

Horizontal transfer of genetic materials in *Saccharomyces* promoted by animals

**P. GIUDICI¹, A. PULVIRENTI¹,
A. TODARO², C. ZAMBONELLI³**

1) Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,
Via Kennedy, 17, 42100 Reggio Emilia, Italy.

2) Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Modena e Reggio
Emilia, Via Campi, 213/d, 41100 Modena, Italy.

3) Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare (DIPROVAL),
Università degli Studi di Bologna, Villa Levi, Via Fratelli Rosselli, 107,
42100 Reggio Emilia, Italy.

KEY WORDS : Wine, must, yeast strains, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation.

ABSTRACT

*The objective of this study was to verify whether animals promoted the formation of new yeast strains by increasing the probability of encounters between otherwise separated spores. This study was carried out on three invertebrates, marine fresh water and territorial ecosystems were nourished with two different foods composed of one or several spore yeast strains and digested matter was analyzed as an index. The results revealed that the digestive apparatus of the tested species was capable of breaking the "asci" cell wall (as do enzymes) produced by species belonging to the *Saccharomyces* genus without affecting the enclosed spore vitality. Under favorable conditions, the spores evacuated in fecal matter have a high agglutination capacity. They can germinate directly or can combine to form hybrids. Hybrids between strains of the same species give rise to cultures for which the parent characteristics present a new combination. Interspecific hybrids *S. cerevisiae* x *S. uvarum* obtained by the same procedure and although they are sterile can propagate by asexual reproduction. These results support the hypothesis of horizontal transfer of genetic materials between yeast species and the probability of forming hybrids in natural environment and provides doubts on the great diversity of yeasts already observed in nature. (Bulletin O.I.V., 2002, vol. 75, n° 857-858, pp. 484-500).*

Transferts horizontaux de matières génétiques dans *Saccharomyces* favorisés par les animaux

**P. GIUDICI¹, A. PULVIRENTI¹,
A. TODARO², C. ZAMBONELLI³**

1) Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,
Via Kennedy, 17, 42100 Reggio Emilia, Italie.

2) Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia,
Via Campi, 213/d, 41100 Modena, Italie.

3) Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare (DIPROVAL),
Università degli Studi di Bologna, Villa Levi, Via Fratelli Rosselli, 107,
42100 Reggio Emilia, Italie.

Mots Clés : Vin, moût, souches de levures, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation.

RÉSUMÉ

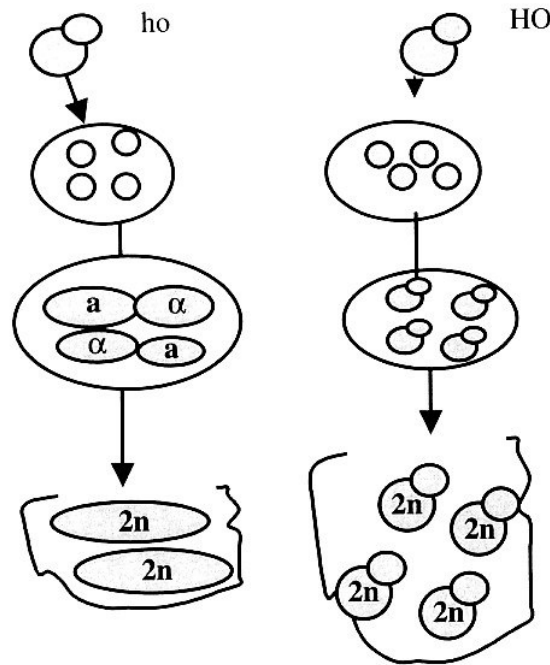
Dans le but de vérifier si les animaux peuvent favoriser la formation de nouvelles souches de levures en augmentant les chances de rencontres entre des spores autrement séparés, trois espèces d'invertébrés marins, d'eau douce et des écosystèmes terrestres ont été nourris avec deux alimentations différentes composées d'une ou de plusieurs souches de levures en état de sporification. Les matières digérées ont été analysées comme indice. Les résultats indiquent que l'appareil digestif des espèces testées est capable de casser la paroi de l'«asci» (comme le feraient des enzymes) produites chez des espèces appartenant au groupe des *Saccharomyces* sans affecter la vitalité des spores qu'elles renferment. Les spores évacués par les matières fécales ont, dans des conditions favorables, une forte capacité d'agglutination. Ils peuvent germer directement ou combiner à des formes d'hybrides. Les hybrides entre souches de même espèce donnent lieu à des cultures dans lesquelles les caractéristiques parent ont une nouvelle combinaison. Les hybrides interspécifiques *S. cerevisiae* x *S. uvarum* obtenus par le même procédé et bien que stériles peuvent se propager par reproduction asexuée. Ces résultats appuient l'hypothèse de transferts horizontaux de matières génétiques entre les espèces de levures et la probabilité de formation d'hybrides dans des milieux naturels, et jette un doute dans la grande diversité des levures déjà observées dans la nature. (*Bulletin O.I.V.*, 2002, vol. 75, n° 857-858, pp. 484-500).

INTRODUCTION

Variation in the genetic frequencies within a population or genetic drift result from the combined result of different factors: size of the population, type of mating, geographical distribution of the individuals, mutation, migration and natural selection (Hardy-Weinberg equilibrium model). Any obstacle to the free recombination of the genes in a population can contribute to the formation of new species. In yeasts that belong to the *Saccharomyces* genus, and in particular *S. cerevisiae*, the free recombination of genes is limited by the fact that this species has persistent asci (Kriejen-van Rij, 1984) and germination and conjugation of the spores occur inside the intact asci.

FIGURE 1

The life cycle of hetherothallic and homothallic strains of *Saccharomyces cerevisiae*

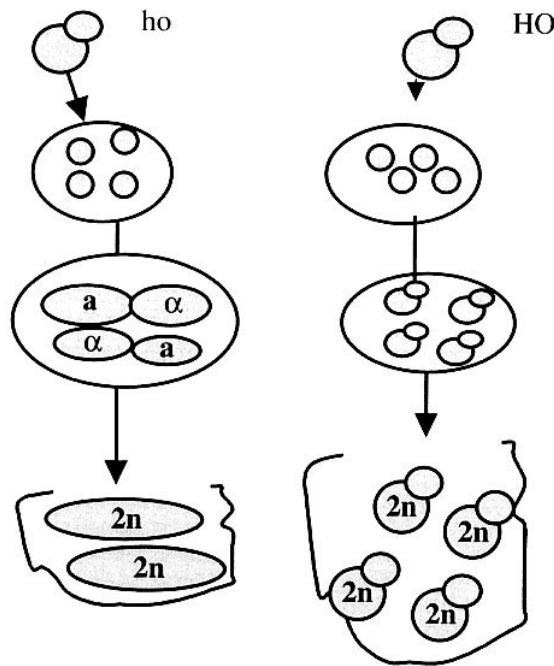


The majority of wild strains are homothallic (HO) (Thornton and Eschenbruch, 1976; Thornton, 1985; Giudici, 1998) and so interconversion of the sexual type allows conjugation between the mother and daughter cells, and the restoration of the diploid state gives rise to homozygote descendents for all the genes except for the mating type locus (fig. 2). Conjugation between

INTRODUCTION

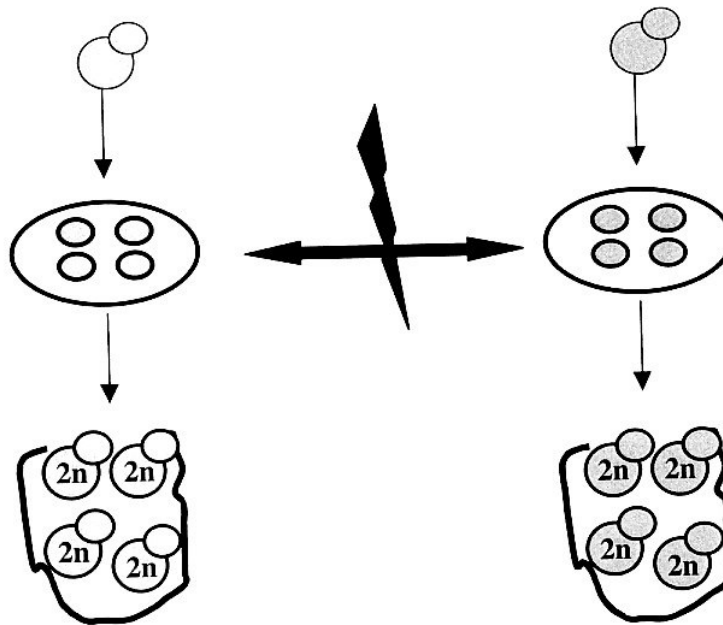
La variation des fréquences génétiques au sein d'une population ou d'une dérive génétique provient de la combinaison de divers facteurs : taille des populations, type d'accouplement, répartition géographique des individus, mutation, migration et sélection naturelle (équilibre de Hardy-Weinberg). Tout obstacle à la libre recombinaison des gènes au sein d'une population peut contribuer à l'apparition de nouvelles espèces. Dans les levures qui appartiennent au genre *Saccharomyces*, et en particulier la levure *S. cerevisiae*, la libre recombinaison des gènes est limitée par le fait que cette espèce possède un asque persistant (Kriejen-van Rij, 1984) et que la germination et la conjugaison des spores a lieu à l'intérieur de l'asque intact.

FIGURE 1
Cycle de vie des souches hétérothalliques et homothalliques
de la levure *Saccharomyces cerevisiae*



La majorité des souches sauvages sont homothalliques (HO) (Thornton et Eschenbruch, 1976; Thornton, 1985; Giudici, 1998). Ainsi, l'interconversion du type sexuel permet la conjugaison entre les cellules mères et les cellules filles et la restitution de l'état diploïde donne lieu à des descendants homozygotes pour tous les gènes sauf pour le locus de la reproduction (fig. 2).

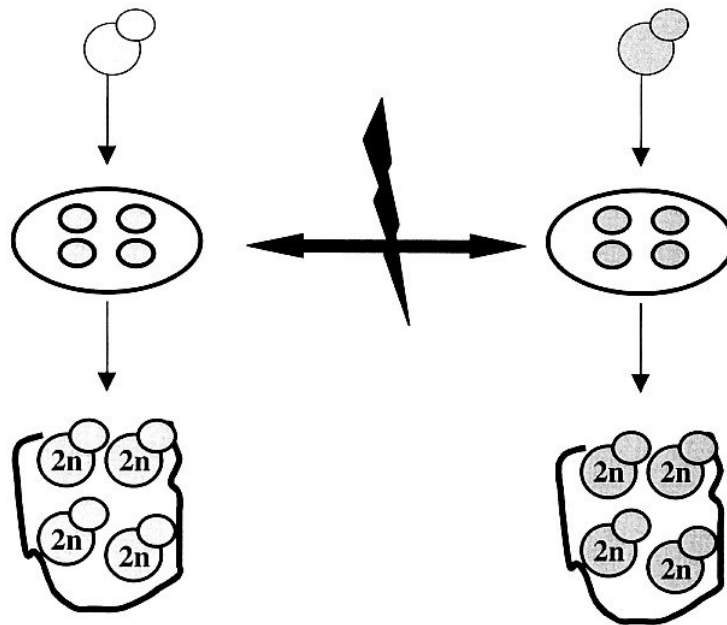
FIGURE 2
Homothallic strain with persistent asci



perfectly identical gametes has been indicated by Mortimer as the main factor responsible for genomic renewal and for the formation of strains with new characteristics (Mortimer, 2000).

In summary, *S. cerevisiae* is made up of overall homothallic strains which have persistent asci with spore germination before their release, and consequently the free recombination of genes of the population is limited in this species. In effect, one can often see yeast strains belonging to *S. cerevisiae* that present genotypical and phenotypic characteristics that do not perfectly correspond to the average characteristics of the species, thus demonstrating considerable biodiversity. On the basis of the electrophoretic karyotype, a number of authors have demonstrated the high level of polymorphism in the *S. cerevisiae* species. In general, the electrophoretic profiles of the *S. cerevisiae* strains obtained under standard conditions can have from 14 to 16 different molecular weight bands, with a significant variability in the low and high molecular weight areas. These differences support the hypothesis of a high genetic drift within the species. To support this thesis, the karyotypes of the randomly selected strains of fermenting musts are shown in fig. 3.

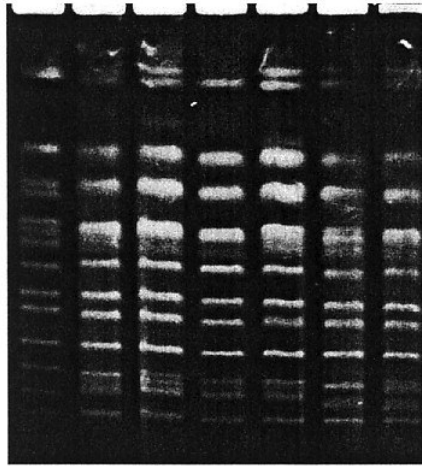
FIGURE 2
Souche homothallique avec asque persistant



Mortimer a montré que la conjugaison entre des gamètes parfaitement identiques était le principal facteur responsable du renouvellement génomique et de la formation de souches ayant de nouvelles caractéristiques (Mortimer, 2000).

En résumé, la *S. cerevisiae* est constituée de souches homothaliques complètes comportant des asques persistants avec une germination de spores avant leur libération. De ce fait, la libre recombinaison des gènes de la population est limitée dans cette espèce. En réalité, il n'est pas rare de trouver des souches de levure appartenant à *S. cerevisiae* présentant des caractéristiques génotypiques et phénotypiques qui ne correspondent pas tout à fait aux caractéristiques moyennes de l'espèce. Ceci témoigne de la grande biodiversité qui existe. En se basant sur les électrocaryotypes, de nombreux scientifiques ont montré le niveau élevé de polymorphismes dans l'espèce *S. cerevisiae*. Généralement, les profils électrophorétiques des souches de *S. cerevisiae* obtenus dans des conditions normalisées peuvent avoir de 14 à 16 bandes de poids moléculaires différentes, avec une variabilité significative dans les zones de poids moléculaires élevés et faibles. Ces différences soutiennent l'hypothèse d'une dérive génétique importante au sein de l'espèce. Pour étayer cette hypothèse, la figure 3 présente des caryotypes de souches sélectionnées au hasard venant de moûts en fermentation.

FIGURE 3
Karyotypes of the strains isolated in fermenting musts

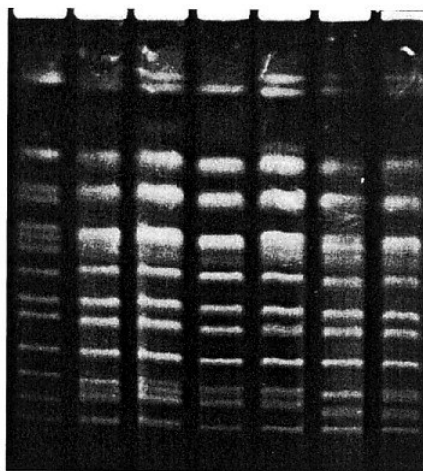


Although the number of strains examined is limited with respect to the universe of strains in existence, it should be noted that despite the high level of polymorphism within the *S. cerevisiae* species, the number of species currently known and phylogenetically correlated to *S. cerevisiae* is not such as to support a high genetic drift. There are two possible hypotheses that can explain this apparent contradiction:

- 1) It is probable that most or almost all yeast cells die as a consequence of natural events such as the seasons or lack of nourishment and consequent extinction of potential new genetic lines. The recolonization of the niches can be mediated by animals that come into contact with niches, even if physically remote. In summary, we can assume that the niches that allow the growth of yeasts (flowers, fruit and the natural environments where yeasts live) are cyclically recolonized by yeasts that have not necessarily survived within the same environment.
- 2) There is a free recombination of genes within a population of homothallic yeasts with persistent asci.

The first hypothesis is highly indicative and supported by the data of Mortimer and Polsinelli (1999) which reported different animals spread yeast from different habitat. The second hypothesis is in part supported by the traceability of the yeast strains which, on the basis of their phenotypical and molecular characteristics are to be considered natural hybrids between strains belonging to different species of the *Saccharomyces* genus (Masneuf et al.,

FIGURE 3
Caryotypes de souches isolées dans des moûts en fermentation



Bien que le nombre de souches examinées soit limité par rapport à toutes les souches qui existent, il ne faut pas oublier que malgré le niveau élevé de polymorphismes au sein de l'espèce *S. cerevisiae*, le nombre d'espèces actuellement connues et phylogénétiquement associées à *S. cerevisiae* n'est pas en mesure de supporter une forte dérive génétique. Deux hypothèses peuvent expliquer cette apparente contradiction :

- 1) Il est probable que la plupart, voire quasiment toutes les cellules de levure, meurent à la suite d'événements naturels comme les saisons, le manque de nourriture et l'extinction consécutive de nouvelles lignées génétiques potentielles. La recolonisation des niches peut se faire par l'intermédiaire des animaux qui entrent en contact avec ces niches, même s'ils sont physiquement éloignés. En bref, nous pouvons supposer que les niches qui permettent la croissance des levures (fleurs, fruits et environnements naturels dans lesquels vivent les levures) sont recolonisées de manière cyclique par les levures qui n'ont pas nécessairement survécu au sein du même environnement.
- 2) Il existe une libre recombinaison des gènes au sein d'une population de levures homothaliques avec asques persistants.

La première hypothèse est hautement indicative et est soutenue par les données obtenues par Mortimer et Polsinelli (1999), qui signalent que divers animaux disséminent des levures venant de différents habitats. La seconde hypothèse est soutenue en partie par la traçabilité des souches de levure qui au vu de leurs caractéristiques phénotypiques et moléculaires peuvent être considérées comme des hybrides naturels de souches appartenant à

1998). Nevertheless, there are no explanations or hypotheses on the way of conjugation. We believe (Pulvirenti et al., 2002, submitted for publication) that animals that feed on yeasts can in some way be responsible for recombination within a same species or even between individuals belonging to different species.

Different animals are able to digest asci and to release spores that are still able to germinate. Following are photographs (figs. 4 a, b and c) of a number of species that are representative of different ecological niches and which feed on yeasts. Our studies have demonstrated that the intestines of these beings are capable of breaking the asci and releasing the still vital spores with the faeces (fig. 5).

FIGURE 4a
Tigriopus fulvus

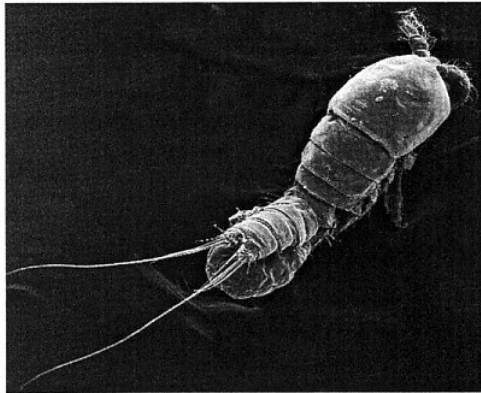
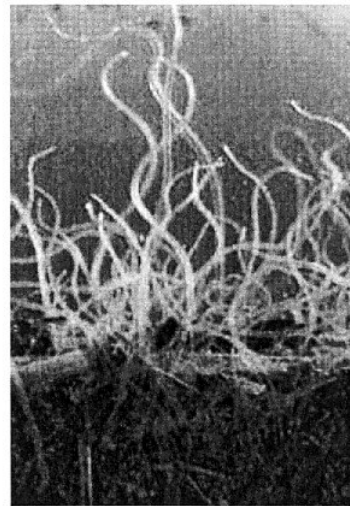
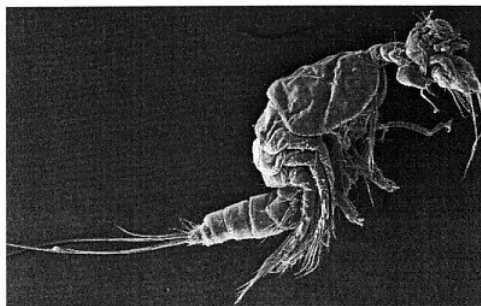


FIGURE 4b
Tubifex tubifex



différentes espèces du genre des *Saccharomyces* (Masneuf *et al.*, 1998). Cependant, aucune explication ni hypothèse n'a été faite sur la conjugaison. Nous pensons (Pulvirenti *et al.*, 2002, donné à publier) que les animaux qui ingèrent des levures peuvent être d'une certaine façon responsables de la recombinaison au sein d'une même espèce ou même entre des individus appartenant à des espèces différentes.

Certains animaux peuvent digérer des asques et libérer des spores encore capables de germer. Les photographies ci-dessous (*figures 4 a, b et c*) montrent certaines espèces qui sont représentatives de différentes niches écologiques et qui ingèrent des levures. Nos études ont montré que les intestins de ces êtres sont capables de casser les asques et de libérer les spores encore viables dans les matières fécales (*figure 5*).

FIGURE 4a
Tigriopus fulvus

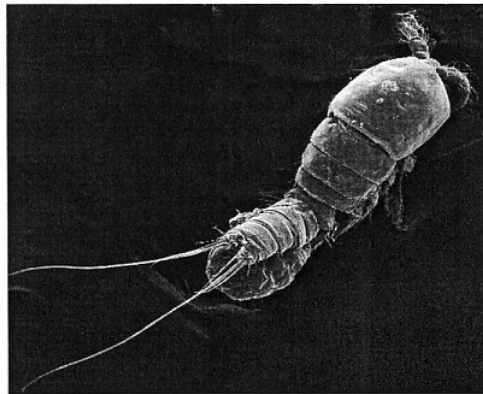


FIGURE 4b
Tubifex tubifex

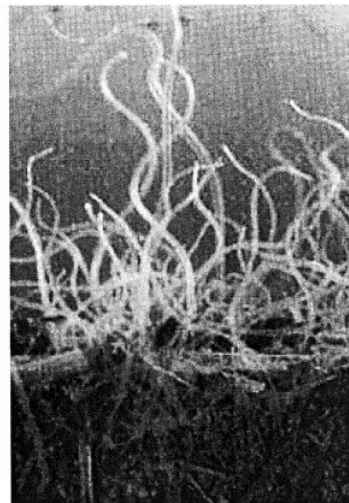
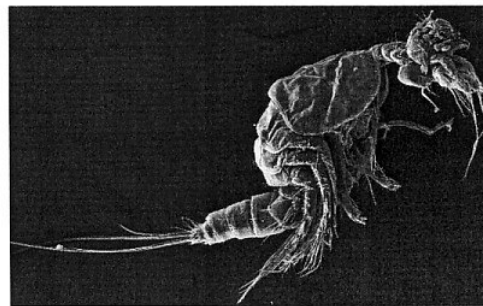


FIGURE 4C
Drosophila melanogaster

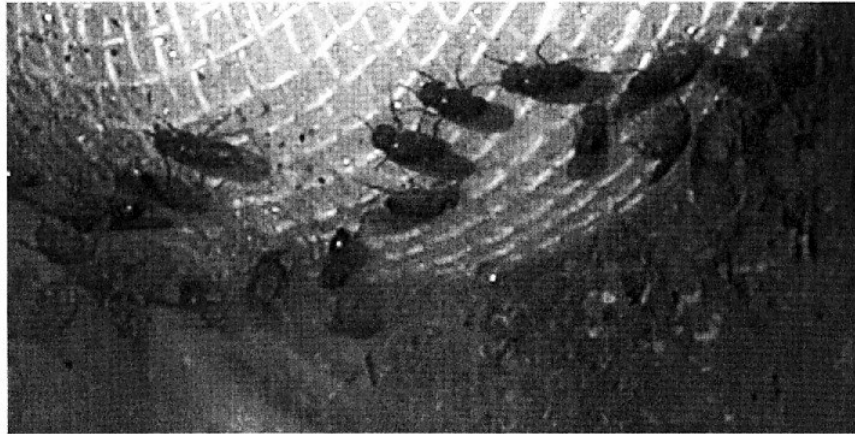
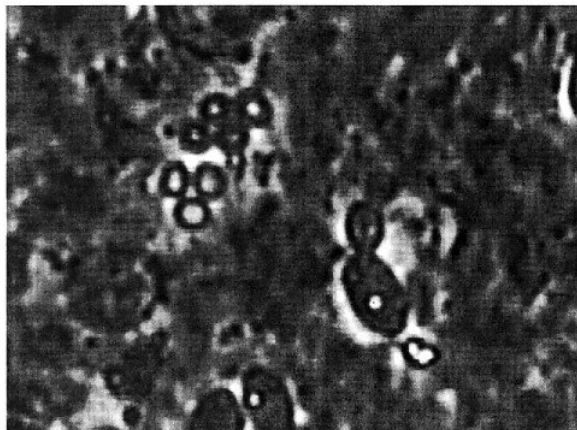


FIGURE 5
Microscopic observation of faecal pellets

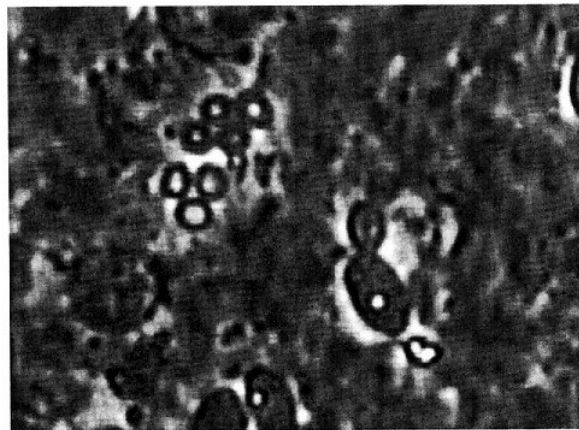


*Inocula of faeces obtained from animals fed with yeast asci originated colonies that according to their phenotypic characteristics resulted as derived from cultures from a single spore. More thorough analyses made after feeding the animals with asci with two strains, one *S. cerevisiae* and one *S. uvarum*, allowed us to isolate strains that resulted as being interspecific hybrids. Demonstration of the effective conjugation is given both by the RFLP of the ITS regions and by the analysis of the karyotype.*

FIGURE 4C
Drosophila melanogaster



FIGURE 5
Observation microscopique de boulettes fécales



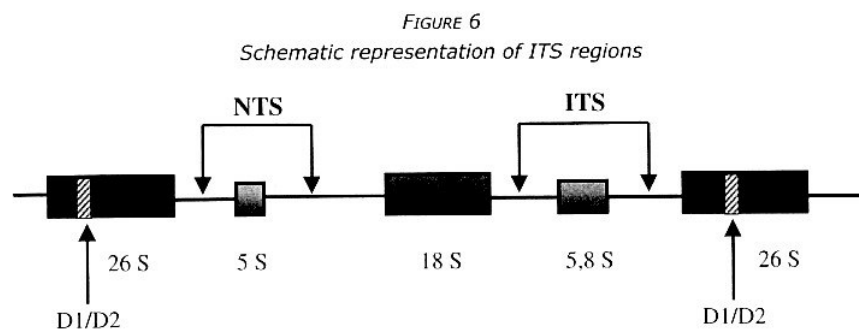
Des inoculats de matières fécales obtenus à partir d'animaux ayant ingéré des asques de levure ont donné naissance à des colonies qui selon leurs caractéristiques phénotypiques ont pu être considérées comme résultant des dérivés de cultures venant d'un seul spore. Des analyses plus approfondies menées après avoir nourri les animaux avec des asques de deux souches, l'une de *S. cerevisiae* et l'autre de *S. uvarum*, nous ont permis d'isoler les souches qui se sont avérées être des hybrides interspécifiques. La méthode RFLP des régions ITS ainsi que les analyses des caryotypes ont pu démontrer cette réelle conjugaison.

The PCR/RFLP of the ITS regions (fig. 6) using restriction enzyme *Hae* III with a high capacity of discrimination among strains belonging to the *S. cerevisiae* and *S. uvarum* species and giving rise to a banding pattern of four fragments corresponding to 320, 220, 180 and 145 bp in the former species and a profile of three fragments (500, 220 and 145 bp) in the latter. In the hybrid, the restriction profile (number and size of bands) is the result of a combination of the two parents. The hybrids has a profile that is perfectly additional to the parental profile, with 5 bands of 500, 320, 220, 180 and 145 pb, as shown in fig. 7.

Further confirmation was obtained via electrophoresis in the pulsed field, using the demonstrated hypothesis (Giudici *et al.*, 1998) that the interspecific hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* group originate an additional profile that comprise the sum of the karyotype of both parents. The karyotypes of the parents and of the isolate confirm the full conjugation between the spores of the two species released by the respective asci via the intervention of the intestinal enzymes of the organisms used (Fig. 8).

What has been illustrated demonstrates that genetic exchanges between different species can occur in nature and limits the hypothesis of the genetic drift between species of yeasts that belong to the *Saccharomyces* genus.

The implications of this demonstration go beyond the intention of the experiment and provide a moment of reflection on the subject of the emission of yeasts modified with heterologous genes in the environment, since there exists the possibility of the transfer of genetic material even between yeasts of different species.



La technique PCR/RFLP des régions ITS (*figure 6*) qui utilise l'enzyme de restriction Hae III possédant une grande capacité de discrimination parmi les souches des espèces *S. cerevisiae* et *S. uvarum* forme un diagramme de bandes de quatre fragments correspondant à 320, 220, 180 et 145 bp pour les premières espèces et un profil de trois fragments (500, 220 et 145 bp) pour les autres. Dans l'hybride, le profil de restriction (nombre et taille des bandes) est en réalité le résultat d'une combinaison entre les deux parents. Les hybrides présentent un profil parfaitement complémentaire avec le profil des souches parentes, avec 5 bandes de 500, 320, 220, 180 et 145 pb, comme on le voit à la *figure 7*.

L'électrophorèse en champs pulsés a confirmé plus avant ces constatations en utilisant l'hypothèse démontrée (Giudici *et al.*, 1998) que les hybrides interspécifiques au sein du groupe *Saccharomyces stricto sensu* donnent naissance à un nouveau profil, constitué de la somme des caryotypes des deux parents. Les caryotypes des parents et des isolats corroborent la conjugaison totale entre les spores des deux espèces libérés par les asques respectifs via l'intervention des enzymes intestinales des organismes utilisés (*figure 8*).

Les illustrations montrent ainsi que les échanges génétiques entre les différentes espèces peuvent se dérouler dans la nature et elles modèrent l'hypothèse des dérives génétiques entre les espèces de levure qui appartiennent au genre des *Saccharomyces*.

Les implications de cette démonstration vont bien au-delà de ce que cette expérience visait à montrer et offrent un moment de réflexion sur le thème des émissions de levures modifiées avec des gènes hétérologues dans l'environnement, dans la mesure où des possibilités de transfert de matériel génétique existent même entre des levures d'espèces différentes.

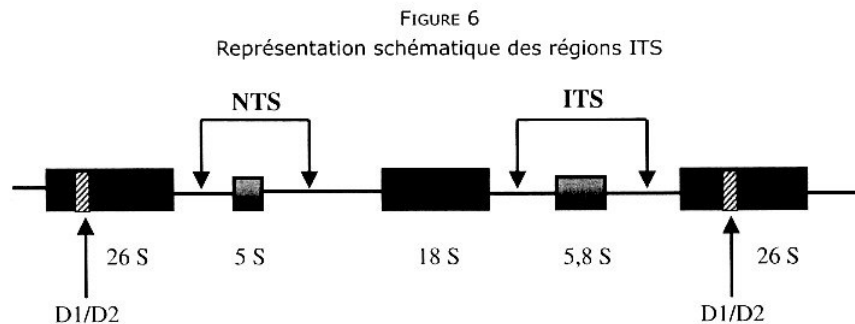


FIGURE 7
RFLP of the ITS regions
with HaeIII restriction enzymes

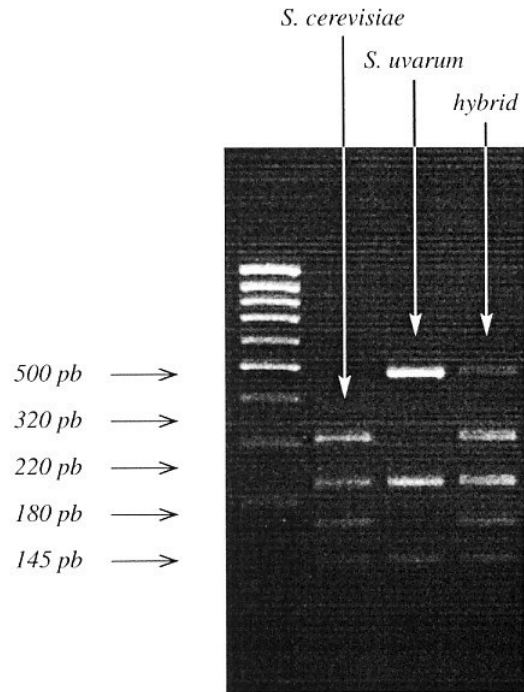


FIGURE 8
Pulsed field gel
electrophoresis (PFGE)
banding patterns
of chromosomal DNA
of hybrids and
their parental strains

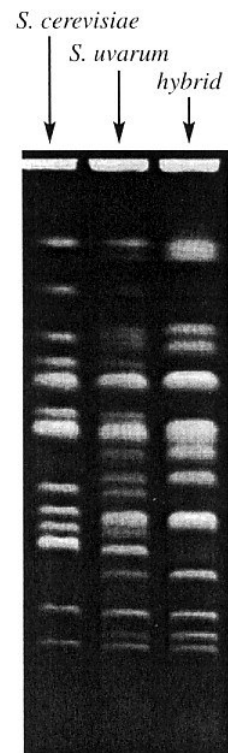


FIGURE 7
Technique RFLP des régions ITS avec des enzymes
de restriction *HaeIII*

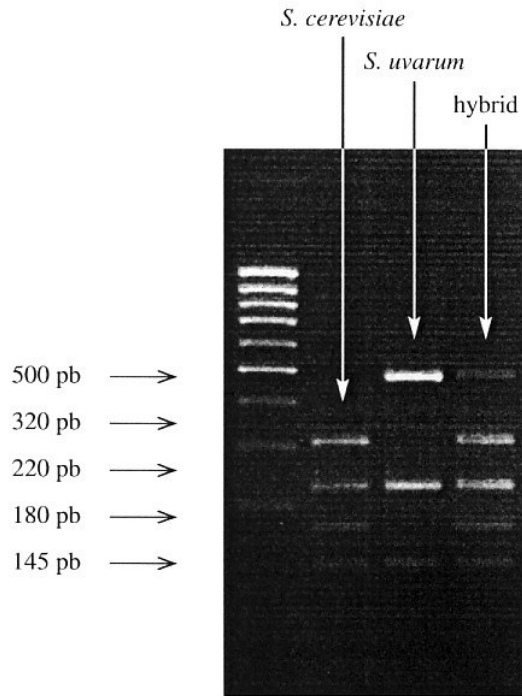
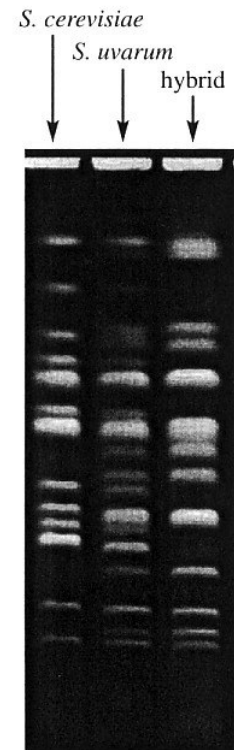


FIGURE 8
Diagramme de bandes
d'ADN chromosomique
d'hybrides et de leurs
souches parentes par
électrophorèse en
champs pulsés (PFGE)



BIBLIOGRAPHIE

- GIUDICI (P.), CAGGIA (C.), PULVIRENTI (A.), ZAMBONELLI (C.), RAINIERI (S.), 1998. – Electrophoretic profile of hybrids between cryotolerant and non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **27**, 31-34.
- KRIEJEN-VAN RIJ (N. J. W.), 1984. – The Yeast – a taxonomic study, 3rd ed., Elsev. Sci. Pub., Amsterdam.
- MARINONI (G.), MANUEL (M.), PETERSEN (R. F.), HVIDTFELDT (J.), SULO (P.), PISKUR (J.), 1999. – Horizontal transfer of genetic material among *Saccharomyces* yeasts, *J. Bact.* **181**: 6488-6496.
- MASNEUF (I.), HANSEN (J.), GROTH (C.), PISKUR (J.), DUBOURDIEU (D.), 1998. – New Hybrids between *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3887-3892.
- MORTIMER (R. K.), 2000. – Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome, *Genome Research.* **10**, 403-409.
- MORTIMER (R.), POLSINELLI (M.), 1999. – On the origins of wine yeasts. *Res. Microbiol.* **150**, 199-204.
- PULVIRENTI (A.), ZAMBONELLI (C.), TODARO (A.), GIUDICI (P.) – Origin of Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* and its Interspecific hybrids. Submitted for publication.
- THORNTON (R.J.), 1985. – The introduction of flocculation into a homothallic wine yeast. A practical example of the modification of wine-making properties by the use of genetic techniques. *Am. J. Enol. Vitic.* **36**, 47.
- THORNTON (R.J.), ESCHENBRUCH (R.), 1976. – Homotallism in wine yeast. A. van Leeuwenhoek, **42**, 503.
-