

Sekvenace genomu spodní pivovarské kvasinky

Sequencing The Genome of Bottom Brewer's Yeast

Pavel DOSTÁLEK¹, Jan KVASNIČKA², Rudolf CEJNAR¹, Jaroslav VOHANKA³, Martin MOKREJŠ², Jaroslava HÁJKOVÁ², Petra BOBČÍKOVÁ², Tomáš BRÁNYIK¹, Karel MELZUCH¹, Karel SEDLÁŘ⁴

¹Ústav biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, Praha 6, 166 28 / Department of Biotechnology, Institute of Chemical Technology Prague, Technická 5, Praha 6, CZ 166 28

²Trombotické centrum a Centrální hematologické laboratoře, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. Lékařská fakulta UK Praha / Thrombotic Centre and the Central Haematological Laboratory; Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, General Faculty Hospital and the 1st Medical Faculty of Charles University in Prague

⁴Ústav biomedicínského inženýrství, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, Technická 12, 616 00 Brno / Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical Engineering and Communication, Brno University of Technology, Technická 12, CZ-616 00 Brno

e-mail: dostalekp@vscht.cz

recenzovaný článek / reviewed paper

Dostálek, P. – Kvasnička, J. – Cejnar, R. – Vohanka, J. – Mokrejš, M. – Hájková, J. – Bobčíková, P. – Brányik, T. – Melzoch, K. – Sedlář, K.: Sekvenace genomu spodní pivovarské kvasinky. Kvasny Prum. 59, 2013, č. 10–11, s. 313–316

Saccharomyces pastorianus CCY48-91 je kmen pivovarské spodní kvasinky, která je hojně používána v českém pivovarství. Hlavním cílem práce bylo sekvenovat genom této kvasinky a učinit ho dostupným pro širokou vědeckou veřejnost. Data byla zpřístupněna hlavně z důvodu, že neexistuje mnoho průmyslových kmenů kvasinek, jejichž genom by byl znám a byl dostupný.

Dostálek, P. – Kvasnička, J. – Cejnar, R. – Vohanka, J. – Mokrejš, M. – Hájková, J. – Bobčíková, P. – Brányik, T. – Melzoch, K. – Sedlář, K.: Sequencing the genome of bottom brewer's yeast. Kvasny Prum. 59, 2013, No. 10–11, p. 313–316

Saccharomyces pastorianus CCY48-91 is a strain of bottom-fermenting brewing yeast most commonly used in Czech brewing. The main goal of this study is to sequence its genome and make this assembly publicly available. Because there are not many industrial yeast strains that have been sequenced, this data could be of value to other researchers.

Dostálek, P. – Kvasnička, J. – Cejnar, R. – Vohanka, J. – Mokrejš, M. – Hájková, J. – Bobčíková, P. – Brányik, T. – Melzoch, K. – Sedlář, K.: Sequenzierung des Genoms der Boden Bierhefe. Kvasny Prum. 59, 2013, Nr. 10–11, S. 313–316

Saccharomyces pastorianus CCY48-91 ist ein Stamm der Boden Bierhefe, die oft in den tschechischen Brauereien angewandt ist. Der Hauptziel der Arbeit war die Sequenzierung des Genoms dieser Hefe und ihre Bereitstellung für die allgemeine wissenschaftliche Gemeinschaft. Die Zugänglichmachung wurde aus dem Grund durchgeführt, daß Genom dieser Hefe bekannt und zugänglich ist, weil existieren viele industrielle Hefestämme und ihr Genom nicht bekannt ist.

Klíčová slova: genom, kvasinka, *Saccharomyces pastorianus*

Keywords: genome, yeast, *Saccharomyces pastorianus*

1 ÚVOD

Pivovarské kvasinky se dělí do dvou skupin: na svrchně kvasící kmeny, používané pro výrobu piva typu ležák. Obě skupiny se řadí do druhu *Saccharomyces*. Kmeny spodních kvasinek a svrchních kvasinek se však vzájemně liší fyziologickými a genetickými vlastnostmi a jedná se tedy o dva rozdílné druhy rodu *Saccharomyces*. Svrchní kvasinky jsou geneticky blízké rodu *Saccharomyces cerevisiae*, zatímco spodní kvasinky tvoří heterogenní druh a jsou jedním z nejlepších příkladů přirozených hybridů kvasinek (Saerens et al., 2010).

Kvůli jejich odlišnosti od svrchních kvasinek byly spodní kvasinky Hansenem nazvány *Saccharomyces carlsbergensis* (Saerens et al., 2010). Později byly spodní kvasinky zařazeny do rodu *Saccharomyces pastorianus* (Martini a Martini, 1987). Studie založené na hybridizaci dvou molekul DNA ukázaly, že *S. pastorianus* obsahuje dva typy chromozomů, které byly označeny jako *S. cerevisiae*-typ a *S. bayanus*-typ (Tamai et al., 1998; Yamagishi a Ogata, 1999). Jak bylo u mezidruhového hybridu předpokládáno, byly u *S. pastorianus* nalezeny dva rozdílné ortology u téměř všech testovaných genů. Jednotlivé geny spodních kvasinek byly skutečně velmi podobné buď genům *S. cerevisiae* nebo *S. bayanus* (Borsting et al., 1997; Casaregola et al., 2001; Fujii et al., 1996; Hansen Jorgen et al., 1994; Hansen Joergen a Kielland-Brandt, 1994; Kodama et al., 2001; Tamai et al., 2000; Yamagishi a Ogata, 1999). Přítomnost dvou typů genomu ve spodních kvasinkách byla též potvrzena analýzou proteomu (Joubert et al., 2000) a metodou RAPD – random amplified polymorphic DNA (Fernandez-Espinar et al., 2003). Přítomnost genomu druhu *S. bayanus*, který je znám svou vyšší tolerancí k chladu než druh *S. cerevisiae*, mohla vést ke schopnosti druhu *S. pastorianus* kvasit při nízkých teplotách (Saerens et al., 2010).

Kromě toho mohou některé izoláty spodních kvasinek obsahovat i různé kombinace genomů druhů blízké příbuzných skupině *S. cerevisiae* sensu stricto a nemusí se nutně jednat pouze o *S. cerevisiae*

1 INTRODUCTION

Brewing yeasts are divided into two groups: top-fermenting yeasts, used for producing ale, and bottom-fermenting yeasts, used for producing lager beer. Both of them belong to the genus *Saccharomyces*. However, ale and lager yeast strains have different physiological and genetic properties, suggesting that they belong to two different *Saccharomyces* species. Top-fermenting yeasts are closely related to *Saccharomyces cerevisiae*, while lager strains form a heterogeneous species and are one of the best examples of natural hybrid yeasts (Saerens et al., 2010).

Because of its difference from the ale yeast strains, Hansen named the bottom-fermenting yeast *Saccharomyces carlsbergensis* (Saerens et al., 2010). The lager brewer's yeast was later included into the species *Saccharomyces pastorianus* (Martini and Martini, 1987). Studies based on DNA–DNA hybridisation showed that *S. pastorianus* has two types of chromosomes, named *S. cerevisiae*-type and *S. bayanus*-type (Tamai et al., 1998; Yamagishi and Ogata, 1999). As expected in an interspecies hybrid, two divergent orthologous genes were found in *S. pastorianus* for almost all genes tested. In fact, lager brewer's yeast genes were very similar to either the corresponding *S. cerevisiae* or *S. bayanus* genes (Borsting et al., 1997; Casaregola et al., 2001; Fujii et al., 1996; Hansen Jorgen et al., 1994; Hansen Joergen and Kielland-Brandt, 1994; Kodama et al., 2001; Tamai et al., 2000; Yamagishi and Ogata, 1999). The presence of two genome types in lager brewer's strains was also confirmed by proteome analysis (Joubert et al., 2000) and random amplified polymorphic DNA PCR (Fernandez-Espinar et al., 2003). The presence of the genome of *S. bayanus*, which is known to be more cold-tolerant than *S. cerevisiae*, may have led to the ability of *S. pastorianus* to carry out fermentations at low temperatures (Saerens et al., 2010).

Furthermore, it was shown that different lager brewer's yeast isolates can contain different combinations of the genomes of closely related *S. cerevisiae* sensu stricto species, not exclusively restricted



Obr. 1 Genomový sekvenátor FLX / Fig. 1 Genome sequencer FLX

nebo *S. bayanus* (Rainieri et al., 2006). V současnosti se předpokládá, že ke vzniku druhu *S. pastorianus* byly zapotřebí alespoň dvě hybridizace a že existují nejméně dva nezávislé původy tohoto druhu (Dunn and Sherlock, 2008). Genomy jednotlivých spodních kmenů jsou tedy rozličnými kombinacemi genomů různých druhů kvasinek (zejména *S. cerevisiae* a *S. bayanus*). Důsledkem jsou rozdíly mezi vlastnostmi a schopnostmi jednotlivých kmenů, přičemž konkrétní genotyp závisí na původu kmene. Konkrétní kmeny a jejich vlastnosti pak lze přiřadit k určitým pivovarům nebo lokalitě a každý kmen je definován charakteristickým uspořádáním genomu, počtem jeho kopií, ploiditou a sekvenčními polymorfismy (Dunn and Sherlock, 2008).

Výsledky sekvenace genomu kmene spodní pivovarské kvasinky Weihenstephan 34/70 ukazují, že po hybridizaci genomů *S. cerevisiae* a *S. bayanus* došlo mezi těmito genomy k osmi chromozomálním translokacím. U většiny translokací se jednalo o nerekiproké rekombinace. Počet chromozomů se v důsledku zvýšil z původních 16 na 36 (Nakao et al., 2009).

Mezi svrchní pivovarské kvasinky se řadí mnoho druhů rodu *Saccharomyces*, většina z nich je blízké příbuzné druhu *S. cerevisiae*. Některé z nich jsou však také hybridní povahy, jak ukázala molekulární charakterizace svrchních kmenů nalezených v belgických trapistických pivech, kde 25% testovaných kmenů pravděpodobně vzniklo hybridizací *S. cerevisiae* a *S. kudriavzevii* (Gonzalez et al., 2008). Hybridy vznikly minimálně po dvou hybridizacích a některé z hybridů mají původ shodný s kmeny vinařských kvasinek, které byly původně klasifikovány jako *S. cerevisiae*. Lze se tedy domnívat, že u části svrchních kvasinek v současnosti klasifikované jako *S. cerevisiae* se může též jednat o hybridy (Querol and Bond, 2009).

Cílem této práce bylo provést sekvenaci genomu izolátu spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces pastorianus* CCY48 – 91 pomocí technologie 454 sekvenování od f. Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) založené na pyrosekvenování.

2 METODIKA

Pro celogenomové sekvenování se až do roku 2005 výhradně používala Sangerova dideoxy technologie (Sanger a Coulson 1975; Sanger et al. 1977). To se s nástupem masivního paralelního sekvenování, také nazývané jako nová generace sekvenování (NGS), změnilo. Jednou z prvních technologií využívající NGS bylo 454 sekvenování od f. Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) založené na pyrosekvenování (Shendure et al. 2005). Tato metoda je založena na snímání světelného signálu, který je excitovaný během enzymatické reakce (obr. 1).

Příprava vzorku gDNA pro sekvenování na Genomovém sekvenátoru 454 FLX f. Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) je rozložena do několika kroků. Příprava knihovny gDNA, emulzní PCR (em-PCR) a samotný sekvenační běh. Izolát genomické DNA (ds DNA) je nejprve náhodně natrhán proudem dusíku pod tlakem 30 psi v nebulizační zkumavce (obr. 2) po dobu jedné minuty. Tím vznikne směs fragmentů o délce 50 bp až 900 bp s hlavním podílem fragmentů

to *S. cerevisiae* and *S. bayanus* (Rainieri et al., 2006). Recent studies suggest that there were two or more hybridisation events and at least two independent origins of *S. pastorianus* strains (Dunn and Sherlock, 2008). Thus, the genomes of individual industrial lager strains comprise various combinations of the genomes of various yeast strains (mainly *S. cerevisiae* and *S. Bayanus*), resulting in different properties between the lager strains. Each independent group of lager brewer's yeast could indeed be correlated with specific breweries and/or geographic locations and is defined by characteristic genome rearrangements, copy number variations, ploidy differences and DNA sequence polymorphisms (Dunn and Sherlock, 2008).

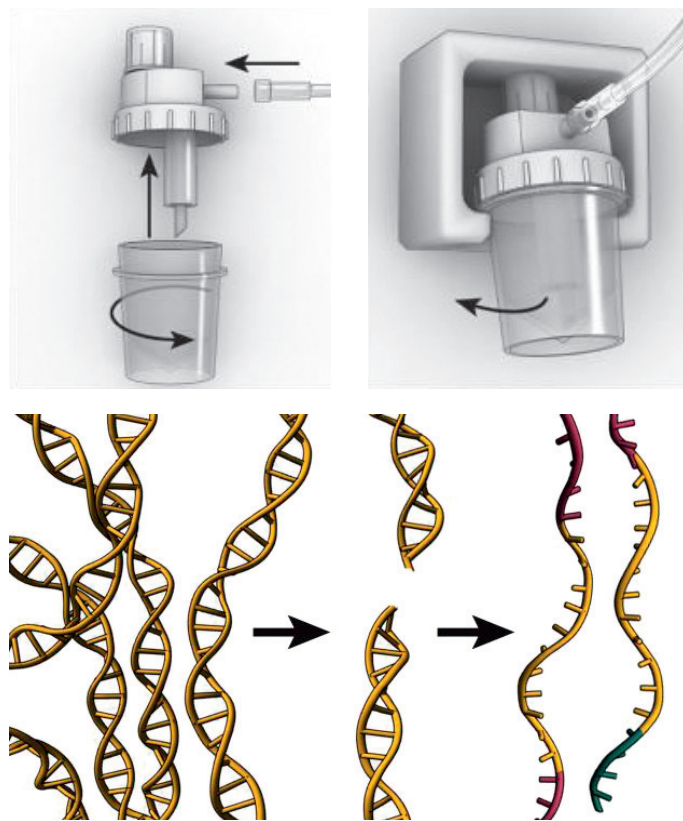
The results of genomic sequencing of the lager brewer's yeast strain Weihenstephan 34/70 suggests that eight chromosomal translocations occurred between the *S. cerevisiae*- and *S. bayanus*-type genomes after the hybridisation event. Most translocations occurred by non-reciprocal recombination. As a result, the number of chromosomes increased from 16 to 36. (Nakao et al., 2009).

Ale yeast strains are comprised of many *Saccharomyces* species, most of them closely related to *S. cerevisiae*. However, some of them are of a hybrid nature as well, as revealed by molecular characterisation of ale yeast strains found in Belgian Trappist beers, where 25% of investigated ale strains seem to have arisen from a hybridisation event between *S. cerevisiae* and *S. kudriavzevii* strains (Gonzalez et al., 2008). The hybrids originated from at least two hybridisation events and some of them share their origin with wine hybrid strains, originally classified as *S. cerevisiae*. Thus, it can be assumed that some of the ale strains currently classified as *S. cerevisiae* may also represent hybrids (Querol and Bond, 2009).

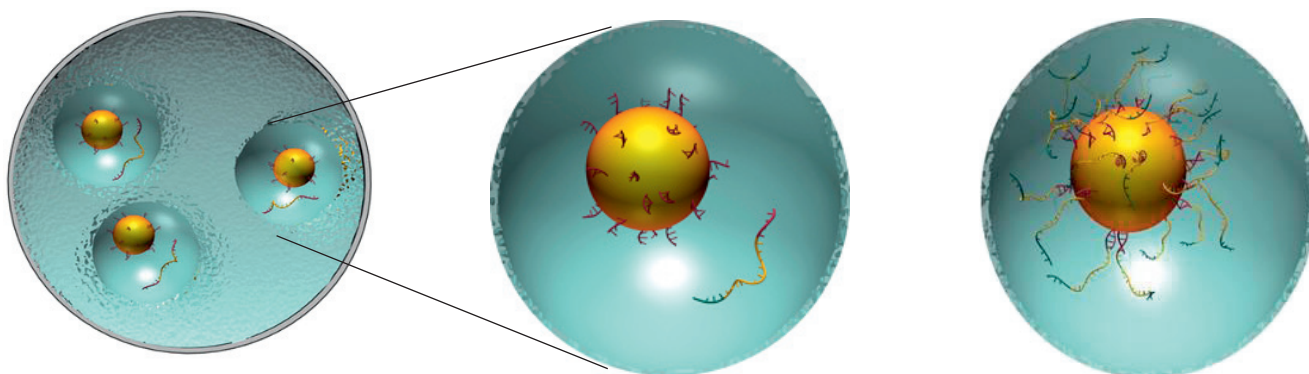
The aim of this work was to sequence the genome of *Saccharomyces pastorianus*, strain-isolate CCY48 – 91, using 454 sequencing technology from Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), based on pyrosequencing.

2 METHODS

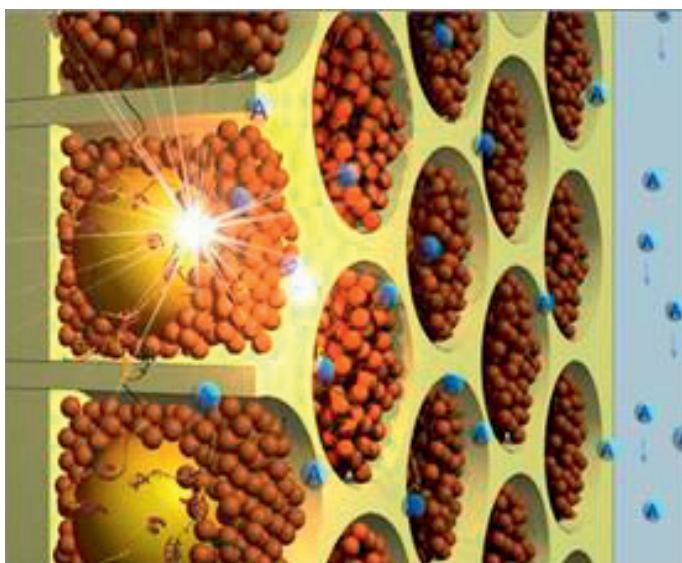
The Sanger sequencing method was the only method used for whole genome sequencing until 2005 (Sanger and Coulson, 1975; Sanger et al., 1977). When massive parallel sequencing, also called next generation sequencing was developed, data generation and processing speeds increased dramatically. One of the first commercial companies offering NGS was 454 technology under Roche



Obr. 2 Nebulizační zkumavka a způsob fragmentace / Fig. 2 Nebulization tube and mechanism of fragmentation



Obr. 3 A, emulzní PCR, vodné enzymaticky bohaté kapénky vytvoří mikoreaktory v olejové fázi; B, obohacovací kulička před em-PCR pokryta komplementárními adaptory a jeden fragment před emulzní PCR; C, výsledek po emulzní PCR, kdy obohacovací kulička je plná klonálních amplikonů / Fig. 3 A, emPCR, water droplets are created in oil emulsion; B, one droplet before em-PCR with one capture bead and one ssDNA fragment; C, the same droplet after em-PCR where clones of one fragments were amplified

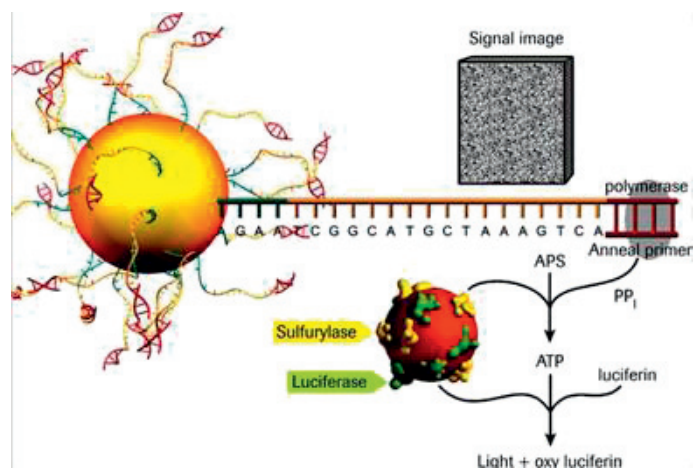


Obr. 4 Simulace průtoku nukleotidů přes sekvenační destičku / Fig. 4 Simulation of flow through Pico Titer Plate (PTP)

v oblasti 450–550 bp. Takto vzniklé fragmenty se enzymaticky pomocí směsi PNK (polynucleic kinase), T4 ligasy, volných nukleotidů (dNTPs), zarovnají na tupé konce a Taq polymerasa přidá A konce, které se využijí pro TA ligaci. Na takto připravené fragmenty DNA se liguje Y adaptor, který obsahuje sekvence nezbytné pro 454 sekvenování. Y adaptor se skládá z klíčové sekvence, MID (multiple identifier), FAM adaptor pro přesnou kvantifikaci a sekvence nezbytná pro dosednutí sekvenačního primeru a vazbu na obohacovací kuličku. Po úspěšné ligaci se knihovna kvantifikuje pomocí FAM fluoroforu a ředí se na 107 molekul v 1 µl. Emulzní PCR je připravena podle protokolu Roche. Během em-PCR dochází ke klonální amplifikaci každého fragmentu gDNA zvlášť na obohacovací kuličce. Principem em-PCR je enzymaticky bohatá vodná fáze rozmíchaná v oleji. Kapénky vodné fáze vytváří mikro PCR reaktory, ve kterých následně PCR probíhá (Kleppe et al., 1971; Bartlett a Stirling, 2003). Do každého mikoreaktoru při přípravě emulzní PCR putuje právě jedna obohacovací kulička a právě jeden fragment gDNA. Na kuličce, která obsahuje komplementární adaptory k fragmentu se amplifikuje DNA v počtu 10-35 milionu kopií (obr. 3). Oleje zbarvené obohacovací kuličky se centrifugací vpraví do sekvenační PTP destičky (pico titer plate). Tato skleněná destička má v sobě vyleptaných cca 3 mil symetrických jamek. Do každé jamky zapadne pouze jedna kulička s fragmenty. Během sekvenačního procesu postupně vždy následované promývacím krokem následují jednotlivé nukleotidy TACG (obr. 4). Pokud se na prodlužujícím řetězci inkorporuje právě plující nukleotid, uvolní se PPi (pyrofosfát). Ten se využije k tvorbě ATP, které je následně kaskádou reakcí spotřebované, kdy v posledním kroku je luciferin převeden na oxyluciferin a emituje světlo. Toto světlo je pomocí integrované CCD kamery snímáno a zaznamenáno (obr. 5). Na základě série obrázků a světelných záblesků software GS FLX+ vytvoří flowgramy a SFF soubor, který obsahuje sekvence typu FASTA včetně kvality. Tyto sekvence jsou analyzované a skládány zpět do ucelených celků (kontigů a skafoldů).

(F. Hoffmann-La Roche Ltd.). This technology is based on pyrosequencing (Shendure et al., 2005) where emitted light is captured by a CCD camera (Fig. 1).

Sample preparation for 454 GS FLX (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) consists of several steps including library preparation, emulsion PCR (em-PCR) and sequencing. The first step is fragmentation of gDNA. Nebulization is carried out inside a nebulization tube for 1 minute under 30 psi pressure (Fig. 2). After nebulisation, all DNA fragments are in a size distribution range from 50 bp to 900 bp with a major peak of 450-550 bp. These fragments are repaired during the fragment end repair procedure (mixture of PNK, T4 ligase, NTPs,) and A tailing was carried out using Taq polymerase. When fragments are repaired, a Y adaptor, which is mandatory for 454 sequencing, is ligated onto both ends. The Y adaptor contains key sequences: MID (which allows multiplexing), FAM (for precise quantification) and the 454 sequence, which is used for binding fragments to enrichments beads and the site where the sequencing primer is subsequently located. When the Y adaptor is successfully bound, FAM is used for quantification and the sample is diluted to 107 fragments in 1 µl. Em-PCR is carried out via a standard Roche protocol. The principle of em-PCR is clonal amplification of a DNA fragment in an enzymatic water droplet within an oil phase. Water droplets are used as a PCR reactor for individual clonal PCR amplification (Kleppe et al., 1971; Bartlett and Stirling, 2003), where one enrichment bead binds one fragment that is clonally amplified in a final total of 10-35 x106 fragments (Fig. 3). Oil-free enriched beads are mounted on a pico titer plate (PTP) by centrifugation. There are approximately 3 x106 symmetric wells on the surface. Inside each well could be only one bead. During the sequencing run the four bases, TACG, flow above the well (Fig. 4). When a complementary nucleotide is incorporated, pyrophosphate is released (PPi) and used for ATP synthesis. The final step in this enzymatic cascade is the transformation of luciferin to oxyluciferin and light emission (Fig. 5). This light is captured by the CCD camera. Signal processing followed by data processing produces a flow diagram and an SFF file. This file is used for de-novo assembly or reference mapping complete with contigs and scaffolds.



Obr. 5 Princip 454 sekvenační technologie / Fig. 5 Scheme of the principle of 454 technology

3 ZÁVĚR

Genom izolátu spodní pivovarské kvasinky *Saccharomyces pastorianus* CCY48-91 byl sekvenován pomocí technologie 454 od firmy Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.) založené na pyrosekvenování. Genom byl nahrán do databáze Genbank na NCBI (The National Center for Biotechnology), která obsahuje biomedicínské a genomové informace, pod projektem s přístupovým číslem PRJNA169496 (dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/169496>). V rámci projektu je zveřejněna celogenomová assembly na úrovni kontigů i přímo sekvenační data v rámci databáze SRA (The Sequence Read Archive).

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví ČR: RVO-VFN-64165/2013 a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (Výzkumné centrum 1M0570 a Výzkumný záměr MSM6046137305). Autoři také děkují firmě ROCHE s.r.o. za podporu.

LITERATURA / REFERENCES

- Bartlett, J. M. S.; Stirling, D., 2003: A Short History of the Polymerase Chain Reaction. PCR Protocols 226: 3–6.
- Borsting, C., Hummel, R., Schultz, E.R., Rose, T.M., Pedersen, M.B., Knudsen, J., Kristiansen, K., 1997: *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional genes encoding the acyl-CoA binding protein, one similar to the ACB1 gene from *S. cerevisiae* and one identical to the ACB1 gene from *S. monacensis*. Yeast 13: 1409–1421.
- Casaregola, S., Nguyen, H.-V., Lapathitis, G., Kotyk, A., Gaillardin, C., 2001: Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1607–1618.
- Dunn, B., Sherlock, G., 2008: Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. Genome Res. 18: 1610–1623.
- Fernandez-Espinar, M.T., Barrio, E., Querol, A., 2003: Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Yeast 20: 1213–1226.
- Fujii, T., Yoshimoto, H., Nagasawa, N., Bogaki, T., Tamai, Y., Hamachi, M., 1996: Nucleotide sequences of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. Yeast 12: 593–598.
- Gonzalez, S.S., Barrio, E., Querol, A., 2008: Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. Appl. Environ. Microbiol. 74: 2314–2320.
- Hansen, J., Cherest, H., Kielland-Brandt, M.C., 1994: Two divergent MET10 genes, one from *Saccharomyces cerevisiae* and one from *Saccharomyces carlsbergensis*, encode the α subunit of sulfite reductase and specify potential binding sites for FAD and NADPH. J. Bacteriol. 176: 6050–6058.
- Hansen, J., Kielland-Brandt, M.C., 1994: *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional MET2 alleles similar to homologs from *S. cerevisiae* and *S. monacensis*. Gene 140: 33–40.
- Joubert, R., Brignon, P., Lehmann, C., Monribot, C., Gendre, F., Boucherie, H., 2000: Two-dimensional gel analysis of the proteome of lager brewing yeasts. Yeast 16: 511–522.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G., 1971: Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. J. Mol. Biol. 56(2): 341–361.
- Kodama, Y., Omura, F., Ashikari, T., 2001: Isolation and characterization of a gene specific to lager brewing yeast that encodes a branched-chain amino acid permease. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3455–3462.

3 CONCLUSIONS

The genome of an isolate of bottom brewing yeast strain *Saccharomyces pastorianus* CCY48-91 was sequenced using 454 technology from Roche (F. Hoffmann-La Roche Ltd.), which is based on pyrosequencing. The genome was uploaded into the Genbank database at NCBI (The National Center for Biotechnology), which contains biomedical and genomic information under project with accession number PRJNA169496 (available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/169496>). Whole genome assembly to the contig level was posted as well as raw data under SRA database (The Sequence Read Archive).

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic – conceptual development of research organization: RVO-VFN-64165/2013 and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Research Centre 1M0570 and Research Programme MSM6046137305). The authors would like to thank ROCHE Ltd. for support.

- Martini, A.V., Martini, A., 1987: Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. Antonie Van Leeuwenhoek 53: 77–84.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., Ashikari, T., 2009: Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. DNA Res. 16: 115–129.
- Querol, A., Bond, U., 2009: The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. FEMS Microbiol. Lett. 293: 1–10.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., 2006: 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.
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 94 (3): 441–448.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74 (12): 5463–5467.
- Saerens, S.M.G., Duong, C.T., Nevoigt, E., 2010: Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 1195–1212.
- Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, D., Zhang, Kun, Mitra, R.D., Church, G.M., 2005: Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. Science 309 (5741): 1728–1732.
- Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H., Kaneko, Y., 1998: Co-existence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. Yeast 14: 923–933.
- Tamai, Y., Tanaka, K., Umemoto, N., Tomizuka, K., Kaneko, Y., 2000: Diversity of the HO gene encoding an endonuclease for mating-type conversion in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. Yeast 16: 1335–1343.
- Wicker, T., Schlagenhauf, E., Graner, A., Close T.J., Keller B., Stein N., 2006: 454 sequencing put to the test using the complex genome of barley, BMC Genomics. 7: 275.
- Yamagishi, H., Ogata, T., 1999: Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. Syst. Appl. Microbiol. 22: 341–353.