



Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico

Teresa Orberá Ratón

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Santiago de Cuba, Cuba

Resumen

Las levaduras poseen numerosas aplicaciones en la biotecnología tradicional y moderna. Participan en procesos de producción de alimentos, proteínas de organismos unicelulares, productos con valor añadido y en las últimas décadas se han incorporado a la industria biotecnológica como hospederos para la producción de proteínas de eucariontes. A pesar de las ventajas que poseen, algunos géneros son causantes de micosis en el hombre y, en algunos casos, son patógenos oportunistas asociados a enfermedades como el VIH. También son causantes del deterioro de alimentos frescos y elaborados para el consumo humano. Por estas razones se hace imprescindible la identificación exacta y rápida de las levaduras de interés industrial, clínico y ambiental. La taxonomía de levaduras ha estado soportada en técnicas convencionales, basadas en la descripción morfológica y fisiológica de especies y géneros, pero éstas dependen de las condiciones de cultivo de las cepas, por lo que han introducido errores en la ubicación taxonómica y dieron origen al fenómeno de la dualidad de la nomenclatura. Estas dificultades se han solucionado con la aplicación de las técnicas moleculares, basadas en el análisis de fragmentos de las moléculas de ácidos nucleicos, siendo las más utilizadas la electroforesis de cariotipo, el análisis de microsátélites, el polimorfismo de longitud del DNA mitocondrial, el polimorfismo longitudinal de los fragmentos de restricción del RNA ribosomal, el polimorfismo del DNA amplificado aleatoriamente y el análisis de los RNA de bajo peso molecular. En el presente trabajo se describen todos estos métodos, los cuales han permitido el desarrollo de herramientas de identificación de aplicación industrial y clínica y para el esclarecimiento de relaciones filogenéticas entre especies y géneros de levaduras de interés biotecnológico.

Palabras clave

Levaduras, Taxonomía, RFLP, RAPD, nDNA, rRNA, mtDNA, LMW-RNA

Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest

Summary

Yeasts have numerous applications in modern and traditional biotechnology. They take place in production of food, unicellular protein and products with added value, and in the last decades they have been incorporated to the biotechnology industry as host in the production of eukaryotes proteins. Apart from their advantages, some genera are the causes of mycosis on man and in some cases, are opportunistic pathogens associated to diseases such as HIV. They are also agents responsible for the damaging of fresh and elaborated food for human consumption. For these reasons, the quick and accurate identification of industrially, environmentally and clinically significant yeasts is important. Yeast taxonomy has been supported by conventional techniques, based on morphological and physiological descriptions of species and genera, but depend on strain culture conditions, therefore they have introduced errors in yeast taxonomy and originated the duality of their nomenclature. These difficulties have been solved with the application of molecular techniques, based on the sequence analysis of nucleic acid, specially karyotyping electrophoresis, microsatellite analysis, mitochondrial DNA length polymorphism, restriction fragment length polymorphism of ribosomal RNA, random amplified polymorphic DNA and low molecular weight RNA. In this review all those methods are described, which have allowed the development of identification kits for clinical and industrial application for the clearance of phylogenetic relationships among species and genera of yeasts of biotechnological interest.

Key words

Yeast, Taxonomy, RFLP, RAPD, nDNA, rRNA, mtDNA, LMW-RNA

Dirección para correspondencia:

Lic. Teresa Orberá Ratón
Centro de Estudios de Biotecnología Industrial
Apartado Postal 4011
CP 90400, Santiago de Cuba, Cuba
Teléfono: +53 22 632095
Fax: +53 22 630363
Correo electrónico: torbera@cebi.uo.edu.cu

Las levaduras tienen una amplia aplicación en la biotecnología tradicional y moderna. Desde la antigüedad se han reconocido como protagonistas en la producción de alimentos y bebidas por fermentación y actualmente son utilizadas como fuentes de obtención de vitaminas del complejo B, pigmentos, cofactores, proteínas de organismos unicelulares, biomasa y otros productos con valor añadido [21]. En las últimas décadas se han venido utilizando como hospederos para la obtención de proteínas heterólogas de organismos eucariontes por vías de la ingeniería genética [20]. Sin embargo, en sus actividades dañinas pueden ocasionar importantes pérdidas económicas en la conservación y producción comercial y manufacturada de alimentos y bebidas, y algunas son causantes de enfermedades en el hombre [4,13,17,18]. Aunque son variadas las aplicaciones en el campo de la biotecnología que se le atribuyen a las levaduras, aún quedan muchos hábitats naturales por explorar en busca de nuevas especies, de forma tal que puedan diseñarse tecnologías novedosas protagonizadas por estos microorganismos [3]. La caracterización de levaduras hasta el nivel de especie es de relevancia desde el punto de vista industrial, debido a que muchos grupos forman parte de la microflora natural de alimentos y bebidas fermentadas y/o participan en el proceso de obtención de éstos [6]. De ahí la necesidad de poseer métodos de identificación rápidos, precisos y fáciles, que puedan ser aplicados al control de la calidad en la industria, con el fin de asegurar que la cepa de partida, la que conduce el proceso y la que rinde el producto final, sea la misma. Por otro lado, en los laboratorios de control de calidad de alimentos ya se está haciendo necesaria la identificación de levaduras alteradoras, tanto para la detección del origen de la contaminación como para la solución de litigios, relacionados con la propiedad industrial [6]. Las áreas de comparación taxonómica en las cuales se enmarca la taxonomía de levaduras incluyen la Morfología, Fisiología, Genética, Bioquímica, Ecología y Biología Molecular [3]. En el presente trabajo se describen los métodos moleculares para la identificación de levaduras industriales, así como la implementación de herramientas para la detección de contaminaciones por levaduras en alimentos y productos biotecnológicos. Estas técnicas se basan en el estudio del genoma nuclear, ribosómico y mitocondrial. Aunque la mayoría son costosas y algunas laboriosas, en muchos casos son la base para el desarrollo de herramientas moleculares que combinan la exactitud con la rapidez y la factibilidad, aplicadas con éxito en la industria y para el diagnóstico clínico.

Taxonomía de levaduras: historia

La taxonomía de levaduras ha transitado por dos períodos, el primero caracterizado por un fuerte estudio de la morfología comparativa, la fisiología y la genética convencional y una segunda etapa, que se extiende hasta la actualidad, identificada por una ampliación en los estudios de morfología al nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y la introducción de los estudios de la Biología Molecular [13]. Entre los principales aportes de la segunda etapa se destacan la diferenciación por microscopía electrónica de transmisión de las fases levaduriformes de los ascomicetes y basidiomicetes [3] y la aplicación de los perfiles de ácidos nucleicos para la identificación de géneros, especies y cepas, mediante las técnicas de secuenciación de DNA/RNA, cariotipado y el estudio de los patrones de restricción de los RNAs [13].

Desventajas de los métodos convencionales de identificación de levaduras

La identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de unas 100 pruebas, lo cual es laborioso, complejo y consume tiempo [5]. Se estudia la morfología del estado asexual y sexual, presencia de homo y heterotalismo, etc., características que solo permiten la identificación hasta el nivel de género [3]. Las principales desventajas que han mostrado las pruebas morfológicas se manifestaron con el descubrimiento del estado sexual de reproducción de la fase levaduriforme de los ascomicetes y basidiomicetes, o sea, la relación anamorfo/teleomorfo, lo cual ha generado la llamada dualidad de la nomenclatura binomial, que no es más que una misma especie sea nombrada de una forma en el estado vegetativo (anamorfo) y de otra en el estado sexual (teleomorfo). En este caso se encuentran los dúos *Bullera/Bulleromyces*, *Cryptococcus/Filobasidiella* y *Brettanomyces/Dekkera*, etc. Aunque la dualidad ha sido aceptada por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, el esclarecimiento de estas relaciones en base a los estudios de los patrones genéticos de las especies en estado asexual, son la base del reclamo de los investigadores para la reelaboración de la nomenclatura de las levaduras [22].

Las principales pruebas fisiológicas utilizadas en identificación de levaduras son las de fermentación/asimilación de fuentes de carbono, asimilación de compuestos nitrogenados, requerimientos vitamínicos, resistencia a cicloheximida y termotolerancia. Éstas no siempre son estables ni reproducibles, debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden metabolizarse por rutas comunes y en ocasiones su metabolismo es controlado por varios genes [3,18]. La prueba de fermentación de azúcares no es muy exacta debido a que las levaduras de fermentación lenta no liberan el CO₂ de forma tan inmediata para que sea atrapado en un tubo Durham, lo cual ha provocado que especies consideradas durante mucho tiempo no fermentativas, hayan tenido que reclasificarse [3].

Dentro de las pruebas genéticas empleadas, está el apareamiento entre cepas complementarias con la subsiguiente aparición del estado sexual, sin embargo muchas especies estrechamente relacionadas llegan a aparearse, aunque no generan una progenie viable [3].

Como pruebas bioquímicas predominan la electroforesis de proteínas, análisis de los patrones de isoenzimas y de Resonancia Magnética Nuclear, el número de unidades de isopreno en la coenzima Q y la cromatografía de ácidos grasos de cadena larga de la pared celular. Estas técnicas también dependen del estado fisiológico de las cepas [3,5].

Estos métodos en general, producen ambigüedades e incorrecciones en los resultados, debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo [3,5].

Métodos moleculares de identificación de levaduras

Los métodos moleculares de identificación de levaduras y microorganismos en general, se basan en el estudio de las moléculas de DNA y RNA. En levaduras se iniciaron con el estudio de complementariedad del DNA nuclear, determinándose la existencia de relaciones coespecíficas entre cepas cuyos caracteres fisiológicos y morfológicos considerados determinantes para discernir entre especies eran diferentes (ej. el género *Torulopsis*, que carece de pseudohifas, es coespecífico con *Candida* que sí

las forma; *Hansenula*, que asimila el nitrato, es coespecífico de *Pichia*, que no lo asimila [11]).

Polimorfismo longitudinal de los cromosomas. Electroforesis de cariotipo. Cariotipificación. Mediante este método, la molécula de DNA previamente digerida con endonucleasas de restricción de corte poco frecuente, es sometida a un campo eléctrico a velocidad constante en un gel de electroforesis, de forma tal que debido a la carga negativa que posee a pH fisiológico, migre hacia el polo positivo [23]; la migración se realiza a una velocidad que depende del tamaño y la carga de las moléculas, de tal manera que en el gel de electroforesis se visualiza un patrón de bandas [8]. Este patrón en levaduras es específico de especie, debido a fenómenos genéticos y evolutivos que han tenido lugar en los cromosomas (inserciones, deleciones y translocaciones). Esta técnica ha constituido una herramienta útil en la diferenciación de especies de *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces*, para el estudio de relaciones anamorfo-teleomorfas entre especies de *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*, así como para verificación de sinonimia [1]. La técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), es la de mayor poder discriminatorio [23].

Polimorfismo del DNA mitocondrial (mtDNA). Las levaduras son organismos con un amplio grado de variabilidad en el tamaño del mtDNA, el cual puede variar entre los 6 y los 25µm. En la mayoría de las especies es de forma circular [1]. Entre las ventajas del uso del mtDNA en taxonomía se encuentran su pequeño tamaño, elevado número de copias, en cada aislamiento de un fenotipo salvaje dicariótico se recupera un solo halotipo y que la electroforesis del DNA total digerido con endonucleasas de restricción, permite la visualización en gel de fragmentos de hasta 2kb [1].

La elevada variabilidad del mtDNA lo hizo atractivo para su uso en la identificación de especies por electroforesis, pero poseía la limitante de que se requería el aislamiento de las mitocondrias y del mtDNA, lo cual lo hacía impracticable para su uso en la identificación de gran cantidad de muestras. Esta dificultad fue superada por el método diseñado por Querol et al. 1992 para el análisis de restricción del mtDNA, sin necesidad de aislamiento ni purificación previa. La técnica fue desarrollada en *S. cerevisiae* y se basa en las diferencias existentes en el contenido de G+C existentes entre el DNA nuclear (nDNA) y el mtDNA, de tal forma que en el nDNA es de un 40%, mientras que en el mtDNA es solo de un 20%. Esto permite que si a un aislamiento de DNA total se le hace un análisis de restricción utilizando enzimas específicas para reconocer regiones ricas en G+C, tales como SacII y SstII cuya secuencia blanco es CCGCGG, el nDNA sufre una sobredigestión generándose numerosos fragmentos de muy pequeño tamaño, indetectables en un gel de agarosa. De esta manera, en una electroforesis de DNA total digerido con estas endonucleasas solo se observan los fragmentos correspondientes al mtDNA ubicados según su tamaño y mostrando un perfil específico de especie [6]. Recientemente, los autores introdujeron una variante que reduce el tiempo de duración del método original en 52,5 h, por disminución del tiempo de incubación para la digestión del DNA de 12 h a 33 min en un horno de microondas, y del crecimiento celular a 36 h. La comparación de ambos métodos utilizando las mismas endonucleasas reveló iguales perfiles en la electroforesis [16]. Este método ha sido utilizado para la caracterización de *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Brettanomyces/Dekkera* y *Zygosaccharomyces*. Otras especies de interés industrial como

Kluyveromyces lactis han demostrado poseer potencialidades para la aplicación de la técnica [1].

Análisis de microsatélites. Esta técnica se basa en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y consiste en la amplificación de fragmentos con cebadores de oligonucleótidos específicos para secuencias simples repetitivas presentes en el DNA, denominadas microsatélites. Entre los más utilizados se encuentran (GTC)₅, (GACA)₄, Fago DNA M13 y la secuencia del M13 GAGGGTGGCGGTTCT. Esta técnica difiere del RAPD (ver más adelante), en que la temperatura de hibridación del cebador es mayor (55 °C), en lugar de la de 37 °C, por lo que estos hibridan en zonas específicas del genoma, de ahí que la reproducibilidad es mayor. Se ha empleado en la identificación de especies del género *Zygosaccharomyces*, contaminantes de salsas mayonesas y otros aderezos para ensaladas [18].

Métodos basados en el uso del genoma ribosomal

Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del rDNA/rRNA (RFLP). La determinación del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, consiste en la diferenciación de los organismos por el análisis de los patrones de ruptura que se generan en un sitio específico del genoma, cuando es cortado por enzimas de restricción. De esta forma, en un gel de electroforesis aparece un patrón de bandas polimórficas correspondientes a los fragmentos de diferentes tamaños, que se generan con el corte de cada endonucleasa (Tabla 1). Estos fragmentos polimórficos aparecen debido a que los organismos de diferentes especies, e incluso cepas, difieren en la distancia de los sitios de clivaje para cada enzima de restricción. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, y la existencia de patrones únicos permite la identificación [10,21]. Este método se ha empleado para diferenciar entre las especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y otras [5], así como para estudios ecológicos utilizando el rRNA 16S, en determinación de posición taxonómica utilizando el rDNA 18S, así como el dominio D1/D2 del rDNA 26S, una región de elevada variabilidad [9,15].

El más amplio uso que se le ha dado a la técnica de RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial, utilizando la región del rDNA 5,8S y los espaciadores transcritos internos ITS 1 e ITS 2 (5,8S – ITS) [5,11]. La región 5.8S es codificadora y conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica que no permite la delimitación entre cepas de una misma especie, sin embargo la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, permite el reconocimiento a nivel interespecífico. Ésta ha sido empleada para la identificación de especies del género *Kluyveromyces* [2]. En estos estudios se ha utilizado una variante de la técnica conocida como RFLP-PCR. Para ella, se amplifican fragmentos específicos del DNA por PCR y luego son tratados con endonucleasas de restricción para obtener los patrones específicos. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de las diferentes especies darán lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis. Los productos de la PCR del rDNA muestran elevada variación longitudinal para las diferentes especies. En la Tabla 1 se observa que el tamaño de los productos de la PCR y el análisis de restricción de esta región con las endonucleasas HinfI, CfoI y HaeIII que genera un patrón especie - específico, excepto para los pares anamorfo/teleomorfo y las especies muy similares como las del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, no presentan diferencias [5].

Tabla 1. Tamaño en pares de bases (pb) de los productos de la PCR y los fragmentos de restricción de la fase levaduriforme de ascomicetes y basidiomicetes [5].

Especies	Producto de PCR (pb)	Fragmentos de Restricción		
		CfoI	HaeIII	Hinfi
<i>Candida tropicalis</i>	550	280+250	450+90	270+270
<i>Candida albicans</i>	630	330+300	500+70+60	350+160+120
<i>Kluyveromyces lactis</i>	740	285+190+165+90	655+80	290+180+120+80+65
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	740	285+185+140+100	655+80	240+185+120+80+65+50
<i>K. marxianus</i> var. <i>drosophilaram</i>	740	285+190+165+90	665+80	240+185+120+80+65+50
<i>Pichia pastoris</i>	380	360	380	250+130
<i>Saccharomyces bayanus</i>	880	385+365	500+220+145	365++155
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	385+365	320+230+180+150	365+155
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	880	385+365	700	450+225
<i>Rhodotorula acuta</i>	880	385+365	650	250+190+185
<i>Rhodotorula glutinis</i>	640	320+240+80	430+210	340+225+75
<i>Sporobolomyces roseus</i>	610	320+250	600	280+120+105+105
<i>Brettanomyces bruxelensis</i>	500	230+130+180	375+105	265+215
<i>Debaryomyces bruxelensis</i>	485	255+140+190	375+95	270+215

Polimorfismo del DNA aleatoriamente amplificado (RAPD). Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR). DNA Amplification Fingerprinting (DAF). Se basa en la amplificación por PCR simultánea del DNA genómico en presencia de un único cebador de pocos oligonucleótidos. Debido a la baja temperatura de hibridación (35-39 °C) el cebador se une a sitios inespecíficos, distribuidos en regiones aleatorias en todo el genoma, permitiendo la amplificación de fragmentos polimórficos de DNA. Los productos amplificados se visualizan por electroforesis. El uso de RAPD permite obtener las llamadas "huellas digitales" que no son más que las diferencias de número y tamaño en los fragmentos del DNA amplificado, las cuales son específicas de especies e incluso cepas [19]. En 1993, Fell aplicó la denominada Técnica de los Tres Cebadores; para lo cual utilizó dos cebadores externos específicos de la región correspondiente al dominio D1/D2 de la subunidad mayor (LSU) del rRNA (rRNA 26S) y uno interno específico de cada especie a analizar. Los cebadores externos permiten la amplificación de un fragmento de 600 pb común a todas las especies de levaduras, mientras que el interno permite la amplificación de una secuencia menor, específica de especie [11]. El RAPD posee potencialidades para ser empleado en estudios de control de calidad de inóculos para fabricación de cerveza y otras bebidas, pues la comparación del cultivo original con el de las líneas subcultivadas, permite que cualquier contaminante sea identificado [24]. La técnica ha sido utilizada para estudios de identificación de cepas a partir del análisis del dominio D1/D2 del rRNA 26S, una región altamente variable, con diferencias entre especies de hasta una única base [12]. Esta región ha permitido separar todas las especies de ascomicetes de fase levaduriforme existentes, incluso las altamente relacionadas [14]. En la misma línea, está el diseño de métodos específicos para la identificación de especies de un mismo género, como el Método de los Cuatro Cebadores de Kurtzman y Mannarelli en 1998, el cual se basa en el uso de dos cebadores universales empleados como control positivo y dos internos específicos de especie derivados de la región D1/D2. La amplificación genera dos fragmentos de 1200-1300 pb que aparecen siem-

pre y uno pequeño de 114-336 pb presente solo cuando está la especie buscada [13]. El RAPD-PCR se empleó recientemente en el análisis de la variabilidad genética de los miembros del grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* y *S. pastorianus*). Este estudio permitió delimitar entre estas especies estrechamente relacionadas, así como grupos intraespecíficos como los dos existentes en la especie *S. bayanus*. En el trabajo se determinó también el origen híbrido de la especie *S. pastorianus*, a partir del análisis de la fracción de bandas mostradas por cada híbrido y las cepas parentales [7].

Uso de los RNA de bajo peso molecular (LMW-RNA). Este método se basa en el uso de los patrones de electroforesis de los RNAs de bajo peso molecular, 5,8S/ 5S rRNA y el tRNA de clase 1 y 2; de esta forma se ha comprobado que los patrones de los LMW-rRNA permiten diferenciar cepas hasta el nivel de género, mientras que el LMW-tRNA, permite distinguir entre especies incluso dentro del mismo género [24].

Conclusiones

La identificación molecular de levaduras, posee valor práctico para el desarrollo de métodos y herramientas para la identificación rápida y precisa en muestras heterogéneas procedentes de la industria, de origen clínico y ambiental. Los datos obtenidos del estudio del genoma, han generado cambios importantes en la taxonomía de géneros y especies y han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de estos microorganismos.

A la memoria del Dr. Federico Uruburu, el amigo de los curadores del mundo.

Bibliografía

1. Belloch C, Barrio E, Uruburu F, García MD, Querol A. Characterization of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial analysis. *System Appl Microbiol* 1997; 20: 397-408.
2. Belloch C, Barrio E., García MD, Querol A. Inter and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast* 1998; 14: 1341-1354.
3. Boekhout T, Kurtzman C. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berlin, Germany, 1996: 1-81.
4. Deak T, Beuchat LR. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. New York, CRC Press, 1996.
5. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Intern Jour Syst Bacteriol* 1999; 49: 329-337.
6. Fernández-Espinar MT, Querol A, Ramón D. Molecular characterization of yeasts strains by mitochondrial DNA restriction analysis. En: Spencer JFT, Spencer AL. (Eds.) *Methods in Biotechnology*. New York, Humana Press Inc, 2000: 329-333.
7. Fernández-Espinar MT, Barrio E, Querol A. Analisis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* 2003; 20: 1213-1226.
8. Gonzalo Claros M, Avila C, Gallardo F, Cánovas F. *Bioquímica aplicada: Manual para el diseño experimental y para el análisis de datos en Bioquímica y Biología Molecular*. Ediciones S. L. Asturias, 2001: 106-107.
9. Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. Rapid identification of wine yeasts species based on RFLP analysis on the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch Microbiol* 1998; 169: 387-392.
10. Henrick-Kling CMT. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphisms in the rRNA internal transcribed spacer region. *Food Technol Biotechnol* 2000; 38: 69-75.
11. Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* 1994; 10: 1727-1740.
12. Kurtzman CP, Dien BS. *Candida arabinofementans*, a new L-arabinose fermenting yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; 74: 237-243.
13. Kurtzman CP, Mannarelli BM. Rapid identification of *C. albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1334-1641.
14. Kurtzman CP, Robnett CJ. Synonymy of the genera *Wingea* and *Debaryomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* 1994; 66: 337-342.
15. Kurtzman CP. Relationships among the genera *Ashbya*, *Eremothecium*, *Holleya* and *Nematospora* from rDNA sequence divergence. *J Industrial Microbiol* 1995; 14: 523-530.
16. López V, Querol A, Ramón D, Fernández-Espinar MT. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Intern J Food Microbiol* 2001; 68: 75-81.
17. Loureiro V, Malfeito – Ferreira M. SPOILAGE. *Yeasts in Spoilage*. Elsevier Science Ltd., 2003.
18. Loureiro V, Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol* 1999; 10: 1-10.
19. Loureiro, V. Spoilage yeasts in foods and beverages: Characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research Intern* 2000; 33: 247-256.
20. Sasson A. Productos y procedimientos comerciales basados en organismos modificados genéticamente. En: *Elfos Scientiae* (Eds.) *Biotechnologías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas*, La Habana, 1998: 21-31.
21. <http://members.aol.com/ChazStone/Yeast.html>. (03/04/2003)
22. <http://webcd.usal.es/web/psm/abstracts/Encarna.htm>. (24/05/2003)
23. <http://www.belspoube/bccml/news/6-99/bcm03.htm>. (06/05/2003)
24. <http://www.chaseur.usc.edu/pubs/projects/siriate.html> (24/05/2003)