

Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental

D. LIBKIND*

Laboratorio de Microbiología Aplicada y Biotecnología (MABB), Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB) – CCT Comahue, UE Bariloche, CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas). Bariloche, Río Negro, Argentina.

* Correspondencia. E-mail: libkind@crub.uncoma.edu.ar

RESUMEN

La identificación rápida de levaduras de origen ambiental o clínico es de importancia para el estudio de la biodiversidad de estos microorganismos y para la detección de posibles patógenos. *Rhodotorula mucilaginosa* es una levadura ubicua y pigmentada, capaz de producir infecciones en pacientes inmunocomprometidos. En este trabajo se evaluó la utilidad de la técnica de *fingerprinting* conocida como MSP-PCR (Micro/Minisatellite-Primed PCR) en la caracterización e identificación de aislamientos ambientales de *R. mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. Sobre la base de sus caracteres fenotípicos, de un total de 200 levaduras pigmentadas se seleccionaron 110 aislamientos que presuntamente corresponderían a la especie *R. mucilaginosa*. Se evaluaron los iniciadores (GTG)₅, (GAC)₅ y M13 en aislamientos representativos, y se seleccionó el iniciador (GTG)₅ por ser el que permitió una mejor agrupación de los aislamientos pertenecientes a *R. mucilaginosa* y una mejor diferenciación de éstos con los de especies filogenéticamente próximas. Utilizando dicho iniciador, el 87% de los aislamientos de *R. mucilaginosa* presentó un perfil de MSP-PCR similar (> 60%) al de la cepa de referencia CBS 316^T de *R. mucilaginosa*. La técnica de MSP-PCR resultó efectiva, tanto para caracterizar e identificar un número elevado de aislamientos ambientales de *R. mucilaginosa* como para detectar polimorfismos en la especie.

Palabras clave: levaduras, microsátélites, minisátélites, Patagonia, PCR *fingerprinting*

ABSTRACT

Assessment of the MSP-PCR technique for the molecular characterization of *Rhodotorula mucilaginosa* isolates from northwestern Patagonia. The rapid identification of environmental or clinical yeast isolates is important for biodiversity studies and the detection of probable pathogens. *Rhodotorula mucilaginosa* is a ubiquitous and pigmented yeast capable of infecting immunocompromised patients. In this study, we evaluated the Micro/mini satellite-primed PCR (MSP-PCR) fingerprinting method for the characterization and identification of *R. mucilaginosa* isolates from natural environments in northwestern Patagonia. There were selected 110 putative *R. mucilaginosa* isolates from 200 environmental pigmented yeast isolates on the basis of phenotypic criteria. (GTG)₅, (GAC)₅ and M13 primers were initially evaluated in representative *R. mucilaginosa* isolates. (GTG)₅ allowed a good grouping of these isolates and, at the same time, a good differentiation among closely related species, and thus was selected for subsequent studies. *R. mucilaginosa* isolates (87%) presented similar (> 60%) MSP-PCR profiles to those of the reference strain CBS 316^T. The MSP-PCR technique was effective, both, for the characterization and identification of a large number of *R. mucilaginosa* environmental isolates as well as for the detection of polymorphisms within the species.

Key words: yeasts, micro-satellites, mini-satellites, Patagonia, PCR fingerprinting

INTRODUCCIÓN

La especie de levadura basidiomicética *Rhodotorula mucilaginosa* (Jørgensen) Harrison posee una amplia distribución en la naturaleza. Tiene la capacidad de colonizar múltiples sustratos naturales y artificiales, por lo que se la considera una levadura ubicua (4). Además, presenta una asombrosa capacidad de adaptarse a ambientes extremos (3, 11, 17). *R. mucilaginosa* ha sido también aislada de muestras clínicas (7, 18) y, en algunos casos, se la ha considerado un patógeno emergente (8),

dado que puede causar infecciones en huéspedes inmunocomprometidos (10).

R. mucilaginosa se caracteriza por la coloración rojosalmon de sus colonias, lo cual es el resultado de la acumulación de pigmentos carotenoides de interés industrial, tales como torularodina, toruleno y β -caroteno (14). Existen características fenotípicas, tanto bioquímicas como fisiológicas, que permitirían distinguir a *R. mucilaginosa* del resto de las especies de levaduras. Sin embargo, el estudio de estos caracteres fenotípicos es muchas veces laborioso y poco confiable, e implica la

realización de aproximadamente 60 pruebas bioquímicas y fisiológicas.

En la actualidad, la identificación inequívoca de levaduras a nivel de especie requiere indefectiblemente la utilización de técnicas de biología molecular, en particular de las técnicas de secuenciación de regiones de valor taxonómico de los genes que codifican para los ribosomas (ADNr). No obstante, existen técnicas alternativas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR *fingerprinting*), que permiten caracterizar genéticamente cepas de levaduras en forma rápida y económica. La técnica denominada Micro/Minisatellite-Primed PCR (MSP-PCR) es un ejemplo de éstas y se basa en la amplificación de regiones de ADN repetidas y adyacentes denominadas micro (repeticiones de 2 - 10 nucleótidos) o minisatélites (de 15 - 30 nucleótidos), las que se encuentran típicamente distribuidas a lo largo del genoma de los organismos eucariotas. Numerosos trabajos han demostrado la utilidad de la MSP-PCR para estudios de diversidad genética de diferentes especies y géneros (1, 6, 9, 16), y como herramienta en el estudio de la biodiversidad de levaduras en ambientes naturales (5, 12, 19). Saracli *et al.* (18) estudiaron aislamientos clínicos de *R. mucilaginosa* mediante electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), y constituye éste el único antecedente en el estudio de un número elevado de cepas de esta especie por técnicas de biología molecular.

Durante un estudio de diversidad de levaduras en ambientes acuáticos de la Patagonia noroccidental, se encontró que *R. mucilaginosa* representaba más del 50% de los aislamientos, y que se trataba de la especie de mayor distribución en los cuerpos de agua estudiados (12). Aunque con menor frecuencia, en sustratos terrestres de la región Patagónica también se evidenció la presencia de *R. mucilaginosa* (13). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad de la técnica de MSP-PCR para la caracterización e identificación rápida de aislamientos de *R. mucilaginosa* de origen ambiental; en particular, de aquellos provenientes de ambientes naturales de la Patagonia noroccidental argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y conservación

Se obtuvieron 200 aislamientos de levaduras productoras de pigmentos carotenoides (pigmentadas) a partir de muestras de agua (de lagos, lagunas y ríos), de suelo de bosque nativo, de la superficie del estroma del hongo *Cyttaria* spp., de néctar de flores y de frutos silvestres. El estudio de los sustratos mencionados se realizó dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi. Las metodologías utilizadas para el aislamiento fueron descritas por Brizzio y van Broock (2) y Libkind *et al.* (12). Se incluyó la cepa de referencia *R. mucilaginosa* CBS 316^T, cedida por el Dr. J. P. Sampaio (Centro de Recursos Microbiológicos, SABT, FCT, Universidade Nova de Lisboa, Portugal). Los cultivos puros fueron conservados a 4 °C mediante repiques periódicos en agar papa glucosado (PDA) en pico de flauta (20).

Caracterización fenotípica

Se realizó la caracterización fenotípica de los 200 aislamientos, que incluyó estudios micro/macro-morfológicos (pigmentación de las colonias, producción de balistosporas, margen y textura de las colonias, forma celular) y fisiológicos (asimilación de compuestos nitrogenados y de compuestos carbonados, síntesis de compuestos amiláceos, T° máxima de crecimiento, producción de ureasa), según lo descrito por Yarrow (20).

Caracterización molecular

La extracción del ADN se realizó mediante el protocolo descrito por Libkind *et al.* (12). Para el análisis por MSP-PCR se emplearon los oligonucleótidos sintéticos (GTG)₅ y (GAC)₅ (Pharmacia Biotech) en experimentos de micro-satélites, y la secuencia central del fago M13 (GAGGGTGGCGTTCT, iniciador M13, Pharmacia Biotech) para experimentos de minisatélites. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 25 µl que contenía 1X PCR buffer (Pharmacia, Biotech); 2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (Promega); 3,5 mM de cloruro de magnesio; 0,8 mM de iniciador, 10-15 ng del ADN genómico y 1 U *Taq* ADN polimerasa (Pharmacia, Biotech). El ADN fue amplificado en un termociclador Uno II Thermal Cycler (Biometra) mediante un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 45 s a 93 °C, 60 s a 50-55 °C y 60 s a 72 °C, y un paso final de extensión de 6 min a 72 °C. Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (Gibco-BRL) en 0,5 X TBE buffer (Buffer tris-Borato-EDTA) a 90 V por 3,5 h y teñidos en solución de bromuro de etidio (2 mg/ml). En cada gel fue incluido un marcador de peso molecular como referencia (ADN del fago λ cortado con *Hind*III y ADN de ΦX174 cortado con *Hae*III - Pharmacia, Biotech). Todas las reacciones se realizaron al menos por duplicado, a fin de evaluar la reproducibilidad de los perfiles de bandas obtenidos.

Análisis de los perfiles moleculares

Los perfiles de amplificación de bandas obtenidos fueron visualizados mediante un transiluminador UV y fotografiados con el sistema Kodak Digital Science EDA 120. Se empleó el programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis para la interpretación de la imagen y el GelCompar, versión 4.1 (Applied Maths 1998, Kortrijk), para analizar los patrones de bandas de ADN. En el análisis fueron incluidas las bandas de entre 300 y 2000 pb, y en general se analizaron entre 5 y 20 bandas por perfil. La relación entre los perfiles fue estimada mediante el coeficiente de Pearson (también conocido como coeficiente de correlación producto-momento) provisto por el programa GelCompar, y se generaron dendrogramas mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method).

Análisis de las secuencias del ADN

Para un número selecto de cepas se efectuó el análisis de la secuencia de los dominios D1/D2 de la región del ADN que codifica para la subunidad ribosomal 26S (26S ADNr), de acuerdo con lo descrito por Libkind *et al.* (12). Las secuencias obtenidas, una vez corregidas, fueron comparadas con secuencias equivalentes disponibles en bases de datos públicas (GenBank), a través de la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 200 aislamientos de levaduras pigmentadas provenientes de ambientes naturales de la Patagonia noroccidental, 110 (55%) fueron asignados preliminarmente a la especie *R. mucilaginosa*, sobre la base de las características fenotípicas observadas, a

saber: elevada mucosidad de las colonias; ausencia de producción de compuestos amiláceos; ausencia de estructuras sexuales; ausencia de balistosporas e incapacidad de asimilar inositol, eritritol y D-glucuronato como fuentes de carbono y NO_3^- como fuente de nitrógeno. Dichas características concuerdan con las típicas de la especie (4). Los 90 aislamientos restantes no presentaron estas características, por lo que se consideró que pertenecían a especies diferentes de *R. mucilaginosa*.

A través de la técnica de MSP-PCR y empleando individualmente los iniciadores $(\text{GAC})_5$, $(\text{GTG})_5$ y M13, se obtuvieron los perfiles de ADN para 5 aislamientos de *R. mucilaginosa* elegidos al azar y para la cepa de referencia. La Figura 1 muestra estos perfiles, así como los de especies emparentadas con *R. mucilaginosa*, también aisladas de la Patagonia y tomadas a modo de ejemplo. Los 3 iniciadores arrojaron perfiles de bandas similares para los aislamientos de *R. mucilaginosa*, con un patrón también similar al de la cepa de referencia. El iniciador $(\text{GTG})_5$ evidenció el perfil de MSP-PCR de mayor similitud (> 80%, coeficiente de Pearson) entre la cepa de referencia y las cepas salvajes. Las especies distintas de *R. mucilaginosa* incluidas en la Figura 1 a modo comparativo corresponden a especies cercanas filogenéticamente a la especie en estudio. A diferencia del iniciador M13, los iniciadores $(\text{GAC})_5$ y $(\text{GTG})_5$ permitieron la correcta diferenciación de estas 3 especies respecto de *R. mucilaginosa*. Los perfiles de ADN obtenidos con el iniciador M13 fueron en general homogéneos, caracterizados por una única banda predominante de aproximadamente 575 pb. Estos resultados sugieren que en este caso el iniciador M13 amplificaría regiones más conservadas y, por lo tanto, tendría menor grado de resolución para diferenciar especies emparentadas con *R. mucilaginosa*. Otros autores reportaron resultados que apoyan esta hipótesis (6). Si bien el iniciador M13 no sería de utilidad para diferenciar especies cercanas a *R. mucilaginosa*, es de destacar que sí lo es para diferenciar

especies pertenecientes a otros grupos taxonómicos (9, 12, 15). El comportamiento de los distintos iniciadores en la técnica de MSP-PCR varía con el grupo filogenético en estudio.

Dado que el iniciador $(\text{GTG})_5$ arrojó los perfiles de mayor similitud entre los distintos aislamientos de *R. mucilaginosa* y también entre éstos y la cepa de referencia, al mismo tiempo que permitió diferenciarlos de especies próximas, fue seleccionado para estudiar la totalidad de los aislamientos mediante la técnica de MSP-PCR *fingerprinting*. Los perfiles obtenidos fueron variables, lo que permitió rápidamente confirmar que los 90 aislamientos no considerados *R. mucilaginosa*, sobre la base de criterios fenotípicos, diferían en más del 60% en sus perfiles MSP-PCR con la cepa de referencia. Asimismo, al analizar los perfiles obtenidos para los 110 aislamientos a priori considerados *R. mucilaginosa*, se observó que el 75,5% de éstos (83 aislamientos) exhibía al menos 60% de similitud entre sí y con la cepa de referencia *R. mucilaginosa* CBS 316^T.

En la Figura 2 se presenta un análisis de los perfiles obtenidos a partir de un grupo representativo del total de aislamientos estudiados, incluyendo 13 de los 27 aislamientos que tuvieron perfiles de similitud menores al 60%. Como se puede observar, no se detectaron correlaciones entre los distintos *clusters* obtenidos en el análisis de perfiles de MSP-PCR y el origen de los aislamientos. Las secuencias D1/D2 de aislamientos representativos que poseían perfiles de similitud mayor al 60% resultaron ser idénticas en un 100% a *R. mucilaginosa* CBS 316^T (AF070432), lo que confirma su pertenencia a dicha especie (datos no publicados).

La evidencia recolectada en el presente trabajo sugiere que una similitud en los perfiles de MSP-PCR con $(\text{GTG})_5$ de al menos 60% sería suficiente para permitir una identificación inequívoca de aislamientos de *R. mucilaginosa*. De los 27 aislamientos con perfiles de similitud menor al 60%, tan solo 12 pertenecían verdade-

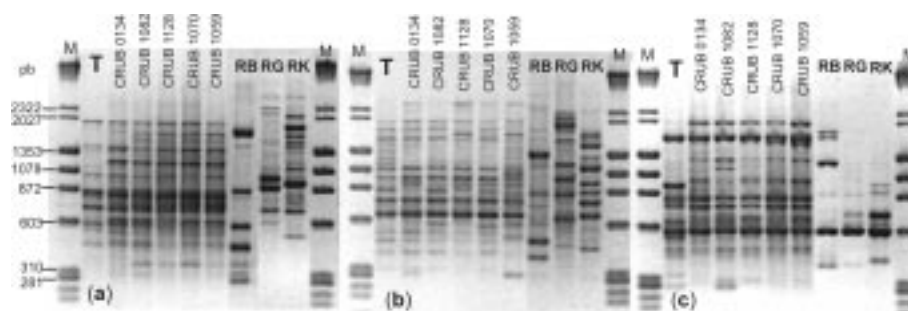


Figura 1. Caracterización de 5 aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* mediante MSP-PCR utilizando los iniciadores $(\text{GAC})_5$ (a), $(\text{GTG})_5$ (b) y M13 (c). T: cepa de referencia CBS 316^T; RB: *Rhodospiridium babjevae* CRUB 1113; RG: *Rhodotorula graminis* CRUB 1118; RK: *Rhodospiridium kratochvilovae* CRUB 0014; M: marcador de peso molecular (1 ADN cortado por *Hind*III y 1 ADN cortado con *Hae*III).

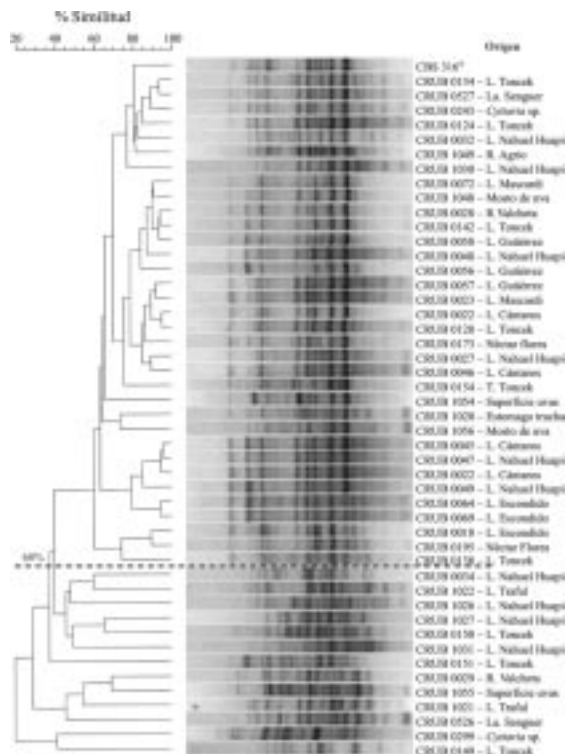


Figura 2. Análisis de los perfiles MSP-PCR obtenidos con el iniciador (GTG)₅ procesados mediante el programa GelCompar y el algoritmo UPGMA. Coeficiente de correlación cofenético: 0,883. L.: Lago; La.: Laguna; R.: Río; CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures; CRUB: Centro Regional Universitario Bariloche. La línea punteada representa el límite de similitud de perfiles del 60%.

ramente a *R. mucilaginosa* considerando los resultados de secuenciación del ADNr. Las 15 cepas identificadas incorrectamente como *R. mucilaginosa* por métodos fenotípicos fueron clasificadas en las especies *Rhodospo-*

poridium babjevae, *Rhodospo- ridium kratochvilovae* y *Rhodotorula graminis*. De este modo, se confirma un total de 95 aislamientos patagónicos de *R. mucilaginosa*.

Tanto de las muestras provenientes de ambientes acuáticos como de las terrestres, se aisló *R. mucilaginosa* (Tabla 1). Sin embargo, esta especie fue considerablemente más abundante en los ambientes acuáticos, en particular en los cuerpos de agua lénticos, donde fue la especie predominante. Hasta el momento, no ha sido posible obtener aislamientos de *R. mucilaginosa* a partir de muestras de suelo o frutos silvestres. En conjunto, los resultados sugieren una amplia distribución de esta especie de levadura en los ambientes naturales de la Patagonia noroccidental.

Los resultados aquí presentados indican que la identificación de *R. mucilaginosa* de muestras ambientales mediante técnicas fenotípicas puede arrojar resultados incorrectos, por lo tanto, ésta debería ser complementada por métodos moleculares. La técnica de microsatélites utilizando el iniciador (GTG)₅ se presenta como una alternativa promisoriosa, dado que en el presente trabajo permitió la correcta identificación de más del 87% de los aislamientos de *R. mucilaginosa*. Como ya fue reportado con anterioridad (12), es evidente que esta técnica, además, detecta variabilidad intraespecífica en *R. mucilaginosa*. En el trabajo citado se analizaron un número limitado de aislamientos de *R. mucilaginosa* provenientes exclusivamente de ambientes acuáticos, mientras que el presente estudio abarca un mayor número de aislamientos ambientales, tanto de origen acuático como terrestre. Esto permite una mejor evaluación de la técnica de MSP-PCR en el estudio de esta especie. En nuestro laboratorio se encuentran actualmente en desarrollo estudios tendientes a evaluar el valor taxonómico de la heterogeneidad intraespecífica de *R. mucilaginosa* aquí observada.

Tabla 1. Distribución y abundancia relativa de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* en ambientes naturales de la Patagonia noroccidental

Ambiente de origen	Nº de aislamientos obtenidos	Abundancia relativa ⁽¹⁾
Acuáticos		
Lagos	36	Alta
Lagunas	52	Alta
Ríos	3	Baja
Terrestres		
Suelos	0	Ausente
Estromas <i>Cyttaria</i> spp.	2	Baja
Néctar flores	2	Baja
Frutos silvestres	0	Ausente

⁽¹⁾ Alta: especie con mayor frecuencia de aislamiento respecto de las restantes especies encontradas. Baja: especie con baja frecuencia de aislamiento respecto de las especies predominantes. Ausente: ausencia de aislamientos.

Saracli *et al.* (18) llevaron a cabo un estudio epidemiológico con aislamientos de origen clínico de *R. mucilaginosa*. En dicho trabajo, uno de los pocos (si no el único) que aborda la caracterización molecular de aislamientos de *R. mucilaginosa*, se analizaron 6 aislamientos utilizando los métodos RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA, o amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN) y PFGE. Ambas técnicas permitieron separar los 5 aislamientos obtenidos de muestras de sangre de aquel obtenido de próstata. Sin embargo, se consideró que los aislamientos estudiados correspondían a *R. mucilaginosa* teniendo en cuenta los resultados de la asimilación de algunas fuentes de carbono, lo cual, como se ha demostrado en el presente estudio, puede arrojar identificaciones incorrectas. Más aún, todos los aislamientos estudiados mostraron perfiles de RAPD y PFGE diferentes de la cepa de referencia utilizada. Sería necesaria la confirmación de la identidad de los aislamientos por secuenciación de ADN para permitir la correcta interpretación de los resultados obtenidos en el citado estudio.

La técnica de MSP-PCR se destaca por su sencillez metodológica, bajo costo y rápida obtención de resultados, en comparación con otras técnicas moleculares como PFGE, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, o polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) o secuenciación del ADN. La alta reproducibilidad de esta técnica también le da ventajas respecto de técnicas similares, como el RAPD. A su vez, la técnica de MSP-PCR presenta elevada versatilidad por la existencia de iniciadores con diferente grado de resolución, los que permitirían la diferenciación tanto a nivel de especie como de subespecie. En el presente trabajo, esta técnica fue fundamental para lograr una rápida caracterización e identificación de un número elevado de aislamientos ambientales de *R. mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental.

Agradecimientos: el presente trabajo ha sido financiado por la Universidad Nacional del Comahue (proyecto B121), del CONICET (proyecto PIP6536) y la ANPCyT (proyecto PICT 22200, PMT – BID 1728/OC-AR). Se agradece al Dr. J. P. Sampaio (Centro de Recursos Microbiológicos, SABT, FCT, Universidade Nova de Lisboa, Portugal) por proveer la cepa de referencia de *R. mucilaginosa* y facilitar su laboratorio para la realización de este trabajo. D. Libkind fue beneficiado por una beca del CONICET y por el convenio con Portugal PO/PA02-BI/002 financiado por la SECYT. Se agradece el permiso de muestreo a la administración de Parques Nacionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Balefires Couto MM, Eijmsa B, Hofstra H, Huis in't Veld JH, van der Vossen JM. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 41-6.
- Brizzio S, van Broock M. Characterization of wild yeast killer from Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina). *J Food Technol Biotechnol* 1998; 4: 273-8.
- de Sillon MI, Payo EM, Callejo MA, Marquina D, Peinado JM. Environmental adaptation factors of two yeasts isolated from the leachate of a uranium mineral heap. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 210: 233-7.
- Fell JW, Statzell-Tallman A. *Rhodotorula* F.C. Harrison. En: Kurtzman C, Fell JW editors. *The Yeast, A Taxonomic Study*. Florida, Elsevier Science Publishers, 1998, p. 800-27.
- Gadanhó M, Libkind D, Sampaio JP. Yeast diversity in the extreme acidic environments of the Iberian Pyrite Belt. *Microb Ecol* 2006; 52: 552-63.
- Gadanhó M, Sampaio, JP. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis* sensu stricto and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Res* 2002; 2: 47-58.
- Gómez-López A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 312-6.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 462-78.
- Inácio J, Portugal L, Spencer-Martins I, Fonseca A. Phylloplane yeasts from Portugal: seven novel anamorphic species in the *Tremellales* lineage of the *Hymenomycetes* (*Basidiomycota*) producing orange-coloured colonies. *FEMS Yeast Res* 2005; 5: 167-83.
- Jiménez-Mejías ME, Ortiz Leyba C, Jiménez Gonzalo FJ, del Nozal M, Campos T, Jiménez Jiménez FJ. Fungemia caused by *Rhodotorula mucilaginosa* in relation to total parenteral nutrition. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10: 543-6.
- Lahav R, Fareleira P, Nejdat A, Abeliovich A. The identification and characterization of osmotolerant yeast isolates from chemical wastewater evaporation ponds. *Microb Ecol* 2002; 43: 388-96.
- Libkind D, Brizzio S, Ruffini A, Gadanhó M, van Broock MR, Sampaio JP. Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 84: 313-22.
- Libkind D, Ruffini A, van Broock MR. Levaduras teleomórficas pigmentadas de ambientes naturales de la Patagonia noroccidental. *Bol Soc Arg Bot* 2004; 39: 5-12.
- Libkind D, van Broock MR. Biomass and carotenoid pigments production by Patagonian native yeasts. *World J Microbiol Biotechnol* 2006; 22: 687-92.
- López C, Giro L, Ramos L, Ramón L, Bulacio L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 16-21.
- Meyer W, Maszewska K, Sorrell TC. PCR fingerprinting: a convenient molecular tool to distinguish between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Med Mycol* 2001; 39: 185-93.
- Russo G, Libkind D, Sampaio JP, van Broock M. Levaduras de un ambiente acuático ácido: Lago Cavihué – Río Agrio. *Bol Soc Arg Bot* 2006; 41: 167-75.
- Saracli MA, Sener K, Gonlum A, Yildiran ST, Wickes BL. Genotyping of clinical *Rhodotorula mucilaginosa* isolates by pulsed field gel electrophoresis. *Mycoses* 2003; 46: 487-91.
- Wuczowski M, Prillinger H. Molecular identification of yeasts from soils of the alluvial forest national park along the river Danube downstream of Vienna, Austria ("National park Donauauen"). *Microbiol Res* 2004; 159: 263-75.
- Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. En: Kurtzman CP, Fell J editors. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Amsterdam, Elsevier Science B.V., 1998, p. 77-100.