Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 1996, **30**, N°1, 15-21

DÉLIMITATION GÉNÉTIQUE DES ESPÈCES *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET *SACCHAROMYCES BAYANUS* PAR L'ANALYSE PCR/RFLP DU GÈNE *MET2*

GENETIC DETERMINATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ET *SACCHAROMYCES BAYANUS* SPECIES BY PCR/RFLP ANALYSIS OF THE *MET2* GENE

Isabelle MASNEUF* et (1), M. AIGLE** et D. DUBOURDIEU*

*Faculté d'Œnologie de Bordeaux, Université de Bordeaux II,
351, cours de la Libération, 33400 Talence (France)
**Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire,
1, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux (France)

Résumé : Plusieurs souches de levures, rattachées aux espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* par les expériences d'hybridation et les mesures du pourcentage d'homologie ADN/ADN sont caractérisées par la technique Réaction de Polymérisation en Chaîne/ Polymorphisme de Taille des Fragments de Restriction (PCR/RFLP) du gène *MET2*. La concordance entre les résultats de cette technique et ceux des analyses de la génétique classique ne présente aucune exception pour l'ensemble des souches analysées. Les souches œnologiques races *bayanus*, *chevalieri* et *capensis* donnent un profil de restriction caractéristique de l'espèce *S. cerevisiae* tandis que la plupart des souches *uvarum* appartiennent à l'espèce *S. bayanus*. Les œnologues devraient renoncer à utiliser le terme *bayanus* pour désigner les souches Gal- de *S. cerevisiae* et considérer que *S. bayanus* constitue une espèce distincte de *S. cerevisiae*.

Abstract : Several yeast strains of the species *S. cerevisiae*, *S. bayanus* and *S. paradoxus*, first identified by hybridization experiments and DNA/DNA hybridization were characterized by using Polymerase Chain Reaction/ Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR/RFLP) of the *MET2* gene. The concordance between this tool and classical genetic analyses did not reveal any exception for all the strains analysed, so PCR/RFLP of the *MET2* gene proves to be a reliable and fast tool for delimiting *S. cerevisiae* and *S. bayanus*. Œnological strains race *bayanus*, *chevalieri*, *capensis* gave *S. cerevisiae* restriction patterns, whereas most of strains race *S. uvarum* belong to *S. bayanus* and displayed a specific chromosomal band patterns different from band patterns of *S. cerevisiae* strains. To avoid confusion in œnological terminology, œnologists should no longer use the name of *bayanus* to designate industrial or wild *S. cerevisiae* Gal- strains, and should consider *S. bayanus* as a distinct species.

Mots clés : Taxonomie moléculaire, *Saccharomyces cerevisiae, S. bayanus,* PCR/RFLP, caryotypes

Key words : Molecular taxonomy, *Saccharomyces cerevisiae, S. bayanus,* PCR/RFLP, electrophoretic karyotype

INTRODUCTION

Depuis une dizaine d'années, la caractérisation génétique des souches de levures de vinification a beaucoup progressé par l'application de différentes techniques issues de la biologie moléculaire : l'analyse du polymorphisme de taille des fragments de restriction (RFLP) de l'ADN mitochondrial (DUBOURDIEU et *al.*, 1987 ; HALLET et *al.*, 1988 ; VEZINHET et *al.*, 1990) et de l'ADN génomique à l'aide de sondes nucléaires spécifiques (DEGRE et *al.*, 1989), l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé (VEZINHET et *al.*, 1990 ; FREZIER et DUBOURDIEU, 1992) et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (NESS et *al.*, 1993 ; LIECKFELD et *al.*, 1993). Ces méthodes, initialement développées pour différencier les souches de *S. cerevisiae* sont actuellement utilisées pour délimiter les 4 espèces du genre *Saccharomyces sensu stricto* (VAUGHAN-MARTINI et *al.*, 1993 ; GUILLAMON et *al.*, 1994) : *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus* et *Saccharomyces pastorianus* que seules jusqu'ici les expériences d'hybridation et les mesures du pourcentage d'homologie ADN/ADN permettaient de distinguer (VAUGHAN-MARTINI et KURTZMAN, 1985 ; VAUGHAN-MARTINI et MARTINI, 1987 ; NAUMOV, 1987 ; BANNO et KANEKO, 1988).

(1) Chargée de recherches SARCO, détachée à la Faculté d'Œnologie

Les levures de vinification appartiennent à un petit nombre d'espèces ou de races. Les œnologues utilisent pour les désigner, d'après la nomenclature de YARROW (1984) les noms de variétés *cerevisiae*, *bayanus*, *uvarum*, *chevalieri*, *capensis*, etc., établis d'après les tests de fermentation et d'assimilation de différents substrats, accolés au nom de l'espèce *S. cerevisiae*. Cependant, cette désignation n'est plus en accord avec la récente classification de BARNETT et *al.* (1990) qui distingue dans le genre *Saccharomyces*, 10 espèces parmi lesquelles *S. cerevisiae* et *S. bayanus*. Ainsi, le terme *bayanus* est utilisé pour désigner une race physiologique de *S. cerevisiae* par les œnologues, alors que pour les taxonomistes *S. bayanus* constitue une espèce distincte de *S. cerevisiae*.

En 1993, NAUMOV et *al.* montrent que la plupart des souches de levures de vinification, fermentant le mélibiose (Mel+) et classées comme *S. cerevisiae* var. *uvarum* dans la classification de YARROW (1984), appartiennent à l'espèce *S. bayanus*, mais que quelques souches Mel+ sont dans l'espèce *S. cerevisiae*. De plus, selon ces auteurs, *S. bayanus* possède un caryotype facilement discernable de celui de *S. cerevisiae*. Dans une étude récente sur l'origine phylogénique de *S. carlsbergensis*, l'utilisation de la technique PCR-RFLP du gène *MET2* est proposée pour différencier *S. cerevisiae* de *S. bayanus* (HANSEN et KIELLAND-BRANDT, 1994).

Notre travail se propose de vérifier la concordance des tests d'hybridation et de la technique PCR/RFLP du gène *MET2* pour délimiter les espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* et d'appliquer cette même technique à la caractérisation d'un grand nombre de souches de levures de vinification.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I — SOUCHES DE LEVURES

Les souches de levures de référence *S. cerevisiae* CBS 5287=VKM Y-502 et MUCL 27831, *S. bayanus* VKM Y-1146, *S. italicus* CBS 459, *S. chevalieri* CBS 400 et *S. capensis* MUCL 27830 sont utilisées. Les souches de levures issues de la Collection de Levure d'Intérêt Biotechnologique (C.L.I.B.) sont sous forme de clones monosporiques. Les levures industrielles ou indigènes utilisées proviennent de la collection de la Faculté d'Œnologie de Bordeaux.

II — OLIGONUCLÉOTIDES

Les oligonucléotides amorces utilisés pour amplifier le gène *MET2* sont ceux décrits par HANSEN et KIELLAND-BRANDT (1994). L'oligonucléotide 1 a pour séquence 5'- CGAAAACGCTCCAAGAGCTGG et l'oligonucléotide 2 a pour séquence 5'-GACCACGATATGCACCAGGCAG.

III — CONDITIONS D'AMPLIFICATION

La réaction d'amplification est réalisée directement sur levures entières, après croissance sur milieu solide (YPG + agar) jusqu'à la phase stationnaire (MASNEUF et DUBOURDIEU, 1994). Après deux lavages successifs, les cellules sont maintenues pendant 10 min à 95°C.

Les cycles d'amplification sont réalisés par un automate, DNA Thermal Thermocycler 480, Perkin Elmer. Le volume réactionnel final 100 µl contient 2 à 4.10^6 cellules/ml, 100 pmol de chaque oligonucléotide, 10 µl de tampon 10X C APPLIGENE (concentration finale en $MgCl_2$ 1,5mM) fourni avec l'enzyme, 200 µM de chaque dNTP et 2 unités de Taq DNA polymérase fournie par Appligene. Les 30 cycles d'amplification sont réalisés suivant le programme suivant : dénaturation à 95°C pendant 30 s, hybridation à 60°C pendant 30 s, élongation à 72°C pendant 2 min.

Les produits d'amplification sont précipités et un aliquote est digéré par des enzymes de restriction. Les fragments, directement après amplification et après digestion sont analysés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 1,8 p. cent, en présence de bromure d'éthidium. L'ADN visualisé sous UV à 524 nm est photographié (film Polaroid négatif, type 665). Le marqueur de taille utilisé est le marqueur VIII de Boerhinger Mannheim.

IV — ELECTROPHORÈSE À CHAMP PULSÉ

Les chromosomes sont préparés dans des blocs d'agarose (BELLIS et *al.*, 1987) et analysés dans un gel à 0,8 p. cent, à voltage constant 165 volts, à la température 10°C, par un appareil CHEF-DRII, BIORAD, selon la programmation suivante (FREZIER et DUBOURDIEU, 1992) :

- pulse de 40 à 90 s pendant 12,5 h
- pulse de 80 à 120 s pendant 26,5 h

RÉSULTATS

Dans un premier travail, HANSEN et KIELLAND-BRANDT (1994) ont étudié les souches suivantes : *S. cerevisiae* S288C, *S. bayanus* CBS 380 et *S. uvarum* CBS 395. Nous avons étendu cette analyse PCR-RFLP du gène *MET2* à des souches Mel+ (ex. *uvarum*) déjà identifiées *S. cerevisiae* et

MOV et *al.*, 1993). Les souches analysées sont regroupées dans le tableau I.

Nous utilisons l'enzyme *Pst*I en complément de *Eco*RI, car *S. bayanus* possède un site de coupure *Pst*I dans la séquence du gène *MET2*, qui n'existe pas dans la séquence *MET2* de *S. cerevisiae*.

Une partie des résultats obtenus est présentée sur les figures 1a et 1b correspondant respectivement à l'utilisation des enzymes *Eco*RI et *Pst*I. Ont été analysées deux souches de référence *S. cerevisiae* VKM Y-502 (piste 8) et *S. bayanus* VKM Y-1146 (piste 9) et 7 levures œnologiques Mel+ désignées *S. uvarum* selon la classification de YARROW (1984) (pistes 1 à 7). Parmi ces souches, 5 ont été classées comme *S. bayanus* (piste 1 à 5) et 2 comme *S. cerevisiae* (piste 6 et 7) par les tests d'hybridation (NAUMOV et *al.*, 1993). Pour les 2 enzymes de restriction utilisées, les profils de restriction 1 à 5 sont identiques à celui de la piste 9 (*S. bayanus* de référence) et le profil de restriction des pistes 6 et 7 à celui de la piste 8 (*S. cerevisiae* de référence). Autrement dit, nous vérifions bien que *Eco*RI coupe l'amplifiat du gène *MET2* des *S. cerevisiae* (deux bandes à 219 pb et 369 pb) et ne coupe pas l'amplifiat du gène *MET2* des *S. bayanus*. Le comportement de *Pst*I est strictement inverse, puisque cette enzyme coupe le fragment *MET2* de *S. bayanus* (deux bandes à 215 pb et 365 pb) mais pas celui de *S. cerevisiae*.

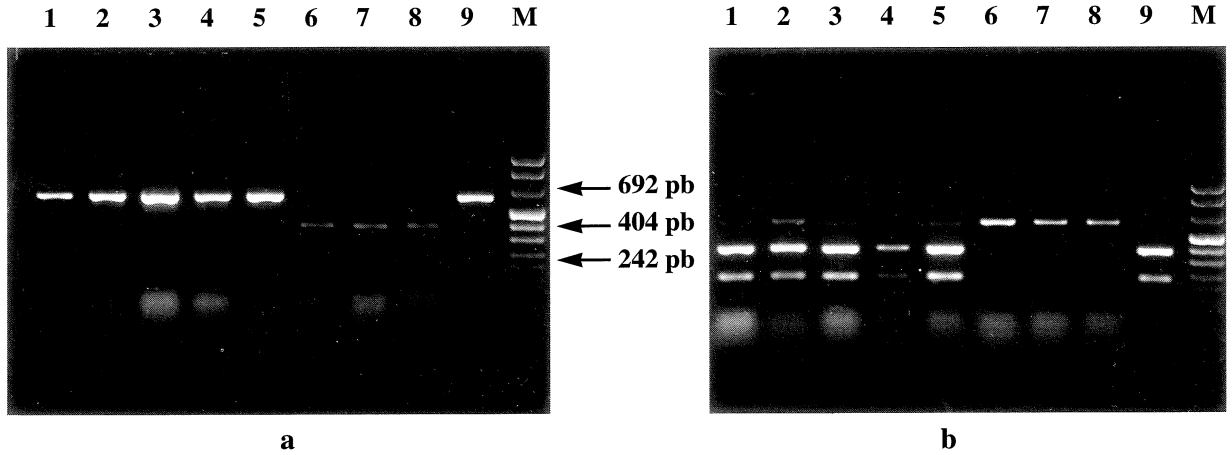


Fig. 1a et 1b — Electrophorèse en gel d'agarose à 1,8 p. cent des fragments de restriction de l'amplifiat du gène *MET2* des souches de levures Mel+ étudiées par NAUMOV et *al.* (1993). Restriction par *Eco*RI (a) et *Pst*I (b)

Piste 1 : *S. bayanus* SCU 11 - Piste 2 : *S. bayanus* SCU 13 - Piste 3 : *S. Bayanus* SCU 73 - Piste 4 : *S. bayanus* L 19
Piste 5 : *S. Bayanus* L490 - Piste 6 : *S. cerevisiae* L 579 - Piste 7 : *S. cerevisiae* L1425 - Piste 8 : *S. cerevisiae* VKm Y-502
Piste 9 : *S. bayanus* VKM Y-1146 - M : marqueur de poids moléculaire

TABLEAU I

Délimitation des espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* par les techniques d'hybridation et PCR/RFLP du gène *MET2* (R : souche de référence)

Souches	Tests d'hybridation	Tests PCR-RFLP
CLIB 219:VKM Y-502 R	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*
CLIB 218:VKM Y-1146 R	*S. bayanus*	*S. bayanus*
58 I	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 101:SCU 11	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 103:SCU 74	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 102:SCU 13	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 108: L 19	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 109:L 99	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 110:L 490	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 113:DBVPG 1642	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 114:DBVPG 1643	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 115:DBVPG 1689	*S. bayanus*	*S. bayanus*
CLIB 94:L 579	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*
CLIB 95:L 1425	*S. cerevisiae*	*S. cerevisiae*

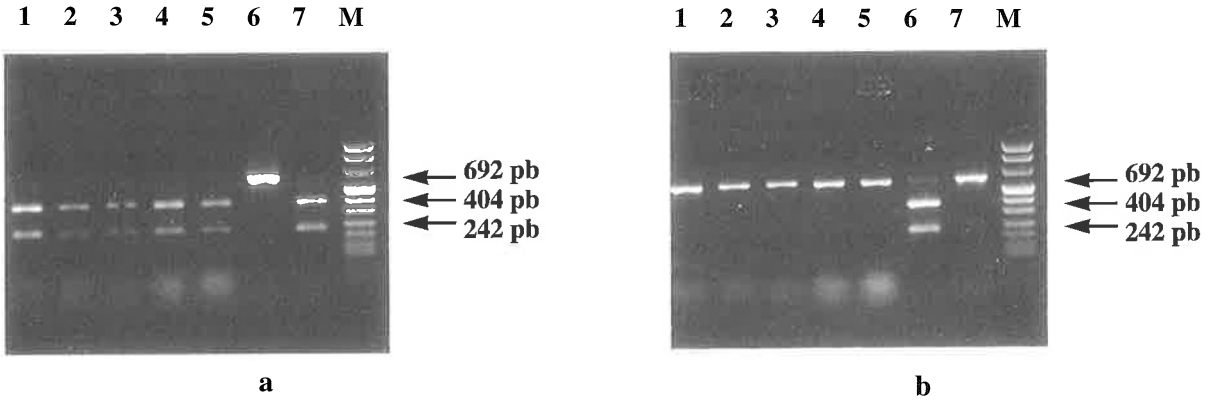


Fig. 2a et 2b — Electrophorèse en gel d'agarose des fragments de restriction de l'amplifiat du gène *MET2* de souches de levures industrielles. a : restriction par *Eco*RI - b : restriction par *Pst*I

Piste 1 : F10 - Piste 2 : Kd - Piste 3 : BO213 - Piste 4 : DV10 - Piste 5 : QA23 - Piste 6 : *S. bayanus* VKM Y-1146
Piste 7 : *S. cerevisiae* VKM Y-502 - M : marqueur de poids moléculaire

La comparaison complète des résultats obtenus par les tests d'hybridation (NAUMOV et *al.*, 1993) et la technique PCR-RFLP du gène *MET2* pour l'ensemble des souches analysées est présentée dans le tableau I. La concordance de ces deux méthodes pour la délimitation des espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* ne présente aucune exception pour les 14 souches analysées.

Nous avons ensuite analysé, par la même technique, 17 souches industrielles commercialisées sous la forme de Levures Sèches Actives, appartenant à l'espèce *S. cerevisiae*, 4 fermentant le galactose (Gal+) et 13 ne fermentant pas le galactose (Gal-). Les désignations œnologiques usuelles de ces deux catégories étant *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* (Gal+) et *S. cerevisiae* var. *bayanus* (Gal-). L'ensemble des résultats est présenté tableau II. Toutes ces souches, Gal+ ou Gal- présentent un profil de restriction *Eco*RI et *Pst*I de l'amplifiat du gène *MET2* caractéristique de l'espèce *S. cerevisiae* (figures 2a et 2b et tableau II).

Nous avons également analysé un grand nombre de souches de vinification sauvages isolées de fermentations spontanées (8 souches Gal+, 45 souches Gal-, 25 souches Mel+, 2 souches *capensis*, Gal- et Mal- (ne fermentant pas le maltose), 3 souches *chevalieri*, Gal+ et Mal- et une souche *italicus*). Les profils de restriction par *Eco*RI, *Mae*III et *Pst*I de l'amplifiat du gène *MET2* sont caractéristiques de *S. cerevisiae* (tableau III). En revanche la majorité des souches Mel+ désignées *uvarum* (22 souches/25) donnent des profils de restriction caractéristiques de l'espèce *S. bayanus*. Trois souches, cependant doivent être rattachées à l'espèce *S. cerevisiae* (tableau III).

Dans des travaux antérieurs, de nombreux auteurs ont montré que l'analyse des caryotypes par électrophorèse en champ pulsé permettait de différencier certaines espèces appartenant au genre *Saccharomyces sensu stricto* (CARDINALLI et MARTINI, 1994) et notamment les espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* (NAUMOV et *al.*, 1993 ; KISHIMOTO et GOTO, 1995). L'analyse des caryotypes des souches de levures de vinification étudiées dans ce travail par électrophorèse en champ pulsé confirment les résultats obtenus par la technique PCR/RFLP du gène *MET2*. Les souches rattachées à l'espèce *S. bayanus* par cette technique présentent des caryotypes identiques entre eux mais différents de ceux des souches rattachées à l'espèce *S. cerevisiae* (figure 3).

TABLEAU II

Souches œnologiques industrielles de *Saccharomyces* analysées dans ce travail par PCR/RFLP du gène *MET2*

Souches	Désignation œnologique	Espèces
VL1 VL3c 71B WET136	*cerevisiae*	*S. cerevisiae*
VL3a F10 Kd BO213 CH 158 N96 Vin13 QA23 IOC O16 SB1 CEG DV10	*bayanus*	*S. cerevisiae*

TABLEAU III

Souches œnologiques indigènes de *Saccharomyces* analysées dans ce travail

Souches	Désignation œnologique	Espèce*
YIId2 YIId11 TbIVd10 TbIVd11 TbIVd13 TbIVd15 TbIVd17 YIId1	*cerevisiae*	*S. cerevisiae*
ChIb20 ChIb25 Tb3IIb4 Tb3IIb5 Tb3IIb23 Tb3IIb28 Tb3IVd10 Tb3IVd15 YIId3 YIId4 YIId8 7665 BA N15 NC MC1 IF BRY265 RW7 CVC BTV 1 S6 Penedes 86 BO7 76D CIVC A47DO8 Avize Strecker 2	*bayanus*	*S. cerevisiae*
Penedos 29 CVC 13.5 NC MC1	*bayanus*	*S. cerevisiae*
T73C Epernay-Freiburg RW3 NCYC 361 T73D California Champagne Solvino Reviver Condessa EC IF Klosteinerberg BA	*bayanus*	*S. cerevisiae*
Tb3IVc22	*capensis*	*S. cerevisiae*
Tmsp21	*chevalieri*	*S. cerevisiae*
Tmsp2	*chevalieri*	*S. cerevisiae*
Tb3IIb13 Tb3IId30 Tb3IIc3 Tb3IVc28 Tb3IIb14 Tb3IVd16 Tb3IVd9 TbIIb20 TbIIb27 YIIc2 YIIc27 VS2 VS6 VS10 VS19 PJS1 PJS5 PJS6 PJS9 PJP1 PJP2 Sμ1	*uvarum*	*S. bayanus*
34/70 L 1617 Tb3IVc16	*uvarum*	*S. cerevisiae*

*déterminée par PCR/RFLP du gène *MET2*

TABLEAU IV

Fréquence d'apparition des espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* dans les prélèvements réalisés dans la région du Val de Loire (en pourcentage)

	Prélèvement I	Prélèvement II	Prélèvement III
S. cerevisiae	80	35	—
S. bayanus	20	50	100
Hanseniaspora uvarum	—	15	—

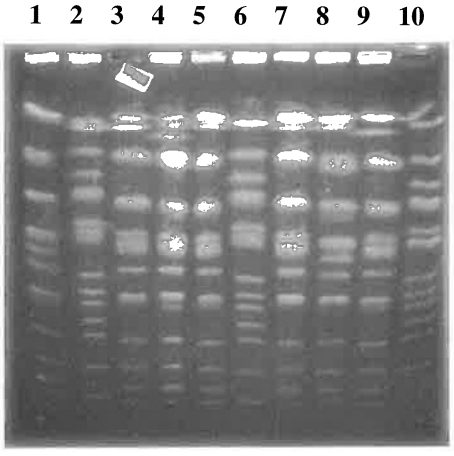


Fig. 3 — Caryotypes de souches indigènes de *S. cerevisiae* et *S. bayanus*

Pistes 1, 3, 4, 7, 8, 9 : *S. cerevisiae* - Pistes 2, 6, 10 : *S. Bayanus*

La première application de la technique PCR/RFLP pour étudier l'écologie des souches œnologiques de *Saccharomyces* nous a permis de mettre en évidence la présence de souches fermentaires appartenant à l'espèce *S. bayanus* dans des prélèvements de moûts réalisés à mi-fermentation. Cette espèce est présente de façon minoritaire dans la région bordelaise (4 p. cent à 10 p. cent des colonies analysées). En revanche, les analyses réalisées dans des prélèvements issus de la région du Val de Loire mettent en évidence la présence parfois majoritaire de souches appartenant à l'espèce *S. bayanus* (tableau IV).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Longues et délicates à mettre en œuvre, les techniques d'hybridation de la génétique classique, ADN/ADN ou spores à spores sont difficilement applicables à la délimitation rapide des espèces de levures de vinification.

En revanche, la technique PCR/RFLP du gène *MET2* présente l'avantage d'être simple et rapide à mettre en œuvre. L'amplification directe sur levures entières et l'utilisation de l'endonucléase de restriction *Pst*I nous ont permis de l'optimiser pour caractériser les espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus*. Les résultats obtenus sont parfaitement cohérents avec ceux des tests d'hybridation. Ils sont également en accord avec les différenciations basées sur l'analyse des caryotypes, méthode cependant plus longue à mettre en œuvre et dont les résultats sont délicats à interpréter, compte tenu du polymorphisme intraspécifique des caryotypes de levures de vinification (VEZINHET et *al.*, 1990 ; FREZIER et DUBOURDIEU, 1992).

D'un point de vue taxonomique, cette technique apporte des renseignements nouveaux pour la délimitation des espèces de levures de vinification. Après l'analyse d'un grand nombre de levures industrielles ou indigènes, nous montrons que les levures œnologiques race *bayanus*, *capensis* et *chevalieri* sont des *S. cerevisiae* ayant vraisemblablement perdu la capacité d'utiliser le galactose pour *bayanus* et *capensis* et le maltose pour *capensis* et *chevalieri*. En revanche, la grande majorité des levures de vinification Mel+ ex. *uvarum* sont des *S. bayanus*, en accord avec les résultats obtenus par NAUMOV et *al.* (1993). Cependant, le phénotype Mel+ n'est pas utilisable pour différencier les espèces *S. cerevisiae* et *S. bayanus* puisque certaines souches Mel+ font partie de l'espèce *S. cerevisiae*. Pour éviter toute confusion de langage, le terme *bayanus* doit être abandonné pour désigner les souches Gal- de l'espèce *S. cerevisiae* et réservé aux levures actuellement appelées *S. bayanus* par les taxonomistes, constituant une espèce distincte.

De nombreux auteurs rapportent les propriétés cryophiles des souches de *S. bayanus* (ex. *uvarum*) par rapport aux souches de *S. cerevisiae* (KISHIMOTO et *al.*, 1993 ; GUIDICI et *al.*, 1995 ; KISHIMOTO et GOTO, 1995). Dans la région du Val de Loire, les vendanges effectuées sous un climat plus froid que celui de Bordeaux pourraient expliquer la sélection naturelle de souches de levures cryophiles au détriment des souches de *S. cerevisiae*.

La présence de levures appartenant à l'espèce *S. bayanus* au cours de la fermentation alcoolique dans certaines régions viticoles et pour certains types de vinification nous incite à réexaminer les propriétés œnologiques de certaines souches de cette espèce et d'étudier les facteurs climatiques ou technologiques qui déterminent l'apparition de cette espèce au cours de la fermentation alcoolique.

Remerciements :

Les auteurs remercient la société LALLEMAND (Canada) pour les souches de levures et la société SARCO (Bordeaux) pour le support financier déterminant qu'elle a apporté à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBIOGRAPHIQUES

BANNO I. and KANEKO Y., 1988. A genetic analysis of taxonomic relation between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *7th Int. Symp. on Yeasts*, S373.

BARNETT J.A., PAYNE R.W. and YARROW D., 1990. *The Yeasts, Characteristics and Identification*, 2nd ed., Cambridge University Press.

BELLIS M., PAGES M. and ROIZES G., 1987. A simple and rapid method for preparing yeast chromosome for Pulsed Field Gel Electrophoresis. *Nucl. Acids Res.*, **15**, n°16, 6749.

CARDINALLI G. and MARTINI A., 1994. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the *sensu stricto* group of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bact.*, Oct, 791-797.

DEGRE R., THOMAS D.Y., MAILHOT K., MORIN A. and DUBORD C., 1989. Wine yeast identification. *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 309-315.

DUBOURDIEU D., SOKOL A., ZUCCA J., THALOUARN A., DATTEC A. et AIGLE M., 1987. Identification de souches de levures isolées de vins par l'analyse de leur ADN mitochondrial. *Connaissance Vigne Vin*, **21**, 267-278.

FRÉZIER V. and DUBOURDIEU D., 1992. Ecology of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, n°4, 375-380.

GUIDICI P., ZAMBONELLI P., PASSARELLI P. and CASTELLARI L., 1995. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, n°1, 143-147.

GUILLAMON J. M., BARRIO E., HUERTA T. and QUEROL A., 1994. Rapid characterisation of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *Int. J. Syst. Bact.*, Oct., 708-714.

HALLET J.-N., GRANUGUY B., DANIEL P. et POULARD A., 1988. Caractérisation de différentes souches industrielles de levures œnologiques par les profils de restriction de leur ADN mitochondrial. *Prog. Agric. Vitic.*, **105**, 328-333.

HANSEN J. et KIELLAND-BRANDT M.-C., 1994. *Saccharomyces carlsbergensis* contains two functional *MET2* alleles similar to homologues from *S. cerevisiae* and *S. monasensis*. *Gene*, **140**, 33-40.

KISHIMOTO M. and GOTO S., 1995. Growth temperatures and electrophoretic karyotyping as tools for practical discrimination of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **41**, 239-247.

KISHIMOTO M., SHINOHARA T., SOMA E. and GOTO S., 1993. Selection and fermentation properties of cryophilic wine yeasts. *J. Ferm. Bioeng.*, **75**, n°6, 451-453.

LIECKFELD E., MEYER W. and BÖER T., 1993. Rapid identification and differenciation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic. Microbiol.*, **3**, 413-426.

MASNEUF I. et DUBOURDIEU D., 1994. Comparaison de deux techniques d'identification des souches de levures de vinification basées sur le polymorphisme de l'ADN génomique : réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse des caryotypes (électrophorèse en champ pulsé). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **28**, n°2, 153-160.

NAUMOV G.I., 1987. *Genetic basis for classification and identification of the ascomycetous yeasts, The expanding realm of yeast-like fungi*. Elsevier Science Publishers, 469-475.

NAUMOV G., NAUMOVA E et GAILLARDIN C., 1993. Genetic and karyotypic identification of wine *Saccharomyces bayanus* isolated in France and Italy, System. *Appl. Microbiol.*, **16**, 274-279.

NESS F., LAVALLÉE F., DUBOURDIEU D., AIGLE M. and DULAU L., 1993. Identification of yeasts strains using the Polymerase Chain Reaction. *J. Sci. Agric.*, **62**, 89-94.

VAUGHAN-MARTINI A. and KURTZMAN C.-P., 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces sensu stricto*. *Int. J. Syst. Bact.*, **35**, 508-511.

VAUGHAN-MARTINI A. and MARTINI A., 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **53**, 77-84.

VAUGHAN-MARTINI A., MARTINI A. et CARDINALI G., 1993. Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **43**, 145-156.

VEZINHET F., BLONDIN B. et HALLET J.-N., 1990. Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tool for identification of œnological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 568-571.

YARROW D., 1984. Genus 22, *Saccharomyces* Meyen ex Reess. In Kreger-van Rij, N. J. W. (Ed.). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 3rd ed., 379-395, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Manuscrit reçu le 19 octobre 1995 ;
accepté pour publication le 28 novembre 1995.