* i *S. kudriavzevii* w wyniku analizy restrykcyjnej 5 genów jądrowych ulokowanych na różnych chromosomach, regionu 5,8S ITS rDNA i genu mitochondrialnego COX2, ujawniła obecność w winach szwajcarskich 3 typów hybryd [40]. W późniejszych badaniach [41] zidentyfikowano 6 nowych typów hybryd *S. cerevisiae* i *S. kudriavzevii* wśród drożdży piwowarskich, bazując na analizie RFLP 35 genów kodujących białka. Hybrydy te przypuszczalnie zawierały chromosomy chimeryczne, prawdopodobnie generowane przez rekombinacje między homologicznymi chromosomami z różnych źródeł rodzicielskich [9].

## 6.4. Drożdże do produkcji cydru

Szczepy zawierające materiał genetyczny z różnych źródeł znaleziono także wśród drożdży stosowanych do wytwarzania cydru. Stwierdzono, że drożdże te były hybrydami zawierającymi materiał genetyczny z gatunków *S. cerevisiae* i drożdży zbliżonych budową do *S. bayanus* i do *S. kudriavzevii*. Dodatkowe różnicowanie genomowe było wynikiem międzygatunkowej hybrydyzacji, która występowała między dwoma lub więcej gatunkami *Saccharomyces* [74].

Tak więc hybrydyzacja, która długo wydawała się, że występuje tylko u drożdży piwowarskich, ostatecznie, okazało się, jest powszechna w rodzaju *Saccharomyces*, występuje także w drożdżach winiarskich i cydrowych [24, 54].

Obecność hybryd *S. cerevisiae* × *S. bayanus* jest łatwo wytłumaczalna, ponieważ oba gatunki koegzystują w tych samych procesach i środowiskach fermentacyjnych (warzenie piwa) [76], produkcja cydru [21, 84]. Jednak w przypadku hybryd *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* nie jest łatwo zrozumieć, kiedy nastąpiła hybrydyzacja i jak te hybrydy skolonizowały produkcję wina w centralnej Europie [41], ponieważ *S. kudriavzevii* jak dotąd, nie znaleziono w środowisku fermentacyjnym. Szczepy *S. kudriavzevii* izolowano z opadniętych liści i ziemi w Japonii [67].

## 7. Zmiany w budowie genomu

Stosowanie drożdży przez człowieka prowadziło do selekcji wyspecjalizowanych szczepów w piekarstwie, piwowarstwie i winiarstwie. Te wyspecjalizowane szczepy drożdży *S. cerevisiae* wykazują specyficzne cechy fenotypowo-technologiczne. Budowa genomowa tych drożdży zmieniła się pod wpływem różnych zdarzeń. Były to: duże rearanżacje chromosomalne (Gross Chromosomal Rearrangement GRC), zmienna liczba kopii genów i polimorfizm sekwencji oraz introgresje (transfer DNA) [8, 10].

### 7.1. Duże rearanżacje chromosomalne

Od dawna wiadomo, że drożdże winiarskie wykazujące wysoki poziom polimorfizmu długości chromosomów powstały w wyniku rearanżacji chromosomalnych. W wyniku tych rearanżacji nastąpiły translokacje, delecje i amplifikacje regionów chromosomalnych [17, 18]. Nastąpiło przemieszczenie między sekwencjami Ty lub zduplikowanymi genami [20]. Z wykorzystaniem analiz porównawczej hybrydyzacji genomowej podkreślono rolę mobilnych retrotranspozonów

w generowaniu zmienności w genomach szczepów winiarskich [16]. I tak np. sekwencja genomu szczepu winiarskiego EC1118, zawiera wiele bloków chromosomalnych z translokacjami i insercjami nieobecnymi w genomie referencyjnego szczepu S288c. Wiele z tych translokacji i insercji jest zlokalizowanych w telomerowych regionach chromosomów [91]. Rearanżacje genomowe mogą modyfikować ekspresję genu i zmieniać fenotyp, zwłaszcza jeśli są zlokalizowane wewnątrz ORF lub w regionie regulatorowym genu.

W większości przypadków nie udowodniono bezpośredniego związku między tymi rearanżacjami a cechami fenotypowymi. W niektórych jednak przypadkach udało się tę rolę zdefiniować. Wzajemne translokacje między chromosomem VIII i XV, widoczne w drożdżach winiarskich, zwiększają ekspresję genu *SSU1*, który koduje białko błony komórkowej związane w transport anionów siarkowych, podwyższając oporność na związki siarki [42, 71]. Prawdopodobnie ta translokacja powstała przez ciągłe stosowanie związków siarki w winiarstwie i udowodniła związek między rearanżacjami chromosomalnymi a adaptacją do warunków przemysłowych.

Drożdże flor także zawierają wiele rearanżacji. Ekspozycja drożdży na wysokie stężenia acetylaldehydu i alkoholu, mogła wpływać na pęknięcia podwójnej nici, co faworyzowało występowanie GCR (Gross Chromosome Rearrangement) [46].

## 7.2. Zmienna liczby kopii genów

Amplifikacja genów jest znanym mechanizmem adaptacji przez różne organizmy, służącym przetrwaniu w stresujących środowiskach lub zwiększeniu oporności na wiele toksycznych czynników. Po oparciu na mikromacierzach hybrydyzacji całego genomu różnych szczepów *S. cerevisiae* [81, 83, 94] wykazano obecność powtórzeń sekwencyjnych DNA i podkreślono ich rolę w strukturalnej dywersyfikacji i adaptacji do specyficznych warunków środowiska. Analizy zmienności liczby kopii wykazują duplikacje i delecje genów subtelomerowych [16, 31]. Wiele różnic między szczepami dotyczy genów transporterowych i genów włączonych w odpowiedzi na leki/narkotyki [31]. Zmienność liczby kopii sekwencji obserwowano także w telomerowych lub subtelomerowych regionach chromosomalnych szczepów *S. cerevisiae* stosowanych w wytwarzaniu etanolu, stosowanego jako biopaliwo. Analiza zmienności liczby kopii pięciu przemysłowo ważnych szczepów drożdży *S. cerevisiae* biorących udział w procesie wytwarzania biopaliwa potwierdziła amplifikacje w telomerowych genach *SNO* i *SNZ*, które są włączone w biosyntezę witaminy B6 i B1 [83].

## 7.3. Polimorfizm sekwencji

Porównawcza identyfikacja polimorfizmu sekwencji nukleotydowych jest podstawową metodą w badaniu genetycznych różnic szczepów, także w wyjaśnieniu historii ewolucyjnej gatunków [81]. W 63 szczepach drożdży *S. cerevisiae* izolowanych z różnych środowisk piwowarskich, winiarskich, szpitalnych i środowiska naturalnego, po hybrydyzacji genomowego DNA każdego szczepu z całym genomem szczepu S288c wykryto 1,89 mln polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (Single Nucleotide Polymorphism SNP). Zlokalizowano 3 985 delecji o długości ponad 200 pz w genomach badanych szczepów. Obserwowano zmniejszenie gęstości SNP w odległości 25 pz od centromerów. Kontrastowo, wyższą zmienność sekwencji obserwowano w regionach oddalonych o 15–45 pz od telomerów, także większość zdeletowanych genów znajdowała się w regionach subtelomerowych. Potwierdzono w ten sposób zmienność regionów subtelomerowych umożliwiających adaptację szczepów do asymilacji różnych źródeł węgla [94].

W kilku przypadkach wykazano wpływ polimorfizmu sekwencji na cechy fenotypowe o znaczeniu przemysłowym. Np. szczepy drożdży flor mają dwie mutacje we *FLO11*, genie kluczowym w formowaniu *velum*, kodującego mucynę w ścianie komórkowej. Te mutacje w promotorze i regionie kodującym *FLO11* wzmacniają ekspresję tego genu i zdolność komórek do przylegania do siebie [34, 46]. Inny przykład podaje G u i l l a u m e [43], który zidentyfikował allel *HXT3*, odpowiadający za wzmożoną zdolność do fermentowania fruktozy w kilku szczepach drożdżach winiarskich.

## 7.4. Transfer DNA. Introgresje

Pozyskiwanie genów przez transfer DNA długo było spostrzegane jako rzadkie zjawisko u drożdży. Jednak niespodziewanie okazało się, że genom drożdży *S. cerevisiae* szczepu winiarskiego EC1118 zawiera duże segmenty chromosomów uzyskane w wyniku niezależnego zdarzenia HGT z różnych donorów, włączając gatunki nie-*Saccharomyces* [69]. Te introgresje zawierały 34 nowe geny związane przede wszystkim z metabolizmem węgla i azotu, co sugerowało ich potencjalną rolę w adaptacji szczepów do środowiska winiarskiego, gdzie istotne są te szlaki metaboliczne. Jeden z nowo badanych genów, homologiczny do *FSY1* u *S. pastorianus* koduje wysoką zdolność do symportu/transportu fruktozy, wzbogacając podobną funkcję nieznalezioną w *S. cerevisiae*. Ten gen transporter ma znaczenie przy końcu fermentacji winiarskiej, gdy większość pozostałego cukru występuje w formie fruktozy

[37]. Ostatnio wykazano obecność dwóch zduplikowanych tandemowych genów kodujących transportery oligopeptydów. Te geny należały do nowej rodziny grzybowych transporterów oligopeptydowych (*FOT*) zidentyfikowanych w wyniku przeprowadzenia analizy metatranskryptomowych populacji eukariotycznych mikroorganizmów glebowych [22]. Obecność tych nośników u drożdży czyni możliwym transport większych oligopeptydów niż zwykle transportowanych przez nośniki Ptr2p i Dal5p [45]. Niskie stężenia azotu przy końcu fermentacji i stosowanie dipeptydów może występować w drożdżach winiarskich zawierających transportery *FOT* zlokalizowane we fragmencie 65-pz DNA znalezionym w subtelomerowym fragmencie regionu chromosomu XV u wielu szczepów drożdży winiarskich. Ten fragment DNA także jest zawarty w genie *XDH1* (EC1118\_1D0\_6623g), który koduje przypuszczalnie dehydrogenazę ksylitolu, ostatnio zidentyfikowaną w przy badaniu „zużywania” ksylozy przez szczepy winiarskie [92]. Donor jednej z innych introgresji znaleziony w genomach drożdży winiarskich pochodzi z mikroorganizmu (*Zygosaccharomyces bailli*), należącego do flory zakażającej moszcze winne, sugerując, że te zdarzenia mogą być ułatwiane przez ekologiczną bliskość, sąsiedztwo [69]. Wykazano także, że ta introgresja znajdowała się w wielu kopiach w genomach drożdży winiarskich, w różnych lokalizacjach chromosomalnych. Absorpcja, utrzymanie i ekspansja tych obcych genów w genomie szczepów drożdży winiarskich modeluje ewolucję adaptatywną drożdży winiarskich.

Introgresję genu *DUP240* z chromosomu I *S. paradoxus* obserwowaną w drożdżach izolowanych z handlowych preparatów i dzikich szczepach winiarskich, opisano także w klinicznym szczepie YJM789 [91] i izolowanym z fig szczepie EM93, przodka szczepu S288c [32]. Dodatkowo szczep EM93 wykazuje polimorfizm korespondujący z tym samym regionem, jak introgresowany region z *MAL* chromosomu VII *S. paradoxus*. To zjawisko obserwowano u szczepu BG2 stosowanego do biopaliwa, wskazując, że ten region może także podlegać introgresji w szczepie EM93 [32].

Znaleziono również introgresje, definiowane jako relatywnie małe regiony różnych gatunków wewnątrz genomu innych gatunków, głównie występujące u blisko spokrewnionych gatunków grupy *Saccharomyces sensu stricto* [26, 57, 64, 65]. Telomery niosą geny nieortologiczne do *S. cerevisiae*, dodając specyficzności/oryginalności drożdżom piwowarskim, ponieważ telomery znane są z obecności genów włączonych w proces wytwarzania piwa. Geny transportery maltozy i maltotriozy włączone w proces fermentacji były także obecne w wyższej liczbie kopii w genomie zsekwencjonowanego genomu drożdży piwowarskich, było to spójne z różnymi fizjologicznymi zdolnościami hybryd piwowarskich.

Stosowanie sztucznych inter- i intraspecyficznego hybrydyzacji wśród drożdży *Saccharomyces sensu stricto* jest szeroko stosowane do udoskonalania szczepów drożdży w przemyśle fermentacyjnym [76].

Wiele badań wskazuje, że teoretycznie nie ma granic w wymianie materiału genetycznego w grupie drożdży *Saccharomyces sensu stricto*.

### 7.5. Sekwencje powtórzone

Tandemowo powtórzone sekwencje DNA są wysoko dynamicznymi składnikami genomów. Większość z nich znajduje się w regionach intergenowych, lecz niektóre w sekwencjach kodujących lub pseudogenach [89]. U ludzi, ekspansja intragenowych powtórzeń tripletowych jest związana z różnymi chorobami, włączając płasawicę Huntingtona i zespół łamliwego chromosomu X [59]. W genomie *Saccharomyces cerevisiae* większość genów zawiera intragenowe powtórzenia kodujące białka ściany komórkowej. Te powtórzenia zapoczątkowują częste zdarzenia rekombinacyjne w genie lub między genem i pseudogenem, będąc przyczyną ekspansji i powiększaniu wielkości genu. Zmiana wielkości wpływa na zmiany w fenotypie tj. adhezję, flokulację lub tworzenie biofilmu. Zróżnicowanie liczby powtórzeń intragenowych prowadzi do funkcjonalnej różnorodności antygenów ściany komórkowej, który pozwala grzybom i innym patogenom, na szybką adaptację do środowiska i zmiany systemu immunologicznego [89].

## 8. Pangenom drożdży *Saccharomyces sensu stricto*. Różnorodność szczepów w obrębie grupy

W większości badań z ostatnich lat, sekwencje nukleotydowe szczepów drożdży porównywano jedynie z sekwencjami pierwszego sekwencjonowanego organizmu eukariotycznego, jakim jest referencyjny szczep laboratoryjny S288c, przez wiele lat jedyny zsekwencjonowany przedstawiciel gatunku *Saccharomyces cerevisiae*. Od całkowitego zsekwencjonowania genomu drożdży szczepu S288c w 1996 r. [39] nastąpił niedawno gwałtowny wzrost sekwencjonowania innych szczepów *S. cerevisiae* [11–13, 26, 58, 91], rozszerzając wiedzę zarówno na poziomie SNP i zmienności strukturalnej i ujawniając nieznane kilobazy dodatkowych sekwencji nieobecnych w referencyjnym genomie S288c.

Rozwój wiedzy o pangenomie *S. cerevisiae* możliwy jest po analizie dużej próbki np. powszechnie stosowanych handlowych drożdży winiarskich i porównanie ich z innymi drożdżami przemysłowymi, włączając naturalne, dzikie szczepy drożdży winiarskich, piwowarskich, piekarskich i gorzelniczych.

Tabela III  
Niektóre zsekwencjonowane genomy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Rok sekwencjonowania	Szczep	Pochodzenie	Charakterystyka
1996	S288c	Pochodzi od szczepu EM93 (88% genomu), EM126, NRRL YB-210, Yeast Foam, FLD, LK	
2005	RM11-1a	Haploid	Uzyskany ze szczepu Bb32(3)
2007	YM789	Haploid, patogen oportunistyczny od pacjenta	Zdolności flokulacyjne, toleruje wysoką temperaturę i wirusy
2008	M22	Włoska winiarnia	
	YPS163	Gleba, dąb	Odporny na niską temperaturę, wysoka ekspresja na akwaporynę
	AWRI1631	Australijski szczep winiarski, haploid	Uzyskany z przemysłowego szczepu winiarskiego N96
	AWRI796	Australijski, haploidalny uzyskany z przemysłowego szczepu N96	Szczep winiarski
2009	JAY291	Nieflokulujący haploid z ze szczepu PE-2 do produkcji bioetanolu	Toleruje stres tlenowy i temperaturowy
	EC1118	Diploidalny, handlowy, powszechnie używany do produkcji wina	Trzy unikalne regiony od 17 do 65 pz, obecność genów wskazujących metabolizm i transport cukru i azotu, brak 100 genów w por. z S288c
2010	VIN13	Z Afryki Południowej	Toleruje niskie temperatury, wina aromatyczne
	AWRI796	Z Afryki Południowej, haploidalny uzyskany z przemysłowego szczepu N96	Bardziej przydatny do win czerwonych, fermentacja w wyższych temperaturach
	CLIB215	Z piekarni z Nowej Zelandii	
2011	CBS7960	Cukrownia w Brazylii	
	PW5	Palma, Nigeria	
	CLIB 324	Piekarski szczep z Wietnamu	
	CLIB382	Z piwa, Irlandia	
	EC9-8	Haploid, z Kanionu Ewolucji, Izrael	Odporny na kadm
	T7	Dąb, USA	
	T73		Niskie wymagania azotowe, wysoka tolerancja na alkohol, niskie wytwarzanie lotnych kwasów
	UC5	Sake, Japonia	
	VL3		aromatyczne białe wina, wysoka zawartość tiolu
	K7		Szczep do sake
	QA23	Vinho Verde, Portugalia	Toleruje niskie temperatury, niskie wymagania składników pokarmowych i tlenu, wysoka aktywność betaglukozydazy
	Y10	Orzech kokosowy, Filipiny	
	YJM269	Winogrona z Austrii	
Era NGS			

Rozwijająca się dynamicznie genomika porównawcza, dzięki zsekwencjonowaniu coraz większej liczby szczepów drożdży, pomaga w poszukiwaniu odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób przez tysiące lat następowała adaptacja genomów uprzednio dzikich gatunków, w wyniku której otrzymano zróżnicowane, wyspecjalizowane szczepy, o różnych szlakach metabolicznych, wykorzystywanych przemysłowo przez człowieka. Przykłady takich szczepów podano w tab. III.

Większość genów szczepu S288c jest obecnych w winiarskim szczepie T73. Główna różnica między

szczepami S288c i T73 polega na obecności w większej liczbie kopii elementów Ty1 i Ty2, obecnych w S288c.

We i i wsp. [91] znalazł ok. 60 000 polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) i ok. 6000 insercji/delecji w trakcie porównania szczepów YJM789 i S288c. Zmiany występowały zarówno w różnej gęstości polimorfizmu między chromosomami i między specyficznymi genami. W szczepie JAU291, o dobrze scharakteryzowanych allelach wielu genów związanych z fermentacją, wykazano znaczne różnice międzyszczepowe w porównaniu do sekwencji szczepów S288c, RM-11 i YJM789.



Wykazano, że sekwencje nukleotydowe genomowego DNA diploidalnego szczepu K7, używanego przy wytwarzaniu sake, są prawie identyczne z sekwencjami laboratoryjnego szczepu S288C oprócz kilku subtelerowych polimorfizmów i dwóch dużych inwersji obecnych w szczepie K7. Analiza heterozygotycznych nukleotydów między chromosomami homologicznymi ujawniła obecność mozaikowej, nierównomiernie nieparzystej dystrybucji heterozygot w szczepie K7 [1].

Porównawcze badania nad różnorodnością genomów szczepów *S. cerevisiae* wskazują na obecność unikatowych klastrowych szczepów stosowanych do produkcji sake, różnych od winiarskich i laboratoryjnych [58, 81] zgodnie z ich unikatowymi filogenetycznymi pozycjami i wysokim wytwarzaniem etanolu.

Występujące różnice wielkości między genami w różnych szczepach *S. cerevisiae* są istotne, jako że wielkość większości genów jest konserwowana ponad miliony lat w różnych gatunkach drożdży. Porównanie liczby genomowych kopii vs. poziomów transkryptów może prowadzić do charakterystyki konkretnego szczepu drożdży. Szczególnie informacja o elementach Ty i dużych rodzinach genów, takich jak rodziny subtelerowe, może być stosowana jako czułe narzędzie molekularne stosowane do opisu szczepów przemysłowych, jak sugerował uprzednio P r e t o r i u s [72].

Rearanżacje genomu, szczególnie amplifikacje i delecje regularnie obserwowano w odpowiedzi na zastosowaną silną presję selekcyjną w populacji mikroorganizmów w hodowli ciągłej. W warunkach chemostatu, ewolucja mikrobiologiczna występowała przez sekwencyjne nagromadzenie mutacji. Haploidalne i izogeniczne kloni, propagowano aseksualnie przez 100–500 generacji w hodowli z ograniczonym dostępem glukozy. Diploidy ewoluowały szybciej niż haploidy. Stosując macierz CGH, po stresowaniu drożdży znaleziono dodatkowe charakterystyczne rearanżacje genomowe w 6 z 8 szczepów. Te rearanżacje włączając poprzednio wskazane lokalne amplifikacje genowe, zmieniły liczbę kopii w chromosomie i translokacji wewnątrz i między chromosomami. Przyczyną większości rearanżacji była ektopowa rekombinacja z włączeniem sekwencji związanych z transpozonomem [29].

Rodziny genów subtelerowych ewoluują szybciej niż geny położone bliżej centromeru. Regiony subtelerowe częściej są miejscami duplikacji genu [2], co potwierdza unikalną rolę subtelerów jako znaczących miejsc w ewolucji genomu i zmianach innowacyjnych budowy/funkcji genomu [14], np. przypuszczalna adaptacyjna amplifikacja subtelerowych genów *SNO/SNZ* występuje w szczepach stosowanych w wytwarzaniu etanolu paliwowego [83]. Lokalizacja subtelerowa genów utylizujących cukier zapewne także podlega adaptacji [14]. Dodatkowo, wiele rodzin elementów transpozonowych wykazuje zróżnicowa-

nie liczby lub nie występują w różnych szczepach [59]. Innym źródłem zróżnicowania adaptacyjnej ekspansji jest zwielokrotnienie liczby genów, takich jak loci *CUP1* [35] i *HXT6/7* [29, 48].

## 9. Modele ewolucji u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Badania genomiki porównawczej ostatnio grają większą rolę w objaśnianiu ewolucji drożdży *Saccharomyces*. Ważnym mechanizmem eukariotycznej chromosomalnej ewolucji jest duplikacja segmentowa chromosomu, która prowadzi do krótkotrwałego, przemijającego częściowego stanu diploidalnego, który następnie jest zmieniany przez utratę lub duplikację genu albo zróżnicowanie sekwencji. Wg jednych ewolucyjny model *S. cerevisiae* jest zdegenerowanym tetraploidem, wg innych zdegenerowanym poliploidem.

Interesujące porównanie budowy genomów dwóch grup drożdży *lager* prowadzi do wniosku [30], że pochodzą z dwóch niezależnych zdarzeń intergatunkowej hybrydyzacji między dwoma zarodnikami *S. cerevisiae* i *S. bayanus* var. *bayanus* i fuzji między diploidem *S. cerevisiae* i haploidalnym *S. bayanus* var. *bayanus*. Prawdopodobnie, po prostym etapie hybrydyzacji, genom hybrydy podlegał ekstensywnej chromosomalnej rearanżacji, włączając ubytki chromosomów i chromosomową generację chimerycznych chromosomów przez niewzajemną, nierównoważną rekombinację między homologicznymi chromosomami [9].

W o l f e i S h i e l d s [97] początkowo proponowali ewolucyjny model dla *Saccharomyces cerevisiae*. Ich model wskazywał, że te drożdże są generowane przez całkowitą duplikację genomu ich przodka prowadząc serię chromosomalnych translokacji i delecji frakcji genomowych. Badania nad rearanżacją chromosomalną w *S. cerevisiae* i *S. bayanus* wskazują, że takie rearanżacje są zdolne do przyspieszenia dywersyfikacji sekwencji genomu w specjacji, ponieważ one indukują nieżywe spory w kulturach hybrydowych. P e r e z - O r t i n i w s p . [71] wykazał, że duże chromosomowe rearanżacje, zwane zwrotnymi wzajemnymi translokacjami między chromosomem VIII i XVI genu *SSU1* i genu *ECM34* są włączone w adaptacyjną ewolucję *S. cerevisiae* i wydaje się, że znaleziono je tylko w szczepach winiarskich.

Wyjaśnienie drogi, jaką ewoluują drożdże *Saccharomyces* jest fundamentalne do zrozumienia jak następowała specjacja *Saccharomyces sensu stricto*. Te kontrowersyjne teorie, pokazują drogę ewolucyjną, prowadzącą do obecnych drożdży *Saccharomyces*.

Szczegółowa charakterystyka szczepu produkcyjnego, prognozowanie właściwości biotechnologicznych na podstawie budowy genomu staje się jednym z krytycznych czynników determinujących wybór szczepu

i strategię jego stosowania w celu uzyskania powtarzalnych i unikalnych walorów smakowych produktów fermentacji.

## Piśmiennictwo

- Akao T. i 34 innych: Whole-Genome Sequencing of Sake Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no. 7, *DNA Research*, **18**(6) 423–434 (2011)
- Ames R.M., Rash B.M., Hentges K.E., Robertson D.L., Delneri D., Lovell S.C.: Gene duplication and environmental adaptation within yeast populations. *Genome Biol. Evol.* **2**, 591–601 (2010)
- Arroyo-Lopez F.N., Orlic S., Querol A., Barrio E.: Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *Int. J. Food. Microbiol.* **131**, 120–127 (2009)
- Ayoub M.-J., Legras J.-L., Saliba R., Gaillardin C.: Application of Multi Locus Sequence Typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 699–711 (2006)
- Azumi Goto-Yamamoto: AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application of phenetic clustering. *Yeast*, **18**, 1145–1154 (2001)
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification, 2<sup>nd</sup> (Eds). Cambridge Univ Press, Cambridge 1990
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification, 2<sup>nd</sup> (Eds). Cambridge Univ. Press, Cambridge 2000
- Barrio E., Gonzalez S.S., Arias A., Belloch C., Querol A.: Molecular mechanisms involved in the adaptive evolution of industrial yeasts GH Fleet), pp. 153–174. Springer Verlag, Germany, 2006
- Belloch C., Perez-Torrado R., Gonzalez S.S., Perez-Ortin J.E., Garcia-Martinez J., Querol A., Barrio E.: Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2534–2544 (2009)
- Blondin B., Dequin S., Querol A., Legras J.-L. Genome of *Saccharomyces cerevisiae* and related yeasts, in: H. Konig, G. Uuden, J. Frohlich (Eds.), *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, Springer Berlin Heidelberg, Heidelberg, Germany, 361–78 (2009)
- Borneman A.R., Desany B.A., Riches D., Affourtit J.P., Forgan A.H., Pretorius I.S., Egholm M., Chambers P.J.: Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **7**(2), e1001287. doi: 10.1371/journal.pgen.1001287 (2011a)
- Borneman A.R., Desany B.A., Riches D., Affourtit J.P., Forgan A.H., Pretorius I.S., Egholm M., Chambers P.J.: The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00773.x. (2011)
- Borneman A.R., Forgan A.H., Pretorius I.S., Chambers P.J.: Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* **8**, 1185–1195 (2008)
- Brown C., Murray A., Verstrepen K.: Rapid expansion and functional divergence of subtelomeric gene families in yeasts. *Curr. Biol.* **20**, 895–903 (2010)
- Callon C., Delbe's C., Duthoit F., Montel M.C.: Application of SSCP-PCR fingerprint to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* **29**, 172–180 (2006)
- Carreto L., Eiriz M.F., Gomes A.C., Pereira P.M., Schuller D., Santos M.A.S.: Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics*, **9**:524. doi: 10.1186/1471-2164-9-524 (2008)
- Carro D., Bartra E., Pina B.: Karyotype rearrangements in a wine yeast strain by rad52-dependent and rad52-independent mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2161–2165 (2003)
- Carro D., Garcia-Martinez J.E., Perez-Ortin B., Pina B.: Structural characterization of chromosome I size variants from a natural yeast strain. *Yeast*, **20**, 171–183 (2003)
- Casaregola S., Nguyen H.V., Lapathitis G., Kotyk A., Gaillardin C.: Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1607–1618 (2001)
- Codon A.C., Benitez T., Korhola M.: Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 154–163 (1998)
- Coton E., Coton M., Levert D., Casaregola S., Sohier D.: Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **108**, 130–135 (2006)
- Damon C., Vallon L., Zimmermann M., Haider V., Galeote S., Dequin P., Luis L. Fraissinet-Tachet, Marmeisse R.: A novel fungal family of oligopeptide transporters identified by functional metatranscriptomics of soil eukaryotes. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2011.67 (2011)
- de Barros Lopes M., Rainieri S., Henschke P. A., Langridge P.: AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 915–924 (1999)
- De Barros Lopes M., Bellon J.R., Shirley N.J., Ganter P.F.: Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res.* **1**(4) 323–331 (2002)
- Demuyter C., Lollier M., Legras J.-L., Le Jeune C.: Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1140–1148 (2004)
- Doniger S.W., Kim H.S., Swain D., Corcuera D., Williams M., Yang S-P., Fay J.C.: A catalog of neutral and deleterious polymorphism in yeast. *PLoS Genet.* **4**: e1000183. doi: 10.1371/journal.pgen.1000183. (2008)
- Dujon B.: Yeasts illustrate the molecular mechanisms of eukaryotic genome evolution. *Trends in Genetics*, **22**, 375–386 (2006)
- Dujon B.: Yeast evolutionary genomics. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 512–524 (2010)
- Dunham M.J., Badrane H., Ferea T., Adams J., Brown P.O., Rosenzweig F., Botstein D.: Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 16144–16149 (2002)
- Dunn B., Sherlock G.: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.* **18**, 1610–1623 (2008) Dunn B., Levine R.P., Sherlock G.: Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics*, **6**, 53. doi: 10.1186/1471-2164-6-53 (2005)
- Esberg A., Muller L.A., McCusker J.H.: Genomic structure of and genome-wide recombination in the *Saccharomyces cerevisiae* S288C progenitor isolate EM93. *PLoS ONE*, **6** (9): e25211. doi: 10.1371/journal.pone.0025211 (2011)
- Fernandez-Espinar M.T., Barrio E., Querol A.: Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, **20**, 1213–1226 (2003)
- Fidalgo M., Barrales R.R., JIbeas J.I., Jimenez J.: Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 11228–11233 (2006)

34. Fogel S., Welch J.W.: Tandem gene amplification mediates copper resistances in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 5342–5346 (1982)
35. Franco-Duarte R., Umek L., Zupan B., Schuller D.: Computational approaches for the genetic and phenotypic characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast collection. *Yeast*, 26: 675–692 (2009)
36. Galeote V., Novo M., Salema-Oom M., Brion C., Valerio E., Goncalves P., Dequin S.: FSY1, an horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain encodes a high affinity fructose/H<sup>+</sup>symporter, *Microbiology*, 156, 3754–3761 (2010)
37. Goddard M.R., Anfang N., Tang R., Gardner R.C., Jun C.: A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ. Microbiol.* 12, 63–73 (2010)
38. Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H. Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G.: Life with 60 000 genes. *Science*, 274: 546, 563–567 (1996)
39. Gonzalez S.S., Barrio E., Gafner J., Querol A.: Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations, *FEMS Yeast Res.* 6, 1221–1234 (2006)
40. Gonzalez S.S., Barrio E., Querol A.: Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2314–2320 (2008)
41. Goto-Yamamoto N., Kitano K., Shiki K., Yoshida Y., Suzuki T., Iwata T., et al.: SSU1-R, a sulfite resistance gene of wine yeast, is an allele of SSU1 with a different upstream sequence. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 427–433 (1998)
42. Guillaume C., Delobel P., Sablayrolles J.M., Blondin B.: Molecular basis of fructose utilization by the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a mutated *HXT3* allele enhances fructose fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2432–2439 (2007)
43. Hennequin C., Thierry A., Richard G.F., Lecoindre G., Nguyen H.V., Gaillardin C., Dujon B.: Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 551–559 (2001)
44. Homann O.R., Cai H., Becker J.M., Lindquist S.L.: Harnessing natural diversity to probe metabolic pathways. *PLoS Genet.* 1, e80. (2005)
45. Infante J.J., Dombek K.M., Rebordinos L., Cantoral J.M., Young E.T.: Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, 165, 1745–1759 (2003)
46. James T.C., Usher J., Campbell S., Bond U.: Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr. Genet.* 53, 39–152 (2008)
47. Kao K.C., Sherlock G.: Molecular characterization of clonal interference during adaptive evolution in asexual populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* 40, 1499–1504 (2008)
48. Kiehlbrandt M.C., Nilsson-Tillgren T., Gjermansen C., Holmberg S., Pedersen M.B.: Genetics of brewing yeasts, in: A.H. Rose, E. Wheals, J.S. Harrison (Eds.), *The yeasts*, Academic Press, London, 223–254 (1995)
49. Kreger van Rij N.J.W.: *The yeasts, a taxonomic study*, 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier Science Publisher, Amsterdam (1984)
50. Kurtzman C. P., Fell J. W.: *The yeasts, a taxonomic study*, 4<sup>th</sup> ed. Elsevier Science, Amsterdam (1998)
51. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Phylogenetic relationships among yeasts of the *Saccharomyces* complex determined from multi-gene sequence analyses. *FEMS Research*, 3, 417–432 (2003)
52. Kvittek D.J., Will J.L., Gasch A.P.: Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. *PLoS Genet.* 4: e1000223. doi: 10.1371/journal.pgen.1000223. (2008)
53. Le Jeune C., Lollier M., Demuyter C., Erny C., Legras J.L., Aigle M., Masneuf-Pomarede I.: Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, *FEMS Yeast Res.* 7, 540–549 (2007)
54. Legras J-L., Ruh O., Merdinoglu D., Karst F.: Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 73–83 (2005)
55. Libkind D., Hittinger C.T., Valerio E., Goncalves C., Dover J., Johnston M., Goncalves P., Sampaio J.P.: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 35, 14539–14544 (2011)
56. Liti G., Barton D.B.H., Louis E.J.: Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, 174, 839–850 (2006)
57. Liti G., Carter D.M., Moses A.M., Warringer J., Parts L., James S.A., Davey R.P., Roberts I.N., Burt A., Koufopanou V., et al.: Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature*, 458: 337–341 (2009)
58. Liti G., Peruffo A., James S.A., Roberts I.N., Louis E.J.: Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTRretrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 22, 177–192 (2005)
59. Lodder J.: *The yeasts, a taxonomic study*, 2<sup>nd</sup> ed. North Holland Publishing Company, Amsterdam (1970)
60. Lopandic K., Gangl H., Wallner E., Tschek G., Leitner G., Querol A., Borth N., Breitenbach M., Prillinger H., Tiefenbrunner W.: Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* 7, 953–965 (2007)
61. Manzano M., Medrala D., Giusto C., Bartolomeoli I., Urso R., Comi G.: Classical and molecular analyses to characterize commercial dry yeasts used in wine fermentation. *J. App. Microbiol.* 100, 3, 599–607 (2006)
62. McGover P.E., Zhang J., Tang Z., Zhang Z., Hall G.R., Moeau R.A., Nunez A., Butrym E.D., Richards M.P., Wang C.S., Cheng G., Zhao Z., Wang C.C.: Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 17593–17598 (2004)
63. Muller L.A.H., McCusker J.H.: A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 143–152 (2009a)
64. Muller L.A.H., McCusker J.H.: Microsatellite analysis of genetic diversity among clinical and nonclinical *Saccharomyces cerevisiae* isolates suggests heterozygote advantage in clinical environments. *Mol. Ecol.* 18, 2779–2786 (2009b)
65. Nakao Y., Kanamori T., Itoh T., Kodama Y., Rainieri S., Nakamura N., Shimonaga T., Hattori M., Ashikari T.: Genome sequencing of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res.* 16, 115–129 (2009)
66. Naumov G. I.: *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. *Microbiology*, 69, 338–342 (2000)
67. Naumov G.I., Naumova E.S., Pomarede I.: Genetic Identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus* Wang. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 1–7 (2010)
68. Novo M., Bigey F., Beyne E., Galeote V., Gavory F., Mallet S., Cambona B., Legras J-L., Wincker P., Casaregola S. i in. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 16333–16338 (2009)

69. Perez-Ortín J.E., García-Martínez J., Alberola T.M.: DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* **98**, 227–241 (2002)
70. Perez-Ortín J.E., Querol A., Puig S., Barrio E.: Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* **12**, 1533–1539 (2002)
71. Pretorius I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, **15**, 16(8): 675–729 (2000)
72. Pulvirenti A., Nguyen H-V., Caggia C., Giudici P., Rainieri S., Zambonelli C.: *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 191–196 (2000)
73. Querol A., Bond U.: The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 1–10 (2009)
74. Rainieri S., Kodama Y., Kaneko Y., Mikata K., Nakao Y., Ashikari T.: Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3968–3974 (2006)
75. Rainieri S., Pretorius I.S.: Selection and improvement of wine yeasts. *Ann. Microbiol.* **50**, 15–31 (2000)
76. Rainieri S., Zambonelli C., Kaneko Y.: *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, Genetic Diversity and Evolution. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 1–9 (2003)
77. Richard G.-F., Dujon B.: Molecular evolution of minisatellites in hemiascomycetous yeasts. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 189–202 (2006)
78. Richards K.D., Goddard M.R., Gardner R.C.: A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **96**, 355–359 (2009)
79. Rolland T., Dujon B., Richard G.-F.: Dynamic evolution of megasatellites in yeasts. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4731–4739 (2010)
80. Schacherer J., Shapiro J.A., Ruderfer D.M., Kruglyak L.: Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **458**, 342–345 (2009)
81. Soltsova A., Spirek M., Horvsath A., Sulo P.: Mitochondria – tool for taxonomic identification of yeasts from *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Microbiol. (Praha)*, **45**(2) 99–106 (2000)
82. Stambuk B.U., Dunn B., Alves S.L., Duval E.H., Sherlock G.: Industrial fuel ethanol yeasts contain adaptive copy number changes in genes involved in vitamin B1 and B6 biosynthesis. *Genome Res.* **19**, 2271–2278 (2009)
83. Suárez Valles B., Pando Bedriñana R.: A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **103**, 4, 778–786 (2007)
84. Tornai-Lehoczki J., Dlauchy D.: An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes. *Lett. Appl. Microbiol.* **23** (4) 227–230 (1996)
85. van der Walt J.P.: Genus *Saccharomyces* Meyen emend. Rees, 555–718. in Lodder J. (ed.), *The yeasts, a taxonomic study*, 2<sup>nd</sup> ed. North Holland Publ. Co., Amsterdam (1970)
86. Vaughan-Martini A., Kurtzman C.P.: Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu Stricto*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **35**, 508–511 (1985)
87. Vaughan-Martini A., Martini A.: Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol.* **14**, 514–522 (1995)
88. Verstrepen K.J., Reynolds T.B., Fink G.R.: Origins of variation in the fungal cell surface (Review) *Nature Rev. Microbiol.* **2**, 7, 533–540 (2004)
89. Vigentini I., Fracassetti D., Picozzi C., Foschino R.: Polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in wine production. *Curr. Microbiol.* **58**, 211–218 (2009)
90. Wei W., I 20 innych Steinmetz L.M.: Genome sequencing and comparative analysis of *Saccharomyces cerevisiae* strain YJM789. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 12825–12830 (2007)
91. Wenger J.W., Schwartz K. Sherlock G.: Bulk segregant analysis by high throughput sequencing reveals a novel xylose utilization gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **6** e1000942. (2010)
92. Wiens F., Zitzmann A., Lachance M.A., Yegles M.M., Pragst F., Wurst F.M. Spanagel R.: Chronic intake of fermented floral nectar by wild treesrews. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10426–10431 (2008)
93. Winzeler E.A., Castillo-Davis C.I., Oshiro G., Liang D., Richards D.R., Zhou Y., Hartl D.L.: Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics*, **163**, 79–89 (2003)
94. Yamagishi H., Ogata T.: Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 341–353 (1999)
95. Wolfe K.H., Shields D.C.: Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, **12**, 387, (6634): 708–713 (1997)
96. Wong S, Wolfe K.H.: Birth of a metabolic gene cluster in yeast by adaptive gene relocation. *Nat. Genet.* **37** (7), 777–782 (2005)
97. Zohary D., Hopf M.: *Domestication of plants in the old world*, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford Univ. Press, New York, 151–159 (2000)