

IDENTIFICATION DES SOUCHES DE LEVURES ISOLÉES DE VINS PAR L'ANALYSE DE LEUR ADN MITOCHONDRIAL

D. DUBOURDIEU*, Aline SOKOL*, J. ZUCCA**, P. THALOUARN**, Agnès DATTEE**
et M. AIGLE***

* Institut d'Oenologie, Université de Bordeaux II
351, cours de la Libération, 33405 Talence Cedex (France).

** Laboratoire de cytopathologie végétale

2, rue de la Houssinière, 44072 Nantes Cedex (France).

*** Laboratoire de génétique, Allée des Facultés, 33405 Talence cedex (France).

INTRODUCTION

La fermentation alcoolique est réalisée par des levures appartenant essentiellement au genre *Saccharomyces*. Il s'agit de fermentations spontanées assurées par des levures naturellement présentes, ou de fermentations induites grâce à l'adjonction dans les moûts de levures sélectionnées (levurage). Dans ce dernier cas, des souches de levures sèches actives sont au préalable produites en masse en cultures pures.

Lors de la mise en œuvre des fermentations par levurage, il est primordial de disposer de moyens d'identification des souches de levures. La microbiologie classique rend d'importants services dans le cadre de ces contrôles mais ses techniques sont peu satisfaisantes lorsqu'il s'agit de différencier des souches à l'intérieur d'une même espèce. Le besoin s'est donc fait sentir de mettre au point de nouvelles techniques d'identification permettant de différencier sans contestation possible des levures de proche parenté. Un certain nombre de ces techniques ont déjà été expérimentées dans cette optique : BOUIX (1979) a proposé une méthode de différenciation des levures basée sur l'étude électrophorétique de leurs fractions extracellulaires. Cette technique a été appliquée avec succès à l'étude de l'origine des levures assurant la fermentation spontanée du vin, ainsi qu'à la reconnaissance de levures sèches actives après un levurage.

Cet auteur a également étudié la fraction cytoplasmique des levures par immunoelectrophorèse pour différencier des souches de *S. cerevisiae* et exploité les propriétés antigéniques des parois pour détecter par immunofluorescence des levures contaminantes en brasserie.

VEZINHET et LACROIX (1984) ont préconisé le marquage génétique des levures comme outil de contrôle des fermentations. Ce marquage consiste en l'acquisition de caractères aisément identifiables sur boîte de Pétri. Cette méthode est étudiée au stade pilote pour les contrôles de levurages industriels, mais elle ne peut être utilisée pour l'identification des levures responsables de fermentations spontanées.

Avec le développement de la génétique moléculaire, d'autres auteurs (HUDSPETH et *al.*, 1980; HWANG-LEE et *al.*, 1983) ont analysé les fragments de restriction de l'ADN mitochondrial (ADN mt) isolé de levures. L'intérêt de l'étude de l'ADN mt réside dans le fait qu'en dépit de sa variabilité génétique très grande, il demeure stable lors de la multiplication végétative d'une levure et peut donc être utilisé pour comparer des souches de nature différente. En employant le même type de technique, AIGLE et *al.*, (1984) puis LEE et *al.*, (1985) ont pu montrer l'identité des profils de restriction obtenus après digestion de l'ADN mt de levures de brasserie par plusieurs enzymes de restriction; ils ont pu noter des différences, entre ces levures d'une part, et des levures témoin d'autre part.

A ce jour, ces dernières techniques de génétique moléculaire n'ont pas été utilisées en œnologie. C'est la raison pour laquelle, au cours du travail qui suit, la méthode décrite par AIGLE et *al.*, (1984) a été appliquée à la caractérisation de levures de vinification. Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence les différences pouvant exister entre les profils de restriction données par des levures œnologiques, en culture pure.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — LES LEVURES

L'origine des souches levuriennes étudiées sont présentées dans le tableau I.

Ces levures ont été présélectionnées en fonction de leurs capacités fermentaires (production d'éthanol, tolérance à l'éthanol, adaptation à des températures basses ou élevées, absence de production d'hydrogène sulfuré, tolérance à l'anhydride sulfureux, phénotype Killer...) et aromatiques. Elles appartiennent toutes au genre *Saccharomyces* et sont cultivées dans un milieu YPD (yeast extract 10 g, peptone pancréatique 10 g, glucose 20 g, eau bidistillée q.s.p. 1 litre, stérilisé 30 minutes à 110°C).

II — TAMPONS

- Tampon SCE : sorbitol 1,2 M; citrate de sodium 0,1 M; EDTA 0,006 M; pH 7,0.
- Tampon de lyse : Tris-HCl 0,2; pH 8,0; EDTA 0,1 M; lauryl sarconisate de sodium 1,5 %; pH 8,0.
- Tampon de dialyse : Tris 0,01 M; EDTA 0,01 M; pH 8,0.
- Tampon T.E. : Tris 0,01 M; EDTA 0,01 M; pH 7,5.
- Tampon de charge : bleu de bromophénol 0,25 p. 100; saccharose 25 p. 100; Tris 0,01 M; EDTA 0,05 M; pH 8,0; conservé à + 4°C.
- Tampon T.B.E. : Tris 0,089 M; acide borique 0,089; EDTA 0,002 M; pH 0,8.
- T.E. RNase : RNase 10 g. l⁻¹, dans tampon T.E.
- Phénol saturé : phénol fraîchement distillé ramené à pH 7,5 et saturé par du tampon Tris HCl (0,01 M, pH 7,5).
- Enzymes de restriction : les tampons recommandés par les fournisseurs sont utilisés.

TABLEAU I
Souches levuriennes étudiées.

Souches	Origines géographiques	Organisme sélectionneur
L.L. (1)	Sèvre et Maine	I.T.V. Nantes
L.P. (1)	»	»
L.B. (1)	»	»
C.L. (1)	Coteau du Layon	»
S.M. (1)	Charentes	»
A.A. (1)	Graves	Institut d'Oenologie Bordeaux
A.B. (1)	»	»
C.B. (1)	»	»
C.C. (1)	»	»
F (2)	1 ^{ère} Côtes de Bordeaux	»
G.A. (2)	Médoc	»
G.B. (1)	»	»
H.A. (1)	»	»
H.B. (1)	»	»
EG8*	Alsace	INRA Colmar
CEG*	Champagne	Institut de Geisenheim

(1) Souches isolées de vins blancs.

(2) Souches isolées de vins rouges.

* Levures sèches actives commerciales.

III — LES MÉTHODES

1 - Stabilité des souches étudiées

Avant toute étude expérimentale les souches ont été subclonées. Les clones de chaque origine ont été conservés à -80°C dans un mélange de milieu YPD et de glycérol (75-25 p. 100).

2 - Extraction de l'ADN mitochondrial

La méthode de AIGLE et *al.*, (1984) est basée sur la séparation de l'ADN mitochondrial sur gradient de densité de chlorure de césium. Les levures possèdent un ADN mitochondrial (ADNmt) très particulier, caractérisé par une très haute teneur en paires de bases A-T (82 p. 100) (DUJON, 1981). L'utilisation d'un agent intercalant fluorescent (bisbenzimidazole : Hoechst n° 33258) à haute affinité pour les bases A-T, permet d'amplifier la différence de densité entre l'ADN mt et l'ADN nucléaire, opération indispensable pour une bonne séparation sur le gradient de chlorure de césium.

a) *Préparation des souches*

Si on ne dispose pas de quantité suffisante de levures, chaque souche est ensemencée dans 500 ml de milieu YPD, à une concentration telle qu'après une nuit de culture à 28°C on obtienne une biomasse d'environ 3 g de cellules. On peut également préparer l'ADN à partir de biomasse provenant directement de vins en fermentations.

Les culots de cellules sont récupérés par centrifugation pendant 10 minutes à 3000 rpm. Ils sont ensuite lavés à l'eau distillée (centrifugation 10 minutes à 3000 rpm), puis au tampon SCE contenant 5 µl/ml de 2-mercaptoéthanol (centrifugation 10 minutes à 3000 rpm).

b) *Préparation des protoplastes*

Chaque culot est remis en suspension dans 3 ml de tampon SCE par gramme de cellules. Les cellules sont traitées à 37°C avec une β 1, 3-glucanase afin de digérer leurs parois (exemple : la cytohélécasse IBF). La conversion en protoplastes est vérifiée par le test d'osmosensibilité suivant : un échantillon (100 µl) est dilué au 1/20 dans l'eau, ce qui entraîne une diminution de la densité optique à 600 nm due à la lyse des protoplastes (50 p. 100 après 30-60 mn). Les protoplastes sont alors lavés 3 fois dans 40 ml de tampon SCE (centrifugation 10 minutes à 3000 rpm).

c) *Préparation du lysat clair*

Chaque culot de protoplastes est alors remis en suspension dans 15 ml de tampon de lyse, et soumis à une agitation douce pendant une heure à température ambiante. Les lysats sont ensuite placés 10 minutes à + 4°C, puis clarifiés par centrifugation à 12.000 g pendant 30 minutes à + 4°C.

d) *Centrifugation*

A x ml de lysat clarifié sont ajoutés x g de chlorure de césium et 0,1 x ml d'une solution de bisbenzimidazole à 10 mg ml⁻¹. Après dissolution parfaite du chlorure de césium, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 10.000 g. Le surnageant clair est transvasé dans des tubes d'ultracentrifugation en polyallomère, puis centrifugé à 137.000 g à 18°C pendant 15 heures dans un rotor vertical.

e) *Extraction de l'ADN mitochondrial*

L'ultracentrifugation terminée, l'ADN mt et l'ADN nucléaire apparaissent sous la forme de 2 bandes fluorescentes visibles sous lumière UV. La bande supérieure d'ADN mt est récupérée à l'aide d'une seringue stérile.

f) *Purification de l'ADN mitochondrial*

La bisbenzimidazole est éliminée par lavage à l'isopropanol V/V (centrifugation pendant 5 minutes à 2000 rpm). Plusieurs lavages sont effectués jusqu'à ce que la phase supérieure (isopropanol) soit transparente sous la lumière UV.

Le chlorure de césium est éliminé de la phase inférieure contenant l'ADN mt, par trois dialyses d'une heure chacune contre 2 litres de tampon de dialyse.

L'ADN mt est précipité par addition de 1/5 volume d'acétate d'ammonium 10 M et de 3 volumes d'éthanol absolu. Après centrifugation (20 minutes, 10.000 rpm), les culots sont remis en suspension dans 1 ml de tampon T.E.

Plusieurs extractions par le phénol saturé (V/V) sont réalisées (centrifugation pendant 5 mn à 10.000 rpm) afin d'éliminer les protéines, lipides... contaminant l'ADN mt. La phase supérieure, contenant l'ADN mt est extraite à nouveau (V/V) par un mélange chloroforme-alcool isoamylique (24 V/1 V). L'ADN mt purifié est concentré par une nouvelle précipitation à l'éthanol-acétate d'ammonium, et remis en suspension dans 100 μ l de tampon T.E. après séchage sous une cloche à vide. Sa concentration est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose par comparaison avec un ADN témoin en quantité connue (MANIATIS *et al.*, 1982).

3 - Caractérisation de l'ADN mitochondrial

Elle s'effectue après une digestion par des endonucléases de restriction suivie d'une électrophorèse sur un gel horizontal d'agarose. On prépare tout d'abord une solution enzymatique contenant :

- tampon spécifique de l'enzyme 10 fois concentré : 6 μ l
- T.E. RNase : 6 μ l
- endonucléase de restriction (10 unités) : 1 à 3 μ l
- H₂O bidistillée stérile q.s.p. 50 μ l

A cette solution, on ajoute 10 μ l d'eau distillée stérile contenant environ 250 g d'ADN mt.

Les essais sont incubés à 37°C pendant une nuit. Ils sont ensuite précipités à l'éthanol-acétate d'ammonium et centrifugés. Les culots sont repris dans 10 μ l de tampon T.E. Après addition de 2 μ l de tampon de charge, ils sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes.

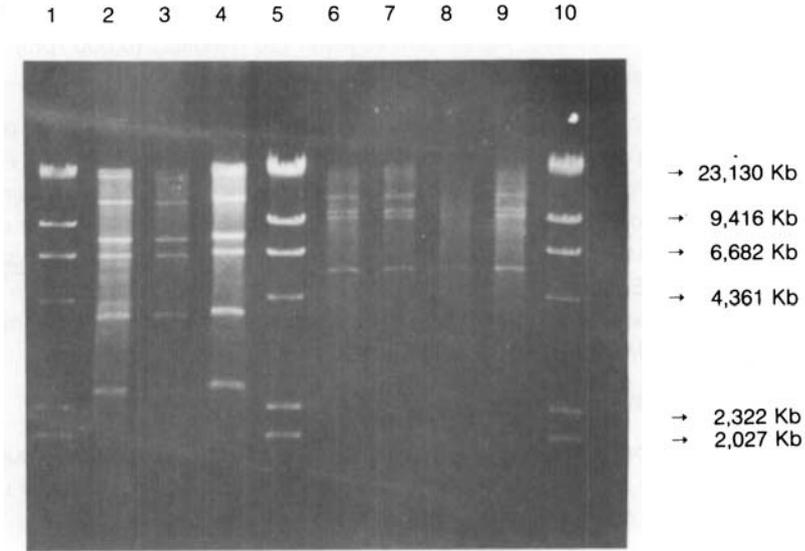
Les essais sont déposés dans les fentes d'un gel horizontal d'agarose à 0,75 p. 100 contenant 1 μ g. ml⁻¹ de bromure d'éthidium. Le tampon de migration est constitué par le tampon T.E.B. auquel il est ajouté 1 μ g. ml⁻¹ de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est menée sous une tension de 150 volts jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait migré à l'extrémité positive du gel. La migration terminée, le gel est observé sous lumière UV et photographié.

L'ADN du phage λ (0,05 μ g. μ l⁻¹) digéré par Hind III et celui du phage \varnothing x 174 (0,05 μ g. μ l⁻¹) digéré par Hae III, ont servi de marqueurs de poids moléculaires.

RÉSULTATS

I — ÉTUDE DE SOUCHES INDUSTRIELLES (LSA)

Deux levures sèches actives d'origines différentes (EG8 et CEG voir tableau I) ont été analysées. Les levures ont été subclonées à partir d'un conditionnement commercial et trois ou quatre subclones ont été étudiés. Les résultats sont donnés figure 1.



Pistes 1,5,10 : ADN du bactériophage Lambda coupé par Hind III;
 Pistes : 2, 3, 4 : Souche CEG;
 Pistes : 6, 7, 8, 9 : Souche EG8;

Fig. 1. — Profil de restriction d'ADN mitochondriaux des souches CEG et EG8.

1 - Analyse de la souche CEG

La digestion de l'ADN mt par l'enzyme EcoR1 suivie de l'électrophorèse donne une série de bandes (colonne 2). Elles correspondent à des fragments d'ADN spécifiques dont la taille peut être calculée par rapport au standard (colonne 1,5, 10). La combinaison entre le nombre de bandes et leur taille définit le «profil de restriction» de l'ADN mt de la souche.

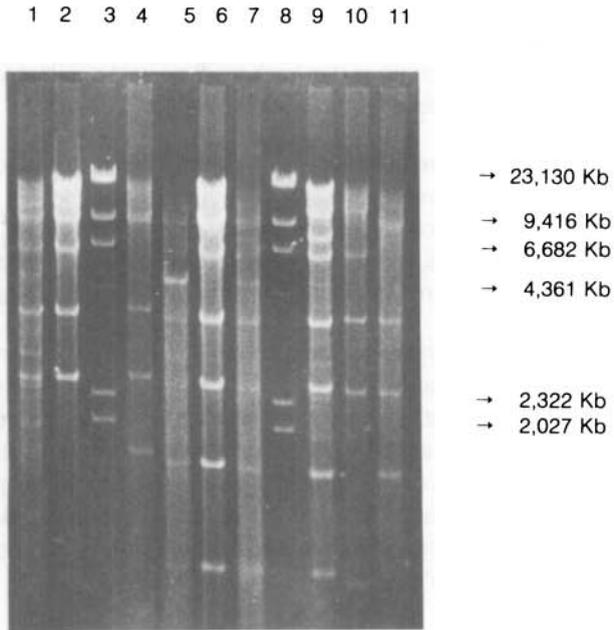
La reproductibilité de la méthode est montrée par les résultats obtenus dans les colonnes 2, 3 et 4. Il est clair que seuls des échantillons contenant la même quantité d'ADN sont comparables. Par exemple sur la colonne 3 où la quantité d'ADN déposée est insuffisante, la bande n° 7 est à peine visible.

2 - Comparaison des profils de EG8 et CEG

Le profil de restriction obtenu pour EG8 (colonne 6 à 9) est très différent de celui de CEG. Il est également reproductible pour les subclones d'une même souche dans la mesure où les échantillons contiennent une quantité équivalente d'ADN (colonnes 6, 7 et 9).

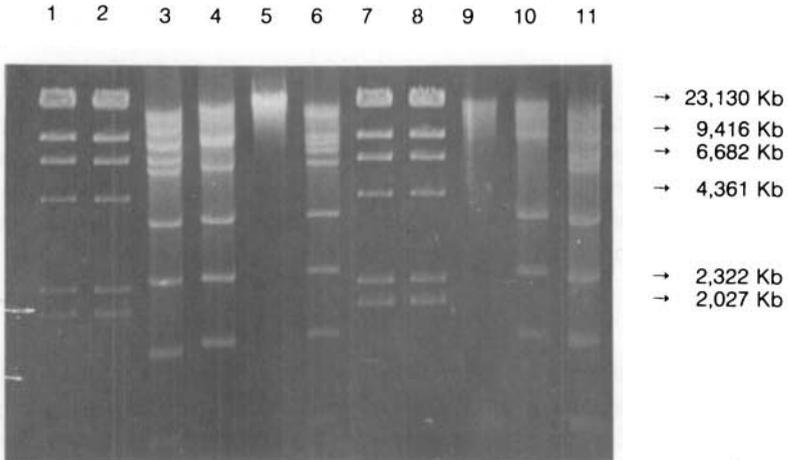
Le fait que le profil de EG8 contienne beaucoup moins de bandes nécessite un commentaire particulier.

L'ADN mt de *S. cerevisiae* est une molécule circulaire d'environ 75.000 paires de bases (75 Kb) (DUJON 1981). Si cette molécule est coupée en plusieurs endroits par une enzyme comme EcoR1, la somme des longueurs des différents fragments obtenus



Pistes 3, 8 : ADN du bactériophage Lambda digéré par Hind III ;
Pistes 1 : souche LL0 ; 2 : souche LL2 ; 4 : souche LL3 ; 5 : souche LP4 ; 6 : souche LP6 ;
7 : souche LB1 ; 9 : souche LB7 ; 10 : souche CL833 ; 11 : souche SM102.

Fig. 2. — Profils de restriction d'ADN mitochondriaux de plusieurs souches du Pays Nantais, des Coteaux du Layon et des Charentes.



Pistes 1, 2, 7, 8 : ADN du bactériophage Lambda digéré par Hind III ;
Pistes 3 : souche AB1 ; 4 : souche CB5 ; 5 : souche CC1, non digéré ; 6 : souche CC1 ;
9 : souche F5, non digéré ; 10 : souche F5 ; 11 : souche HA7.

Fig. 3. — Profils de restriction d'ADN mitochondriaux de plusieurs souches du Bordelais.

nus devrait théoriquement être environ 75 Kb. C'est le cas pour la souche CEG mais pas pour EG8 où l'on obtient beaucoup moins (43 Kb). Ceci peut s'expliquer simplement en considérant que la technique d'extraction ne permet pas d'obtenir des molécules intactes, mais des fragments aléatoires.

Si les deux sites de coupure par EcoR1 sont proches, la probabilité de trouver ces deux points sur le même fragment aléatoire est grande. On obtiendra donc grande quantité de fragments de restriction (cas des bandes entre 1 et 15 Kb ici). Par contre, si les deux sites sont très éloignés, la probabilité de trouver un morceau intact est faible. Il en résulte que les grands fragments de restriction seront absents sur le profil.

Une observation supplémentaire appuie ce raisonnement. Si on compare la colonne 2, par exemple, au standard colonne 1, le profil d'ADN mt présente un fond de fluorescence absent chez le standard. Ceci est sans doute dû aux nombreux morceaux d'ADN générés par le fractionnement aléatoire lors de la préparation, recoupés ou non par EcoRI. Dans le cas de EG 8, des fragments de ce type sont présents dans la zone de grande taille et en particulier supérieurs à la plus grande bande visible sur la colonne 7 par exemple. Ceci suggère qu'il existe sans doute un fragment de grande taille (supérieur à 30 Kb) qui n'a pu être mis en évidence ici.

De cette première analyse, il résulte donc que, dans les limites de validité du système (charge équivalente et taille comprise entre 1 et 20 kb environ), les profils sont reproductibles et nettement différents d'une souche à l'autre.

2 - Étude de souches indigènes

Afin de tester l'étendue des variations de profils de différentes souches, des analyses ont été effectuées sur une vingtaine de souches isolées de différents vignobles (voir tableau I). Quelques exemples sont donnés figures 2 et 3. Les profils schématisés sont rassemblés figure 4.

L'observation de ces résultats montre que la grande majorité des souches présente des profils différents. Quelques souches, originaires des mêmes cuves (LP4 et LP6, AB2 et AB4) présentent un profil identique. Il est possible qu'il s'agisse en fait de subclones d'une même souche. Enfin deux souches d'origines géographiques différentes (LP4 et LB1) montrent un profil équivalent (voir discussion).

DISCUSSION

Les résultats présentés ci-dessus montrent que chaque souche de levure peut être caractérisée par le profil de restriction de son ADN mt. La seule exception que nous ayons observée (LP4 et LB1) peut être due à un problème de sensibilité. En effet, l'utilisation exclusive de l'enzyme EcoR1 ne permet de générer que peu de bandes (entre 4 et 10). Des analyses avec d'autres enzymes aboutissant à un nombre de bandes supérieur devraient augmenter la sensibilité de ce test. Des résultats préliminaires indiquent que c'est bien le cas.

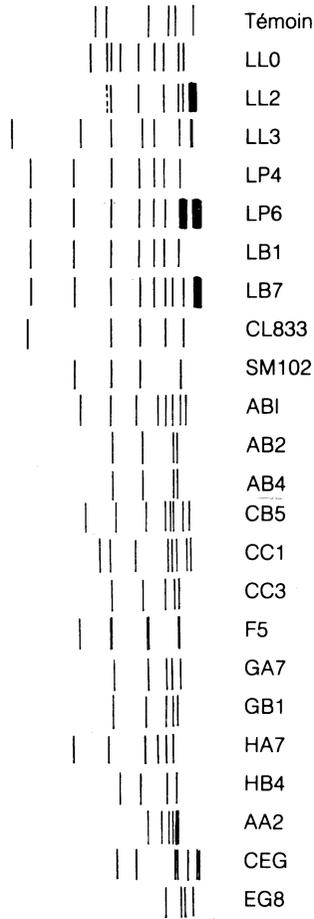


Fig. 4. — Diagramme électrophorétique des ADN mt de plusieurs souches, digérés par EcoR1.

Il en résulte que chaque souche peut être identifiée par le profil de restriction de son ADN mt, qui lui est propre. Cette méthode présente certains avantages par rapport aux techniques actuelles (voir introduction) :

- elle ne nécessite aucun marquage des souches
- l'analyse peut se faire directement sur la biomasse, sans subclonage ni préculture
- les résultats sont indépendants des conditions de culture

Ces avantages s'accompagnent cependant de quelques contraintes qui limitent l'utilisation de cette méthode aux laboratoires spécialisés possédant un matériel adapté et un personnel qualifié. En effet certaines étapes de la préparation demandent beaucoup de soins :

- ultracentrifugation
- prélèvement de l'ADN mt
- purification de cet ADN
- digestion et électrophorèse

L'ensemble constitue une manipulation qui s'étend sur 4 jours environ.

A ce stade de l'étude, il apparaît donc qu'une optimisation doit être effectuée pour augmenter la sensibilité de la méthode et la simplifier.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La possibilité d'identifier sans ambiguïté les différentes souches de levure pourrait aider la maîtrise du levurage à différentes étapes du procédé.

Lors de la fabrication des levures sèches actives, le contrôle sur les lots devrait permettre d'éviter les erreurs et de résoudre des problèmes de qualité. Par exemple, si plusieurs lots ont un comportement très différent, il sera possible de vérifier s'il s'agit véritablement de la même souche.

Lors de la commercialisation, l'identification des produits pourra amener une clarification d'un marché où la sous-traitance augmente les risques d'erreur ou de redondance des souches.

Lors du levurage, enfin, l'analyse de la biomasse au cours de la fermentation ou à la fin de celle-ci donnera sans doute des indications sur l'implantation de la souche utilisée. Cette analyse est particulièrement importante lors des essais de nouvelles souches. La sensibilité d'une telle analyse reste à établir.

Sur le plan de l'écologie de la microflore, l'étude des souches indigènes montre une surprenante variété (voir figure 4). Presque toutes les souches sont différentes. Ceci permet de reposer la question des «souches de terroir» en termes plus précis.

Les réponses à de telles questions pourront influencer sur les stratégies de sélection et les techniques de levurage.

Une fermentation alcoolique spontanée est-elle réalisée par une souche prédominante ou un mélange de nombreuses souches ?

La répartition des souches est-elle identique dans les récipients d'un même chai ?

Y-a-t-il une stabilité de la population des levures indigènes d'un même chai d'un millésime à l'autre ?

Manuscrit reçu le 3 décembre 1987 ; accepté pour publication le 17 décembre 1987.

Remerciements

Les auteurs remercient Ph. DARRIET et Ph. NEUVILLE, qui ont effectué les analyses sur les souches industrielles, et A. POULARD, qui a sélectionné les souches de la région nantaise.

RÉSUMÉ

L'analyse des profils de restriction de l'ADN mitochondrial des levures permet une caractérisation fine des souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette analyse a été appliquée à deux souches de levures sèches actives et à une vingtaine de souches indigènes, isolées de différents moûts lors de la fermentation spontanée.

Les profils de restriction de l'ADN mt des souches étudiées présentent une grande diversité.

La méthode mise en œuvre est décrite de façon détaillée et les applications pratiques discutées.

SUMMARY

The analysis of restriction patterns from yeast's mitochondrial DNA leads to a fine characterization of different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. This analysis has been applied to two commercial strains and to twenty wild yeasts, isolated from different musts in case of natural fermentations.

The DNA restriction patterns of the strains studied present a wide diversity.

The method we used is minutely described and the practical applications are discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

Die analyse der Restriktionsprofile des mitochondrialen DNS's der Hefen erlaubt eine feine Charakterisierung der *Saccharomyces cerevisiae* - Stämme.

Diese Untersuchung wurde bei zwei aktiven Trockenhefen und bei etwa 20 wilden Stämmen, die aus spontan gärenden Mosten isoliert wurden, durchgeführt.

Die Restriktionsprofile des mitochondrialen DNS's der untersuchten Stämme zeigt eine große Diversität auf.

Die angewandte Methode wird ausführlich beschrieben und die praktischen Anwendungen werden diskutiert.

RESUMEN

El análisis de los perfiles de restricción del ADN mitocondrial (ADN mt) de las levaduras permite una caracterización fina de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Este análisis a sido aplicado a dos cepas de levaduras secas activas y a veinte cepas de levaduras salvajes, aisladas de diferentes mostos durante fermentaciones naturales.

Los perfiles de restricción del ADN mt de las cepas estudiadas presentan una grande diversidad.

El método utilizado esta describo con muchos detalles y las aplicaciones prácticas discutadas.

RIASSUNTO

L'analisi dei profili di restrizione dell'ADN mitocondriale dei lieviti permette una caratterizzazione minuta dei ceppi di *Saccharomyces Cerevisiae*. Quest's analisi é stata applicata a due ceppi di lieviti secchi attivi e ad una ventina di ceppi indigeni isolati in differenti mosti durante la fermentazione spontanea.

Il profili di restrizione dell'ADN mitocondriale dei ceppi studiati presentano una grande diversità.

Il metodo adoperato é descritto di modo particolareggiato e le applicazioni pratiche commentate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AIGLE M., ERBS D. et MOLL M., 1984. «Some Molecular structures in the Genome of Lager Brewing Yeast». *Am. Soc. of Brewing Chemists*, **42**, N° 1, 1-7.
- BOUIX M., 1979. «L'électrophorèse, l'immunoélectrophorèse et l'immunofluorescence appliquées à la différenciation fine et rapide des levures. Applications à l'œnologie et à la brasserie». Thèse de Docteur-Ingénieur, E.N.S.I.A.A.
- DUJON B. in STRATHERN J.N., JONES E.W. et BROACHE J.R., 1981. «Mitochondrial Genetics and Functions». The molecular biology of yeast Saccharomyces. Cold Spring Harbor Laboratory; 505-605.
- HUDSPETH M., SHUMARD D. et TATTI K., 1980. «Rapid purification of yeast mitochondrial DNA in high Yield». *Biochemica et Biophysica Acta*, **610**, 221-228.
- HWANG-LEE L., BLAMIRE J., COTTREL S.F., 1983. «A rapid procedure for the isolation of yeast mitochondrial DNA suitable for restriction fragment analysis». *Analytical Biochemistry*, **128**, N° 1, 47-53.
- LEE S.Y., KNUDSEN F.B. et POYTON R.O., 1985. «Differentiation of Brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA». *Journal of the Institute of Brewing*, **91**, N° 3, 169-173.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F. et SAMBROOK J., 1982. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- VEZINHET F. et LACROIX S., 1984. «Marquage génétique des levures : outil de contrôle des fermentations en souche pure». *Bull. O.I.V.*, **57**, 759-773.