

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL-UFRGS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – Cbiot
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR- PPGBCM

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS SELVAGENS
PROVENIENTES DE REGIÕES VINÍCOLAS DE SANTA CATARINA.**

Tese de Doutorado

Sandra Denise Camargo Mendes

Porto Alegre, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL-UFRGS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA – Cbiot
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR- PPGBCM

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LEVEDURAS SELVAGENS
PROVENIENTES DE REGIÕES VINÍCOLAS DE SANTA CATARINA.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Sandra Denise Camargo Mendes

Orientadora: Profa. Patricia Valente da Silva

Co-orientadora: Profa. Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2015

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em parceria com o Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnologia, situado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Parte deste estudo foi realizado no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, sob supervisão da Dra. Jenifer Saffi.

Dedicatória

Aos meus pais, por seu incondicional apoio e inspiração para realização dos meus sonhos e projetos de vida.

Agradecimento especial

À minha orientadora, Patricia Valente da Silva, por ter acreditado em meu potencial de trabalho e pela amizade cultivada nestes quatro anos.

Agradecimentos

Aos Professores Plinio Herts, Adriano Brandelli e o Pesquisador Fabiano Cleber Bertoldi, membros da comissão de acompanhamento, pelas sugestões e pelo tempo disponibilizado.

Aos demais Professores do PPGBCM, pelo ensinamento e dedicação a nós, alunos.

À Professora Maria Lucia Scroferneker, por me receber no laboratório, por seus conselhos e cuidados, uma grande amiga para a vida toda.

Ao Professor Mario Inostroza Ponta, pela contribuição e informações concedidas.

À Professora Jenifer Saffi, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

A todos, os membros da fraternidade que a vida me deu: Jandora Severo Poli, Rodolfo Ribas Kruger e Luciana Senter por me auxiliarem no primeiro ano do Doutorado; Juliano Garavaglia, Belize Leite, Priscila Dallé Rosa, Cheila Stopiglia, Cibele Manganin, Daiane Heidrich e Andreia Formoso, em especial ao Mauricio Ramirez-Castrillón por dividir seu conhecimento na elaboração deste trabalho.

A todos os colegas dos laboratórios 206, 209, 210, 220 (Vale) e Laboratório de Genética Toxicológica (UFCSPA), pela agradável companhia e pelos aprendizados diários indispensáveis para meu crescimento profissional.

À Bruna F. Immich, pelos ensinamentos e pelo auxílio indispensável nos experimentos de estresse oxidativo.

À Erli Camargo e sua maravilhosa família, por me receber em sua casa durante minha estada em Porto Alegre. Se não fosse pelo apoio e carinho de vocês, possivelmente minha vida seria muito diferente durante o Doutorado.

Aos secretários da Pós-Graduação, Silvia e Luciano, pela disponibilidade e atenção que sempre prestaram aos alunos.

Aos demais colegas do PPGMAA - UFRGS, pelo convívio e auxílio nestes quatro anos.

À EMBRAPA e Epagri, pelo auxílio financeiro e bolsa de Doutorado.

A todos que compartilharam suas experiências neste longo período de construção da minha pessoa.

“Tente uma, duas, três vezes e se for possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar aonde a maioria não chega, faça aquilo que a maioria não faz”.

Bill Gates

Sumário

Lista de Tabelas	- 11 -
Lista de abreviações, símbolos e unidades	- 17 -
Resumo.....	- 20 -
Abstract	- 22 -
1. INTRODUÇÃO	- 23 -
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	- 26 -
2.1 Taxonomia	- 26 -
2.2 Caracterização Molecular.....	- 27 -
2.3 Diversidade de leveduras: da uva para o vinho.....	- 28 -
2.4 O papel da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na fermentação	- 32 -
2.5 Origem de <i>S. cerevisiae</i>	- 34 -
2.6 Ciclo de vida da <i>S. cerevisiae</i>	- 38 -
2.6.1 Ploidia.....	- 39 -
2.7 Produção de ésteres por leveduras	- 41 -
2.8 Técnicas de biologia molecular	- 44 -
3. OBJETIVOS.....	- 47 -

3.1 Objetivos específicos	- 47 -
4. Capítulo I	- 48 -
Abstract	- 50 -
1. Introduction	- 51 -
2. Results and discussion	- 52 -
2.1. Yeast identification.....	- 52 -
2.2 Standardization and assessment of MSP-PCR Fingerprinting profiles.....	- 52 -
2.3 The “lower diversity” yeast dataset	- 54 -
3. Materials and methods.....	- 55 -
3.1 Strains and growth conditions	- 55 -
3.2 DNA extraction	- 56 -
3.3 MSP-PCR <i>Fingerprinting</i>	- 56 -
3.4 Molecular identification.....	- 57 -
3.5 Clustering analysis.....	- 57 -
3.6 Discriminatory power.....	- 58 -
3.7 Concordance between the (GTG) ₅ MSP-PCR fingerprinting and sequencing, sensitivity and specificity assessments.....	- 59 -

References	- 60 -
Tables and Figures legends	- 69 -
Supporting Information	- 72 -
5. Capítulo II	- 73 -
Abstract	- 75 -
1. Introduction	- 76 -
2. Materials and methods	- 77 -
2.1 Sampling areas	- 77 -
2.2 Isolation of strains and growth conditions	- 78 -
2.3 DNA extraction	- 78 -
2.4 Molecular identification of the yeasts	- 79 -
2.5 Physiological and biochemical characterization.....	- 80 -
2.6 Statistical analysis	- 80 -
3. Results.....	- 81 -
3.1 Observed species richness	- 82 -
3.2 Estimated species richness and taxonomic diversity	- 83 -
3.3 Phenotypic characterization	- 84 -

3.4 Functional diversity	- 84 -
4. Discussion	- 85 -
4.1 Serra do Marari and Campos Novos	- 86 -
3.2 Pinheiro Preto.....	- 88 -
References	- 90 -
6. Capítulo III.....	- 112 -
Resumo.....	- 114 -
2. Introdução	- 115 -
2. Materiais e Métodos	- 117 -
2.1 Linhagens utilizadas, cultivo, caracterização e extração de DNA genômico	- 117 -
2.2 Análise de Ploidia	- 117 -
2.3 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H ₂ S)	- 118 -
2.4 Teste de exclusão por estresse.....	- 118 -
2.5 Determinação do perfil de aromas	- 119 -
2.6 Extração dos componentes voláteis	- 119 -
2.7 Determinação do valor da atividade olfativa (OAV)	- 121 -
2.8 Análises Estatísticas	- 121 -

3. Resultados	- 121 -
3.1 Caracterização fenotípica e genotípica	- 121 -
3.2 Análise de ploidia.....	- 122 -
3.3 Tolerância a condições de estresse	- 123 -
3.4 Determinação de compostos voláteis.....	- 123 -
3.5 Determinação do valor da atividade olfativa.....	- 124 -
4. Discussão.....	- 125 -
5. Conclusões	- 128 -
Referências	- 129 -
Figuras e Tabelas.....	- 135 -
Discussão Geral	- 147 -
CONCLUSÕES GERAIS.....	- 151 -
PERSPECTIVAS	- 152 -
REFERÊNCIAS	- 152 -
APÊNDICES.....	- 165 -

Lista de Tabelas

Tabela 1. Espécies de leveduras coletadas de bagas e cachos de uva saudáveis. - 31 -

Capítulo I

Table 1. Yeasts species from bottled wines sampled in Rio Grande do Sul and Santa Catarina, South Brazil. - 69 -

Table 2. Specificity, sensitivity and kappa index of MSP-PCR fingerprinting using the primer (GTG)₅ in comparison with rDNA sequencing as the gold standard for the two datasets (“lower diversity” and “higher diversity”), using two ranges of band sizes: 200-3500bp or 200-900bp. - 70 -

Capítulo II

Table 1. List of yeast species isolated in this study and reference strains with their respective access numbers in Genbank. - 106 -

Table 2. Species richness and taxonomic diversity estimates obtained with different indices (mean and standard deviation). 109

Table 3. Functional diversity in vineyards located at altitudes of 678, 973 and 1053 m obtained with the assimilation of different sources of nitrogen (mean and standard deviation). - 110 -

Table 4. Functional diversity in vineyards located at altitudes of 678, 973 and 1053 m obtained with the assimilation of different sources of carbon (mean and standard deviation). - 111 -

Capítulo III

Tabela 1. Respostas fisiológicas e bioquímicas das linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas de vinhedos. - 139 -

Tabela 2. Perfil fermentativo das linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas de vinhedos. - 141 -

Tabela 3. Composição de compostos voláteis das linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto sintético. - 142 -

Tabela 4. Composição de compostos voláteis das linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto Vermentino. - 144 -

Lista de Figuras

Figura 1. Representação da distância genética entre as linhagens do gênero *Saccharomyces*. (a) Neighbor-Joining, representando a distância genética entre as linhagens como calculado a partir do total de diversidade de *SNP* presente nos alinhamentos de genomas; (b) Linhagens representativas de diversas populações geográficas, presentes (a). As linhagens são codificadas pelas cores: vinho/europeia, incluindo a RM11-1A (rosa); cerveja (azul); bioetanol (verde) e sake (amarelo). Figura adaptada de BORNEMAN *et al.* (2011)..... - 37 -

Figura 2. Ciclo de vida da levedura de brotamento. O zigoto sofre meiose e esporulação. Quatro esporos germinam a partir do asco. Cada esporo divide-se, produzindo uma mãe (M) e uma filha (F) célula sem alteração do *mating type*. Durante a segunda divisão mitótica, somente a célula mãe pode alternar o *mating type* antes da divisão. Figura adaptada de COSMA, (2004)..... - 39 -

Figura 3. Progressão do ciclo celular em células de leveduras. Figura adaptada de DELOBEL & TESNIÈRE (2014)..... - 41 -

Figura 4. Os fenótipos das leveduras de vinho foram selecionados pelo espectro de aromas com grupos de compostos de aromas ponderados indicados por setas sólidas de acordo com magnitude do impacto (setas em negrito, setas tracejadas). Exemplos de fenótipos que podem ser desejáveis para vinificação com objetivos diferentes objetivos indicados pelo posicionamento de levedura. Figura adaptada de CORDENTE *et al.*, (2012). - 44 -

Capítulo I

Figure 5. Dendrograms of the clustering of the strains from the "lower diversity" dataset by Hierarchical Clustering using: (a) average linkage (b) complete linkage, (c) single linkage, and (d) Wards method. The distance was computed using the Euclidean distance between the genetic profiles based on the MSP-PCR fingerprinting with the primer GTG₅. - 71 -

Capítulo II

Figure 1. Yeast populations in vineyard located in Serra do Marari (1053m), Pinheiro Preto (698m) and Campos Novos (973m). Box and bars are upper and lower values. Significant differences are indicated by $***p < 0.001$ - 98 -

Figure 2. Structure of the yeast community in Pinheiro Preto. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Pinheiro Preto. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals - 99 -

Figure 3. Structure of the yeast community in the Serra do Marari. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Serra do Marari. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals. - 100 -

Figure 4. Structure of the yeast community in Campos Novos. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Campos Novos. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals. - 101 -

Figure 5. Taxonomic diversity indices for the vineyard regions. (a) Taxonomic diversity assessed using Shannon index for Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos showed no significant differences between the averages obtained. (b) Taxonomic diversity assessed using reciprocal Simpson index ($1/D$), significant differences indicated by $***p < 0.0001$. Upper and lower bars are confidence intervals and averages respective cross bars correspond to confidence intervals. - 102 -

Figure 6. Physiological and biochemical responses for yeast strains isolated from the vineyards. (a) Profile assimilation of carbon sources. (b) Relative frequency of assimilation of carbon sources in relation to the intensity considering (0) unassimilated source and (1) assimilated source. Bars are confidence intervals and filled circles correspond to the average relative frequency. - 103 -

Figure 7. Physiological and biochemical responses for yeast strains isolated from the vineyards. (a) Profile for assimilation of nitrogen sources. (b) Relative frequency of assimilation of nitrogen sources in relation to the intensity considering (0) unassimilated source and (1) assimilated source. Bars are confidence intervals and filled circles correspond to the average relative frequency. - 104 -

Figure S1. The Venn diagram representing three sets of community structures. The Venn diagram set, representing four common yeast species in the regions studied: Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos (gray area). It can be observed that only one yeast species (*M. chrysoperlae*) is common in Pinheiro Preto and Campos Novos (green area); *M. guilliermondii* is common in Pinheiro Preto and Serra do Marari and *H. clermontiae* is common in Serra do Marari and Campos Novos (pink area). - 105 -

Capítulo III

Figura 1. Análise de citometria de fluxo por fluorescência. Histogramas foram analisados usando CellQuest software (Becton Dickson). Na parte superior da coluna, da esquerda para direita (a) Linhagem BY4743; (b) Linhagem 11CE; (c) Linhagem 13PP; (d) Linhagem 33CE; (e) Linhagem 41PP; (f) Linhagem 01PP; e (g) Linhagem 12M. Barras indicam a mediana usada para determinação do coeficiente de Variação. Os CVs foram determinados na metade da altura do pico 1C. - 135 -

Figura 2. Análise de citometria de fluxo por fluorescência. Histogramas foram analisados usando CellQuest software (Becton Dickson). Na parte superior da coluna, da esquerda para direita (a) Linhagem controle diploide BY4743; (b) Linhagem SC 2028; (c) Linhagem SC 2033; (d) Linhagem SC 2048. Barras indicam a mediana usada para determinação do coeficiente de Variação. Os CVs foram determinados na metade da altura do pico 1C. - 136 -

Figura 3. Efeito das linhagens desafiadas com as seguintes condições de estresse. (a) teste de estresse de etanol (EtOH); (b) teste de estresse osmótico com glicose (YPG 200 g / L) e etanol (EtOH); (c) teste de estresse sacarose (YPS 200 g / L); (d) teste de estresse osmótico com sacarose e etanol (YPS 200 g / L). - 137 -

Figura 4. Perfil de aromas das linhagens do gênero *Saccharomyces*. PC1 versus PC2 dispersão das principais fontes de variabilidade entre as linhagens: (a) relação entre a formação dos compostos voláteis e o mosto sintético; (b) entre as linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto sintético; (c) a relação entre a formação dos compostos voláteis e mosto do vermentino. (d) entre as linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto Vermentino..... - 138 -

Lista de abreviações, símbolos e unidades

FACS, Fluorescence assisted cell sorter

pH, Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução

CEF, Conceito de espécies filogenéticas

SNP, Single nucleotide polymorphisms

ITS, Internal Transcribed Spacer

rDNA, Ácido Desoxirribonucleico ribossômico

DNA, Ácido Desoxirribonucleico ribossômico

PCR, Reação em cadeia da polimerase

NS, Não pertencentes ao gênero *Saccharomyces*

aC, antes de Cristo

rRNA, Ácido ribonucleico ribossômico

MAT,

ATF1 e ATF2, Álcool acetil transferase

EST2, gene IAH1

ATTase, Alcool acetil transferase

MSP-PCR, Microsatellite *Primed* PCR, Reação em cadeia da polimerase com primer de microssatélite

LSU, Sub-unidade maior do ribossomo

bp, base pair

w/v, weight/volume

CLIB, Collection de Levures d'Interet Biotechnologique

DNTP, Deoxinucleotídeo trifosfato

UFC, Unidade Formadora de Colônia

mL, mililitro

YPD, D-Glicose, peptona, extrato de leveduras

M, mol/L

mM, mili-mol/L

μ L, microlitro

RPM, Rotações por minuto

p/v, peso/volume

ng/ μ L, nanogramas/microlitro

pmol/ μ L, picomol/microlitro

s, segundo

UPGMA, Unweighted Pair Group with Arithmetical Average

V, Volts

FAD2, Functional attribute diversity

FDc, Functional community based diversity

ICE, Incidence - base coverage estimator

ACE, Abundance base coverage estimator

DDB, Diazonium Blue B

g, gramas

m, metros

RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA

CE, *Chardonnay* área experimental

CN, Campos Novos área Experimental

PP, Pinheiro Preto, vinhedo e Cantina

Resumo

Os vinhedos estão entre as formas mais intensivas de plantio e a diversidade de leveduras associadas a estes vinhedos ainda não foram caracterizadas e, informações concernentes à ecologia e diversidade ainda é limitada. Neste contexto, o trabalho tem como objetivo estudar a diversidade e riqueza de leveduras associadas a regiões produtoras de vinho, selecionar linhagens do gênero *Saccharomyces* com fenótipos desejáveis para vinificação. As leveduras foram isoladas de três vinhedos localizados em Pinheiro Preto, Serra do Marari e Campos Novos no sul do Brasil. Em Pinheiro Preto, o mais antigo, foi coletado 20 pontos localizados nos vinhedos e na cantina para um estudo transversal, nos outros dois vinhedos foram coletados cachos de uvas. Após o isolamento em meio enriquecido (YPD), foram incubados por 48 horas a 28°C. Foi utilizado um procedimento de triagem consistindo de agrupamento de leveduras com o mesmo perfil obtido com (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*, seguido de identificação por sequenciamento do domínio D1/D2 (LSU rDNA) ou região ITS1-5.8S-ITS2 de um ou alguns representantes selecionados de cada grupo de leveduras, porém espécies não relacionadas foram agrupados em um mesmo grupo. Resultando em sensibilidade alta e especificidade baixa de (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*. Para análise da biodiversidade e riqueza de espécies foram sequenciados 106 linhagens identificadas em 22 espécies. Os índices de estimativas de riqueza aplicados variaram entre as espécies para cada vinhedo (ICE1, ACE, Jackknife 2, Bootstrap, $p < 0,001$). A comparação da diversidade taxonômica de leveduras provenientes destas regiões usando o índice Recíproco de Simpson apresentou diferença significativa entre os vinhedos de Serra do Marari e Campos Novos ($5,72 \pm 1,18$ e $2,92 \pm 0,36$, $p < 0,0001$). Em geral, observamos que os vinhedos diferenciaram entre si para os índices avaliados (FAD2, FDC e Rao $p < 0,0001$). Foi observada uma possível dispersão de *S. cerevisiae* entre a cantina e o parreiral em Pinheiro Preto. Através da análise fenotípica sugere-se que os isolados 06CE, 11 CE e 33CE

sejam de *Saccharomyces cariocanus*. Foi possível determinar 4 perfis genotípicos com o *primer* E11. De acordo com o perfil de compostos voláteis produzidos foi possível agrupar as linhagens. Os vinhedos apresentaram uma biodiversidade de leveduras, demonstrando ser um ambiente para o isolamento de linhagens do gênero de *Saccharomyces* de interesse industrial e enológico.

Abstract

The vineyards are among the most intensive forms of crop and the diversity of yeasts associated with vineyards have not yet been characterized, and information concerning the ecology and diversity is restricted. In this context, the work aims to study the diversity and richness of yeasts associated with wine-producing regions, select *Saccharomyces* strains with desirable phenotypes for winemaking. The yeasts were isolated from three vineyards located in Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos in southern Brazil. Samples were collected from 20 sites located in the vineyards. In Pinheiro Preto cross evaluation since it is the oldest of the vineyards studied, were collected 20 points located in the vineyards and in the winery, the other two vineyards were collected bunches of grapes. After isolation in YPD enrichment medium were incubated for 48 hours at 28 °C. We used a screening procedure group consisting of yeast with the same profile obtained (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting, followed by sequencing to identify the D1/D2 domain (LSU rDNA) or ITS1-5.8S-ITS2 region of one or some selected representatives from each group of yeasts, but unrelated species were clustered into one group. For analysis of biodiversity and species richness were sequenced 106 strains identified in 22 species. The estimated species richness applied varied between species for each vineyard (ICE1, ACE, Jackknife 2, Bootstrap, $p < 0.001$). A comparison of the taxonomic diversity of the yeasts from these regions using the reciprocal Simpson index showed a significant difference between the Serra do Marari and Campos Novos vineyards (5.72 ± 0.36 and 2.92 ± 0.36 , $p < 0.0001$). The possible spreading of *Saccharomyces cerevisiae* from the winery to the vineyard in Pinheiro Preto was observed. By phenotypic analysis suggests that the isolated 06CE, 33CE and 11CE is *Saccharomyces cariocanus*. Was determined 4 genotypic patterns using primer EI1. By the determination of the volatile profile was possible to group the strains of *Saccharomyces*. The vineyards showed a biodiversity yeast, demonstrating to be an environment for the isolation of the strains *Saccharomyces* of industrial interest oenological.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as áreas intensamente cultivadas têm enfrentado uma grave perda de diversidade. Os vinhedos estão entre as formas mais intensivas de agricultura, muitas vezes resultando em paisagens simplificadas, onde a vegetação seminatural é restrita a pequenas áreas dispersas. No entanto, uma tendência recente entre os produtores de vinho é promover cada vez mais o valor cultural desta paisagem, reconhecendo a importância de associar a produção de vinhos com a qualidade ambiental (NASCIMBENE *et al.*, 2013). A intensidade de manejo influencia negativamente a diversidade de plantas e da comunidade de microrganismos, embora pouca pesquisa tenha sido realizada em vinhedos.

Por outro lado, algumas mudanças simples na atividade agrícola compatíveis com a produção de uva podem potencializar os efeitos positivos sobre a diversidade de vários grupos taxonômicos. Assim, a frequência de corte (ZECHMEISTER *et al.*, 2003), a mecanização e o fornecimento de fertilizantes nitrogenados (MARINI *et al.*, 2007) são fundamentais para avaliar o papel dessas atividades agropecuárias que são suscetíveis de influenciar a diversidade de microrganismos, tais como o uso de tratamentos de herbicidas, fungicidas. Os vinhedos e superfícies da baga da uva proporcionam um ambiente físico em que podem se estabelecer as comunidades microbianas complexas compreendendo leveduras, bactérias e fungos filamentosos (WANG & LIU, 2013).

Na indústria do vinho, as composições de espécies dessas comunidades são de significativa importância, uma vez que as espécies de microrganismos que estão presentes podem contribuir para o processo de fermentação e, portanto, para as propriedades aromáticas do vinho resultante. Isto é de particular relevância nos casos em que a prática enológica inclui fermentações espontâneas, como é o caso em muitas vinícolas (SETATI *et al.*, 2012).

Populações de levedura são espacialmente distribuídas ao longo dos bagos e cachos de uva e ativas durante o curso do desenvolvimento da uva (BARATA, MALFEITO-FERREIRA, & LOUREIRO 2012). A densidade e diversidade da microbiota de uva podem ser influenciadas por vários fatores, incluindo as condições climáticas, doenças, pragas e práticas vitícolas (CADEZ, ZUPAN, & RASPOR, 2010; BARATA, MALFEITO-FERREIRA, & LOUREIRO, 2012). Recentemente, foram relatadas diferenças nas populações de leveduras associadas com uvas provenientes de fazendas orgânicas e convencionais (CORDERO-BUESO; *et al.*, 2011; TOFALO *et al.*, 2013).

Uma característica população autóctone de leveduras a ser considerada representativa de uma região vinícola particular, como acontece nas regiões produtoras da França, Espanha e Itália. Estas leveduras autóctones ocorrem na superfície das uvas, e o sucesso no processo fermentativo depende de um conjunto de fatores físicos, químicos e bióticos da região (QUEROL, *et al.* 2003)

Tem sido relatada a distribuição geográfica de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes regiões vitivinícolas específicas (VERSAVAUD *et al.*, 1995; CARUSO, CAPECE, SALZANO, & ROMANO, 2002;CAPPELLO, BLEVE, GRIECO, DELLAGLIO, & ZACHEO, 2004) bem como observam-se mudanças na composição da microflora em diferentes vinhedos (CAPPELLO *et al.*, 2004). Por vários anos consecutivos, linhagens predominantes de leveduras têm sido observadas em alguns vinhedos (VERSAVAUD *et al.*, 1995).

As leveduras que compõem a microbiota natural das diversas regiões produtoras, no entanto, ainda estão sendo caracterizadas e correlacionadas com a evolução do processo fermentativo, em termos de rendimento em etanol e formação de compostos secundários que qualificam o produto.

A busca de linhagens iniciadoras para uso em fermentações e a caracterização de leveduras selvagens que prevalecem durante a fermentação poderão permitir uma interferência bem sucedida no processo e

estabelecimento de padrões elevados e duradouros para o produto final, o vinho. A produção catarinense de vinhos, por motivos históricos e culturais, segue métodos artesanais e não apresenta desenvolvimento tecnológico suficiente para disputar o mercado com países do Mercosul e Europa. Durante a produção do vinho, o produtor tem buscado melhorar as condições de fermentação, principalmente buscando um melhor controle de higiene, tanto do processo como das instalações.

A falta de controle do processo fermentativo, do ponto de vista microbiológico, é um dos fatores que acarretam variações nas características sensoriais do vinho de safra para safra. Para produzir um vinho de qualidade e fazer com que este produto tenha sustentação no mercado, é necessário que o produtor catarinense adote tecnologia de produção controlada, buscando assegurar a qualidade do produto com tipicidade.

Para alcançar a qualidade desejada, o primeiro passo a ser tomado é definir os parâmetros que influenciam a bebida. Esta inconstância da qualidade compromete o desejo de se regulamentar um padrão de qualidade para indicação geográfica. Neste contexto, o presente trabalho visou contribuir para a busca de linhagens iniciadoras para uso em fermentações e investigar a diversidade de leveduras destas regiões. Para esta pesquisa, foi utilizado sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do rDNA de isolados dos diversos padrões obtidos por *fingerprinting* com o *primer* (GTG)₅. Os isolados selecionados identificados como *S. cerevisiae* foram caracterizados metabolicamente e avaliados quanto a sua sensibilidade estresse osmótico, alcoólico e perfil de compostos voláteis.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Taxonomia

A classificação refere-se ao agrupamento de organismos em um *taxon* com base em suas semelhanças ou relações ancestrais comuns, enquanto que a identificação incorpora o conceito de comparar os organismos desconhecidos em espécies classificadas com base em características semelhantes (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Inicialmente, os taxonomistas classificaram as espécies de leveduras, sejam ascomicéticas ou basidiomicéticas, pelo critério da sexualidade ou ausência, e secundariamente, as outras subdivisões, como famílias, subfamílias, gênero, espécies e linhagens, enquanto que a classificação e identificação foram baseadas em características morfológicas, fisiológicas e moleculares dela (KURTZMAN & ROBNETT, 2003).

As leveduras são fungos ascomicetos ou basidiomicetos unicelulares, nas quais o crescimento resulta, principalmente, em brotamento ou fissão binária (KURTZMAN *et al.*, 2011). Podem ser caracterizadas por estados sexuais que são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação (BARNETT, 1992). No trabalho mais atualizado referente à taxonomia de leveduras, foram descritos mais de 149 gêneros e 1500 espécies de leveduras (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Muitos destes critérios, assim como os estudos de compatibilidade sexual utilizados para a classificação de leveduras, são derivados de uma pequena porção do genoma, e são, portanto, muitas vezes pouco confiáveis e demorados. Uma vez que várias das características morfológicas e fisiológicas podem ser revertidas por uma mutação em um único gene, estes métodos são inadequados para identificação de leveduras (BARNETT, 1992). Além disso, o conceito biológico, que delimita as espécies à sua capacidade para hibridização, também é um problema em sistemática de levedura. A ausência

de fertilidade não exclui a especificidade, uma vez que apenas alguns genes atuam na aptidão de cruzamento entre as espécies (de BARROS LOPES, RAINIERI, HENSCHKE, & LANGRIDGE, 1999; PRETORIUS, WESTHUIZEN, & AUGUSTYN, 1999)

A taxonomia molecular tem várias vantagens reais ou potenciais para estudo ecológicos em comparação com taxonomias tradicionais, incluindo (i) o fato de que pode ser aplicada a uma ampla gama de taxa, incluindo aqueles que possuem algumas características morfológicas distintas, (ii) pode ser aplicada em todo ciclo de vida da espécie, (iii) a necessidade reduzida de treinamento, por exemplo conhecimento da morfologia, interpretação e comparação entre diferentes estudos, (iv) o potencial para a automatização de grande parte do processamento de caracterização da amostra, e (v) a capacidade de caracterizar taxonomicamente um grande número de amostras que são típicas da maioria dos estudos ecológicos (CARON *et al.*, 2009).

Assim, taxonomia polifásica se caracteriza pela inclusão de dados moleculares ao conjunto de dados que anteriormente foram utilizados, como os dados filogenéticos para classificação dos organismos, essencialmente indicando um consenso entre as abordagens utilizadas para associação. A taxonomia de leveduras tem uma abordagem polifásica com as espécies e gêneros formados por clados monofiléticos e polifiléticos fundamentados em dados genômicos, genotípicos, fenotípicos e ecológicos (VANDAMME, *et al.*, 1996).

2.2 Caracterização Molecular

Atualmente, além dos testes fisiológicos para identificação e separação de linhagens de leveduras, têm sido utilizadas técnicas de análise molecular como cariotipagem, análises de DNA mitocondrial e PCR. Todos esses métodos permitem uma distinção mais precisa entre as linhagens de *S. cerevisiae*, uma vez que a sistemática de leveduras baseada em critérios

morfológicos, fisiológicos e bioquímicos provou ser inadequada para a determinação de espécies, principalmente em grupos de leveduras de perfil nutricional restrito, como é o caso do gênero *Saccharomyces*. Embora estes critérios continuem sendo usados para identificação de um isolado a ser descrito (BARNETT; PAYNE; YARROW, 1990), as características fisiológicas são determinadas apenas por uma pequena fração do genoma (de BARROS LOPES *et al.* 1999).

As espécies de *Saccharomyces* são fenotipicamente indistinguíveis, e não podem ser diferenciadas com base nos testes taxonômicos convencionais (NAUMOV, L, & NAUMOVA, 2013). A diversidade genômica de linhagens de vinho pode ser avaliada de diferentes formas. Há características principais que são utilizadas para determinar a relação de genomas como conservação da sequência, diferenças primárias de sequências codificantes e as não codificantes do gene, genes sintênicos e manutenção da relação e posicionamento dos genes no cromossomo (BISSON, 2012).

2.3 Diversidade de leveduras: da uva para o vinho

A diversidade biológica, ou biodiversidade, é definida como uma variedade da vida na Terra em todos os seus níveis, de genes aos ecossistemas, e os processos ecológicos e evolutivos que a sustentam (GASTON, 1996). Abrange a diversidade de genes, fenótipos, populações, espécies, comunidades e ecossistemas (MOUCHET, VILLÉGER, MASON, & MOUILLOT, 2010).

A preservação da biodiversidade também é importante para garantir a conservação dos conjuntos gênicos de importância tecnológica. Com relação a este tema, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o impacto das práticas de vinificação, incluindo o uso extensivo de levedura seca ativa na comunidade natural microbiana (VALERO *et al.*, 2007).

A prática intensiva da vitivinicultura foi descrita como um efeito negativo na diversidade de leveduras no Chile em áreas mais tradicionais da cultura, revelando o efeito negativo do uso de monoculturas sobre a biodiversidade de leveduras em regiões produtoras de vinho. Por outro lado, mostra potencialidade das leveduras não-*Saccharomyces*, confirmando-se como produtores de enzimas com interesse industrial (GANGA & MARTINEZ, 2004).

Dessas leveduras, *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*) é a espécie mais frequentemente encontrada, podendo sobreviver mais tempo e com crescimento máximo entre 10^6 - 10^7 células/mL. Ainda que o crescimento destas leveduras limite-se apenas aos primeiros 2-3 dias de fermentação, a atividade de linhagens de *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera*) pode influenciar significativamente a composição química final do vinho (ROMANO, 2003; ZOTT *et al.*, 2010).

Embora seja esperado que a inoculação do mosto com *S. cerevisiae* selecionadas suprima as linhagens selvagens não pertencentes ao gênero *Saccharomyces* (NS), vários estudos revelam que as leveduras NS podem realmente persistir durante as várias etapas da produção de vinho (FLEET, 2003). Com relação às fermentações naturais, as linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e NS não convivem pacificamente. Em determinadas condições, as características enológicas destas linhagens NS não são expressa ou podem ser moduladas por culturas puras de *S. cerevisiae* (CIANI, BECO, & COMITINI, 2006; SETTANNI, SANNINO, FRANCESCA, GUARCELLO, & MOSCHETTI, 2012).

Podemos descrever o vinho como um produto de reações bioquímicas sequenciais governadas por microrganismos, como as leveduras. O vinho é caracterizado por um ambiente com valores de baixo pH e altas concentrações de açúcar que são limitantes para crescimento de espécies de microrganismos. No entanto, podemos afirmar que a qualidade distinta do vinho é determinada pela interação entre o tipo de uva, tecnologia, leveduras e ambiente. A

comunidade de leveduras presentes nos bagos de uvas, no mosto e durante a fermentação é descrita em diversas regiões no mundo nas quais são cultivadas uvas viníferas (FLEET, 2008). Independentemente da localização e variedade da uva, os gêneros *Candida*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Pichia* estão freqüentemente presentes (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de leveduras coletadas de bagas e cachos de uva saudáveis.

Espécies	França	Italia	Espanha	Portugal	Grécia	Eslovenia	Canada	Brasil	Argentina	China
<i>Basidiomycetes</i> ^a	***	***		***		***	***	*	*	*
<i>Aureobasidium pullulans</i>		***	*	**	*	**	***	*		
<i>Hanseniaspora</i> spp	**		***		**	**				*
<i>H.uvarum</i>		**	***		***		*	***	***	***
<i>Metschnikowia</i> spp			*	*		*			***	*
<i>Candida</i> spp	***	*		*					*	*
<i>Candida stellara/zemplanina</i>					*				*	*
<i>Debaryomyces</i> spp	*					*				
<i>Issatchenkia</i> spp			**		*			***	*	*
<i>Kluyveromyces spp/Lachancea</i> spp	*		*	*						
<i>Pichia</i> spp	*	*	*						*	
<i>Brettanomyces</i> spp	*	*								
<i>Saccharomyces</i> spp	*	*								
<i>S. cerevisiae</i>			**							
<i>Saccharomycopsis</i> spp		**								
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>				*					*	
<i>Torulaspota</i> spp			*							
<i>Zygosaccharomyces</i> spp										*
<i>Z. baillii</i>		*	*							*
Amostragem	Cacho	Baga	Baga	Baga	Cacho	Cacho	Cacho	Baga/Cacho	Cacho	Cacho
Contagem (Log)	3 -5/mL	—	—	2-6/g	3-4/g	3- 5 /g	—	—	5-6/g	3-5/g
Meio de cultura	G	G	G/A	G/S	G/S	G	G	G	G	G/S
Referência	Renouf <i>et al</i> 2005	Sabate <i>et al</i> 2002	Clavijo <i>et al</i> 2010	Barata <i>et al</i> 2008	Nsiotou and Nychas (2007)	Raspor <i>et al</i> 2006	Subden <i>et al</i> 2003	Baffi <i>et al</i> 2011	Combina <i>et al</i> 2005	Li <i>et al</i> 2010

a: *Cryptococcus* spp.; *Bulleromyces* spp., *Sporobolomyces* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporom* spp. G:uso geral; A: auto enriquecimento, S: Meio seletivo.

O símbolo * indica a proporção relativa de espécies detectadas. Tabela adaptada de BARATA *et al.*,(2012).

2.4 O papel da *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação

A primeira evidência de produção de bebidas fermentadas data de 7000 a.C., no período Neolítico em uma aldeia denominada “Jiahuin” (China) (McGovern et al., 2004). Porém, as primeiras evidências de vinificação foram encontradas em um sítio arqueológico denominado “Hajji Firuz Tepe”, no noroeste do Irã (5400 – 5000 a.C.). A partir destas origens nas encostas do norte de Zagros, no leste de Taurus e das montanhas do Cáucaso, os vinhedos foram gradualmente espalhando-se para regiões adjacentes da Mesopotâmia, o vale do Jordão e, mais além, para o Mediterrâneo Oriental, como as regiões do Egito, Fenícia, Creta e Grécia (5000 a.C) (THIS, LACOMBE, & THOMAS, 2006).

A colonização dos fenícios, cartagineses e gregos levaram a vinificação para todas as regiões do Mediterrâneo Ocidental, sul da Europa e Norte da África. Por volta de 500 a.C., o vinho estava sendo produzido na Itália, Sicília, sul da França, Península Ibérica e região noroeste da África (Magrebe). A cultura do vinho foi, posteriormente, espalhada pelos romanos para os limites do norte de seu império (100 a.C.). A próxima expansão importante da produção de vinho foi durante a colonização europeia da América no século 16, da África do Sul, no século 17 e, finalmente, Austrália e Nova Zelândia entre os séculos 18 e 19 (PRETORIUS *et al.*, 1999). Desde a descoberta de levedura como a causa da fermentação numerosas linhagens de *S. cerevisiae* foram isolados, a maioria das quais foram encontrados associados com a produção de bebidas alcoólicas (FAY & BENAVIDES, 2005).

Até cerca de 1980, a contribuição das leveduras na produção de vinho era vista como um conceito relativamente simplista. Essencialmente, o suco de uva passava por fermentação espontânea que, quase invariavelmente, era dominada por linhagens de *S. cerevisiae*. Consequentemente, culturas puras destas leveduras foram isoladas e desenvolvidas como fermentos para a realização da fermentação do vinho (FLEET, 2008). Esta espécie, juntamente com *Saccharomyces paradoxus*, *S. mikatae*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S.*

pastorianus e *S. bayanus*, e, foram confirmadas como espécies biológicas distintas, constituíam o complexo de *Saccharomyces sensu stricto* (NAUMOV *et al.*, 2000).

Esta nova classificação tem criado uma grande confusão referente ao epíteto *bayanus*. Para os taxonomistas, *S. bayanus* é uma espécie distinta de *S. cerevisiae*. Para os enologistas e viticultores, *S. bayanus* (*oviformis*) designa uma linhagem fisiológica de *S. cerevisiae* que não fermenta galactose e possui uma forte resistência ao etanol, sendo denominada de *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Por milhares de anos, as leveduras do gênero *Saccharomyces* têm sido empregadas pelo homem na fermentação em diferentes processos. Atualmente, sete espécies formam o gênero *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. arboricola*, *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* e *S. paradoxus*. Duas espécies principais, *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, são atualmente reconhecidas entre as leveduras de vinho. (NAUMOVA *et al.*, 2011).

As leveduras do gênero demonstram grande capacidade de transformar carboidratos de carbono em etanol e CO₂, através do processo de fermentação, e este expediente tem sido aplicado por seres humanos em processamento de pão, vinho e cerveja (SICARD & LEGRAS, 2011; ALMEIDA; ARAUJO, 2013).

A habilidade de crescer e fermentar em altas temperaturas são pré-requisitos importantes para que as leveduras sejam utilizadas em fermentações industriais. Embora *S. cerevisiae* seja sempre predominante em fermentações, a queda na temperatura afeta a sua competitividade (LÓPEZ-MALO, QUEROL, & GUILLAMON, 2013).

Segundo TOFALO *et al.* (2009), populações de linhagens selvagens têm uma alta diversidade. A competição durante a fermentação alcoólica realizada em temperaturas diferentes pode ser uma forma de aproveitar tecnologicamente essa diversidade.

Estudos afirmam que *S. cerevisiae* é praticamente ausente nas uvas e solo de videiras (MARTINI, CIANI, & SCORZETTI, 1996); enquanto outros propõem que é um organismo “natural” em frutas (SNIEGOWSKI, DOMBROWSKI, & FINGERMAN, 2002). Ainda há outros que sugerem que *S. cerevisiae* é uma espécie domesticada, que tem origem no seu parente próximo *S. paradoxus*, uma espécie selvagem encontrada em todo o mundo associada a insetos, exsudatos de árvores e extrato fermentado de plantas (NAUMOV, NAUMOVA, & MASNEUF-POMARÈDE, 2010).

CIANI *et al.*(2006), investigaram a origem das linhagens de *S. cerevisiae* envolvidas na produção de vinho, e concluíram que aquelas encontradas no ambiente da vinícola são as responsáveis pela fermentação espontânea do mosto de uva. Desta forma, as poucas linhagens de *S. cerevisiae* encontradas na casca da uva não participam, ou têm pouca significância, no processo fermentativo, sendo apenas linhagens transitórias no processo.

2.5 Origem de *S. cerevisiae*

O conceito de espécies filogenéticas define as espécies como um grupo distinto monofilético com base na história evolutiva e extensão geográfica. Este conceito enfrenta as dificuldades de conhecimento incompleto e uma definição um pouco arbitrária de limites específicos (LITI, BARTON, & LOUIS, 2006).

Ainda que a origem de *S. cerevisiae* seja motivo de controvérsia, seu genoma original tem sido submetido à forte pressão seletiva. O sequenciamento subsequente dos genomas de outras linhagens do gênero *Saccharomyces* de diversos nichos ecológicos e de espécies de leveduras não relacionadas gerou novos discernimentos sobre a origem da linhagem moderna do vinho, bem como a evolução de fenótipos, diversidade genética e plasticidade genômica deste importante organismo industrial (SALINAS *et al.*, 2012; BISSON, 2012).

Como as leveduras não são tipicamente dispersas por longas distâncias, devido a barreira continental, por sua longa e estreita associação com os agentes responsáveis pela produção de vinho, cerveja e pão, é uma explicação para a divergência genética entre as populações, apesar de ser transportada por seres humanos e insetos (PRETORIUS *et al.*, 1999; FAY & BENAVIDES, 2005; ZHANG, SKELTON, GARDNER, & GODDARD, 2010).

Os dados obtidos por, PERIS *et al.*, (2012) comparando genomas de *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii*, sugerem que os híbridos devem ter-se originado de vários eventos envolvendo uma linhagem *S. cerevisiae* diplóide e linhagens europeias de *S. kudriavzevii* haplóide ou diplóide. Os híbridos mantiveram os genes envolvidos para a adaptação ao frio, bem como aqueles relacionados com funções mitocondriais de *S. kudriavzevii*.

No entanto, esses rearranjos genômicos podem representar os estágios de formação potencial de novas espécies, como foi visto para *S. pastorianus*. A passagem limitada, que ocorre com as práticas de vinificação atuais, especialmente quando comparada às práticas históricas de re-inoculação da levedura para produção da cerveja, pode ter limitado a oportunidade para estes híbridos de *Saccharomyces* sofrerem uma evolução em grande escala no genoma, como é observado para as atuais linhagens de *S. pastorianus*, (BORNEMAN *et al.*, 2012).

A espécie *S. paradoxus* apresentam uma forte demarcação geográfica entre as linhagens europeias, americanas e do extremo oriente (ZHANG *et al.*, 2010; ZÖRGÖ *et al.*, 2013). LITI *et al.* (2006), demonstraram que as sequências de *S. paradoxus* diferem por seis genes agrupados em três subtipos correlacionados com a origem geográfica como demonstrado na Figura 1. Todos os cruzamentos entre os três principais clados apresentaram isolamento reprodutivo parcial, assim *S. paradoxus* parece estar em uma fase inicial de especiação alopátrica. Estas espécies são caracterizadas por conviver no mesmo ambiente devido a diferentes preferências de temperatura.

GONÇALVES *et al.* (2011), isolaram *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* (ambos termotolerantes) e *S. kudriavzevii* e *S. bayanus* (ambos termossensíveis) nesta investigação, conseguiram isolar até mais de uma espécie a partir do mesmo local. Entretanto, FAY & BENAVIDES (2005) propuseram um modelo em que duas linhagens especializadas de *S. cerevisiae* foram geradas, uma para a produção de vinho e outra para a produção de saquê, estimando que estas duas linhagens permaneceram isoladas uma da outra por milhares de anos, consistente com as primeiras evidências arqueológicas para vinificação, concluindo-se que, embora haja linhagens especializadas para produção de bebidas alcoólicas, estas foram derivadas de populações naturais e não o contrário.

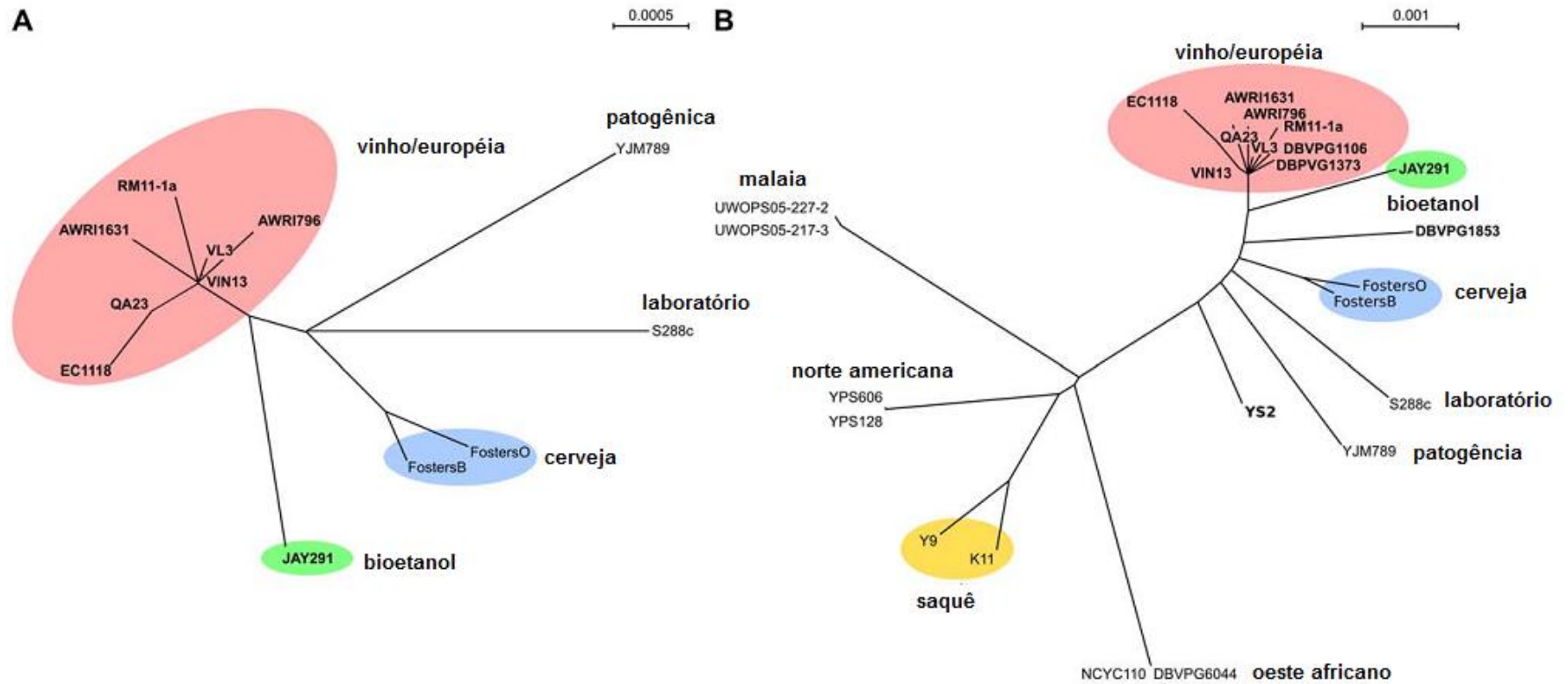


Figura 1. Representação da distância genética entre as linhagens do gênero *Saccharomyces*. (a) Neighbor-Joining, representando a distância genética entre as linhagens calculado a partir do total de diversidade de *SNP* presente nos alinhamentos de genomas totais; (b) Linhagens representativas de diversas populações geográficas, presentes em (a). As linhagens são codificadas pelas cores: vinho/europeia, incluindo a RM11-1A (rosa); cerveja (azul); bioetanol (verde) e sake (amarelo). Figura adaptada de BORNEMAN *et al.* (2011).

A ampla distribuição de algumas linhagens em determinadas regiões vinícolas e a permanência destas linhagens em determinadas regiões vinícolas ao longo de dois anos sugerem a ocorrência de linhagens nativas específicas, representantes de uma região, havendo relação entre origem geográfica e genética entre as linhagens (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2000; CORDERO-BUESO; ARROYO; SERRANO; VALERO, 2011).

A existência de linhagens específicas de *S. cerevisiae* em diferentes regiões vinícolas representa uma adaptação das mesmas a microambientes específicos. Alguns enólogos admitem que possam ser obtidos bons resultados usando-se linhagens originadas destes microambientes como iniciadoras em processos fermentativos (ESTEVE-ZARZOSO *et al.*, 2000).

2.6 Ciclo de vida da *S. cerevisiae*

O ciclo de vida da levedura *S. cerevisiae* refere-se a dois amplos aspectos: a proliferação celular caracterizada pelo evento de uma célula de um *mating* originar duas células que são essencialmente idênticas; o segundo aspecto está relacionado com as mudanças na ploidia do organismo, isto é, as transições do ciclo de vida de ambas as formas haplóides existentes. Células haplóides que pertencem a *mating types* diferentes formam células diplóides, por conseguinte sofrem meiose para formar células haplóides (HERSKOWITZ, 1988; COSMA, 2004). No entanto, os esporos da maioria dos isolados naturais são capazes de mudar o tipo de *mating type*; são referidas como linhagens homotáticas (LANDRY, *et al.*, 2006).

O *mating type* da célula é determinado pelo locus MAT. A interconversão entre MAT α e MAT a entre linhagens homotáticas é produto da proteína do gene HO, que é uma endonuclease que causa a alternância de *mating type* em *S. cerevisiae* (HERSKOWITZ, 1988). A interconversão ocorre exclusivamente em células mãe, jamais em células filhas ou em esporos.

S. cerevisiae é uma levedura haplóide, que geralmente se reproduz assexuadamente por brotamento. Porém, possui uma fase sexual por sistema de

mating, com dois *mating types* (MAT), MAT α e MAT a (Figura 2). Durante o seu ciclo vegetativo, as células diplóides Mat a/α sofrem esporulação e meiose para produzir uma célula mãe e outra célula filha, sendo que as mesmas possuem o mesmo *mating type* dos esporos originários (COSMA, 2004).

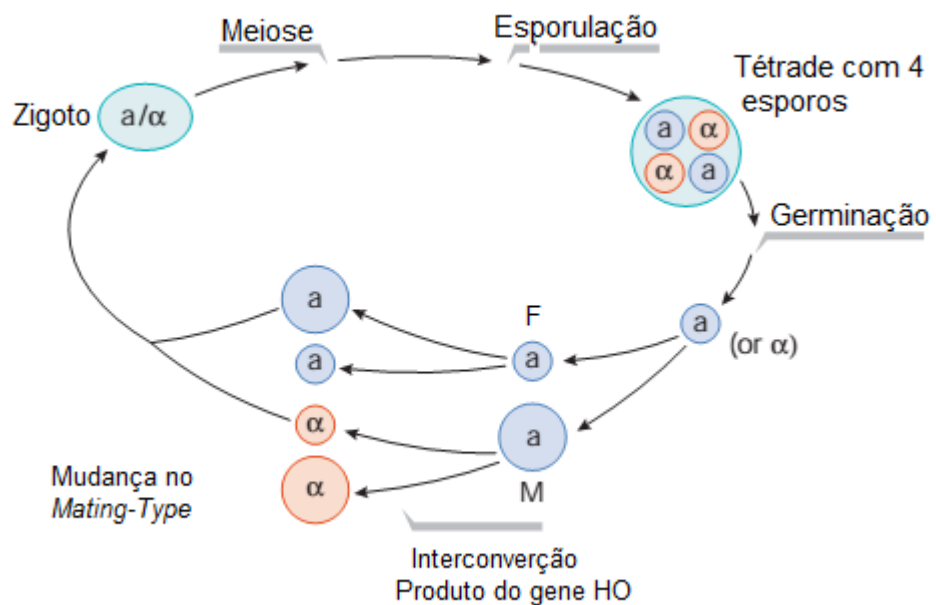


Figura 2. Ciclo de vida da levedura de brotamento. O zigoto sofre meiose e esporulação. Quatro esporos germinam a partir do asco. Cada esporo divide-se, produzindo uma mãe (M) e uma filha (F) célula sem alteração do *mating type*. Durante a segunda divisão mitótica, somente a célula mãe pode alternar o *mating type* antes da divisão. Figura adaptada de COSMA, (2004)

2.6.1 Ploidia

Foram encontradas influências de ploidia na proliferação assexuada em diferentes contextos ecológicos como sendo uma regra e não a exceção, com a maioria dos efeitos da ploidia sendo bem conservados ao longo dos 2 bilhões de

gerações que separam as duas espécies (DUJON, 2010). O número dos "conjuntos" de cromossomos é descrito como a plodia. Linhagens de *S. cerevisiae* de laboratório são geralmente haplóides ou diplóides. Linhagens haplóide de *S. cerevisiae* têm um conjunto (n), linhagens diplóides têm dois conjuntos ($2n$), e estirpes triplóides têm três conjuntos ($3n$) e assim por diante (HAMMOND, 1996).

Como as leveduras *S. cerevisiae* existem em um modo vegetativo, tanto haplóide quanto diplóide, esta alternância entre a fase haplóide, com um conjunto de cromossomos, e fase diplóide com dois conjuntos de cromossomos, representa uma grande mudança genômica afetando a evolução de uma espécie. Todos os organismos sexuais, por definição, têm ciclos de vida que alternam entre duas fases de ploidia: um estado reduzido, após a meiose, e um estado duplicado, desde a união dos gametas (EZOV *et al.*, 2006; GERSTEIN, CHUN, GRANT, & OTTO, 2006). Recentemente, tornou-se claro que a ploidia tem impactos substanciais, definindo evolução do genoma e hereditariedade, tendo impacto na aptidão mitótica, no genótipo e fenótipo da *S. cerevisiae* e seu parente mais próximo *S. paradoxus*, uma espécie selvagem (ZÖRGÖ *et al.*, 2013).

A progressão do ciclo celular das leveduras pode ser investigada através de citometria de fluxo; por exemplo, em uma população em proliferação (Figura 3), a distribuição de células dentro das principais fases distintas do ciclo celular pode ser determinada a partir de diferenças no conteúdo de DNA entre células em fases pré-replicativas (G_0 e G_1), células em replicação de DNA (S), e pós-replicativo mais a fase mitótica ($G_2 + M$). As células em fases G_2 e M têm conteúdo de DNA idêntico e, portanto, não podem ser discriminadas com base neste parâmetro. As células com conteúdo de DNA fracionário que se encontram em uma situação que ocorre durante a apoptose podem ser identificadas como uma população "sub- G_1 " (DELOBEL & TESNIÈRE, 2014).

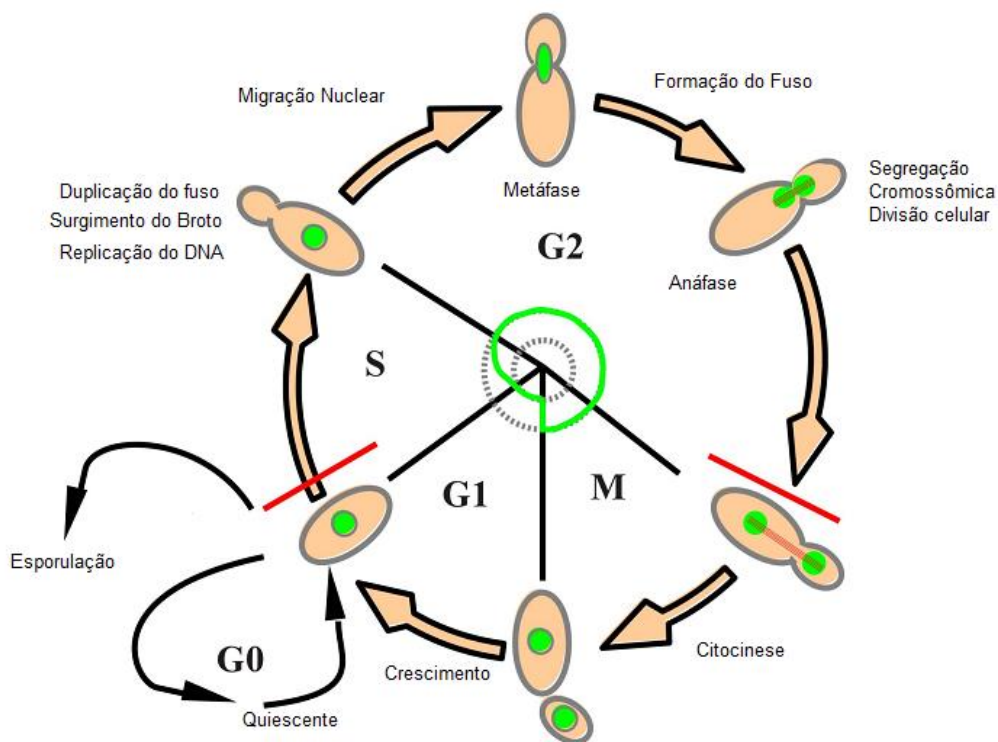


Figura 3. Progressão do ciclo celular em células de leveduras. Figura adaptada de DELOBEL & TESNIÈRE (2014).

2.7 Produção de ésteres por leveduras

Substâncias de aroma ativo produzido através da fermentação por células de levedura podem ser divididas em seis grupos principais: os ácidos orgânicos, álcoois superiores, os compostos de carbonila, moléculas que contêm enxofre, compostos fenólicos e ésteres voláteis. Os compostos traços de esteres voláteis em bebidas fermentadas compreendem o conjunto mais importante de compostos de aroma ativo derivados de levedura. Estes compostos de aroma (Figura 5) denominado “yeast-bouquet” são metabólitos secundários produzidos por inúmeras espécies de

leveduras, representados, principalmente por ésteres acetato, ésteres etilílicos, alcoóis superiores, carbonilas a ácidos graxos voláteis (CORDENTE *et al.*, 2012).

O processo fermentativo leva à formação de uma mistura complexa de produtos que enriquecem o aroma e sabor, tanto de alimentos quanto de bebidas obtidas por fermentação (LILLY *et al.*, 2006). Tradicionalmente, o desenvolvimento da fermentação possui um papel muito importante para a qualidade e quantidade de aromas desenvolvidos em bebidas. As leveduras, assim como outros microrganismos, são grandes produtores de ésteres (SAERENS, DELVAUX, VERSTREPEN, & THEVELEIN, 2010; CORDENTE, CURTIN, VARELA, & PRETORIUS, 2012).

Em condições ótimas, estes componentes podem ser obtidos sem que ocorram perdas no crescimento e no metabolismo fermentativo de tais microrganismos (VOILLEY & ETIÉVANT, 2006). Os ésteres são formados no citoplasma da célula da levedura fermentativa. Como possuem solubilidade a lipídeos, os ésteres acetato se difundem rapidamente pela membrana para o meio de fermentação. Os etil ésteres de ácidos graxos também são produzidos no citoplasma, porém sua transferência para o meio é mais dificultada e é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia de ácido graxo (SUMBY *et al.*, 2010).

Em *S. cerevisiae*, a produção de ésteres acetato ocorre através da expressão de duas enzimas, a enzima álcool acetil tranferase (ATF1) e a enzima éster sintase, e o produto do gene EST2, uma enzima esterase que diminui a quantidade de ésteres acumulados no meio fermentativo, hidrolisando-os. Várias enzimas são envolvidas na formação de ésteres, as mais caracterizadas são a AATase I e II (EC 2.3.1.84), que são codificadas pelos genes ATF1 e ATF2, respectivamente (VERSTREPEN *et al.*, 2003) e enzima éster sintase (LILLY *et al.*, 2006), ambas bem caracterizadas em leveduras *S. cerevisiae*. Os acetatos são sintetizados na célula da levedura pela enzima álcool acetil transferase (AATase), utilizando alcoóis superiores e acetil-CoA como substrato (LILLY *et al.*, 2006). Além disso, os ésteres acetato podem ser produzidos com a condensação de alcoóis superiores (metabolismo de aminoácidos) com etanol (VERSTREPEN *et al.*, 2004).

Ao mesmo tempo, a atividade de enzimas esterase é muito importante e em leveduras *S. cerevisiae*, o gene IAH1 (formalmente EST2) é responsável pela produção de esterases (VERSTREPEN *et al.*, 2003), que atuam sobre os ésteres formados, impedindo sua acumulação no meio. A ação conjunta destas enzimas é necessária para a produção e acúmulo de ésteres acetato no meio de fermentação (VERSTREPEN *et al.* 2004).

Basicamente, dois fatores são importantes na formação de ésteres pela levedura, a concentração dos dois substratos, ou seja, acil-CoA/acetil-CoA e alcoóis superiores ou ácidos graxos, e a atividade total das enzimas envolvidas na formação e hidrólise do respectivo éster, como a AATase, éster sintase e esterases, respectivamente (VERSTREPEN *et al.*, 2004). Condições de cultivo como temperatura, adição de ácidos graxos, fontes de nitrogênio e sua disponibilidade e nível de oxigenação possuem influência sobre a síntese de ésteres, pois modificam a quantidade de acetil-CoA na célula (BORNEMAN *et al.*, 2011).

Existem quatro tipos principais de modificações de componentes de uvas que são catalisadas pela levedura (BISSON & KARPEL, 2010). As glicosidases de leveduras são capazes de liberar uma porção aromática de precursores de glicosídeos não voláteis. Da mesma forma, a enzima cisteinila liase pode liberar compostos tióis voláteis ligados a grupamentos cisteinila e glutatila. As oxidases e redutases podem converter compostos voláteis de aroma originários da uva em diferentes espécies. A levedura pode causar modificações de outras formas que não envolvam a reação de oxidação ou redução, mudando a volatilidade ou natureza do aroma (SAERENS *et al.*, 2008; VERSTREPEN *et al.*, 2003).

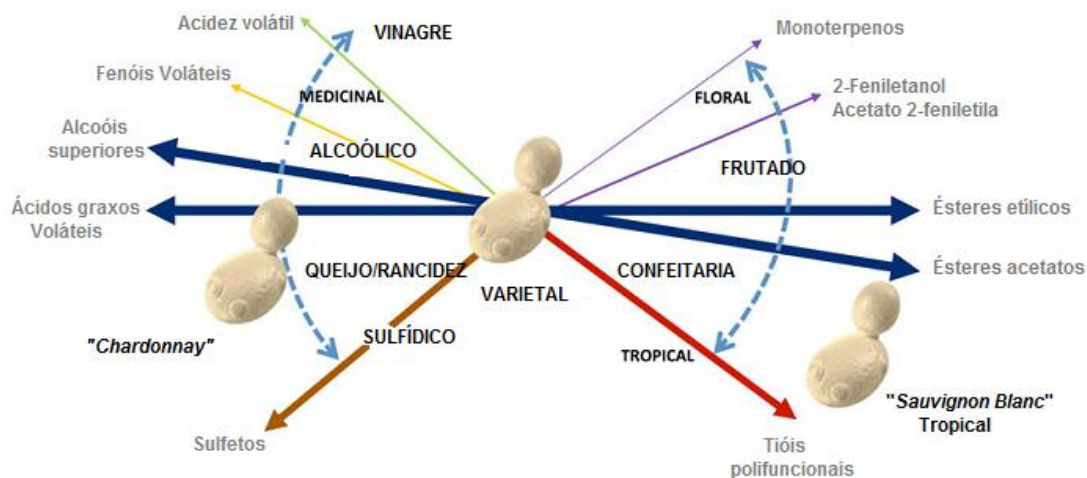


Figura 4. Os fenótipos das leveduras de vinho foram selecionados pelo espectro de aromas com grupos de compostos de aromas ponderados indicados por setas sólidas de acordo com magnitude do impacto (setas em negrito, setas tracejadas). Exemplos de fenótipos que podem ser desejáveis para vinificação com objetivos diferentes objetivos indicados pelo posicionamento de levedura. Figura adaptada de CORDENTE *et al.*, (2012).

2.8 Técnicas de biologia molecular

Nos últimos anos, os métodos moleculares foram incluídos como parte de uma identificação rápida e confiável em leveduras, permitindo, assim, a investigação de um grande número de isolados em um período muito mais curto. As características fenotípicas usadas na sistemática de leveduras têm sido combinadas com o emprego de técnicas moleculares, possibilitando o acompanhamento da dinâmica de populações dos microrganismos durante o ciclo fermentativo.

Desta forma, é possível verificar a influência de parâmetros como nutrientes, temperatura e aeração dos tanques de fermentação no surgimento ou

desaparecimento de espécies e/ou linhagens e correlacionar estes fatores com a qualidade do vinho produzido. A aplicabilidade de técnicas moleculares, tais como o método de RAPD e análise com enzimas de restrição de pequenas subunidades amplificadas por PCR (BALEIRAS COUTO *et al.*, 1995; BALEIRAS COUTO *et al.*, 1996) têm sido demonstradas como uma ferramenta para fins taxonômicos que fornecem informações sobre o nível de espécie (CARUSO *et al.*, 2002).

O conhecimento de regiões hipervariáveis (microsatélites) no DNA genômico de *S. cerevisiae* tem sido utilizado por mostrar polimorfismo entre as linhagens (FIELD & WILLS, 1998). Todas estas características fazem com que marcadores baseados em microsatélite sejam ideais para o mapeamento genético e físico de genomas para identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (GRATTAPAGLIA *et al.*, 2001; MUIR *et al.*, 2011). Os microsatélites constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente através de PCR, utilizando-se um par de *primers* específicos (CAPECE *et al.*, 2003).

Microsatélites são sequências de DNA de unidades curtas (1-10 nucleotídeos) repetitivas, dispersas pelo genoma. O genoma de *S. cerevisiae* apresenta abundância de microsatélites, que estão distribuídos pelos 16 cromossomos, gerando numerosos alelos polimórficos, estando presentes também no DNA mitocondrial (RICHARDS *et al.*, 2009). O princípio desta técnica consiste em um conjunto de microsatélites, tais como (CA)_n, (CT)_n, (GT)_n, (GAC)_n, (GTG)_n, (GACA)_n, (GATA)_n, (TGTC)_n, entre outros, ou minissatélites, que funcionam como iniciadores de uma PCR de segmentos genômicos que são flanqueados por sequências repetidas, como no caso de microsatélites (LIECKFELDT *et al.*, 1993) ou por sequências de DNA minissatélite (MEYER & MITCHELL, 1995).

Neste sentido, muitas técnicas moleculares foram desenvolvidas para discriminar entre espécies de leveduras diferentes, entre estas a técnica *Microsatellite Primed (MSP)-PCR Fingerprinting* foi amplamente usada na literatura

para discriminar linhagens do gênero *Saccharomyces*. O PCR com o *primer* E11 (5'-CTGGCTTGGTGTATGT - 3'), é um *primer* complementar os sítios de processamento de íntron composto por regiões mutáveis no genoma de *Saccharomyces*. GUERRA *et al.* (2001) observaram durante um ciclo de 24 horas, em três destilarias de Minas Gerais pelos métodos de análise de cariótipo e RAPD com o *primer* M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT - 3') e E11, que *S. cerevisiae* foi a principal levedura responsável pela condução da fermentação, sendo verificada a presença de diferentes linhagens ao longo do processo. SILVA-FILHO *et al.* (2005) utilizou o *primer* (GTG)₅ para mostrar a sucessão de leveduras durante a fermentação de álcool combustível.

As técnicas usadas com maior frequência nos laboratórios são as baseadas somente em PCR, isto é, MSP-PCR e RAPDs, já que proporcionam menor tempo de análise comparado com técnicas como cariotipagem ou PCR-RFLP (SILVA-FILHO *et al.*, 2005). Porém, o uso de RAPDs é questionado em relação a sua reprodutibilidade e instabilidade dos perfis obtidos (FERNANDEZ-ESPINAR *et al.*, 2011), portanto o uso de regiões microssatélites para analisar a variabilidade inter e intraespecífica é mais conveniente para avaliar a dinâmica de comunidades e populações de leveduras na indústria e em microbiologia ambiental.

3. OBJETIVOS

A principal proposta deste trabalho é avaliar a diversidade de leveduras em regiões produtoras de vinho no sul do Brasil.

3.1 Objetivos específicos

- Estudar a diversidade molecular de linhagens isoladas de parreirais de regiões de Santa Catarina.
- Validar e padronizar um protocolo para a técnica de MSP-PCR *Fingerprinting* para o monitoramento de vinhos.
- Caracterizar metabolicamente as linhagens identificadas como linhagens do gênero *Saccharomyces*.
- Determinar o perfil de compostos voláteis das linhagens identificadas como *linhagens do gênero Saccharomyces*.
- Avaliar a tolerância ao estresse etanólico e osmofílico das linhagens do gênero *Saccharomyces*.
- Determinar a ploidia das linhagens do gênero *Saccharomyces* por citometria de fluxo.

4. Capítulo I

(GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?

Artigo publicado na Plos one, no dia 29 de agosto de 2014

**(GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine
Associated Yeasts?**

Mauricio Ramírez-Castrillón^{1,2*}, Sandra Denise Camargo Mendes^{1,2,3*},

Mario Inostroza-Ponta⁴, Patricia Valente da Silva²

* Those authors contributed equally for the manuscript.

2. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil.

3. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Laboratório de Análises de Vinhos e Derivados, Estação Experimental de Videira, Rua João Zardo s/nº, Campo Experimental, CEP 89560-000, Videira, SC, Brazil.

4. Departamento de Ingeniería Informática, Universidad de Santiago de Chile, Santiago de Chile, Chile.

*Correspondence and reprints: Patricia Valente da Silva, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 210, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33084196 (e-mail: patricia.valente@ufrgs.br).

Abstract

In microbiology, identification of all isolates by sequencing is still unfeasible in small research laboratories. Therefore, many yeast diversity studies follow a screening procedure consisting of clustering the yeast isolates using MSP-PCR fingerprinting, followed by identification of one or a few selected representatives of each cluster by sequencing. Although this procedure has been widely applied in the literature, it has not been properly validated. We evaluated a standardized protocol using MSP-PCR fingerprinting with the primers (GTG)₅ and M13 for the discrimination of wine associated yeasts in South Brazil. Two datasets were used: yeasts isolated from bottled wines and vineyard environments. We compared the discriminatory power of both primers in a subset of 16 strains, choosing the primer (GTG)₅ for further evaluation. Afterwards, we applied this technique to 245 strains, and compared the results with the identification obtained by partial sequencing of the LSU rRNA gene, considered as the gold standard. An array matrix was constructed for each dataset and used as input for clustering with two methods (hierarchical dendrograms and QAPGrid layout). For both yeast datasets, unrelated species were clustered in the same group. The sensitivity score of (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting was high, but specificity was low. As a conclusion, the yeast diversity inferred in several previous studies may have been underestimated and some isolates were probably misidentified due to the compliance to this screening procedure.

KEYWORDS

MSP-PCR Fingerprinting, (GTG)₅, wine, yeast identification

1. Introduction

Yeast identification is currently based on sequencing of domains 1 and 2 (D1/D2) of the LSU rRNA gene and/or the ITS1-5.8S-ITS2 region [1], proposed as a universal barcode for fungi in 2011 [2]. Monitoring the contribution of each species or population, both in industrial microbiology or yeast diversity studies, involves the isolation and analysis of a large number of isolates, which makes the identification of all the isolates by sequencing unfeasible in small research laboratories. In this regard, many molecular techniques have been developed to discriminate between different yeast species. Among them, the Microsatellite/Minisatellite Primed (MSP)-PCR Fingerprinting technique has been widely applied in the literature using primers as (GAC)₅, (GACA)₄, (GTG)₅ and M13. For example, the primer (GTG)₅ was frequently used to discriminate species of the genus *Saccharomyces* [3]–[8], characterize strains of non-*Saccharomyces* species [9]–[12], analyze yeast diversity [13]–[20], and describe new yeast genus and species [21]–[24].

Most of these studies use MSP-PCR fingerprinting as a preliminary clustering step for the choice of representative strains to be sequenced. Identification is ultimately attained by sequencing, and all the strains grouped in the same cluster of the sequenced one are assumed to belong to the same species. Although this procedure has been widely applied in the literature, it has not been properly validated. Furthermore, some studies have reported difficulties in discriminating species using MSP-PCR fingerprinting with different primers [25]–[29]. In this context, each study reports different DNA amplification protocols, jeopardizing the comparison of genetic profiles, and making it impossible to share genotype databases among laboratories.

A MSP-PCR fingerprinting protocol with (GTG)₅ primer was useful for the description of yeast population dynamics along the fuel-ethanol fermentation process, and for the identification of the dominant wild strains that could be used as starter strains [7]; however, this primer has not yet been evaluated for monitoring the yeast dynamics in wine production in Brazil. Therefore, the objective of this study was {I} to propose and validate a standardized protocol for the MSP-PCR

Fingerprinting technique, and {II} to assess its reliability as a tool for discrimination of different yeast species and clustering of isolates belonging to the same species. This protocol was intended to be applied to wine yeasts, and was evaluated using two datasets: yeasts isolated from bottled wines (thereafter considered a "lower diversity" sample), and yeasts from the winery and vineyard environments ("higher diversity" sample). For the validation of the technique, identification by sequencing was selected as gold standard. We found high intra and inter-specific variability in the fingerprint profiles, with clusters comprising isolates belonging to different species, suggesting a high probability of misidentification when MSP-PCR fingerprinting followed by sequencing of representatives of each profile is applied in yeast diversity studies.

2. Results and discussion

2.1 Yeast identification

From the "lower diversity" group of species (isolated from bottled wines), we obtained the genomic DNA of 102 yeast strains, belonging to 11 species, plus 4 non-identified isolates (Table 1). All the isolates were identified by sequencing the D1/D2 domain of the LSU rRNA gene or the ITS1-5.8S-ITS2 region. The analysis was initially performed with the "lower diversity" group of yeasts, and afterwards expanded to the "higher diversity" group. From the "higher diversity" group (isolated from the winery and vineyard environments, see Methods S1), we obtained 101 isolates belonging to 20 species plus 38 non-identified isolates (Table S1).

2.2 Standardization and assessment of MSP-PCR Fingerprinting profiles

We made an initial screening of a subset of 16 isolates with the primers M13 and (GTG)₅ to evaluate the discriminatory power of each primer. Both primers generated discriminative and complex fingerprints, with band sizes ranging from 200 to 2500bp for M13 and 200 to 1800bp for (GTG)₅. Dendrograms for M13 and (GTG)₅ primers showed four clusters with a discriminatory power (D) of 0.66 for M13 (Figure

S1A), and 0.7 for (GTG)₅ (Figure S1B). Nevertheless, the dendrogram made with the primer (GTG)₅ grouped all the four isolates of *Saccharomyces cerevisiae* in the same cluster (Figure S1B). Literature concerning the usefulness of these primers is conflicting. For instance, the primer (GTG)₅ was recommended to monitor populations of yeasts in ethanol fermentation [7]. Several authors demonstrated that non-*Saccharomyces* species participating in different fermentation processes showed similar profiles with M13 and (GACA)₄ and greater variability using the primers (GAC)₅ and (GTG)₅ [13], [16], [30], [31]. On the other hand, the primer M13 was able to differentiate 16 strains of *S. cerevisiae*, although with different amplification conditions [32]. M13 or both M13 and (GTG)₅ primers are widely used for assessment of yeast communities [33], and description of new genus, species or genotypes within species [21], [34], although Libkind [28] suggested that the primer M13 is not able to separate fingerprinting profiles in a complex of closely related species because it amplifies more conserved regions of DNA. Thus, as our goal was to discriminate related and unrelated yeast species, both primers had similar discriminatory power with our subset of 16 isolates, and the primer (GTG)₅ grouped all the isolates of *S. cerevisiae* in the same cluster, we chose primer (GTG)₅ for further evaluation.

The MSP-PCR Fingerprinting was standardized using the (GTG)₅ primer with the strain 20E (*S. cerevisiae*). The number of bands in the *S. cerevisiae* 20E profile was similar to other (GTG)₅ fingerprinting profiles obtained for this species in other studies [7], [35], [36]. The technique proved to be repeatable when tested in two independent PCR reactions with six repetitions using the commercial strain CLIB 2048 (*S. cerevisiae*). Repeatability and reproducibility were also evident when randomly chosen strains were analyzed in independent experiments.

We calculated the concordance between the (GTG)₅ fingerprinting and sequencing using the kappa index for the “lower” and “higher diversity” datasets, taking into account all the bands obtained from each isolate. The 106 isolates from the “lower diversity” dataset and the 139 isolates from the “higher diversity” dataset showed a kappa index of 0.177 and 0.201, respectively, with a confidence interval of 95% (Table 2). This means that the concordance between the identification by sequencing (gold standard) and by the (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting was slight for

the "lower diversity" and fair for the "higher diversity" dataset [37]. High scores of sensitivity (100%, 97.4%) and low scores of specificity (23.3%, 33.7%) with the (GTG)₅ MSP-PCR fingerprintings were found for the "lower" and "higher" diversity datasets, respectively (Table 2). High sensitivity scores mean that the number of isolates correctly identified by the MSP-PCR fingerprinting was high, but the low specificity scores mean that there were also many misidentified isolates in comparison with the "gold standard". The low specificity scores may explain the low concordance between the MSP-PCR fingerprinting and the sequencing methods in the present study. The source of the samples seemed not to influence the quality of the results, since isolates sampled from bottled wines ("lower diversity" dataset) and from the vineyard environments ("higher diversity" dataset) resulted in similar kappa indexes, sensitivities and specificities. The (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting has not been previously evaluated for these parameters.

2.3 The "lower diversity" yeast dataset

In order to understand the effect of the presence/absence of each band obtained by the (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting for the clustering of the isolates, the discriminatory power (D) of each band within each species was calculated for the 245 isolates and three reference strains. The D value of the bands for the five most abundant species of each dataset ranged from 0.048 to 1.000 (see Tables S2, S3). Many species had bands with D values around 1.000, meaning that those bands were able to discriminate all the isolates within the species, therefore making the fingerprinting profiles dissimilar among isolates from the same species. Bands with molecular weight lower than 900 bp were consistently present in almost all the isolates of each species, whereas the presence of bands with molecular weight higher than 900 bp was more variable (Figures S2, S3). Many factors may contribute for this variable result, and can indicate an amplification bias. Among these factors are the annealing temperature in the PCR, the purity of DNA, the thermocycler equipment, and the electrophoresis conditions for gel migration [38], which interfere with other fingerprinting techniques as well [39]. Furthermore, (GTG)₅ MSP-PCR fingerprinting was used in many studies with different protocols [34], , and there is not

a consensus in the PCR parameters (annealing temperature within a range of 42–60°C, etc), or electrophoresis conditions (for example, agarose concentration with a range of 1.4–2% w/v). This contributes for the weak reproducibility of the technique among laboratories, and jeopardizes any posterior comparison between the fingerprinting results. In order to rule out any influence from the variable bands higher than 900 bp in our analysis, we recalculated the kappa index, specificity and sensitivity scores using a range of band sizes between 200 and 900 bp. However, the results showed that concordance did not improve (Table 2).

In the present work, the fingerprinting profiles were analyzed based only on the number and size of bands, although band intensity is also considered by some authors. It has been previously suggested that the identification of two or more strains with the same amplification pattern (number and intensity of bands) might indicate clonality of strains from different geographical origins [7]. In our study, isolates of the species *Pichia membranifaciens* gave repeatedly the same band patterns without differences due to missing bands, although differences in band intensity of some fingerprints occurred. Therefore, the band intensity was not used as a variable for grouping the isolates in our study.

3. Materials and methods

3.1 Strains and growth conditions

The yeast strains isolated in this study are listed in Table 1 and Table S1. Two sets of samples were included. The first group of yeasts (n = 106) was isolated from South Brazilian bottled wines ("lower diversity" dataset, Table 1), and the second group (n = 139) was isolated from environments surrounding the wineries (vineyard soil, effluent, leaves, fruits, cellars - "higher diversity" dataset, Table S1). Details concerning the isolation of yeast strains can be seen in Methods S1. Field collections were conducted according to EPAGRI diversity rules, and all necessary permits were obtained for the field studies (Codes 1414, 13214). Reference strains used in this

study were: *Saccharomyces cerevisiae* CLIB 2048, *Saccharomyces bayanus* CLIB 2033 and *Saccharomyces uvarum* CLIB 2028 (Collection de Levures d'Interet Biotechnologique, Paris-Grignon, France).

3.2 DNA extraction

Two protocols were used in this study. DNA of yeasts isolated from bottled wine was extracted with the potassium acetate-based protocol proposed by [51] with some modifications. Pure colonies of each strain were grown in GYP broth at 30°C for 18 hours. After centrifugation and washing with distilled water, the biomass of each culture was re-suspended in 400µL of lysis buffer (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) and incubated for 60 min at 65°C. The other steps were done as described in [51]. Genomic DNA of samples collected in the second group was extracted using the classic protocol with phenol/chloroform [52]. The quality of the extracted DNA was analyzed on agarose gels (1% w/v) and assessing the A260/A280 ratio.

3.1 MSP-PCR Fingerprinting

MSP-PCR Fingerprinting using the primers (GTG)₅ or M13 was optimized from Silva-Filho *et al.* (6) using strain 20E (*S. cerevisiae*). Different concentrations of each reagent used in PCR were tested: MgCl₂ (1.5-4.5mM), primer (0.2-1.4pmol/µL), dNTPs (10-70µM) and DNA (110-0.1ng/µL). The optimized reaction mix for a volume of 25µL was: 1U of Taq polimerase (Invitrogen), 1X buffer reaction, 3mM MgCl₂, 1pmol/µL primer, 60µM dNTPs Mix and 5µL of DNA (1ng/µL). The program started at 94°C for 5min followed by 35 cycles at 94°C for 15s, 55°C for 45s and 72°C for 90s, with final extension at 72°C for 6min.

The PCR products were separated on 1.8% (w/v) agarose gels in 1X TAE buffer (40 mM Tris–Acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) using electrophoresis with stacking:

initial running at 110V for 5min followed by 70 V for 180 min. Gels were stained with GelRed® for visualization under UV light and digital image capturing was done using the Geni2 gelDoc System (Syngene, Cambridge, UK). The resulting fingerprints were analyzed using the software GeneTools®. The 1Kb plus or 1Kb (Invitrogen) molecular weight marker was used to compare the sizes of the bands.

3.3 Molecular identification

The divergent D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was amplified and sequenced with NL1 and NL4 primers [53]. The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified and sequenced with ITS1 and ITS4 primers [54]. Amplification conditions were as follows: one initial cycle at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 15 s, 55°C for 45 s, 72°C for 90 s, and a final extension cycle at 72°C for 6 min. The PCR products were examined by electrophoresis on a 1.5% agarose gel at 100 V for 45 min and stained with GelRed for visualization under UV light. Digital image capturing was done using the Geni2 gelDoc System (Syngene, Cambridge, UK). The sequences were obtained with ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corp., USA) using standard protocols at the “Ludwig Biotecnologia” facility in Alvorada-RS, Brazil, and were compared with the sequences of type strains published in the GenBank database using the software YeastIP [55]. A cut-off of 99% similarity was used to identify the isolates.

3.4 Clustering analysis

Two clustering algorithms were used to group the (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting profiles: (a) a Hierarchical Clustering algorithm with four versions for pairwise analysis: average linkage, complete linkage, single linkage and Ward’s method; (b) QAPGrid, an unsupervised graph clustering algorithm combined with a combinatorial optimization layout method [46].

For both clustering algorithms, a matrix was constructed considering each isolate and the total number of bands ($n = 23$), with the size of each band for each isolate. The size of the bands took into consideration a deviation of 50 bp for the smallest bands, and 200 bp for the largest ones, due to the agarose gel resolution. Thus, each isolate was represented by 23 integer numbers corresponding to the size of the bands found by the MSP-PCR Fingerprinting method. If a band were not present for an isolate, we considered a value of zero for that band. We used a Euclidean distance between each pair of isolates to compute the distance of the genetic profiles of isolates. The matrix is available in Dataset S1. The second method incorporates the use of a graph-based clustering algorithm that automatically finds the number of clusters based on the distance between the genetic profiles of the isolates. After the clustering is performed, the QAPGrid algorithm produces a layout representative of the clusters. Details of the clustering and layout algorithms can be found in Inostroza-Ponta *et al.* [46], [56]. This combination has been successfully applied in the analysis of other type of genetic data [57]–[58].

3.5 Discriminatory power

In order to compare the discriminatory power (D) of the primers M13 and $(GTG)_5$ in the MSP-PCR fingerprinting, we used the index of discrimination proposed by [59]–[60], which is based on the Simpson's index of diversity. The discriminatory power was calculated based on a subset of 16 strains from the "lower diversity" dataset. Dendrograms were constructed based on the Ward's method and Euclidean distances, and grouped with a cut-off of 50%. The equation used for the calculation of the discriminatory power is as follows:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

where D is the index of discriminatory power, N , the number of unrelated strains tested, S , the number of different types, and x_j , the number of strains

belonging to the j th type, assuming that strains will be classified into mutually exclusive categories. A D value of 1.0 indicates that the primer was able to distinguish each isolate of a community from all other members of that community. Conversely, an index of 0.0 indicates that all isolates of a community were of an identical type [59]–[60].

Afterwards, the discriminatory power of each band of the MSP-PCR fingerprinting profile with the primer $(GTG)_5$ was calculated for 208 isolates and the three reference strains according to the equation described above. The discriminatory power (D) of each band obtained in the $(GTG)_5$ MSP-PCR fingerprinting was calculated as the measurement of the variation of “alleles” (presence or absence of bands) by each “locus” (band position), with a range between zero (homogeneity) and one (heterogeneity). A low D indicates a “locus” with similar “alleles” (presence or absence of bands), while a high D indicates a “locus” with an irregular presence of bands among the isolates.

3.6 Concordance between the $(GTG)_5$ MSP-PCR fingerprinting and sequencing, sensitivity and specificity assessments

We evaluated the concordance between the identification by $(GTG)_5$ MSP-PCR fingerprinting and by sequencing using the whole “lower diversity” ($n = 106$) and “higher diversity” ($n = 139$) datasets, and the Kappa index [61]. The sensitivity and specificity indexes were assessed using the McNemar test for comparison of the results obtained by sequencing (considered as the gold standard) and the ones obtained by the $(GTG)_5$ MSP-PCR fingerprinting [62]. The sensitivity indicates the percentage of isolates identified by sequencing that were identified as the same species by the MSP-PCR fingerprinting (true positive isolates), and is a measure of the probability that an isolate belonging to a certain species will be correctly identified at that species by the $(GTG)_5$ MSP-PCR fingerprinting. The specificity indicates the percentage of isolates that were not identified in a certain species by the sequencing methodology which were not identified in that species by the MSP-PCR fingerprinting

(true negatives) either. We considered the isolates not identified by sequencing as true negative results. All the tests were estimated with a confidence interval of 95%.

Associated content

Supporting information available

Supplemental Figure S1 - S4; Table S1- S3; Methods S1 and Dataset S1 are available free of charge via the internet at <http://www.plosone.org> .

Acknowledgments

We thank Marilene H. Vainstein for carefully reading the manuscript.

References

1. Kurtzman CP (2014) Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematic. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 325–332. doi: 10.1099/ijs.0.054197-0
2. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, *et al.* (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(16): 6241–6246.
3. Lieckfieldt E, Meyer W, Börn T (1993) Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J Basic Microbiol*33: 413–426.
4. Torriani S, Zapparoli G, Suzzi G (1999) Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek* 75: 207–215. doi: 10.1023/a:1001773916407

5. Naumova ES, Korshunova IV, Jespersen L, Naumov GI (2003) Molecular genetic identification of *Saccharomyces sensu stricto* strains from African sorghum beer. *FEMS Yeast Res* 1531: 1–8. doi: 10.1016/s1567-1356(02)00191-5
6. Dellaglio F, Zapparoli G, Malacrino P, Suzzi G, Torriani S (2003) *Saccharomyces bayanus var uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. *Ann Microbiol* 53: 411–425.
7. Silva-Filho EA, Santos SKB, Resende AM, Morais JOF, Morais Jr MA, *et al.* (2005) Yeast population dynamics of industrial fuel–ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek* 88: 13–23. doi: 10.1007/s10482-005-7283-3
8. Orlic S, Tanja V, Huic KB, Arroyo-Lopez FN, Jeromel A, *et al.* (2010) Diversity and oenological characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* associated with Zilavka grapes. *World J Microbiol Biotechnol* 26: 1483–1489. doi: 10.1007/s11274-010-0323-9
9. Naumov GI, Naumova ES (2009) Chromosomal Differentiation of the Sibling Species *Pichia membranifaciens* and *Pichia manshurica*. *Microbiology* 78: 214–217. doi: 10.1134/s002626170902012x
10. Barquet M, Martin V, Medina K, Perez G, Carrau F, *et al.* (2012) Tandem repeat-tRNA (TRtRNA) PCR method for the molecular typing of non-*Saccharomyces subspecies*. *Appl Microbiol Biotechnol* 93: 807–814. doi: 10.1007/s00253-011-3714-4
11. Solieri L, Dakal TC, Croce MA, Giudici P (2013) Unravelling genomic diversity of *Zygosaccharomyces rouxii* complex with a link to its life cycle. *FEMS Yeast Res* 13: 245–258. doi: 10.1111/1567-1364.12027

12. Magalhães-Guedes KT, Rodrigues AK, Gervasio IM, Gervasio I, do Nascimento AP, *et al.* (2013) Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Afr J Microbiol Res* 7(13): 1121–1127. doi: 10.5897/ajmr12.1974
13. Caruso M, Capece A, Salzano G, Romano P (2002) Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett Appl Microbiol* 34: 323–328. doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01090.x
14. Capece A, Salzano G, Romano P (2003) Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int J Food Microbiol* 84: 33–39. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00392-6
15. De Souza AT, Basílio ACM, Resende ADM, Brasileiro BTV, Da Silva-Filho EA, *et al.* (2007) Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *J Appl Microbiol* 102(2): 538–547. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03082.x
16. Basílio ACM, de Araújo PRL, de Moraes JOF, da Silva Filho EA, de Moraes MA, *et al.* (2008) Detection and Identification of Wild Yeast Contaminants of the Industrial Fuel Ethanol Fermentation Process. *Food Microbiol* 27(2): 205–209. doi: 10.1007/s00284-007-9085-5
17. Pedersen LL, Owusu-Kwarteng J, Thorsen L, Jespersen L (2012) Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. *Int J Food Microbiol* 159: 144–151. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016
18. Gaviria J, Osorio-Cadavid E (2012) Diversidad de levaduras asociadas a inflorescencias de mango y flores de “lulo arbóreo”. *RevBio Agro* 10(2): 160–169.
19. Greppi A, Rantsiou K, Padonou W, Hounhouigan J, Jespersen L, *et al.* (2013) Determination of yeast diversity in ogi, mawè, gowé and tchoukoutou, four

traditional fermented products from Benin, using culture-dependent and – independent methods. *Int J Food Microbiol* 165: 84–88. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.005

20. Greppi A, Rantisou K, Padonou W, Hounhouigan J, Jespersen L, *et al.* (2013) Yeast dynamics during spontaneous fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int J Food Microbiol* 165(2): 200–207. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.004

21. Chang CF, Lin YC, Chen SF, Carvajal EJ, Portero P, *et al.* (2012) *Candidatheae* sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the *Lodderomyces* clade. *Int J Food Microbiol* 153(1–2): 10–14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.030

22. Hui FL, Niu QH, Ke T, Li YX, Lee CF (2013) *Candida sanyaensis* sp. nov., an ascomycetous yeast species isolated from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103: 47–52. doi: 10.1007/s10482-012-9785-0

23. Solieri L, Dakal TC, Giudici P (2013) *Zygosaccharomyces sapaie* sp. nov., isolated from Italian traditional balsamic vinegar. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(1): 364–371. doi: 10.1099/ijs.0.043323-0

24. Suh SO, Gujjari P, Beres C, Beck B, Zhou J (2013) Proposal of *Zygosaccharomyces parabailii* sp. nov. and *Zygosaccharomyces pseudobailii* sp. nov., novel species closely related to *Zygosaccharomyces bailii*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(5): 1922–1929. doi: 10.1099/ijs.0.048058-0

25. Gadanho M, Sampaio JP (2002) Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodotorula*: *Rh. glutinis sensu stricto* and *Rh. dairenensis* comb. nov. *FEMS Yeast Res* 2: 47–58. doi: 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00068.x

26. Rodrigues MG, Fonseca A (2003) Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. *Int J Syst Evol Microbiol* 53: 607–616. doi: 10.1099/ijs.0.02437-0
27. Andrade MJ, Rodríguez M, Sánchez M, Aranda E, Córdoba JJ (2006) DNA typing methods for differentiation of yeasts related to dry-cured meat products. *Int J Food Microbiol* 107: 48–58. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.011
28. Libkind D (2007) Evaluación de la técnica de MSP-PCR para la caracterización molecular de aislamientos de *Rhodotorula mucilaginosa* provenientes de la Patagonia noroccidental. *Rev Argent Microbiol* 39: 133–137.
29. Guamán-Burneo C, Carvajal-Barriga J (2009) Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Univ Sci* 14(2–3): 187–197.
30. Baleiras-Couto MM, Eijsma B, Hofstra H, Huisin'tVeld JHJ, van der Vossen JMBM (1996) Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Environ Microbiol* 62: 41–46.
31. Urzi C, De Leo F, Lo Passo C, Criseo G (1999) Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J Microbiol Methods* 36: 95–105. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00014-7
32. Loureiro V (2000) Spoilage yeasts in foods and beverages: Characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Res Int* 33(3–4): 247–256. doi: 10.1016/s0963-9969(00)00044-2
33. Papalexandratou Z, Lefeber T, Bahrim B, Lee OS, Daniel HM, *et al.* (2013) *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial

species for a successful cocoa bean fermentation process. *Food Microbiol* 35(2): 73–85. doi: 10.1016/j.fm.2013.02.015

34. Valente P, Boekhout T, Landell MF, Crestani J, Pagnocca FC, *et al.* (2012) *Bandoniozyma* gen. nov., a Genus of Fermentative and Non-Fermentative Tremellaceous Yeast Species. *PLoS ONE* 7(10): e46060. doi: 10.1371/journal.pone.0046060

35. Brito SK, Basilio ACM, Ramos BT, Simões DA, da Silva-Filho EA, *et al.* (2007) Identification of yeasts within *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCR-fingerprinting. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 1613–1620. doi: 10.1007/s11274-007-9407-6

36. Maqueda M, Zamora E, Rodríguez-Cousiño N, Ramírez M (2010) Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiol* 27: 205–209. doi: 10.1016/j.fm.2009.10.004

37. Landis JR, Koch GG (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1): 159–174. doi: 10.2307/2529310

38. Matsheka MI, Lastovica AJ, Zappe H (2006) The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. *J Appl Microbiol* 42: 600–605. doi: 10.1111/j.1472-765x.2006.01900.x

39. Kornelia S, Oros-Sichler M, Milling A, Heue H, Baumgarte S, *et al.* (2007) Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results?. *J Microbiol Methods* 69: 470–479. doi: 10.1016/j.mimet.2007.02.014

40. Meyer W, Mitchell TG, Freedman EZ, Vilgalys R (1993) Hybridization Probes for Conventional DNA Fingerprinting Used as Single Primers in the Polymerase

Chain Reaction To Distinguish Strains of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Microbiol 23: 2274–2280.

41. Ryberg A, Olsson C, Ahrné S, Monstein HJ (2011) Comparison of (GTG)₅-oligonucleotide and ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS)-PCR for molecular typing of *Klebsiella* isolates. J Microbiol Methods 84: 183–188. doi: 10.1016/j.mimet.2010.11.019

42. Libkind D, Ruffini A, Broock M, Alves L, Sampaio JP (2007) Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffiarhodozyma* and its sexual form *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Appl Environ Microbiol 73(4): 1120–1125. doi: 10.1128/aem.01432-06

43. Turchetti B, Goretti M, Branda E, Diolaiuti G, D'Agata C, et al. (2013) Influence of abiotic variables on culturable yeast diversity in two distinct Alpine glaciers. FEMS Microbiol Ecol 86(2): 327–240. doi: 10.1111/1574-6941.12164

44. Taylor JD, Fulton RW, Dado M, Lehenbauer MW, Confer AW (2010) Comparison of genotypic and phenotypic characterization methods for *Pasteurella multocida* isolates from fatal cases of bovine respiratory disease. J Vet Diagn Invest 22: 366–375. doi: 10.1177/104063871002200304

45. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, et al.. (2010) Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. Nat Rev Microbiol 8(12 suppl): S17–29.

46. Inostroza-Ponta M, Berretta R, Moscato P (2011) QAPgrid: A Two Level QAP-Based Approach for Large-Scale Data Analysis and Visualization. PLoS ONE 6(1): e14468. doi: 10.1371/journal.pone.0014468

47. Yurkov AM, Kemler M, Begerow D (2012) Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. Fungal Ecol 5(1): 24–35. doi: 10.1016/j.funeco.2011.07.004

48. Fernández NV, Mestre MC, Marchelli P, Fontenla SB (2012) Yeast and yeast-like fungi associated with dry indehiscent fruits of *Nothofagus nervosa* in Patagonia, Argentina. *FEMS Microbiol Ecol* 80(1): 179–192. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01287.x
49. García-Hernández Y, Rodríguez Z, Brandão LR, Rosa CA, Nicoli JR, *et al.* (2012) Identification and in vitro screening of avian yeasts for use as probiotic. *Res Vet Sci* 93(2): 798–802. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.09.005
50. Miguel MGCP, Cardoso PG, Magalhães-Guedes KT, Schwan RF (2013) Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. *Braz J Microbiol* 44(1): 113–118. doi: 10.1590/s1517-83822013005000005
51. Osorio-Cadavid E, Ramírez M, López WA, Mambuscay LA (2009) Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev colomb biotecnol* 11(1): 125–131.
52. Ramos JP, Valente P, de Souza RA, Rosa CA, Leoncini O (2001) Heteroduplex mobility assay of the D1/D2 region of the 26SrDNA for differentiation of *Saccharomyces* species. *Lett Appl Microbiol* 33(3): 206–210. doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00981.x
53. O'Donnell K (1993) *Fusarium* and its near relatives in *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, eds Reynolds DR & Taylor JW (Wallingford, UK: CAB International), pp. 225–233.
54. White T, Burns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in *PCR Protocols*, eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (San Diego: Academic Press), pp. 315–322.
55. Weiss S, Samson F, Navarro D, Casaregola S (2013) YeastIP: a database for identification and phylogeny of ascomycetous yeasts. *FEMS Yeast Res* 13: 117–125. doi: 10.1111/1567-1364.12017

56. Inostroza-Ponta M, Mendes A, Berretta R, Moscato P (2007) An integrated QAP-based approach to visualize patterns of gene expression similarity in Proceedings of the 3rd Australian conference on Progress in artificial life (ACAL'07), eds. Randall M, Abbass HA, Wiles J (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg), pp. 156–167.
57. Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, Fox AH, Fortini E, *et al.* (2012) Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res* 22(5): 885–98. doi: 10.1101/gr.131037.111
58. Riveros C, Mellor D, Gandhi KS, McKay FC, Cox MB, *et al.* (2010) A transcription factor map as revealed by a genome-wide gene expression analysis of whole-blood mRNA transcriptome in multiple sclerosis. *PLoS One* 5(12): e14176. doi: 10.1371/journal.pone.0014176
59. Hunter P (1990) Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol* 28: 1903–1905.
60. Hunter PR, Gaston MA (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 26: 2465–2466.
61. Quan H, Shih W (1996) Assessing reproducibility by the within-subject coefficient of variation with random effects models. *Biometrics* 52: 1195–1203. doi: 10.2307/2532835
62. Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, *et al.* (2010) Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 8 (12 suppl): S17–29.

Tables and Figures legends

Table 1. Yeasts species from bottled wines sampled in Rio Grande do Sul and Santa Catarina, South Brazil.

Species	Number of strains	Strain code
<i>Pichia manshurica</i> *	36	MRC188, MRC163, MRC143, MRC130, MRC142, MRC140, MRC139, MRC141, MRC128, MRC124, MRC106B, MRC133, MRC189, MRC109, MRC110, MRC112, MRC122, MRC123, MRC125, MRC107, MRC114, MRC115, MRC116B, MRC127, MRC136, MRC111, MRC132, MRC113, MRC134, MRC116A, MRC171, MRC185, MRC126, MRC186, MRC121, MRC131
<i>Dekkera bruxellensis</i> *	30	MRC178, MRC180, MRC177, MRC88, MRC172, MRC181, MRC117, MRC120, 66E, 67E, 75E, 59E, 60E, 62E, 65E, 68E, 69E, 70E, MRC80, 73E, 77E, 74E, MRC190, MRC78, MRC79, MRC86, MRC87, MRC182, 22E, 71E
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> *	14	MRC162, MRC161, MRC137, MRC160, MRC187, MRC144, MRC145, MRC156, MRC105, MRC118, MRC119, MRC146, MRC173, 24E
<i>Pichia membranifaciens</i> *	8	MRC152A, MRC153, 16E, MRC184, MRC165, MRC152B, MRC166, MRC168,
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	7	MRC154, 26E, 72E, 20E, 15E, MRC164, 19E
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	2	MRC183, 17E
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	MRC148
<i>Candida magnoliae</i>	1	MRC179
<i>Candida zeylanoides</i>	1	18E
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	1	MRC158
<i>Hanseniaspora sp.**</i>	1	MRC81
Non identified	4	MRC129, MRC147, 23E, 25E
Total	106	

* These species were assessed for clustering analysis.

**We considered these species as not identified.

doi:10.1371/journal.pone.0105870.t001

Table 2. Specificity, sensitivity and kappa index of MSP-PCR fingerprinting using the primer (GTG)₅ in comparison with rDNA sequencing as the gold standard for the two datasets (“lower diversity” and “higher diversity”), using two ranges of band sizes: 200-3500bp or 200-900bp.

Dataset	Range of band size		MSP-PCR fingerprinting (GTG₅)	Gold standard (sequencing)	Kappa index
"Lower diversity"	200–3500bp	Specificity	23.30%	100.00%	0.177
		Sensitivity	100.00%	41.70%	
	200–900bp	Specificity	15.20%	100.00%	0.169
		Sensitivity	100.00%	60.30%	
"Higher diversity"	200–3500bp	Specificity	33.70%	97.10%	0.201
		Sensitivity	97.40%	35.60%	
	200–900bp	Specificity	20.20%	95.50%	0.124
		Sensitivity	97.70%	36.40%	

doi:10.1371/journal.pone.0105870.t002

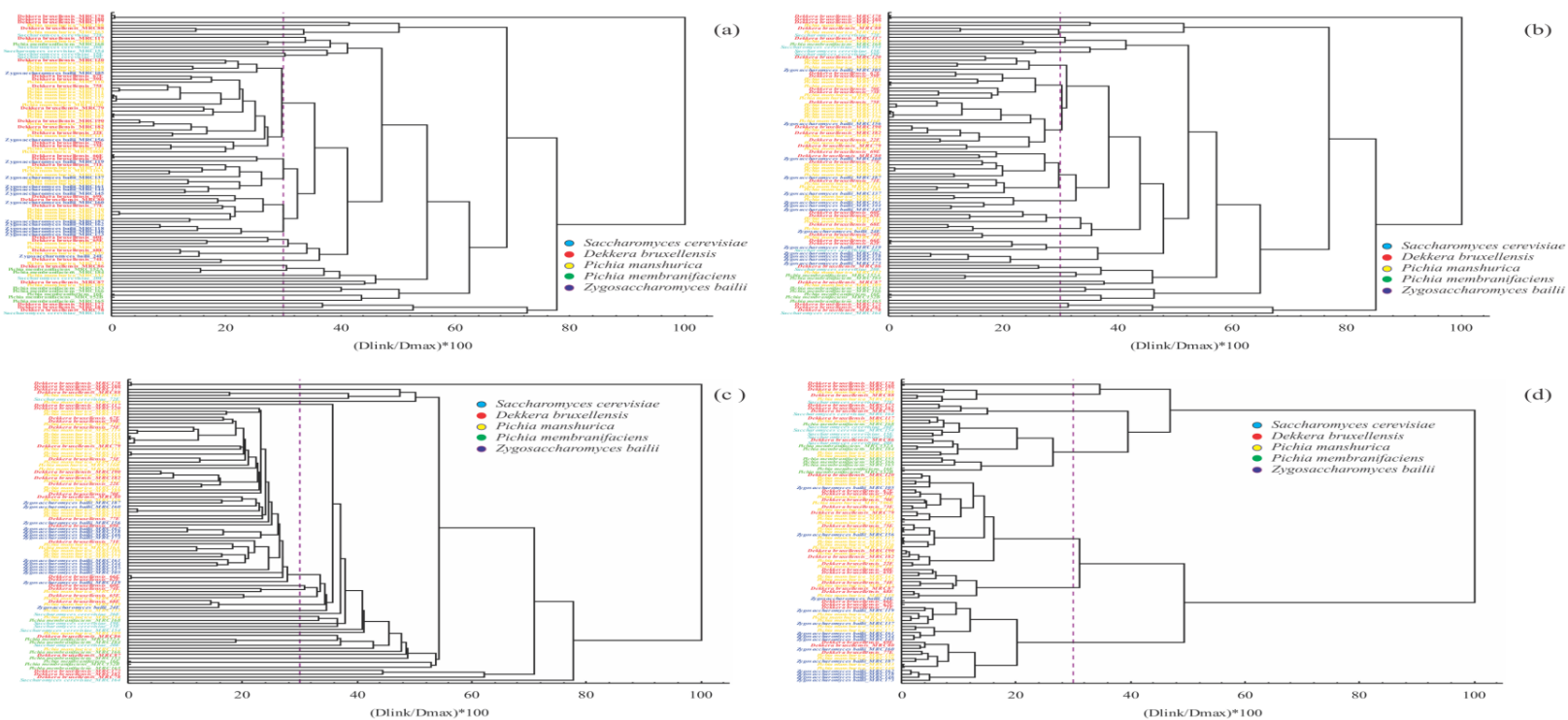


Figure 1. Dendrograms of the clustering of the strains from the "lower diversity" dataset by Hierarchical Clustering using: (a) average linkage (b) complete linkage, (c) single linkage, and (d) Wards method. The distance was computed using the Euclidean distance between the genetic profiles based on the MSP-PCR fingerprinting with the primer GTG_5 .

Supporting Information

Methods S1. Detailed methods for yeast isolation experiments.

Dataset S1. Data matrix.

5. Capítulo II

Environmental Yeast Communities in Vineyards in the Mountains of Santa Catarina State, Brazil.

Artigo submetido à revista "International Journal of Food Microbiology no
dia 30 de outubro de 2014

**Environmental Yeast Communities in Vineyards in the Mountains of
Santa Catarina State, Brazil**

Mendes, S. D. C^{1,4}; Ramírez-Castrillón, M¹; Feldberg, N. P³; Bertoldi, F. C⁴;
Vainstein, M H¹; Valente, P.²

1. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

3. Embrapa Produtos e Mercado, Escritório de Canoinhas. Canoinhas, SC,
Brazil.

4. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa
Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

*Correspondence and reprints: Patricia Valente da Silva, Departamento de
Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 210, CEP: 90050-170, Porto Alegre
- RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33084196 (e-mail: patricia.valente@ufrgs.br).

Abstract

Yeasts were isolated from three vineyards located in the South Region of Brazil. A cross evaluation was carried out at the oldest vineyard of the study in Pinheiro Preto. Samples of grape berries, grapevine leaves and the soil, along with samples of the winery equipment and effluent, were collected. In the Serra do Marari and Campos Novos vineyards only samples of grape clusters were obtained. The 106 yeast isolates were identified by sequencing the D1/D2 or ITS regions in 22 species. The values for the richness indices varied between the vineyards. A comparison of the taxonomic diversity of the yeasts from these regions using the reciprocal Simpson index showed a significant difference between the Serra do Marari and Campos Novos vineyards (5.72 ± 1.18 and 2.92 ± 0.36 , respectively, $p < 0.0001$). The functional diversity was assessed in relation to the use of carbon and nitrogen sources by the yeasts isolated from each location. In general, we observed that the Pinheiro Preto and Campos Novos vineyards differed consistently from the Serra do Marari vineyard according to these indices (FAD2, FDc and Rao, $p < 0.0001$). The possible spreading of *Saccharomyces cerevisiae* from the winery to the vineyard in Pinheiro Preto was observed.

KEYWORDS

Estimator of Diversity, the Community, yeasts.

1. Introduction

The mountainous regions in the midwest of Santa Catarina State, southern Brazil, are characterized by cold conditions for most of the year, reaching temperatures between $-2^{\circ}\text{C} < 0 \leq 5^{\circ}\text{C}$ in winter, when frost and occasionally snow occur. Wine production is relatively recent in these regions, but they are considered to be promising because of the appropriate environmental conditions for making wine of excellent quality. Yeasts are common inhabitants of vineyards and their density in grape berries is strongly associated with several factors, such as climate conditions, geographic location, age of the vineyard, type of soil and application of fungicides during harvesting and grape berry ripening (Pretorius *et al.*, 1999; Chavan *et al.*, 2009). The microclimate of the vineyards can influence the microbial diversity of the grapes and the surrounding environment, which can include filamentous fungi, yeasts and bacteria with different physiological characteristics, and some species are only found in grapes (Li *et al.*, 2010). On their journey from the vineyard to the wine bottle, the grapes are transformed into wine through microbial activity, with important consequences in terms of the quality parameters of the wine product (Bokulich *et al.*, 2013). The grape berries are the main source of microorganisms in the production of wines, but surprisingly the ecology of these microbes remains poorly understood (Raspor *et al.*, 2006; Mercado & Combina, 2010).

Since the introduction of the term "biodiversity" there has been intense public debate regarding the value and the benefit of its preservation. Di Maio *et al.* (2012) reported the remarkable degree of biodiversity in populations of yeasts present in southeastern Sicily, where the practice of spontaneous fermentation to produce wine is still maintained, suggesting that this practice can be beneficial for the local wine industry. In general, it is believed that natural yeast strains are associated with certain varieties of grapes in specific geographic locations, conferring a significant diversity with a regional character, and they are introduced into the winemaking process because of this association (Raspor *et al.*, 2006;

Mercado *et al.*, 2007; Barrajon *et al.*, 2009). Recently, the study of the microbiome of grapevine leaves revealed that the eukaryotic microbial community undergoes several changes during the vegetative cycle of the vine and is highly diverse, but little is known about the role of its interaction with the plant (Pinto *et al.*, 2014). Therefore, the study of natural yeasts collected from vineyard communities is an important step in preserving native genetic resources. In this context, the aim of this study was to characterize the yeast community associated with high-altitude vineyards in the midwest region of Santa Catarina State in southern Brazil.

2. Materials and methods

2.1 Sampling areas

The diversity of yeasts was studied in three different areas located in the midwest of Santa Catarina State (SC), southern Brazil: Pinheiro Preto (latitude 27°03'02 "S, longitude: 51°13'51" W, altitude 698 m), which is approximately 80 years old; Campos Novos (latitude 27°22'59"S, longitude 51°12'55"W, altitude 973 m); and Serra do Marari (latitude 27°12'24"S, longitude 51°06'96"W, altitude 1053 m). The latter two areas relate to experimental fields with around 10 years of production. The sampling was carried out over three months (January, February and March) during the harvest periods in 2010 and 2011. In these grape harvest periods the absolute temperatures ranged from 13.5°C to 31°C, and the average rainfall was 237.67 mm, with 161 h of sunshine and 82% average relative humidity. At each vineyard, 20 sampling sites were defined according to the size of the vineyard, and each site was sampled in triplicate. In Pinheiro Preto samples were collected from the winery equipment and effluent, along with samples of the soil (50 g), leaves (50 g) and grapes (three clusters per plant). In the strategy adopted at the vineyards of Serra do Marari and Campos Novos only grape samples (3 clusters per plant) were collected. The permission required for the

study sites described above were obtained and the owners consented to the collection of samples and the sampling plan.

2.2 Isolation of strains and growth conditions

The samples were collected aseptically from the vineyards and transported to the laboratory at the Epagri Experimental Station in Videira (SC), where they were stored for up to 4 h at 5°C. The samples consisted of healthy and damaged bunches, grapevine leaves, soil and effluent collected at different points of the vineyards as described above, all collected in triplicate. The grape berries were carefully placed into plastic bags containing 450 mL of the following enrichment medium (glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, 0.04% Chloramphenicol) and the yeasts were isolated after 24 h of incubation at room temperature. The isolation of the yeast was performed as described by Prakitchaiwattana *et al.* (2004) and the numbers of colonies were counted using an Olympus SZX9 stereoscope.

Representative samples of each yeast morphotype were isolated, purified in GYP agar (glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5% and agar 2%) and preserved in GYP agar slants, being periodically reactivated for the analysis described below.

2.3 DNA extraction

The DNA of yeasts isolated from the samples was extracted applying the potassium acetate-based protocol proposed by Osorio-Cadauid *et al.* (2009), with some modifications. Pure colonies of each strain were grown in GYP broth at 30°C for 18 h. After centrifugation and washing with distilled water, the biomass of each

culture was re-suspended in 400 µL of lysis buffer (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8) and incubated for 60 min at 65°C. The other steps were carried out as described in Osorio-Cadavid *et al.* (2009). The quality of the extracted DNA was analyzed on agarose gels (1% w/v) and by assessing the A260/A280 ratio.

2.4 Molecular identification of the yeasts

The divergent D1/D2 domain of the LSU rRNA gene was amplified and sequenced with NL1 and NL4 primers. The ITS1-5.8S-ITS2 region was amplified and sequenced with ITS1 and ITS4 primers (Ramírez-Castrillón *et al.*, 2014). The amplification conditions were as follows: one initial cycle at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 15 s, 55°C for 45 s, 72°C for 90 s, and a final extension cycle at 72°C for 6 min. The PCR products were examined by electrophoresis on a 1.0% agarose gel at 100 V for 45 min and stained with GelRed® for visualization under UV light. Digital image capturing was carried out using the Geni2 gelDoc system (Syngene, Cambridge, UK).

The sequences were obtained with an ABI-PRISM 3100 genetic analyzer (Life Technologies Corp. USA) using standard protocols at the “Ludwig Biotecnologia” facility in Alvorada, Rio Grande do Sul State, southern Brazil, and they were compared with the type strain sequences published in the GenBank database using the software YeastIP. A cut-off of 99% similarity was used to identify the isolates (Weiss *et al.*, 2013).

2.5 Physiological and biochemical characterization

Selected physiological and biochemical tests were carried out as follows: fermentation of glucose; assimilation of carbon sources (D-arabinose, L-arabinose, cellobiose, citrate, glucose, galactose, gluconate, inositol, inulin, lactose, maltose, mannitol, melibiose, raffinose, rhamnose, ribitol, ribose, salicin, starch, trehalose, Tween 20, Tween 80 and xylose); assimilation of nitrogen sources (nitrate, creatine, creatinine, ethylamine, lysine, peptone); H₂S production (Ono *et al.*, 1991); lipolytic activity (Kim *et al.*, 2001); evaluation of the potential of accumulation of microbial oil (Xue *et al.*, 2010); urease production; Diazonium Blue B (DBB) test; and growth at 37°C. Before each test, the cultures were reactivated in GYP agar to obtain metabolically active cells. The methodology used for testing the fermentation and assimilation of carbon and nitrogen sources was based on that proposed by Kurtzman *et al.* (2011).

2.6 Statistical analysis

The community structure was determined by considering the frequency of occurrence, i.e., incidence of each species observed at the sampling points, which was calculated as the relative occurrence of species considering the total number of samples. The estimate of the richness was obtained by applying the Jackknife 2 (second-order Jackknife), ACE, ICE and Bootstrap richness estimators. The second-order Jackknife estimator is dependent on the number of species found only once (unique species). Ace is based on the concept of abundance and is used to estimate species richness with ten or fewer individuals per sample, which are not singletons. ICE is based on incidence considering species present in 10 or less samples which are not unique species and Bootstrap estimates the overall richness using data from all species, not restricted to rare species (Ferraz *et al.*, 2009; Pfeiffer & Mezger, 2012). To assess the taxonomic diversity of the samples, the Shannon index, which takes into account the number of rare species and

reciprocal Simpson index ($1/D$), which takes into account the number of dominant species, were used (Saikaly *et al.*, 2005). Functional diversity was evaluated as described by Casanoves *et al.* (2011) and three functional diversity estimators were used: FAD2 is the number of combinations of attributes that occur in the community and is always less than or equal to the richness functional diversity. The dispersion was estimated by the sum of the distances between paired species in a multidimensional space; FDC is a community-based index which corrects for the lack of monotonicity that arises when there is a particular dendrogram for each plot; and for the Rao Entropy the weighted variation of the abundance of the dissimilarities between all pairs of species is calculated. Effects were considered statistically significant at $p = 0.05$. Species accumulation curves were calculated with EstimateS 9.1 using 50 randomizations, sampling without replacement and default settings for upper incidence limit for infrequent species (Colwell *et al.*, 2012). The Kolmogorov-Smirnov and Levene tests were used to assess the normality and homogeneity of variance of the data. Comparisons among the vineyards were carried out with Graphpad Prism 6 software.

3. Results

The vineyard in Pinheiro Preto was chosen for the cross evaluation since it is the oldest of the vineyards studied. At this site samples of grape berries, grapevine leaves and soil, along with samples from the winery equipment and the effluent, were collected. From the vineyards in Serra do Marari and Campos Novos only samples of grape clusters were obtained. A total of 106 strains were isolated from the areas selected: 25 were obtained from Pinheiro Preto, 48 from Serra do Marari and 33 from Campos Novos. Yeasts were observed at all sampling points, except for 9 sampling points in Pinheiro Preto from which the grape clusters were collected and there was a predominance of fungi and bacteria. In general, the yeast counts for the grape berries ranged from $2.93 \log \text{CFU.g}^{-1}$

(Pinheiro Preto) to 4.13 log CFU.g⁻¹ (Serra do Marari), with 3.93 log CFU.g⁻¹ for Campos Novos (Fig. 1). The yeast counts for the grape berries collected from Serra do Marari and Campos Novos showed a significant difference compared with the corresponding values for Pinheiro Preto ($p < 0.0001$).

3.1 Observed species richness

The total of 106 strains identified corresponded to 22 species of yeast (Fig. 2a, 3a, 4a, Table 1). A single individual (singleton) was identified for seven species, whereas four species had two individuals (doubleton). The number of samples was adequate to assess the species richness in the vineyards in Serra do Marari and Campos Novos, but the species rarefaction curve did not reach the asymptote for the vineyard of Pinheiro Preto (Figures 2b, 3b, 4b). The genera with the highest number of isolates were *Hanseniaspora* (38) and *Pichia* (37), the species *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kudriavzevii* being the most abundant, with 32 and 19 isolates, respectively. The Venn diagram (Fig. S1) shows the dissimilarity of the vineyards in terms of the composition of the yeast community, since they had only four species in common (*H. uvarum*, *P. kudriavzevii*, *Hanseniaspora opuntiae* and *Pichia occidentalis*). Approximately 24% of the species were common to the vineyards in Serra do Marari and Campos Novos, in which only grape berries were sampled (Fig. S1).

The species *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Trichomonascus ciferrii* and *Candida allociferrii* were isolated only from the oldest vineyard (Pinheiro Preto), while *Saccharomyces* sp., *Pichia manshurica*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Pichia* sp. were detected only at the vineyard in Serra do Marari. Another three species (*Candida zemplinina*, *Candida intermedia* and *Zygoascus meyeræ*) were isolated only from the vineyard in Campos Novos. Notably, *Saccharomyces* species were only obtained in the

sampled areas in Serra do Marari and Pinheiro Preto, and the yeasts isolated from Serra do Marari were identified as *Saccharomyces* sp. because they presented atypical phenotypic characteristics for the species *S. cerevisiae* (data not shown). In the region of Pinheiro Preto, *S. cerevisiae* was isolated from the vineyard (leaves, grape berries and soil) and the winery (equipment and effluent). This appears to indicate the spread of this species, probably because this is an older vineyard and the winery was in full operation. The strains belonging to the genus *Saccharomyces* represented 34% to 15% of the isolates in the vineyards in Pinheiro Preto and Serra do Marari (Table 1). The frequency of occurrence of the yeast species, calculated as the total number of samples analyzed, varied between regions (Fig. 2a, 3a, 4a). The regions of Pinheiro Preto and Campos Novos had one or two more common species, while for Serra do Marari a higher number of more common species was observed. The species *H. uvarum* and *P. kudriavzevii* presented contrasting frequencies in regions of Serra do Marari and Campos Novos.

3.2 Estimated species richness and taxonomic diversity

Indices to estimate the richness and diversity were calculated for each sampled site (Table S1, Fig. 5). It was observed that depending on the richness estimator used and the vineyard there was a variation from two to five species compared to the observed number of species (Table S1). At the vineyard in Pinheiro Preto, where we sampled different substrates, 12 yeast species were observed, and the richness estimates ranged from 9 (Bootstrap) to 15 (ICE1) species. In the case of Serra do Marari 12 species were also observed and the richness estimates ranged from 10 (Bootstrap) to 14 (ICE1) species. Finally, for Campos Novos the number of species observed was 9, while the estimators ranged from 7 (Bootstrap) to 14 (ICE1) species. At all sampling sites, the value predicted through the richness estimator Bootstrap was the lowest, and the estimator which provided the highest value was ICE1. Campos Novos was the

region with the lowest richness of the vineyards studied (Table S1). For the calculation of the taxonomic diversity, values for the frequency of occurrence as indicators of the abundance of each species were used. Although the Shannon index indicated no significant difference in the diversity of yeasts at the sampled sites, the reciprocal Simpson index ($1/D$) showed that the vineyards in Pinheiro Preto ($1/D = 5.80 \pm 1.88$) and Serra do Marari ($1/D = 5.72 \pm 1.18$) were significantly different from that in Campos Novos ($1/D = 2.92 \pm 0.36$, $p < 0.0001$) (Fig. 5). The reciprocal Simpson index, which gives little weight to rare species, in contrast to the Shannon index (Freitas *et al.*, 2012), indicated that there was a strong influence of the dominant species on the difference in the taxonomic diversity between the sites sampled.

3.3 Phenotypic characterization

The results for the assimilation of carbon and nitrogen sources can be seen in Figs. 6 and 7. All strains grew normally with glucose as the carbon source and peptone as the nitrogen source. Around 84% of the isolates showed growth at 37°C, 87.1% fermented glucose, and 6.4% of these showed weak fermentation, 27% showed lipase activity, 2.4% showed negative urease activity, 0.79% were DBB positive (having *basidiomycetous* affinity), 10.8% produced H₂S and 3.84% were accumulators of microbial oil.

3.4 Functional diversity

Often the taxonomic diversity of a group of organisms is not suitable for assessing the ecological role of this group in the environment, and different taxonomic groups can occupy the same niche in different places. In order to compare the potential for isolated yeasts to occupy the same niche in the

vineyards sampled, the functional diversity was calculated using as parameters the results for the assimilation of carbon and nitrogen sources and considering all of the tests to be of the same weight (equal functional importance in the environment). In general, we observed that the vineyards in Pinheiro Preto (698m) and Serra do Marari (1053m), differed consistently from that in Campos Novos (973 m) for the indices FAD2, FDc and Rao Entropy (Tables S2 and S3, $p < 0.0001$). These indices showed that functional diversity was lower in the Campos Novos community compared to the other vineyards. On comparing Campos Novos and Serra do Marari it was observed that *H. uvarum* is the dominant species in the former region (19 isolates) and *P. kudriavzevii* is dominant in the latter (12 isolates) (Table 1). The *H. uvarum* isolates obtained assimilated only five sources of carbon while *P. kudriavzevii* assimilated 17 sources (Fig. 6).

4. Discussion

In this paper we describe for the first time yeasts associated with three environments in vineyards in southern Brazil (Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos). These vineyards are located at high altitudes (above 690 m) and are typically exposed to extreme weather conditions, especially low temperatures, reaching below 0°C. Wine production in these regions is relatively recent, however, these are considered promising regions for producing wines of excellent quality. Nevertheless, information on the diversity of yeasts in these environments is lacking. A transversal study was carried out in Pinheiro Preto, at the winery and in the vineyard. This is the oldest vineyard of the three evaluated (approximately 80 years of age), and is located at a lower altitude (698 m). At the other two locations only samples of the grape berries were evaluated. These two vineyards are approximately 10 years of age and are located at similar altitudes (973 m and 1053m, respectively). The region of Serra do Marari is located close to Pinheiro Preto (11.3 km) and 52.3 km away from Campos Novos.

4.1 Serra do Marari and Campos Novos

The yeast counts for the grape berries collected in Serra do Marari and Campos Novos were approximately 4 log CFU.g⁻¹, values commonly found for grape berries (Cadez *et al.*, 2010; Setati *et al.*, 2012). The yeast population is reportedly lower for unripe grapes (2 - 3 log CFU.g⁻¹) compared with mature grapes (3-6 log CFU g⁻¹) (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Another study investigated the distribution of yeasts on the grape berries and clusters and noted temporal fluctuations during plant development (Schuller *et al.*, 2012). In general, the high moisture in the environment promotes exosmosis, with the consequent release of nutrients from the grape berry, allowing the growth of yeasts on its surface (Combina *et al.*, 2005). However, the quantitative occurrence of yeasts may vary due to environmental factors, vineyard location, grape type and maturation stage (Comitini *et al.*, 2008).

Different populations of ascomycetes can be observed during the process of grape maturation. Firstly, visually intact microfissures appear on the berry cuticle, which make nutrients available allowing the appearance of oxidative and slightly fermentative ascomycete populations, for example, *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp. and *Pichia* spp. Approaching harvest time, the availability of high concentrations of sugars on the surface of the berries increases and ascomycetes with strong fermentation activity become dominant, such as *Pichia* spp. and *Zygoascus hellenicus*, including species which can spoil the wine (Valero *et al.*, 2007a; Barata *et al.*, 2008; Settanni *et al.*, 2012). This study was performed with ripe grape berries and species of the genera *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Zygoascus*, *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces* were found in the samples collected from Serra do Marari and Campos Novos sites, and the two vineyards shared 23% of the yeast species (Fig. S2, Table 1). The species found in this study were also observed in the characterization of microbial ecosystems in grape must and wine (Fleet, 2003; Zott *et al.*, 2010), demonstrating that the yeast community found in this study is typical of the substrate sampled.

Some of the species found are well documented in the literature and may have characteristics which influence the quality of the wine produced from these berries. For example, in the early phases of wine fermentation *H. uvarum* is the dominant species. Although the role of this yeast in fermentation is not considered to be very important, Hong & Park (2013) compared the use of a strain of *H. uvarum* with *S. cerevisiae* as a grape fermentation starter and concluded that *H. uvarum* improved the quality of the wine produced. *Candida zemplinina* is a strong producer of terpene and lactone and contributes to the formation of aromas in some varieties of wine (Sadoudi *et al.*, 2012). The decarboxylation of hydroxycinnamic acids to form undesirable amounts of volatile phenols, such as 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol, is well known for *Dekkera* species, but it can also occur in the case of other yeasts, such as *M. guilliermondii*, *P. membranifaciens* and *P. manshurica*, which can produce volatile phenols during fermentation (Sáez *et al.*, 2010; Sáez *et al.*, 2011). *Pichia manshurica* can also produce histamine and cadaverine (Tristezza *et al.*, 2014). Finally, *Pichia kudriavzevii* was recently described as a yeast capable of deacidifying the wine due to the ability to degrade malic acid (Del Mónaco *et al.*, 2014). These authors suggest the use of mixed cultures of *S. cerevisiae* and *P. kudriavzevii* to improve the quality of the wine and reduce production costs.

Ecological indexes are widely used in classical ecology (Colwell *et al.*, 2012), but they have only recently been applied to microbial ecology (Yurkov *et al.*, 2011; Yurkov *et al.*, 2012), and have not yet been applied to the microbiology of wine or yeast communities in vineyards. The use of various diversity indices simultaneously allows information to be generated that might otherwise remain unavailable when analyzing an arbitrary measure of diversity (Pallmann *et al.*, 2012). The vineyards in Serra do Marari and Campos Novos, both around 10 years old, have diverse yeast communities with high species richness, as evidenced by the richness and diversity indices obtained (Tab. S1). A comparison in terms of diversity showed a significant difference between the Serra do Marari and Campos Novos vineyards using the reciprocal Simpson index. Furthermore,

the number of more common species was higher in Serra do Marari than in Campos Novos. In the analysis of functional diversity, Serra do Marari also differed from the other vineyards studied (Table S3). These results were expected since the vineyards are located at approximately the same altitude, are geographically close and are subject to the same temperature range, but each vineyard could have a different microclimate.

3.2 Pinheiro Preto

The yeast count for Pinheiro Preto (around 3 log CFU g⁻¹) was significantly lower than those for Serra do Marari and Campos Novos, which can be explained by the type of sample collected at that location, since a cross evaluation study was conducted on the diversity of yeasts and different substrates were sampled. From the samples of grape berries obtained from the Pinheiro Preto vineyard, yeasts belonging to the same genera found at the other two locations were isolated, as well as *Clavispora lusitaniae*, which has not been previously reported as present in a vineyard or wine fermentation environment; however, it has been isolated from other fermentation products (Greppi *et al.*, 2013). Another yeast found in the grape berries collected from Pinheiro Preto that is not found in the other vineyards was *M. pulcherrima*, a species associated with damaged berries, ice wine and botrytized wines and which is also known for its antagonist role in the growth of fungi, yeasts and bacteria (Sipiczki, 2006). Other yeast genera were found to be associated with the different substrates sampled (Table 1). *Saccharomyces cerevisiae* strains were isolated from the winery (equipment and effluent) and vineyard (soil, leaves and grape berries). Of the three vineyards, Pinheiro Preto is the oldest (around 80 years old) and the widespread presence of *S. cerevisiae* is consistent with a possible spread of the yeast from the winery, since this species is reported as uncommon or rare in nature, being present in around 1% of grape berries (Valero *et al.*, 2007b; Clavijo *et al.*, 2010). Cappello *et al.* (2004) suggested

that *S. cerevisiae* strains from vineyards can be adapted to the specific climatic conditions of the area, favoring their dispersal in the environment.

Saccharomyces cerevisiae is a species predominantly found in association with human activity, especially in the production of alcoholic beverages (Hyma & Fay, 2013). The dispersion of this yeast by insects has been reported in the literature (Asahina *et al.*, 2009; Saerens *et al.*, 2010; Palanca *et al.*, 2013) and wasps have been suggested as a reservoir for *S. cerevisiae*, which may act in its spread from the winery to the vineyard (Stefanini *et al.*, 2012). In addition, it has been suggested that the spread of *S. cerevisiae* from wine to other fermentation processes, such as the production of sugarcane spirit (cachaça) in certain regions of Brazil, is probably mediated by insect vectors (Badotti *et al.*, 2014). The isolation of *S. cerevisiae* from cachaça fermentation plants containing gene alleles characteristic of strains isolated from wine demonstrates that the latter were able to colonize another fermentation process and cross with native strains (Badotti *et al.*, 2010). These reports are consistent with the hypothesis that *S. cerevisiae* is dispersed in a multidirectional way not only between wine and vineyards, but also to different environments (Guerra *et al.*, 2001).

The only *basidiomycetous* strain isolated in this study was identified as *Rhodotorula mucilaginosa* and it was obtained from samples of grapevine leaves collected from the Pinheiro Preto vineyard. The low occurrence of *basidiomycetous* yeasts in our study is in agreement with Pinto *et al.* (2014) who evaluated the microbiome of leaves of *Vitis vinifera* using independent cultivation methods and found that *Basidiomycota* was the least abundant group. Some authors have reported the negative effects of using fungicides in vineyards on the yeast community, causing a decrease both in the total population of yeast and in some important genera which protect the plants against pathogens, such as *Rhodotorula* (Pinto *et al.*, 2014; Raspor *et al.*, 2006). Cadez *et al.*, (2010) evaluated the effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries and found that one of the fungicides containing pyrimethanil, which is recommended for use in the vineyards, is a growth suppressor of basidiomycete

yeast species, which is consistent with the data obtained in this study. It is interesting to note, however, that *R. mucilaginosa* is a ubiquitous yeast (Libkind *et al.*, 2009) and it has been reported as one of the most common species associated with vineyards (Tello *et al.*, 2012).

In summary, this is the first study in which the diversity of yeasts in vineyards was studied in Santa Catarina State, southern Brazil, focusing on the vineyards in Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos. The vineyards in Campos Novos showed the lowest taxonomic diversity, and the Serra do Marari vineyard differed from the others in relation to functional diversity. Finally, we were also able to demonstrate the probable spread of *S. cerevisiae* between the winery environment and the vineyard. The information obtained in this study will serve as the basis for the implementation of future studies focused on the improvement of the local wine production.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to winery/vineyard owners for allowing us to collect the samples and financial support was provided by Epagri and Embrapa.

References

Asahina, K., Louis, M., Piccinotti, S. & Vosshall, L.B., 2009. A circuit supporting concentration-invariant odor perception in *Drosophila*. *J Biol* 8: 1-19.

Badotti, F., Dário, M.G., Rosa, C.A. & Stambuk B.U., 2010. Caracterização bioquímica e molecular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de fermentações artesanais de caldo de cana e melado para a produção de cachaça em Florianópolis-SC. *Brazilian J Food Technol* 13: 205–213.

Badotti, F., Vilaça, S.T., Arias, A., Rosa, C.A. & Barrio, E., 2014. Two interbreeding populations of *Saccharomyces cerevisiae* strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. *FEMS Yeast Res* 14: 289–301.

Barata, A., González, S., Malfeito-Ferreira, M., Querol, A. & Loureiro, V., 2008. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. *FEMS Yeast Res* 8: 1008–1017.

Barrajón, N., Arévalo-Villena, M., Rodríguez-Aragón, L.J. & Briones, A., 2009. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. *Food Control* 20: 778–783.

Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M. & Mills, D.A., 2013. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1–10.

Cadez, N., Zupan, J. & Raspor, P., 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res* 10: 619–630.

Cappello, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. & Zacheo, G., 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *J Appl Microbiol* 97:1274-1280.

Casanoves, F., Pla, L., Di Rienzo, J.A. & Díaz, S., 2011. FDiversity: a software package for the integrated analysis of functional diversity. *Methods Ecol Evol* 2: 233–237.

Chavan, P., Mane, S., Kulkarni, G., Shaikh, S., Ghormade, V., Nerkar, D. P., Shouche, Y. & Deshpande, M.V., 2009. Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol* 26: 801–808.

Clavijo, A., Calderón, I.L. & Paneque, P., 2010. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *Int J Food Microbiol* 143: 241–245.

Colwell, R. K., Chao, A., Gotelli, N.J., Lin, S. Y., Mao, C. X., Chazdon, R. L. & Longino, J.T., 2012. Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages. *J Plant Ecol* 5: 3–21.

Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elía, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C. & Catania, C., 2005. Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *J Appl Microbiol* 98: 1055–1061.

Comitini, F., Ciani, M., Politecnica, U. & Bianche, V.B., 2008. Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Ann Microbiol* 58: 489-493.

Del Mónaco, S.M., Barda, N.B., Rubio, N.C. & Caballero, A.C., 2014 Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *J Appl Microbiol* 117(2):451-64.

Di Maio, S., Polizzotto, G., Di Gangi, E., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Scacco, A., Amore, G. & Oliva, D., 2012. Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of south-eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PLoS One* 7: e30428.

Ferraz, A.C.P., Gadelha, B.D.Q. & Aguiar-Coelho, V.M., 2009. Análise faunística de Calliphoridae (Diptera) da Reserva Biológica Ferraz Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. *Rev Bras Entomol* 53: 620–628.

Fleet, G., 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* 86: 11–22.

Freitas, W.K. De, Mauro, L. & Magalhães, S., 2012. Métodos e Parâmetros para Estudo da Vegetação com Ênfase no Estrato Arbóreo. *Floresta Ambient* 19:520-540.

Greppi, A., Rantisou, K., Padonou, W., Hounhouigan, J., Jespersen, L., Jakobsen, M. & Cocolin, L., 2013. Yeast dynamics during spontaneous

fermentation of mawè and tchoukoutou, two traditional products from Benin. *Int J Food Microbiol* 165: 200–207.

Guerra, J.B., Araújo, R.A., Pataro, C., Franco, G.R., Moreira, E.S., Mendonça-Hagler, L.C. & Rosa, C.A., 2001. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Lett Appl Microbiol* 33: 106–111.

Hong, Y. A. & Park, H.D., 2013. Role of non-*Saccharomyces* yeasts in Korean wines produced from Campbell Early grapes: potential use of *Hanseniaspora uvarum* as a starter culture. *Food Microbiol* 34: 207–214.

Hyma, K.E. & Fay, J.C., 2013. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Mol Ecol* 22: 2917–2930.

Kim, E., Jang, W., Ko, J., Kang, J.S. & Noh, M.J., 2001. Lipase and its Modulator from *Pseudomonas sp.* strain KFCC 10818: Proline-to-Glutamine Substitution at Position 112 Induces Formation of Enzymatically Active Lipase in the Absence of the Modulator. *J Bacteriol* 183: 5937–5941.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts, a taxonomic Study*, 5th edn., Amsterdam: Elsevier.

Li, S.S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J.Y., Yan, B., Han, B.Z. & Reeves, M., 2010. Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol* 138: 85–90.

Libkind, D., Moliné, M., Sampaio, J.P. & Van Broock, M., 2009. Yeasts from high-altitude lakes: influence of UV radiation. *FEMS Microbiology Ecol* 69: 353–362.

Mercado, L. & Combina, M., 2010. Exploring the biodiversity of a wine region: *Saccharomyces* yeasts associated with wineries and vineyards. *Current*

Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. *Microbiology* vol 2:1042–1053.

Mercado, L., Dalcerro, A., Masuelli, R. & Combina, M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiol* 24: 403–412.

Ono B, Ishii, N., Fujino, S. & Aoyama, I., 1991. Role of Hydrosulfide Ions (HS^-) in Methylmercury Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 57: 3183–3186.

Palanca, L., Gaskett, A.C., Günther, C.S., Newcomb, R.D. & Goddard, M.R., 2013. Quantifying variation in the ability of yeasts to attract *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 8: e75332.

Pallmann, P., Schaarschmidt, F., Hothorn, L.A., Nacke, H. & Priesnitz, K., 2012. Assessing group differences in biodiversity by simultaneously testing a user-defined selection of diversity indices. *Mol Ecol Resour* 12: 1068–1078.

Pfeiffer, M. & Mezger, D., 2012. Biodiversity assessment in incomplete inventories: leaf litter ant communities in several types of Bornean rain forest. *PLoS One* 7: e40729.

Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C. & Gomes, A., 2014. Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLoS One* 9: e85622.

Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. & Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 4: 865–877.

Pretorius, S., Westhuizen, T.J., Van, De.r & Augustyn, O.P.H., 1999. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *S Afr J Enol Vitic* 20: 61–70.

Ramírez-Castrillón, M., Mendes S.D.C., Inostroza-Ponta, M. & Valente, P., 2014. (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts? *PLoS One* 9: e105870.

Raspor, P., Milek, D.M., Polanc, J., Mozina, S.S. & Cadez, N., 2006. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int J Food Microbiol* 109: 97–102.

Sadoudi, M., Tourdot-Maréchal, R., Rousseaux, S., Steyer, D, Gallardo-Chacón, J.J., Ballester, J., Vichi, S., Guérin-Schneider, R., Caixach, J., Alexandre, H., 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiol* 32: 243–253.

Saerens, S.M.G., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J. & Thevelein, J.M., 2010. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol* 3: 165–177.

Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.C. & Sangorrín, M.P., 2010. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Lett Appl Microbiol* 51: 170–176.

Sáez, J.S., Lopes, C.A., Kirs, V.E. & Sangorrín, M., 2011. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol* 28: 503–509.

Saikaly, P.E., Stroot, P.G. & Oerther, D.B., 2005. Use of 16S rRNA Gene Terminal Restriction Fragment Analysis To Assess the Impact of Solids Retention Time on the Bacterial Diversity of Activated Sludge. *Appl Environ Microbiol* 71: 5814–5822.

Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A.C., Santos, M.A.S. & Casal, M., 2012. Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions. *PLoS One* 7: e32507.

Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U.C. & Bauer, F., 2012. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One* 7: e52609.

Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R. & Moschetti, G., 2012. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. doi:10.1073/pnas.1208362109

Sipiczki, M. (2006) *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl Environ Microbiol* 72: 6716–6724.

Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J., Calabretta, A. & Di Paola, M., 2012. Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Pnas*. 109, 13398-13403 doi: 10.1073/pnas.1208362109.

Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J.M. & Arroyo, T., 2012. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J Appl Microbiol* 112: 302–315.

Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F. & Mita, G., 2014. Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces*

cerevisiae Strains Isolated from Natural Fermentation of Susumaniello Grape Must in Apulia, Southern Italy. Int J Microbiol Epub ahead of print.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. & Dequin, S., 2007a Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res 7: 317–329.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. & Dequin, S. (2007b) Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. FEMS Yeast Res 7: 317–329.

Weiss, S., Samson, F., Navarro, D. & Casaregola, S., 2013. YeastIP: a database for identification and phylogeny of *Saccharomycotina* yeasts. FEMS Yeast Res 13: 117–125.

Xue, F., Gao, B., Zhu, Y., Zhang, X., Feng, W. & Tan, T., 2010. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material. Bioresour Technol 101: 6092–6095.

Yurkov, A.M., Kemler, M. & Begerow, D., .2011. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. PLoS One 6: e23671.

Yurkov, A.M., Kemler, M. & Begerow, D., 2012. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. Fungal Ecol 5: 24–35.

Zott, K., Claisse, O., Lucas, P., Coulon, J., Lonvaud-Funel, A. & Masneuf-Pomarede, I., 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. Food Microbiol 27: 559–567.

Figure and tables legends

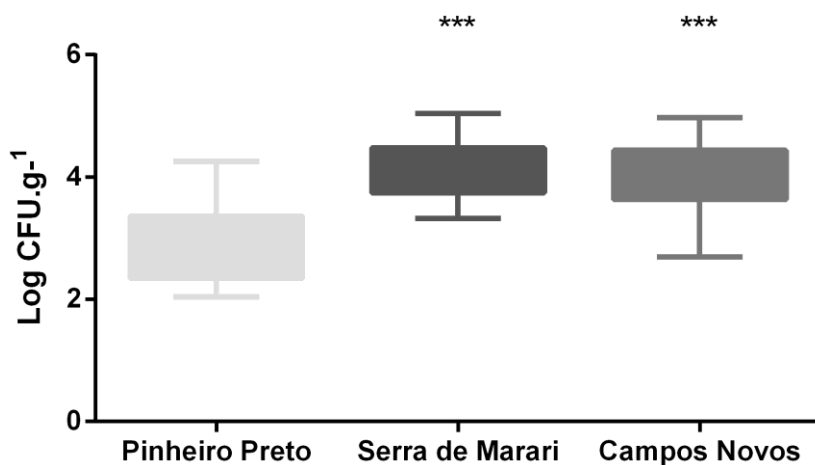


Figure 1. Yeast populations in vineyard located in Serra do Marari (1053m), Pinheiro Preto (698m) and Campos Novos (973m). Box and bars are upper and lower values. Significant differences are indicated by *** $p < 0.001$.

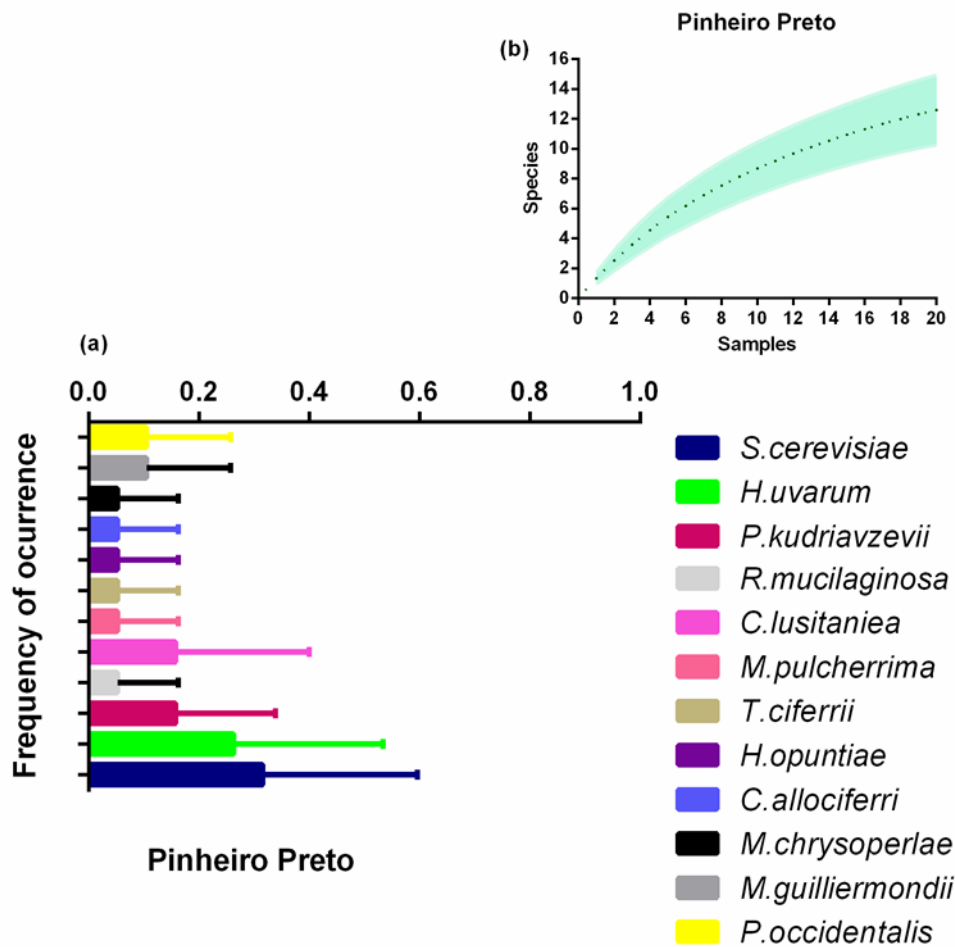


Figure 2. Structure of the yeast community in Pinheiro Preto. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Pinheiro Preto. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals

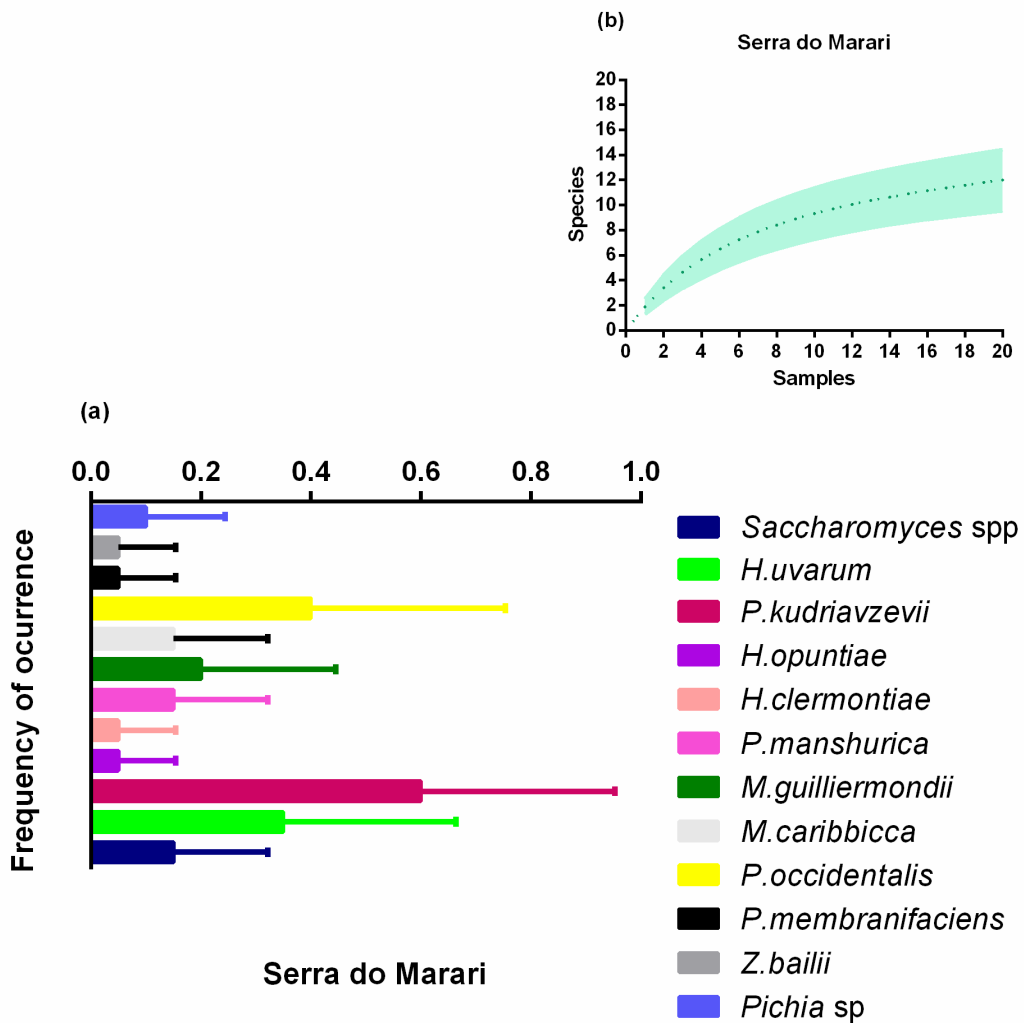


Figure 3. Structure of the yeast community in the Serra do Marari. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Serra do Marari. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals.

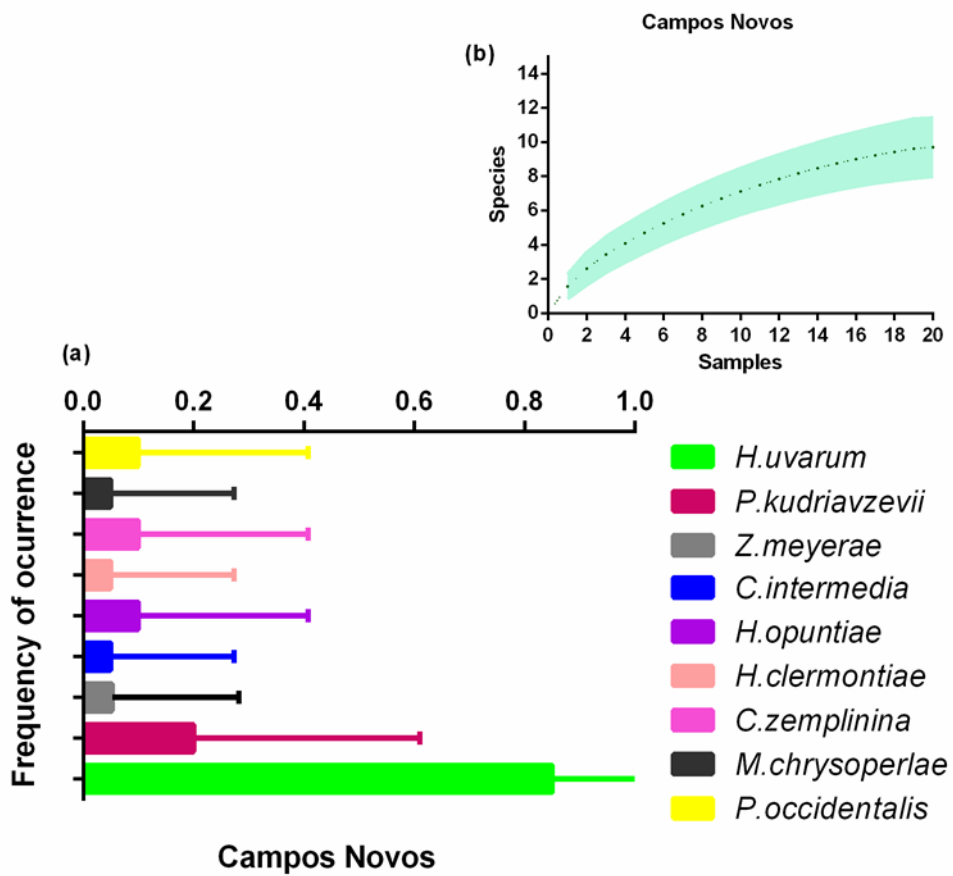


Figure 4. Structure of the yeast community in Campos Novos. (a) Frequency of occurrence of species. The frequency was calculated in the following way: occurrence of the species in relation to the total number of samples in Campos Novos. Bars are confidence intervals of 95%. (b) Species accumulation curve (rarefaction). Shaded areas (light green) correspond to confidence intervals.

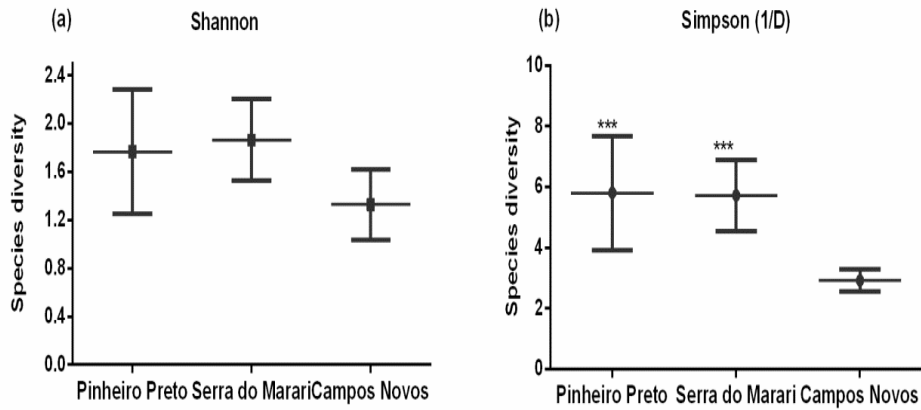


Figure 5. Taxonomic diversity indices for the vineyard regions. (a) Taxonomic diversity assessed using Shannon index for Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos showed no significant differences between the averages obtained. (b) Taxonomic diversity assessed using reciprocal Simpson index (1/D), significant differences indicated by *** $p < 0.0001$. Upper and lower bars are confidence intervals and averages respective cross bars correspond to confidence intervals.

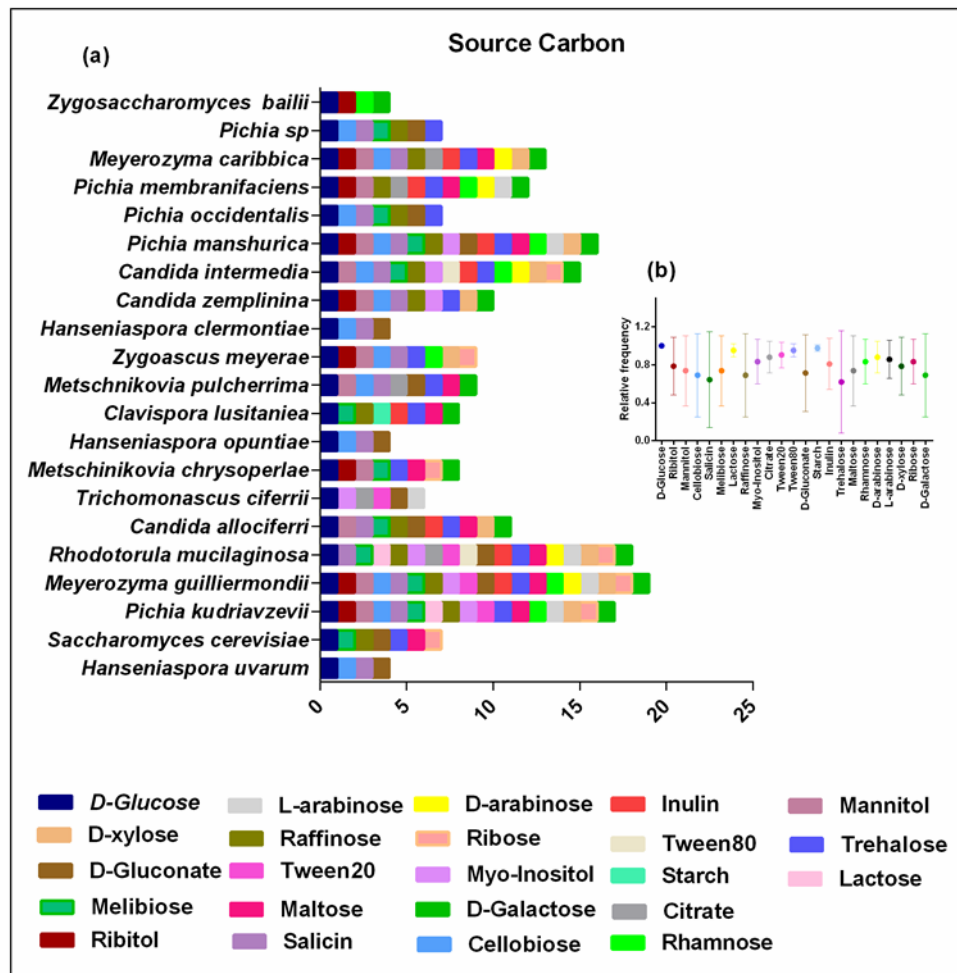


Figure 6. Physiological and biochemical responses for yeast strains isolated from the vineyards. (a) Profile assimilation of carbon sources. (b) Relative frequency of assimilation of carbon sources in relation to the intensity considering (0) unassimilated source and (1) assimilated source. Bars are confidence intervals and filled circles correspond to the average relative frequency.

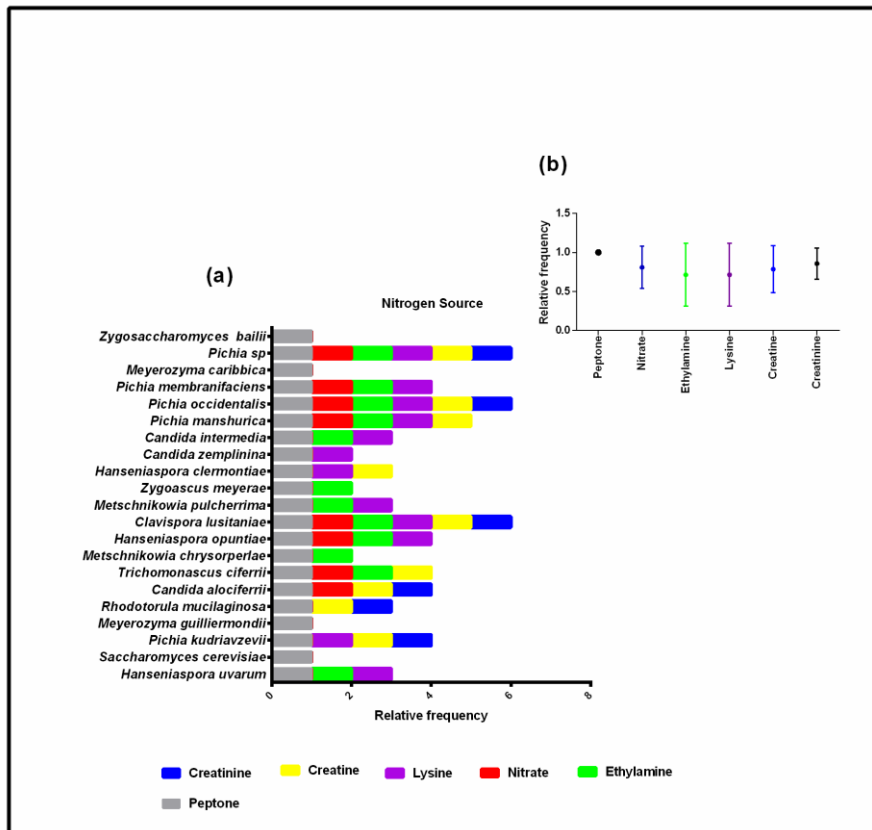


Figure 7. Physiological and biochemical responses for yeast strains isolated from the vineyards. (a) Profile for assimilation of nitrogen sources. (b) Relative frequency of assimilation of nitrogen sources in relation to the intensity considering (0) unassimilated source and (1) assimilated source. Bars are confidence intervals and filled circles correspond to the average relative frequency.

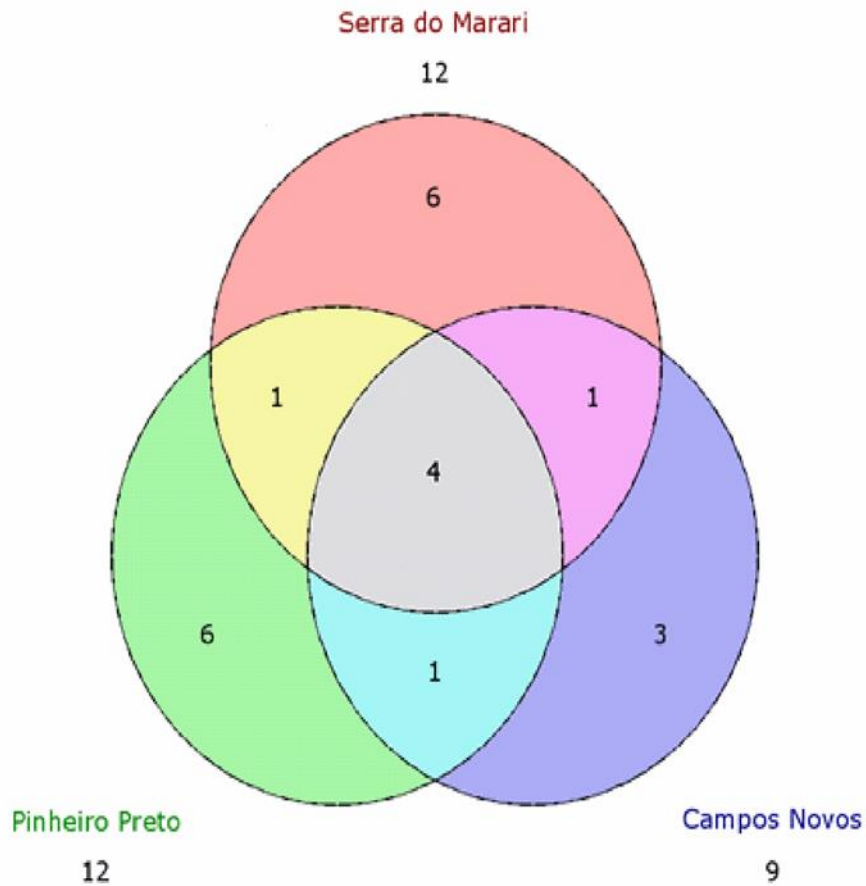


Figure S1. The Venn diagram representing three sets of community structures. The Venn diagram set, representing four common yeast species in the regions studied: Pinheiro Preto, Serra do Marari and Campos Novos (gray area). It can be observed that only one yeast species (*M. chrysoperlae*) is common in Pinheiro Preto and Campos Novos (green area); *M. guilliermondii* is common in Pinheiro Preto and Serra do Marari and *H. clermontiae* is common in Serra do Marari and Campos Novos (pink area).

Table 1. List of yeast species isolated in this study and reference strains with their respective access numbers in Genbank.

Species	Sampling Area								
	Pinheiro Preto								
	Number of strains	Leaf	Soil	Bunch	Equipment	Effluent	Accession Number ^{a,b}	Type Strain	Identities (%)
<i>S. cerevisiae</i>	6	1	1	1	1	2	AJ508581	AJ508581	99
<i>H. uvarum</i>	5	1	nd ^c	2	2	nd ^c	U84229	CBS5314	100
<i>P. kudriavzevii</i>	3	nd ^c	nd ^c	2	1	nd ^c	AJ512452	CBS573	99
<i>R. mucilaginosa</i> ^b	1	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	nd ^c	ATCC32749	ATCC32749	99
<i>C. lusitaniae</i>	3	2	nd ^c	1	nd ^c	nd ^c	AJ508571	CBS4413	99
<i>M. pulcherrima</i>	1	nd ^c	nd ^c	1	nd ^c	nd ^c	U45736	CBS610	99
<i>T. ciferrii</i>	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	1	nd ^c	U40132	CBS295	99
<i>C. alociferrii</i>	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	1	nd ^c	AB041003	CBS5166	99
<i>M. chysoperlae</i>	1	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	nd ^c	AY45204	CBS9803	99
<i>M. guilliermondii</i>	1	nd ^c	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	7	CBS526	99
<i>H. opuntiae</i>	1	nd ^c	nd ^c	nd ^c	nd ^c	1	J508562	CBS58733	99
<i>P. occidentalis</i>	1	nd ^c	nd ^c	1	nd ^c	1	AJ51253	CBS5459	99
							U76348		
<i>All</i>	25 strains, 12 species								

The letters correspond to the sequenced regions, a: D1/D2 domain (26S rDNA), b: ITS1-5.8S-ITS2, c: not detected, d: BLAST identity.

Table continue 1.

Serra do Marari					
Species	Number of strains	Bunch	Accession Number ^{a,b}	Type Strain	Identities (%)
<i>Saccharomyces</i> sp		3	AJ508581	CBS1907	99
<i>H. uvarum</i>	3	8	U84229	CBS5314	99
<i>P. kudriavzevii</i>	8	12	AJ512452	CBS573	100
<i>H. opuntiae</i>	12	1	AJ5124533	CBS58733	100
<i>H. clermontiae</i>	1	1	AJ512452	CBS8821	99
<i>P. manshurica</i>	1	3	DQ104719	CBS241	99
<i>M. guilliermondii</i>	3	4	AJ452047	CBS526	99
<i>M. caribbica</i>	4	3	AM159104	CBS52022	99
<i>P. occidentalis</i>	3	8	U76348	CBS5459	100
<i>P.membranifaciens</i>	8	2	DQ1989957	CBS1331	99
<i>Z. bailii</i>	2	1	U72161	CBS608	99
<i>Pichia</i> sp	1	2	-	-	97 ^d
	2				
<i>All</i>	48 strains, 12 species				

The letters correspond to the sequenced regions, a: D1/D2 domain (26S rDNA), b: ITS1-5.8S-ITS2, c: not detected, d: BLAST identity.

Table continue 1.

Campos Novos					
Species	Number of strains	Bunch	Accession Number	Type Strain	Identities (%)
<i>H. uvarum</i>	19	19	U84229	CBS5314	99
<i>P. kudriavzvi</i>	4	4	AJ152452	CBS5573	100
<i>H. opuntiae</i>	2	2	AJ1524533	CBS58733	100
<i>H. clermontiae</i>	1	1	AJ5124533	CBS8821	99
<i>C. zemplinina</i>	2	2	DQ104719	CBS241	99
<i>C. intermedia</i>	1	1	AJ452047	AJ452047	99
<i>Z. meyeriae</i>	1	1	AM159104	CBS52022	99
<i>M. chrysoperlae</i>	1	1	AY452047	CBS9803	99
<i>P. occidentalis</i>	2	2	U76348	CBS5459	100
<i>All</i>	33 strains, 9 species				

The letters correspond to the sequenced regions, a: D1/D2 domain (26S rDNA), b: ITS1-5.8S-ITS2, c: not detected, d: BLAST identity.

Table 2. Species richness and taxonomic diversity estimates obtained with different indices (mean and standard deviation).

Vineyard	Sampling sites	Observed richness	ACE	ICE1	Jackknife 2	Bootstrap	Shannon	Simpson (1/D)
Pinheiro Preto	20	12	14.00±1.26	14.92±1.25	13.98±1.42	9.43±0.95	1.78±0.52	5.80±1.88
Serra do Marari	20	12	12.95±0.78	13.77±0.76	13.32±0.98	10.17±0.71	1.88±0.34	5.72±1.18
Campos Novos	20	9	13.50±1.25	14.18±1.21	10.61±1.03	7.55±0.67	1.33±0.29	2.92±0.36
Total	60	33						

Abbreviations used: ACE, Abundance-based coverage estimator; ICE, Incidence-based coverage estimator, Jackknife 2, second-order Jackknife richness estimator, Bootstrap, Shannon and reciprocal of Simpson.

Table 3. Functional diversity in vineyards located at altitudes of 678, 973 and 1053 m obtained with the assimilation of different sources of nitrogen (mean and standard deviation).

Vineyard type	FAD2	FDc	Rao Entropy
Pinheiro Preto	2.61±0.01 ^a	1.00±0.01 ^a	0.07±0.01 ^a
Serra do Marari	3.62±0.01 ^b	0.81±0.02 ^b	0.06±0.02 ^b
Campos Novos	0.56±0.03 ^c	0.24±0.01 ^c	0,02±0.02 ^c

Abbreviations used: FAD2, Functional attribute diversity; FDc, community based; Rao Entropy. Significant differences are indicated by different lower case letters, $p < 0.05$.

Table 4. Functional diversity in vineyards located at altitudes of 678, 973 and 1053 m obtained with the assimilation of different sources of carbon (mean and standard deviation).

Vineyard type	FAD2	FDc	Rao Entropy
Pinheiro Preto	13.47±0.01 ^a	4.1±0.02 ^a	0.65±0.01 ^a
Serra do Marari	12.67±0.02 ^b	3.16±0.03 ^b	0.50±0.01 ^b
Campos Novos	3.84±0.02 ^c	0.32±0.01 ^c	0.26±0.01 ^c

Abbreviations used: FAD2, Functional attribute diversity; FDc, community based; Rao Entropy. Significant differences are indicated by different lower case letters, $p < 0.05$.

6. Capítulo III

**Desvendando o perfil de éster das linhagens do gênero *Saccharomyces*
isoladas de vinhedos de Santa Catarina**

Desvendando o perfil de éster das linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas de vinhedos de Santa Catarina

Sandra D. C. Mendes^{a,e}; Bruna Frielink Immich^a; Stefany G. Arcari^f; Jennifer Saffi^{a,d}; Maria Lucia Scroferneker^{b,c}; Patricia Valente da Silva^{a,b}

a. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

b. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

c. Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

d. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

e. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1347 I, CEP 88034-901, Florianópolis, SC, Brazil.

f. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos - (Unicamp), Campinas, SP, Brasil

*Correspondence and reprints: Patricia Valente da Silva, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 210, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33084196 (e-mail: patricia.valente@ufrgs.br).

Resumo

Não obstante a disponibilidade de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* comerciais destinadas a produção de vinho, as linhagens do gênero de *Saccharomyces* associadas a comunidades de leveduras de vinhedos no meio oeste de Santa Catarina, sul do Brasil, em geral, são mais adaptadas as condições ambientais, também são parcialmente responsáveis pelas características que frequentemente identificam vinhos e regiões específicas. Portanto, o objetivo deste estudo foi discriminar as linhagens por suas características fenotípicas e genotípicas. Para determinar os níveis de plodia das linhagens isoladas dos vinhedos, o conteúdo de DNA relativo foi avaliado por Citometria de Fluxo. A maioria das células gerou picos duplos de fluorescência, com exceção do isolado 12M e 01PP, onde percebemos o mesmo padrão de fluorescência equivalente à linhagem diplóide BY4743. Por outro lado, quando se avaliou as condições de tolerância para etanol e osmótico, todos os isolados apresentaram menos de 50 % de sobrevivência para as condições testadas. Para uma visão global dos dados, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) para cada linhagem de *Saccharomyces* durante a fermentação do mosto sintético e o mosto da uva Vermentino. Em nosso estudo, tanto no meio sintético quanto no mosto da uva Vermentino, diferentes níveis de ácido butanoico, acetato de etila (frutado), hexanoato de etila (frutado, aniz) e β -pineno (pinus) foram encontrados, bem como outros compostos foram igualmente importantes como laurato de etila ($9,90 \text{ mg.L}^{-1}$), decanoato de etila ($4,08 \text{ mg.L}^{-1}$), α -pineno ($1,93 \text{ mg.L}^{-1}$), quando as linhagens foram inoculadas no mosto da uva Vermentino. Concluindo que foi possível separar as linhagens do gênero *Saccharomyces* em grupos de acordo com o perfil de compostos voláteis produzidos, sendo a influência do mosto da uva Vermentino mais evidente por ser naturalmente um meio complexo.

Palavras chaves:

2. Introdução

Saccharomyces cerevisiae não é somente a levedura mais usada na indústria de vinificação, de cerveja, panificação, como também é um sistema modelo para organismos eucarióticos. Inicialmente, os isolamentos realizados usando fermentações de suco de uva levaram à conclusão de que esta espécie era frequente nas uvas (Buzzini *et al.*, 2005). No entanto, a utilização de técnica de isolamento direto mostrou uma realidade diferente, estabelecendo que a presença de *Saccharomyces* spp é ausente ou rara nas bagas de uvas (Barata, Malfeito-Ferreira, & Loureiro, 2012).

Os níveis reduzidos de variações genéticas presente nas linhagens usadas para fermentações de vinhos pode ser o resultado de um gargalo genético, seleção de características específicas ou uma combinação dos dois. No caso de domesticação, espera-se que a diferenciação de certos traços fenotípicos (domesticação) seja acompanhada pela diferenciação genética (Hyma, Saerens, Verstrepen, & Fay, 2011).

As linhagens selvagens já foram isoladas a partir de fontes naturais variadas, e têm sido frequentemente encontradas em associação com exsudatos de árvores de carvalho, cascas de árvores e solo (Saerens *et al.*, 2006). Surpreendentemente, os metabólitos voláteis produzidos pela levedura são negligenciados com as exceções mais proeminentes de etanol e acetato de etila, isto pode ser atribuído ao conhecimento limitado da bioquímica e genética envolvidos na formação de metabólitos voláteis que impedem, em geral, a incorporação em estudos de biologia de sistemas (Halbfeld, Ebert, & Blank, 2014).

As leveduras, assim como outros microrganismos, são grandes produtores de ésteres (Ciani, Comitini, Mannazzu, & Domizio, 2010). Em condições ótimas, estes componentes podem ser obtidos sem que ocorram perdas no crescimento e no metabolismo fermentativo de tais microrganismos (Gougeon *et al.*, 2009). Os

compostos de aromas denominados “yeast-bouquet” são metabólitos secundários produzidos por inúmeras espécies de leveduras, representados, principalmente por ésteres de acetato, ésteres etílicos, álcoois superiores, carbonilas e ácidos graxos voláteis (Cordente, Curtin, Varela, & Pretorius, 2012).

Basicamente, dois fatores são importantes na formação de ésteres pela levedura, tais como a concentração dos dois substratos, ou seja, acil-CoA/acetil-CoA e álcoois superiores ou ácidos graxos e a atividade total das enzimas envolvidas na formação e hidrólise do respectivo éster, como a AATase, éster sintase e esterases, respectivamente (Verstrepen *et al.*, 2003). Entretanto, um nível mais elevado de nitrogênio no meio, ou um aumento da temperatura de fermentação de 15 a 26 °C, provoca um forte aumento na produção de ésteres (Saerens, Delvaux, Verstrepen, Dijck, *et al.*, 2008).

Outras condições podem interferir na produção de ésteres, tais como o pH, nitrogênio e sua disponibilidade no meio, além da quantidade de metais (ferro e cobre, principalmente). A disponibilidade de metais no meio de cultura pode aumentar a produção de ésteres, principalmente sobre a produção de acetato de etila (Urit, Löser, Wunderlich, & Bley, 2011). Isolados de ambientais associados à fermentação do vinho mostraram níveis mais baixos de expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse e esgotamento de nutrientes, em particular durante as fases tardias da fermentação, o que sugere que estão melhor adaptados ao estresse imposto por esta condição ambiental particular (Carreto *et al.*, 2011), incluindo, por exemplo, o desempenho de fermentação, tolerância ao estresse e à capacidade de utilizar eficientemente fontes de carbono e nitrogênio, e tolerância a teores de álcool (Vázquez-Lima *et al.*, 2014).

Em um estudo anterior, foi identificado a diversidade de leveduras em três vinhedos localizados nas regiões montanhosas no Meio Oeste do Estado de Santa Catarina (Ramírez-Castrillón, Mendes, Inostroza-Ponta, & Valente, 2014), observou-se a propagação provável de *S. cerevisiae* entre o ambiente da cantina e de vinhedos. Estas linhagens do gênero *Saccharomyces*, presentes nos vinhedos de Pinheiro Preto e Serra do Marari, nunca foram caracterizadas anteriormente. Neste

contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar as características fenotípicas e genotípicas (*fingerprinting* com o *primer* EI1), assim como determinar os níveis de plodia das linhagens do gênero de *Saccharomyces* isoladas dos vinhedos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Linhagens utilizadas, cultivo, caracterização e extração de DNA genômico

As linhagens utilizadas neste estudo foram isoladas de parreirais localizados em Pinheiro Preto e Serra do Marari nos substratos de folhas (41PP), solos (01PP), Cachos (12M, 06CE, 11CE e 33CE), equipamentos (28AD), efluente (13PP, 26PP) e linhagens comerciais (2028, 2048 e 2033). Identificados por sequenciamento do domínio D1/D2 do gene de rRNA LSU (Ramírez-Castrillón, Mendes, Inostroza-Ponta, & Valente, 2014). A discriminação genotípica foi realizada utilizando-se o *primer* EI-1 (5'-CTGGCTTGGTGTATGT-3'), descrito por Barros & Lopes *et al.*, (1996). A metodologia usada para avaliar a capacidade de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e fermentação de carbono foi proposta por Kurtzman *et al.*, (2011). Todas as linhagens foram estocadas a - 30 °C em 20% de glicerol e cultivadas em meio completo YPD (extrato de levedura 0,5%, peptona 2%, dextrose 2%). As células de leveduras em crescimento exponencial foram utilizadas para ajustar o número de células final em $2,0 \times 10^7$ células mL⁻¹, que foram usadas para os testes de exclusão por estresse, teste de produção de sulfeto de hidrogênio, determinação do perfil de compostos voláteis orgânicos e ploidia.

2.2 Análise de Ploidia

A ploidia de cada linhagem foi avaliada através de um procedimento anteriormente publicado por Borneman *et al.*, 2011. A linhagem BY4743 *Wild Type* foi usada como controle e as linhagens de vinhedos foram tratadas como descrito abaixo. As células em crescimento exponencial foram utilizadas para ajustar o

número de células final em $2,0 \times 10^7$ células/mL. Após a padronização do inóculo, foram lavadas com tampão PBS 1X, fixadas com etanol absoluto gelado e incubadas *overnight*. As células foram lavadas novamente com PBS 1X e, então, coradas com $16\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (Sigma) na presença de $0,1\text{mg/mL}$ de Rnase A (Invitrogen). As amostras foram analisadas no FACS Calibur (BDPharMingen), usando CellQuest program suite. O meio de esporulação continha 0.5% de extrato de levedura, 1% de potássio acetato e 2 % de ágar (Guijo, Mauricio, Salmon, & Ortega, 1997).

2.3 Teste de produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S)

As leveduras foram semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar LA (0,3% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 4,0% de glicose, 0,02% de sulfato de amônio e 0,1% de acetato de chumbo) e, em placas de Petri contendo o meio sólido YPD 2% (controle), foram incubadas em estufa a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 dias, conforme descrito por Ono *et al.* (1991). Após o tempo de incubação, foi observado o aparecimento ou não de colônias enegrecidas, característica de produção do sulfeto de hidrogênio. Foram realizados três repiques para cada levedura isolada.

2.4 Teste de exclusão por estresse

As leveduras foram semeadas no meio YPD (2% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne e 2% de d-glicose) e incubadas em estufa a $28\text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas como controle (Guimaraes *et al.*, 2006). As seguintes condições de estresse foram testadas em meio básico suplementado por 2% de glicose, 20% de d-glicose, 20 % de sacarose ou a combinação de fonte de carbono e 8,0 % de etanol, sendo após incubadas a $28\text{ }^\circ\text{C}$ durante 72 horas. O experimento foi realizado duas vezes com replicatas técnicas.

2.5 Determinação do perfil de aromas

Foram utilizados para determinação dos compostos voláteis o mosto da uva Vermentino e mosto sintético com modificações (1,2% de d-glicose, 1,2% de frutose, 0,5% de extrato de leveduras, 0,06% de ácido cítrico, 0,06% de ácido tartárico, 0,028% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 0,028% de $(NH_4)_2SO_4$), descrito por Arroyo-López, *et al.*, (2011). O mosto da uva Vermentino foi previamente tratado com 29g/L de dióxido de enxofre, na forma de metabissulfito de sódio ($Na_2S_2O_5$), 8 mL/L da enzima pectolítica para clarificação do mosto, bem como foi adicionado 7 mL/L de bentonite para facilitar a sedimentação de sólidos não fermentáveis e transferido para câmara fria por 7 dias. Após a clarificação, 200 mL de mosto da uva Vermentino foram esterilizados com membrana de nitrocelulose (0,22 μM , 47 mm de diâmetro). Foram transferidos assepticamente 5 mL do mosto e o meio sintético para vials de 10 mL. O inóculo de cada linhagem foi previamente cultivado a 25 °C durante 24 horas em caldo YPD (0,5% de extrato de levedura, 2,0% de peptona, 2,0 de d-glicose). As células de leveduras em crescimento exponencial foram utilizadas para ajustar o número de células final em $2,0 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, foram inoculados 100 μL de cada linhagem do gênero *Saccharomyces* para o mosto e meio indutor de produção éster e incubados a 25 °C durante 48 horas, bem como foi usado um controle negativo do mosto sintético e do mosto da Vermentino e mantido nas mesmas condições.

2.6 Extração dos componentes voláteis

Componentes voláteis analisados: 3-metil-1-butanol (PubChem CID: 31260), n-butanol (PubChem CID: 263), metanol (PubChem CID: 887), acetato de etila (PubChem CID: 8857), butanoato de etila (PubChem CID: 7762), hexanoato de etila (PubChem CID: 31265), heptanoato de etila (PubChem CID: 7797), octanoato de etila (PubChem CID: 7799), decanoato de etila (PubChem CID: 8048), nonanoato de etila (PubChem CID: 31251), n-laurato de etila (dodecanoato de etila) (PubChem CID: 7800), undecanoato de etila (PubChem CID: 12327), ácido propanoico (PubChem

CID: 1032), ácido perlargonico (ácido nonanoico) (PubChem CID: 8158), ácido heptanoico (PubChem CID: 8094), ácido n-undecanoico (PubChem CID: 8180), ácido butanoico (PubChem CID: 264), ácido valérico (ácido pentanoico) (PubChem CID: 7991), ácido cáprico (PubChem CID: 2969), ácido caproico (PubChem CID: 8892), γ -nonalactona (PubChem CID: 7710), α -pineno (PubChem CID: 6654) β -pineno (PubChem CID: 14896) foram fornecidos por Sigma-Aldrich (Saint Luis, EUA).

Uma fibra de SPME composta por divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano 50/30 mm (DVB/CAR/PDMS), obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA), foi inicialmente condicionada de acordo com as recomendações do fabricante. Após o período de incubação das amostras, adicionou-se 1,5 g de NaCl. O procedimento de extração de compostos voláteis foi realizado utilizando o amostrador automático Triplus-RSH (Thermo Fischer Scientific, USA) e o software ChromQuest (Thermo Fischer Scientific, USA). As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura de 56 °C e, posteriormente a fibra foi exposta no headspace (HS) por 55 minutos. A adsorção no injetor do cromatógrafo a gás foi realizada por 2 minutos à temperatura de 265 °C no modo *splitless*. As análises cromatográficas foram executadas em um cromatógrafo a gás Thermo Scientific Trace 1310 (USA) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e o software ChromQuest. A separação cromatográfica foi realizada empregando uma coluna ZB-WAXplus (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) da Zebron (USA) e gás nitrogênio como carreador a um fluxo de 1,0 mL/ min. A temperatura inicial do forno era de 40 °C por 5 minutos, aumentando-se 2 °C por minuto até atingir 220 °C. A identificação foi efetuada através do tempo de retenção, comparando-se com os padrões dos compostos voláteis e a quantificação foi por padronização interna, com 4-metil-2-pentanol (PubChem CID: 7910) como padrão interno.

2.7 Determinação do valor da atividade olfativa (OAV)

Para determinar a contribuição de um composto químico identificado no aroma global do mosto sintético e mosto da uva Vermentino, foi determinado o valor da atividade olfativa. O valor da atividade olfativa é indicador da importância de um composto específico para o aroma da amostra, sendo que foi calculado como a razão entre a concentração do composto individual e o limiar de percepção descrito na literatura. Somente foram considerados importantes para contribuição global do aroma dos componentes que atingiram o índice de OAV > 1 (Vilanova *et al.*, 2012).

2.8 Análises Estatísticas

Os experimentos foram realizados em triplicatas. Com os dados coletados, foram calculados os valores médios, desvio padrão, coeficiente de variação, ANOVA/MANOVA, TUKEY HSD ($p < 0,05$) e a Análise de Componentes Principais (ACP) dos resultados obtidos para estabelecer a correlação entre os componentes do meio indutor de produção de éster e mosto da uva Vermentino e linhagens testadas. Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos no nível de $p \leq 0,05$. Comparações entre as linhagens foram calculadas com software Graphpad Prism 6.

3. Resultados

3.1 Caracterização fenotípica e genotípica

Nove linhagens do gênero *Saccharomyces* foram isoladas de vinhedos de regiões montanhosas no sul do Brasil e avaliadas em relação a características fenotípicas (morfologia, presença de ascósporos, assimilação de fontes de carbono e de nitrogênio e fermentação de fontes de carbono) e genotípicas (*fingerprinting* com o *primer* EI1). As linhagens apresentaram características morfológicas e

número de ascosporos por asca característicos do gênero *Saccharomyces*. Os resultados dos testes fisiológicos e bioquímicos, incluindo a formação de sulfeto de hidrogênio podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2. Nenhuma das linhagens produziu compostos amilóides. Foram obtidos 4 perfis diferentes com o *primer* EI1, o que permite constatar baixa variabilidade genotípica entre as linhagens analisadas (Fig. S1). Através da análise fenotípica (assimilação e fermentação de fontes de carbono), sugere-se que os isolados 06CE, 11CE e 33CE pertençam à espécie *S. cariocanus*.

3.2 Análise de ploidia

Para determinar os níveis de ploidia das linhagens isoladas dos vinhedos, o conteúdo de DNA relativo foi avaliado por Citometria de Fluxo (Fig. 1). A maioria das células gerou picos duplos de fluorescência, com o segundo pico gerado atribuído a células sofrendo síntese de DNA. As células assíncronicas que continham 2C de teor de DNA apresentaram fluorescência quase 2 vezes maior que as células que continham 1C de teor de DNA. No entanto, a relação 2C/1C de células coradas com iodeto de propídio ficou entre 1,74 a 1,83. Embora o segundo pico pareça mais plano nas linhagens testadas 11CE, 33CE e 41PP, ainda é consistente com a linhagem diplóide BY4743. As células das linhagens 01PP e 12M geraram um pico com metade de fluorescência da linhagem diplóide (BY4743), uma vez que a suspensão continha células em divisão, problemas estes relacionados à obtenção de células em fase G1 do ciclo celular, apresentando uma relação 2C/1C entre 1,89 e 1,98. Percebemos o mesmo padrão de fluorescência com as linhagens comerciais SC2028, 2033 e 2048, que apresentaram os mesmos picos de fluorescência equivalentes à linhagem diplóide, apresentando uma relação 2C/1C entre 1,58 a 1,70 (Fig. 2). Todas as linhagens formaram esporos (dados não mostrados).

3.3 Tolerância a condições de estresse

As linhagens do gênero de *Saccharomyces* foram capazes de crescer em YPD a uma temperatura de 25°C (sem condição de estresse) e no mosto da uva Vermentino. Por outro lado, quando se avaliou as condições de tolerância para etanol e estresse osmótico, todos os isolados apresentaram menos de 50 % de sobrevivência para as condições testadas, tendo sido observadas diferenças significativas entre as médias dos isolados e controle negativo ($p < 0.001$). Observamos que 11CE apresentou maior sensibilidade entre as linhagens para condição de estresse por etanol (Fig. 4a). Quando foi aumentada a concentração de glicose, observou-se que os isolados 01PP e 11CE foram as linhagens mais sensíveis com 25,5 e 19 % de sobrevivência, respectivamente (Figura 4b). Quando foram testadas duas condições combinadas, como estresse por etanol e osmótico com a fonte de carbono glicose e sacarose, os seguintes isolados foram mais sensíveis: 01PP, 11CE, 13PP e 33CE (Fig. 4c e d).

3.4 Determinação de compostos voláteis

Variáveis importantes foram observadas para diferenciação das linhagens do gênero *Saccharomyces*, tanto no meio sintético quanto no mosto da uva Vermentino, com diferentes níveis de ácido butanóico, acetato de etila (frutado), hexanoato de etila (frutado, aniz) e β -pineno (pinus) mostrados nas tabelas 3 e 4. Outros compostos individualmente foram importantes, como laurato de etila ($9,90 \text{ mg.L}^{-1}$), observado na linhagem 01PP, e α -pineno ($0,51 \text{ mg L}^{-1}$), na linhagem de 33CE, quando inoculadas no mosto sintético. Do mesmo modo, os seguintes compostos foram individualmente importantes: decanoato de etila ($4,08 \text{ mgL}^{-1}$), laurato de etila ($8,56 \text{ mgL}^{-1}$) na linhagem 01PP e α -pineno ($1,93 \text{ mg L}^{-1}$) na linhagem 33CE, quando foram testadas no mosto da uva Vermentino.

Para uma visão global dos dados, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) utilizando cada linhagem do gênero de *Saccharomyces* (Fig.5).

Esta abordagem foi utilizada para separar as linhagens com base em suas características fenotípicas e metabólitos secundários produzidos durante as fermentações em micro-escala. As figuras 5a e b mostram em cada parcela correspondente à importância relativa de cada composto volátil para as linhagens no meio utilizado para seu crescimento e produção dos metabólitos. Na parte superior do gráfico, em que o PC1 negativo e PC2 é positivo para mosto sintético testado, a variável com maior contribuição foi o acetato de etila (0,40, aroma frutado, solvente). O segundo PC2 responsável por 17,98% de variabilidade total está fortemente correlacionado com γ -nonalactona (-0,58, coco). Para a fermentação do mosto sintético (Fig.5b), PC1 e PC2 foram responsáveis por 53,19 % e 17,98% de variabilidade, respectivamente. A discriminação clara foi observada entre as linhagens 13PP, 12M e SC2038, no quadrante superior esquerdo, com a linhagem 41PP (isolado de folhas) levemente afastada do grupo. Ao centro, aparece a linhagem 01PP (isolada do solo), uma das linhagens analisadas mais sensíveis ao estresse, 33CE e 30 CN no quadrante superior direito. As linhagens 11CE e SC2028 formaram outro grupo. Na Fig. 5c, a parte superior do gráfico em que o PC1 negativo e PC2 é positivo para o mosto da uva Vermentino, a variável com maior contribuição é o ácido heptanóico (0,91, aroma frutado). O segundo PC2 responsável por 22,81% da variabilidade total está fortemente correlacionado com acetato de etila (0,40, frutado) e γ -nonalactona (- 0,57). Esta mesma tendência foi observada no mosto da uva Vermentino (Fig. 5d), onde PC1 e PC2 foram responsáveis por 39,04% e 22,81% da variabilidade, respectivamente. Neste mosto, apareceu no quadrante superior esquerdo, um grupo contendo as linhagens 33CE e 30CN, que não haviam agrupado no mosto sintético.

3.5 Determinação do valor da atividade olfativa

Foi avaliada a influência de cada composto individualmente, como descrito no item 2.7. Os resultados nas tabelas 3 e 4 mostram os 11 compostos voláteis encontrados neste estudo em concentrações mais elevadas do que seus limiares de odores correspondentes. Destes compostos voláteis, podemos identificar os

principais contribuintes para aroma global das linhagens responsáveis pela produção de compostos secundários. Para todas as linhagens testadas, o mais alto OAV foi mostrado para o ácido butanóico (queijo e suor). Um dos compostos majoritários, acetato de etila, tem limiar de percepção $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$, contribuindo para o caráter frutado e solvente do vinho, sua concentração foi mais alta no mosto da uva Vermentino, com $\text{OAV} > 105.2$. Outro composto importante, presente acima do limiar de odor, foi o laurato de etila nos mostos sintético e da uva Vermentino, em que evidenciam-se nuances florais e frutados, bem como o decanoato de etila (uva) presente no mosto da uva Vermentino que estava acima do limiar de odor. Entre os ácidos, cinco linhagens apresentaram concentrações $\text{OAV} > 1$. A presença de 3 metil-1-butanol (malte) acima do limiar de odor foi somente observada quando foi realizada a fermentação com o mosto da uva Vermentino em todas as linhagens do gênero de *Saccharomyces* testadas. Finalmente, compostos de terpenos apresentaram $\text{OAV} > 1$ para todas as linhagens, o que sugere a importância desta família de compostos de aroma no mosto da uva Vermentino, pois o mesmo estava presente no mosto sintético. Os outros compostos voláteis quantificados estavam abaixo do limite de detecção.

4. Discussão

Para determinar a diferenciação fenotípica das linhagens isoladas de diferentes vinhedos, foi avaliada a capacidade de assimilação de carbono e nitrogênio, bem como as fontes de carbono foram testadas para capacidade fermentativa, produção de sulfeto de hidrogênio (Tabelas 1 e 2). Leveduras com uma elevada produção de sulfeto de hidrogênio são indesejáveis para a produção de vinho, pois confere aroma e sabor que comprometem a qualidade do vinho (Fleet, 2008). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* desempenha um papel central na produção de compostos voláteis de enxofre no vinho. Através da via de redução de sulfato, o íon HS^- é formado, o que pode levar à formação de sulfeto de hidrogênio e de vários compostos de mercaptana (Swiegers & Pretorius, 2007). Outra estratégia utilizada foi a caracterização molecular destas leveduras, o que permitiu diferenciar

as linhagens isoladas nos vinhedos das linhagens comerciais utilizadas na produção de vinho (Fig. S1), esta diferenciação pode ser atribuída ao ambiente de isolamento (Guerra & Araújo, 2001). O gênero *Saccharomyces* pode ser encontrado em ambientes naturais e em fermentações industriais como híbridos inter-específicos entre *S.cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum* e *S. eubayanus* (Libkind *et al.*, 2011; Nguyen, Legras, Neuvéglise, & Gaillardin, 2011).

Das linhagens isoladas, observou-se que 06 CE, 11CE, 33CE não foram capazes de assimilar maltose como fonte de carbono, o que sugere um perfil bastante atípico para *S. cerevisiae* (Naumov *et al.*, 2000). Outra hipótese é que possam pertencer a outra espécie, mas tenham perdido a capacidade de assimilar maltose. De acordo com Bosch-Fusté *et al.*(2009). Isolados de vinhedos quando são esporulados e os seus descendentes testados para assimilação de açúcares como sacarose, maltose e galactose, aproximadamente 67% dos isolados segregados são incapazes de utilizar pelo menos um destes açúcares. Por outro lado, apresentaram um perfil típico para assimilação de fontes de nitrogênio. Nas condições de estresse testadas, em geral todas as linhagens apresentaram menos de 50% sobrevivência (Fig.2). *Saccharomyces cerevisiae* apresenta uma predisposição natural superior para tolerar etanol e dióxido de enxofre (SO₂), devido à adaptação e seleção natural, permitindo seu predomínio em muitos ambientes de fermentação (Blasco & Feijoo-Siota, 2009). Durante o processo de fermentação alcoólica, as linhagens do gênero *Saccharomyces* são expostas a severo estresse osmótico com altas concentrações de açúcar e baixa concentração de nitrogênio para o carbono.

Então, para superar estas limitações, as leveduras têm desenvolvido diversos mecanismos, tais como, permeases específicas para metabolizar de forma eficiente os poucos compostos de açúcares, estratégias de resistência de etanol e um complexo mecanismo de regulação para a utilização do nitrogênio (Jara *et al.*, 2014). Porém, ainda não está claro como estas linhagens adaptadas às condições de produção de vinhos, não utilizam a prolina, uma fonte de nitrogênio predominante neste meio, apesar de sofrer limitação de nitrogênio durante o processo de fermentação (Gutiérrez, Beltran, Warringer, & Guillamón, 2013). Como a levedura *S.*

Cerevisiae pode apresentar-se no modo vegetativo como haploide, diploide e em estados de ploidia superiores (Ezov *et al.*, 2006), presumivelmente reflete a natureza transitória da fase haploide em uma levedura no ambiente. As células assincrônicas geraram picos duplos de fluorescência com o segundo pico gerado atribuído a células sofrendo síntese de DNA, como observado em Haase & Reed (2014). É de conhecimento geral que *S. cerevisiae* historicamente apresenta-se como uma linhagem diploide (Fig. 3).

Os genes cuja expressão está associada à variabilidade fenotípica, como aqueles que codificam proteínas envolvidas na biossíntese e transporte de aminoácidos, assimilação de enxofre e nitrogênio, bem como a degradação da proteína são fortemente regulados sob estresse ambiental (Carreto *et al.*, 2011). Esta seletividade é realizada através da repressão catabólica de nitrogênio, um mecanismo regulador que inibe a expressão de genes necessária para a absorção e degradação de fontes pobres de nitrogênio (prolina e urea) quando são fornecidas em conjunto com uma boa fonte de nitrogênio, como glutamina e amônia (Jiménez-Martí & del Olmo, 2008).

Durante as fermentações em mosto sintético e mosto da uva, as linhagens foram desafiadas em um ambiente mais complexo. Permitindo a discriminação, através de análise multivariada com base no perfil de metabólitos secundários, destas linhagens em grupos com características fenotípicas semelhantes. Existe também uma forte influência da composição da uva sobre a formação de compostos de aroma ativo pela levedura do gênero *Saccharomyces*. Em muitos casos, o papel do metabolismo da levedura é a liberação de um composto aromático de uma molécula precursora não volátil (Jara *et al.*, 2014). O perfil genético do gênero *Saccharomyces* é relevante na formação de metabólitos que conferem aromas específicos para vinho. No entanto, vários outros fatores também afetam o espectro de compostos formados. Muitos dos metabólitos derivam de metabolismo de nitrogênio, de modo que a natureza e nível das fontes de nitrogênio presentes irão afetar o espectro de compostos produzidos (Bisson & Karpel, 2010).

Para seleção de linhagens do gênero *Saccharomyces*, as indústrias de biotecnologia buscam fenótipos em função de capacidade relativa de produzir ésteres, álcoois superiores e ácidos graxos voláteis. Em nosso estudo, tanto no meio sintético quanto no mosto da uva Vermentino, diferentes níveis de ácido butanoico, acetato de etila (frutado), hexanoato de etila (frutado, aniz) e β -pineno (pinus) foram encontrados, bem como outros compostos foram igualmente importantes como laurato de etila ($9,90 \text{ mg.L}^{-1}$), decanoato de etila ($4,08 \text{ mg.L}^{-1}$), α -pineno ($1,93 \text{ mg.L}^{-1}$), quando as linhagens foram inoculadas no mosto da uva Vermentino. Em termos gerais, de acordo com Cordente, Curtin, Varela, & Pretorius (2012), as linhagens podem ser categorizadas em uma dimensão como frutado, floral, neutra, rançoso, espirituoso, dependendo da sua capacidade relativa de produção dos compostos acima descritos. Outra dimensão descrita é tropical ou sulfurados de acordo com a produção de enxofre. Outro importante fator é a concentração da maioria dos ésteres formados durante a fermentação por *S. cerevisiae* em torno de valores de seu respectivo limiar, até mesmo as pequenas mudanças na concentração destes metabólitos secundários pode ter grandes efeitos sobre a qualidade sensorial de bebidas fermentadas (Saerens, Delvaux, Verstrepen, & Thevelein, 2010).

Ao contrário de difusão de acetato de etila, que é rápida e completa, a transferência de ésteres etila para o meio de fermentação é dependente da sua composição. Diminui drasticamente com o aumento do comprimento da cadeia, a partir de 100% para hexanoato de etila, 54-68% para octanoato de etila e 8-17% para decanoato de etila (Saerens *et al.*, 2008). Embora os álcoois superiores, individualmente, não contribuam para um aroma agradável, tem sido estabelecido que o limite para ser considerado positivo para o perfil de aromas é abaixo de 300 mg.L^{-1} . (Genisheva, Vilanova, Mussatto, Teixeira, & Oliveira, 2014). Portanto concentrações superiores podem ser prejudiciais para a qualidade sensorial do vinho.

5. Conclusões

Os resultados da pesquisa demonstraram a caracterização de linhagens do gênero *Saccharomyces* com base em testes tradicionais, quando desafiamos em

ambientes estressantes mudando as concentrações de glicose e sacarose, percebemos que algumas linhagens foram mais sensíveis com menos de 50% de sobrevivência. O nível de ploidia foi consistente com a linhagem diploide BY4743, com exceção dos isolados 01PP e 12M, mas os seus efeitos variaram de acordo com a linhagem utilizada para a fermentação no mosto sintético e mosto da uva Vermentino. Porém foi possível separar em grupos de acordo com o perfil de compostos voláteis, a influência do mosto de Vermentino era mais evidente nas linhagens, naturalmente um meio mais complexo. Portanto, permitiu descrevê-las com as dimensões frutadas (acetato de etila), florais (laurato de etila) ou rançosas (ácido butanóico) de acordo com os descritores dos compostos majoritários. Além disso, foi possível identificar diferenças marcantes entre as linhagens do gênero *Saccharomyces* com respeito aos compostos de aroma voláteis.

Referências

Albertin, W., Marullo, P., Aigle, M., Dillmann, C., de Vienne, D., Bely, M., & Sicard, D. (2011). Population size drives industrial *Saccharomyces cerevisiae* alcoholic fermentation and is under genetic control. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2772–84. doi:10.1128/AEM.02547-10

Arroyo-López, F., Pérez-Través, L., Querol, A., & Barrio, E. (2011). Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a wine model system mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, (March), 423–435. doi:10.1002/yea.1848

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–59. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025

Barbosa, C., Lage, P., Vilela, A., Mendes-Faia, A., & Mendes-Ferreira, A. (2014). Phenotypic and metabolic traits of commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *AMB Express*, 4, 39. doi:10.1186/s13568-014-0039-6

Bisson, L. F., & Karpel, J. E. (2010). Genetics of yeast impacting wine quality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 139–62. doi:10.1146/annurev.food.080708.100734

Borneman, A. R., Desany, B. A., Riches, D., Affourtit, J. P., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., Chambers, P. J. (2011). Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 7(2), e1001287. doi:10.1371/journal.pgen.1001287

BOSCH-FUSTÉ, J.; SARTINI, E.; FLORES-RUBIO, C.; *et al.* (2009). Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, “cavas.” *Food Chemistry*, 114(3), 782–790.

Buzzini, P., Gasparetti, C., Turchetti, B., Cramarossa, M. R., Vaughan-Martini, A., Martini, A., Forti, L. (2005). Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. *Archives of Microbiology*, 184(3), 187–193.

Caliari, V., Burin, V. M., Rosier, J. P., & Bordignon L., M. T. (2014). Aromatic profile of Brazilian sparkling wines produced with classical and innovative grape varieties. *Food Research International*, 62, 965–973. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.013

Carreto, L., Eiriz, M. F., Domingues, I., Schuller, D., Moura, G. R., & Santos, M. A. S. (2011). Expression variability of co-regulated genes differentiates *Saccharomyces cerevisiae* strains. *BMC Genomics*, 12(1), 201. doi:10.1186/1471-2164-12-201

Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10(2), 123–33. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x

Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 601–18. doi:10.1007/s00253-012-4370-z

Ezov, T. K., Boger-Nadjar, E., Frenkel, Z., Katsperovski, I., Kemeny, S., Nevo, E., Kashi, Y. (2006). Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from “Evolution Canyon”: microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status. *Genetics*, 174(3), 1455–68. doi:10.1534/genetics.106.062745

Genisheva, Z., Vilanova, M., Mussatto, S. I., Teixeira, J. A., & Oliveira, J. M. (2014). Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – Effect of biocatalyst storage and SO₂ concentration on wine characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1114–1122. doi:10.1016/j.lwt.2014.06.046

Gerstein, A. C., Chun, H. J. E., Grant, A., & Otto, S. P. (2006). Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 2(9), e145. doi:10.1371/journal.pgen.0020145

Gougeon, R. D., Lucio, M., Frommberger, M., Peyron, D., Chassagne, D., Alexandre, H., Schmitt-Kopplin, P. (2009). The chemodiversity of wines can reveal a metabo-geography expression of cooperage oak wood. *PNAS*, 106(23), 9174–9. doi:10.1073/pnas.0901100106

Guerra, J. B., Araújo, R. A., Pataro, C., Franco, G. R., Moreira, E. S., Mendonça-Hagler, L. C., & Rosa, C. A. (2001). Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*, 33(2), 106–11.

Guijo, S., Mauricio, J., Salmon, J., & Ortega, J. (1997). Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation

and “Flor” film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast*, 117, 101–117. doi/10.1002/(SICI)1097-0061(199702)

Guimarães, T. M., Moriel, D. G., Machado, I. P., Picheth, C. M. T. F., & Bonfim, T. M. B. (2006). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42. 119-126.

Gutiérrez, A., Beltran, G., Warringer, J., & Guillamón, J. M. (2013). Genetic basis of variations in nitrogen source utilization in four wine commercial yeast strains. *PloS One*, 8(6), e67166. doi:10.1371/journal.pone.0067166

Haase, S. B., & Reed, S. I. (2014). Improved Flow Cytometric Analysis of the Budding Yeast Cell Cycle. *Cell Cycle*, 1(2), 117–121. doi:10.4161/cc.1.2.114

Halbfeld, C., Ebert, B. E., & Blank, L. M. (2014). Multi-capillary column-ion mobility spectrometry of volatile metabolites emitted by *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolites*, 4(3), 751-74. doi:10.3390/metabo4030751

Hope, E. A., & Dunham, M. J. (2014). Ploidy-Regulated Variation in Biofilm-Related Phenotypes in Natural Isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3* (Bethesda, Md.), 1–48. doi:10.1534/g3.114.013250

Hyma, K. E., Saerens, S. M., Verstrepen, K. J., & Fay, J. C. (2011). Divergence in wine characteristics produced by wild and domesticated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 11, 540–551. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00746.x

Jara, M., Cubillos, F. A., García, V., Salinas, F., Aguilera, O., Liti, G., & Martínez, C. (2014). Mapping genetic variants underlying differences in the central nitrogen metabolism in fermenter yeasts. *PloS One*, 9(1), e86533. doi:10.1371/journal.pone.0086533

Jiménez-Martí, E., & del Olmo, M. L. (2008). Addition of ammonia or amino acids to a nitrogen-depleted medium affects gene expression patterns in yeast cells during alcoholic fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8(2), 245–56. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00325.x

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011) *The Yeasts, a taxonomic Study*, 5th edn., Amsterdam: Elsevier.

Libkind, D., Todd, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., & Johnston, M. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS*, 108(35), 14539-14544. doi:10.1073/pnas.1105430108

Maio, S. Di, Polizzotto, G., & Gangi, E. Di. (2012). Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of South-Eastern Sicily (Italy): preservation and economic potential. *PloS One*, 7(2), e30428. doi:10.1371/journal.pone.0030428

Nguyen, H.V., Legras, J. L., Neuvéglise, C., & Gaillardin, C. (2011). Deciphering the hybridisation history leading to the Lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380. *PloS One*, 6(10), e25821. doi:10.1371/journal.pone.0025821

Ono, B., Ishii, N., Fujino, S., & Aoyama, I. (1991). Role of Hydrosulfide Ions (HS⁻) in Methylmercury Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, (11), 3183–3186.

Ramírez-Castrillón, M., Mendes, S. D. C., Inostroza-Ponta, M., & Valente, P. (2014). (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts? *PloS One*, 9(8), e105870. doi:10.1371/journal.pone.0105870

Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces*

cerevisiae. *Microbial Biotechnology*, 3(2), 165–77. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00106.x

Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454–61. doi:10.1128/AEM.01616-07

Saerens, S. M. G., Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Voet, A. R. D., Van Dijck, P., Delvaux, F. R., & Thevelein, J. M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(7), 4446–56. doi:10.1074/jbc.M512028200

Tao, Y., & Zhang, L. (2010). Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China). *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1550–1556. doi:10.1016/j.lwt.2010.06.003

Urit, T., Löser, C., Wunderlich, M., & Bley, T. (2011). Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus* on whey: studies of the ester stripping. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(5), 547–59. doi:10.1007/s00449-010-0504-9

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5228–5237. doi:10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003

Vilanova, M., Campo, E., Escudero, A., Graña, M., Masa, A., & Cacho, J. (2012). Volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* red cultivars from north west Spain: correlation between sensory and instrumental analysis. *Analytica Chimica Acta*, 720, 104–111. doi:10.1016/j.aca.2012.01.026

Agradecimentos

Os autores agradecem aos proprietários vinhedos/cantina por nos permitir recolher as amostras e apoio financeiro foi fornecido pela Epagri e Embrapa.

Figuras e Tabelas

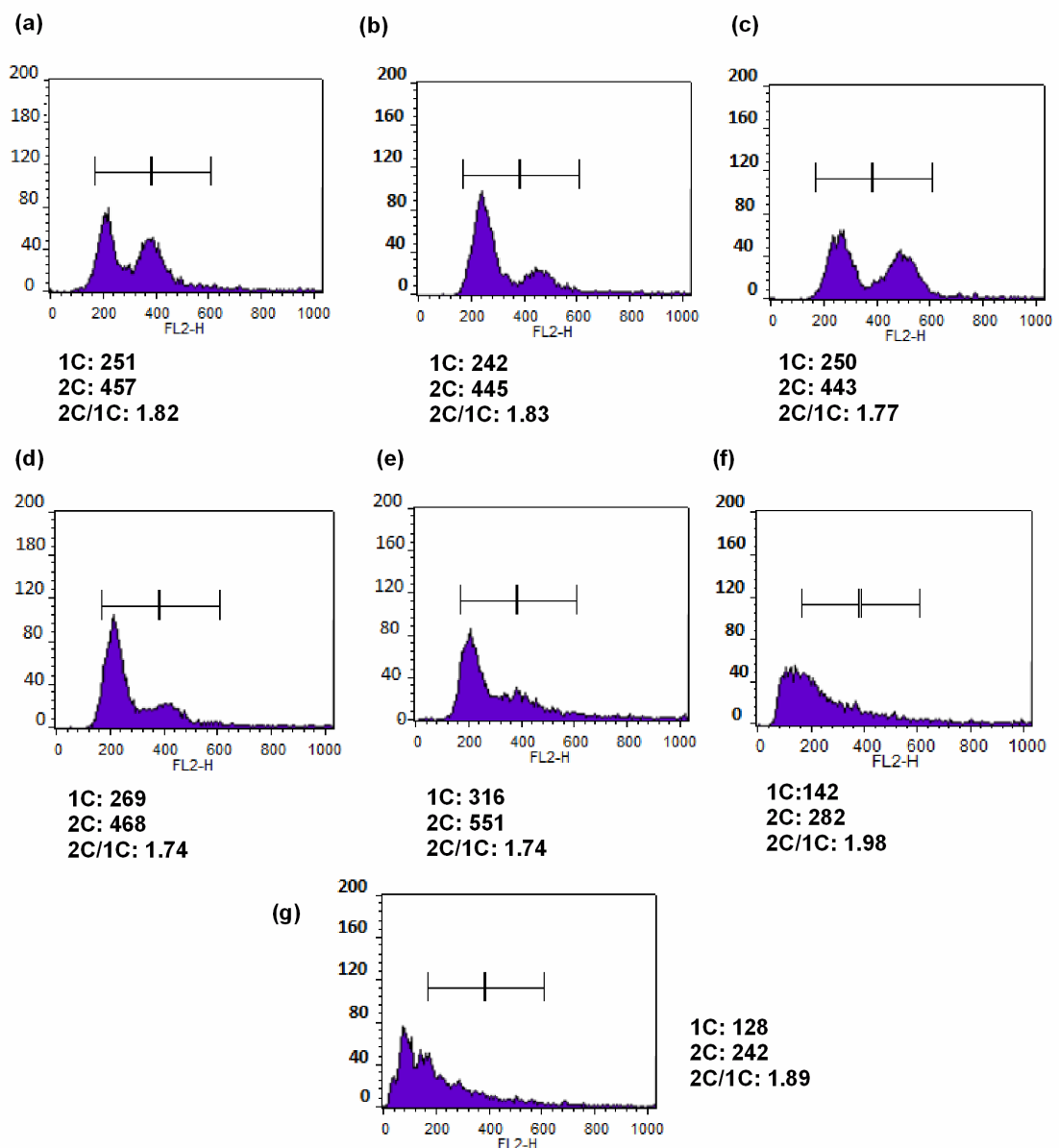


Figura 1. Análise de citometria de fluxo por fluorescência. Histogramas foram analisados usando CellQuest software (Becton Dickson). Na parte superior da

coluna, da esquerda para direita (a) Linhagem BY4743; (b) Linhagem 11CE; (c) Linhagem 13PP; (d) Linhagem 33CE; (e) Linhagem 41PP; (f) Linhagem 01PP; e (g) Linhagem 12M. Barras indicam a mediana usada para determinação do coeficiente de Variação. Os CVs foram determinados na metade da altura do pico 1C.

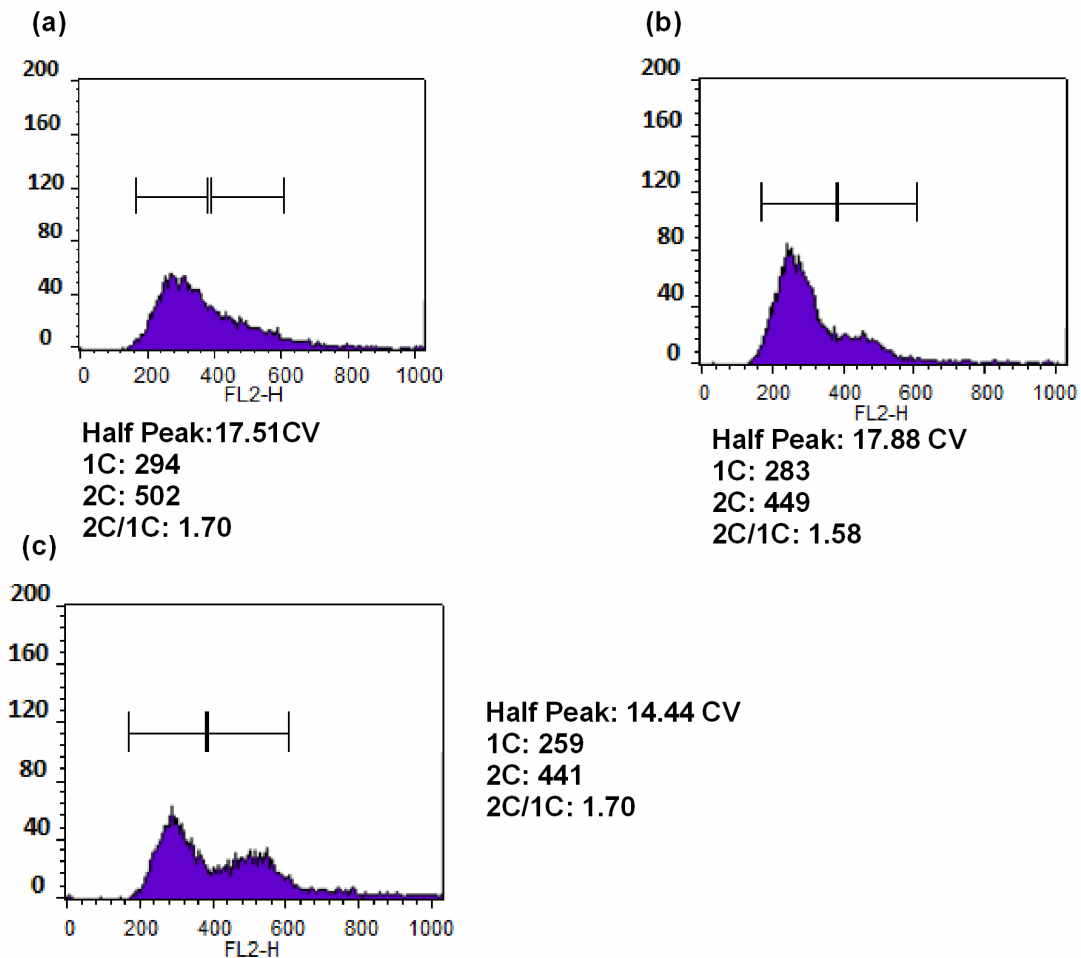


Figura 2. Análise de citometria de fluxo por fluorescência. Histogramas foram analisados usando CellQuest software (Becton Dickson). Na parte superior da coluna, da esquerda para direita (a) Linhagem controle diploide BY4743; (b) Linhagem SC 2028; (c) Linhagem SC 2033; (d) Linhagem SC 2048. Barras indicam a mediana usada para determinação do coeficiente de Variação. Os CVs foram determinados na metade da altura do pico 1C.

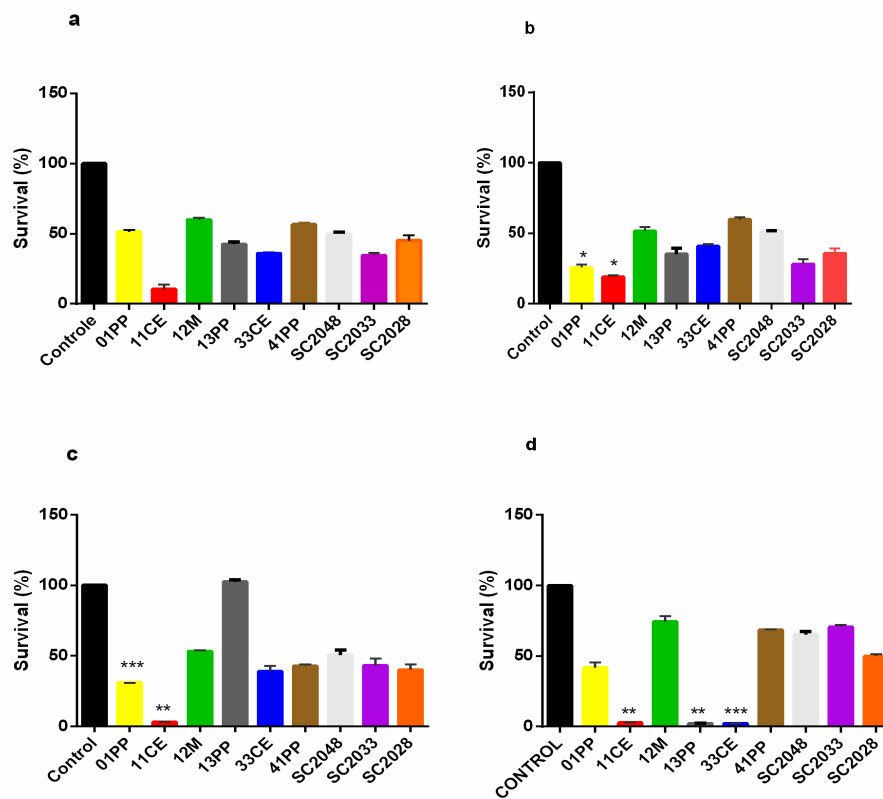


Figura 3. Efeito das linhagens desafiadas com as seguintes condições de estresse. (a) teste de estresse de etanol (EtOH); (b) teste de estresse osmótico com glicose (YPG 200 g / L) e etanol; (c) teste de estresse sacarose (YPS 200 g / L); (d) teste de estresse osmótico com sacarose e etanol (YPS 200 g / L).

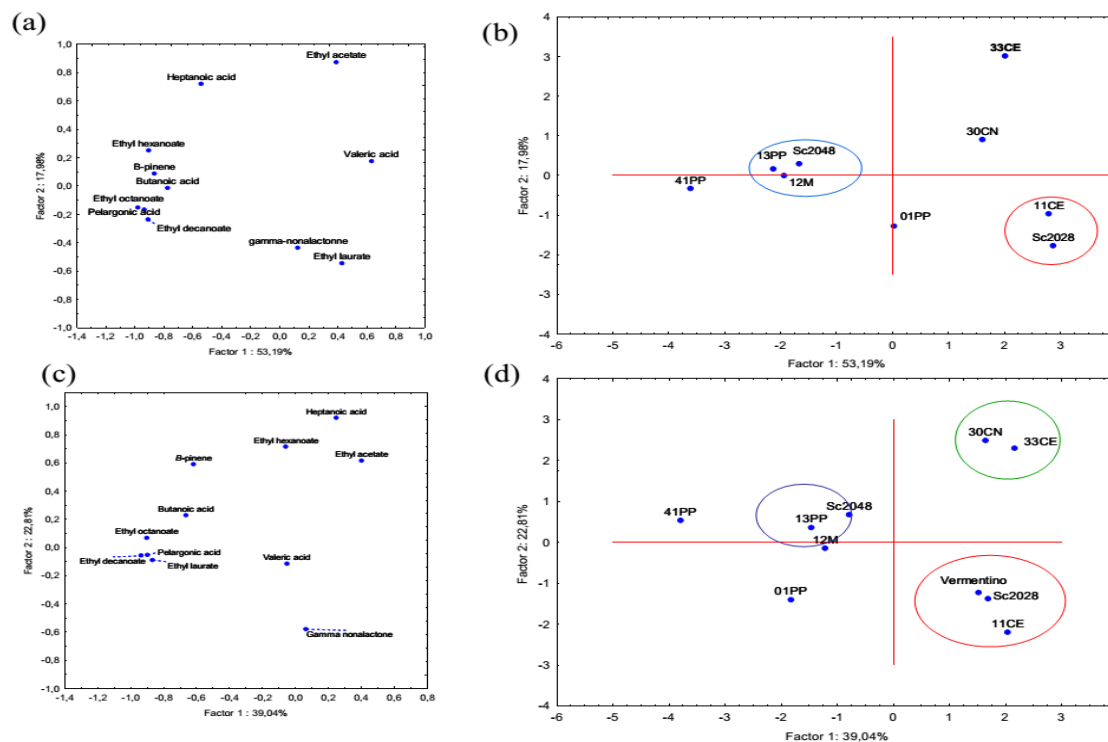


Figura 4. Perfil de aromas das linhagens do gênero *Saccharomyces*. PC1 versus PC2 dispersão das principais fontes de variabilidade entre as linhagens: (a) relação entre a formação dos compostos voláteis e o mosto sintético; (b) entre as linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto sintético; (c) a relação entre a formação dos compostos voláteis e mosto do vermentino. (d) entre as linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto Vermentino.

Tabela 1. Respostas fisiológicas e bioquímicas das linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas de vinhedos.

LINHAGENS													
Respostas dos testes													
FONTE DE CARBONO	01PP	11CE	12M	13PP	33CE	41PP	26PP	280AD	06CE	SC2048	SB ^a	SCR ^b	SC ^c
D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	v
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Celobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	t+	-	-	-	v	-	-
Maltose	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v
α,α Trealose	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+/s	-	+
Citrata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido solúvel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fonte de carbono assimilada (+); Fonte de carbono não assimilada (-); não testada (nt); variável (v); tardia (t) e resposta fraca (w). (a) *S. bayanus*; (b) *S. cariocanus* e (c) *S. cerevisiae* descritas em Kurtman, *et al.*, (2011).

Tabela 1 continuação.

FONTE DE NITROGÊNIO	01PP	11CE	12M	13PP	33CE	41PP	26PP	28AD	06CE	SC2048	SB ^A	SCR ^B	SC ^C
L-lisina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OUTROS TESTES	01PP	11CE	12M	13PP	33CE	41PP	26PP	28AD	06CE	SC2048	SB ^a	SCR ^b	SC ^c
Hidrólise de Ureia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produção de sulfeto de hidrogênio	-	-	-	-	+W	-	+	+	+	-	nt	nt	nt
DDB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nt
Crescimento a 37°C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	v

Fonte de carbono asssimilada (+); Fonte de carbono não asssimilada (-); não testada (nt); variável (v); tardia (t) e resposta fraca (w); (a) *S. bayanus*; (b) *S. cariocanus* e (c) *S. cerevisiae* descritas em Kurtman, *et al.*, (2011).

Tabela 2. Perfil fermentativo das linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas de vinhedos.

Linhagens															
<i>Resultados da Capacidade Fermentativa</i>															
Fontes de Carbono	01PP	11CE	12M	13PP	33CE	41PP	26PP	28AD	06CE	SC2048	SC2033	SC2028	SB ^a	SCR ^b	SC ^c
D-Glicose	+ g	+ g	+g	+ g	+g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+g	+g	+g
D-Galactose	+ g	+ g	+ g	+ g	-	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	-	v	+g	v
D-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+g	+g	+g
D-Manitol	+ g	-	+ g	+g	-	-	+ g	+g	-	+ g	-	-	nt	nt	nt
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nt	-	-
Maltose	+ g	-	+ g	+g	-	+ g	+g	+ g	-	+ g	+ g	+g	+g	-	+g
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutose	+ g	+ g	+ g	+ g	-	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	+ g	nt	nt	nt

Fonte de carbono fermentada (G); não testada (nt); (a) *S. bayanus*; (b) *S. cariocanus*; (c) *S. cerevisiae* descritas em Kurtman, *et al.*, (2011).

Tabela 3. Composição de compostos voláteis das linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto sintético.

	01PP	11 CE	12M	13PP	33CE	41PP	Sc2028	Limiar de Odor	Odor Característico
Alcoois (ppm)									
n-Butanol	-	-	-	-	-	-	-	0,15 ^[a]	Medicinal, etanol
3-metil-1-butanol	-	-	-	-	-	-	-	0,30 ^[b]	Fermentado, malte
<i>Todos</i>	-	-	-	-	-	-	-		
Ácidos (ppm)									
Ácido butanoico	4,94	0,41	14,1	34,04	1,03	18,01	0,81	0,17 ^[b]	Suor
Ácido valérico	1,88	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	-	Desagradável
Ácido heptanoico	0,17	<0,063	3,62	7,16	7,10	4,47	<0,063	0,3	Gorduroso
Ácido pelargonico	0,86	<0,031	0,98	0,91	<0,031	0,71	<0,031	-	Verde, noz tostada
Ácido cáprico	2,69	<0,032	3,39	0,55	<0,032	4,31	<0,032	15,0	Gordura, desagradável
Ácido n-undecanoico	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	-	
Ácido 11-undecanoico	0,05	-	<0,031	-	<0,031	<0,031	-	-	
Ácido caproico	-	4,41	-	<0,031	<0,031	-	<0,031	3,0	Queijo, rancidez.
Ácido propanoico	-	-	-	-	-	<0,032	-	8,1	Pungente
<i>Todos</i>	10,55	4,82	22,09	42,66	8,13	27,50	0,81		
Esteres (ppb)									
Butanoato de etila	-	-	-	-	-	<0,032	-	0,13 ^[b]	Frutado, morango.
Hexanoato de etila	6,06	1,90	0,02	6,94	4,18	4,06	<0,031	14 ^[a]	Anis, frutado, alcaçus
Acetato de etila	2,48	1,88	2,31	2,12	100,3	2,90	1,70	2 ^[b]	Frutado, ester
Heptanoato de etila	-	-	-	-	-	-	<0,031	2 ^[b]	Frutado, damasco
Octanoato de etila	1,43	-	1,34	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	8-12 ^[b]	Frutado
Decanoato de etila	1,51	<0,032	1,50	1,59	<0,032	<0,032	<0,032	8-12 ^[b]	Uva
Pentanoato de etila	-	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	-	-	Frutado, maçã
Nonanoato de etila	-	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	-	2,44	-	
Laurato de etila	9,90	<0,52	<0,52	9,92	<0,52	<0,52	<0,52	1,5 ^[c]	Doce, floral, creme
Undecanoate de etila	-	<0,031	-	<0,031	<0,031	<0,031	-	-	
<i>Todos</i>	21,38	3,78	5,17	7,47	104,48	6,96	4,14		

Letras correspondem às referências para limiar de odor (a) Caliari, Burin, Rosier, & Bordignon Luiz, 2014; (b) Maio, Polizzotto, & Gangi, 2012; (c) Tao & Zhang, 2010, (<): não quantificado (identificado, porém está abaixo do limite de quantificação do método).

Tabela 3 continuação.

Terpenos and lactona (ppm)									
α -pineno	-	-	-	-	0,51	-	-	0,062	Pinus, resina
β -pineno	0,48	-	0,53	0,43	0,40	0,53	0,34	0,082	Pinus, resina, terebentina
γ -nonalactona	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	0,03	Coco. Doce
<i>Todos</i>	<i>0,48</i>	<i>-</i>	<i>0,53</i>	<i>0,43</i>	<i>0,91</i>	<i>0,53</i>	<i>0,34</i>		

Letras correspondem às referências para limiar de odor (a) Caliari, Burin, Rosier, & Bordignon Luiz, 2014; (b) Maio, Polizzotto, & Gangi, 2012; (c) Tao & Zhang, 2010, (<): não quantificado (identificado, porém está abaixo do limite de quantificação do método).

Tabela 4. Composição de compostos voláteis das linhagens do gênero *Saccharomyces* no mosto Vermentino.

	01PP	11 CE	12M	13PP	33CE	41PP	Sc2028	Limiar de Odor	Odor característico
Alcools (ppm)									
n-Butanol	-	-	-	4,41	-	-	-	0,15 ^[a]	Medicinal, etanol
3-metil-1-butanol	0,66	0,77	0,94	0,84	0,80	1,01	0,80	0,30 ^[b]	Fermentado, malte
<i>Todos</i>	-	-	-	5,25	-	-	-		
Ácidos (ppm)									
Ácido butanoico	3,62	0,15	0,84	29,7	2,20	35,60	41,12	0,17 ^[b]	Suor, queijo
Ácido valérico	2,14	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	-	Desagradável
Ácido heptanoico	<0,063	<0,063	<0,063	1,42	3,89	1,32	1,07	0,3	Gordura.
Ácido pelargônico	0,86	<0,031	0,98	0,91	<0,031	0,71	0,16	-	Verde, noz tostada
Ácido cáprico	<0,032	<0,032	3,48	2,42	<0,032	-	1,64	15,0	Gordura, desagradável
Ácido n-undecanoico	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	<0,036	-	
Ácido 11-undecanoico	0,93	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	<0,031	-	-	
Ácido caproico	-	<0,031	-	<0,031	<0,031	-	-	3,0	Queijo, rancidez, gordura
Ácido propanoico	-	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	-	-	8,1	Pungente
<i>Todos</i>	7,55	0,15	5,30	34,45	6,09	37,63	43,99		
Esters (ppb)									
Butanoato de etila	<0,032	-	<0,032	<0,032	<0,032	-	-	0,13 ^[a]	Frutado, morango
Hexanoato de etila	0,73	0,002	4,18	2,81	2,06	0,26	3,77	14,0 ^[a]	Anis, frutado, alcaçus
Acetato de etila	3,18	1,67	1,67	3,70	210,4	5,58	4,05	2,0 ^[b]	Frutado
Heptanoato de etila	-	-	-	-	-	-	-	2,0 ^[b]	Frutado, damasco
Octanoato de etila	0,78	<0,031	<0,031	0,68	<0,031	<0,031	<0,031	8-12 ^[b]	Frutado, gorduroso
Decanoato de etila	4,08	<0,032	0,59	0,28	<0,032	<0,032	0,49	8-12 ^[b]	Uva
Pentanoato de etila	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	<0,076	-	Frutado, maçã
Nonanoato de etila	-	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	-	-	
Laurato de etila	8,56	<0,52	<0,52	<0,52	<0,52	<0,52	<0,52	1,5 ^[c]	Doce, floral, creme
Undecanoate de etila	<0,031	<0,031	<0,031	-	<0,031	-	-		
<i>Todos</i>	17,33	1,67	6,44	7,47	212,46	8,31			

Letras correspondem às referências para limiar de odor (a) Caliari, Burin, Rosier, & Bordignon Luiz, 2014; (b) Maio, Polizzotto, & Gangi, 2012; (c) Tao & Zhang, 2010, (<): não quantificado (identificado, porém está abaixo do limite de quantificação do método).

Tabela 4. Continuação.

Terpenes and lactone (ppm)									
α -pineno	-	-	-	-	1,93	-	-	0,062	Pinus, resina
β -pineno	0,43	-	0,58	-	0,50	0,65	0,48	0,082	Pinus, resina, terebentina
γ -nonalactone	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	<0,032	0,03	Coco, doce
<i>Todos</i>	<i>0,43</i>	<i>-</i>	<i>0,58</i>	<i>-</i>	<i>2,43</i>	<i>0,65</i>	<i>0,48</i>		

Letras correspondem às referências para limiar de odor (a) Caliari, Burin, Rosier, & Bordignon Luiz, 2014; (b) Maio, Polizzotto, & Gangi, 2012; (c) Tao & Zhang, 2010, (<): não quantificado (identificado, porém está abaixo do limite de quantificação do método).

Material Suplementar

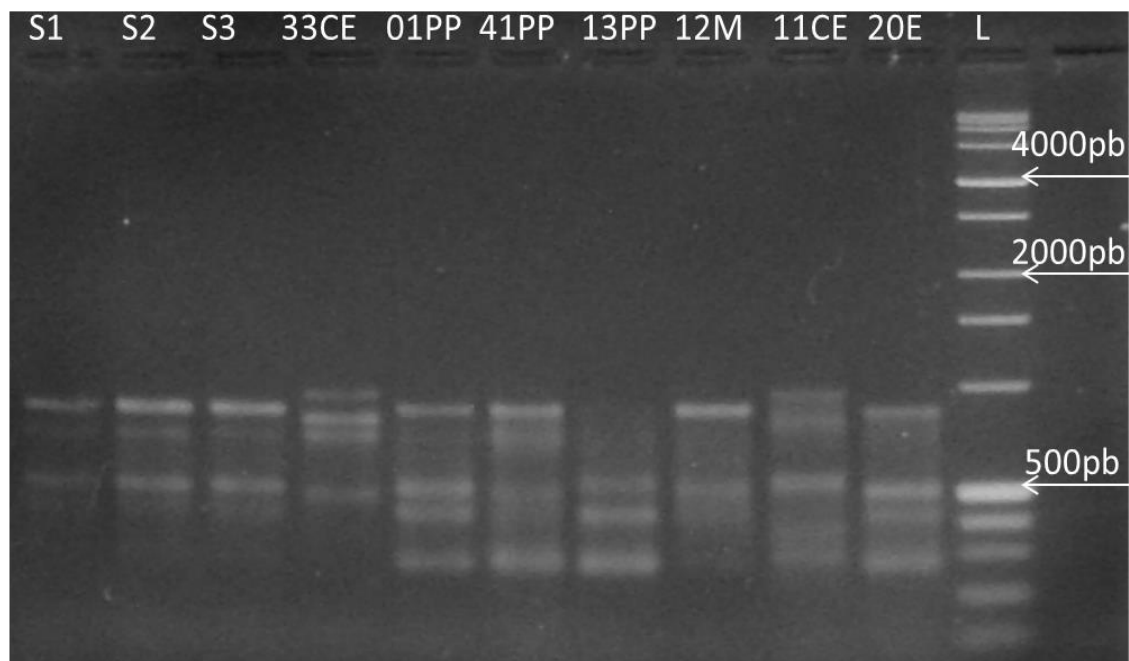


Figura S1. Diferenciação de linhagens do gênero *Saccharomyces* com o *primer* E11. Linhas 1 a 3, *Saccharomyces cerevisiae* 2028, 2033, 2048; Linhas 4 a 8 Linhagens isoladas de vinhedos, Linha 9, *S. cerevisiae* 20E (isolado de amostra de vinho), Linha 10, Marcador molecular 1kb plus, Affimetrix

Discussão Geral

O recente aumento do número de estudos ecológicos de leveduras associadas a vinhedos vem contribuindo para um conjunto significativo de novos conhecimentos a respeito do microbioma de vinhedos. Por outro lado, foi observado um desenvolvimento significativo em outras áreas de ecologia de leveduras, como os relacionados com as plantas, insetos, solo ou habitats extremos (LIBKIND *et al.*, 2009; BARATA *et al.*, 2012). Estes estudos da biodiversidade (riqueza de espécies e a equitabilidade) são importantes para a macro e microecologia pela sua potencial relação com o funcionamento do ecossistema (SAIKALY *et al.*, 2005). Devido ao fato da biodiversidade microbiana diferir em grande parte dos habitats, nenhuma comparação significativa de avaliações da biodiversidade pode ser realizada sem a compreensão da diversidade alfa em um substrato (YURKOV *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, os métodos moleculares foram incluídos como parte de uma identificação rápida e confiável em leveduras, permitindo, assim, a investigação de um grande número de espécies em um período muito mais curto. Todo método tem suas próprias vantagens e desvantagens em relação ao objetivo do trabalho, custo, instalações disponíveis e velocidade e confiabilidade do resultado (MUIR *et al.*, 2011). Os métodos fundamentados em ferramentas moleculares à base de PCR e relacionados a sequenciamento de DNA são os mais comuns devido a sua confiabilidade, e são aplicados com sucesso para diferenciação de espécies, bem como para identificação de leveduras.

O método MSP-PCR *fingerprinting* com o *primer* (GTG)₅ foi o selecionado para monitoramento de cada espécie ou população no presente trabalho. Este método permite a análise de um grande número de isolados, sendo uma ferramenta para discriminação de diferentes espécies e agrupamentos de isolados pertencentes à mesma espécie, sem necessidade de informação genômica prévia. As leveduras isoladas de ambientes diversos (vinhos envasados e vinhedos) foram usadas para responder às seguintes questões básicas, que não foram consideradas anteriormente: (1) A procedência das leveduras isoladas tem um efeito sobre os resultados do método (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*? (2) Qual é a diversidade e

riqueza esperada em três vinhedos estudados em Santa Catarina? (3) Qual é o impacto e potencial biotecnológico das linhagens autóctones isoladas de vinhedos?

Para o conjunto de dados estudados, a procedência das amostras, sejam de um substrato com baixa diversidade (vinhos envasados) ou alta diversidade (vinhedos), parece não influenciar na qualidade dos resultados (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*, obtendo-se semelhante índice Kappa, sensibilidade e especificidade para os dois tipos de substratos. Inúmeros fatores foram considerados por MATSHEKA *et al.*, (2006) para fraca reprodutibilidade, como pureza do DNA, inconsistência dos reagentes usados e termocicladores na reação de (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*, bem como as condições de eletroforese para migração do gel que interferem na técnica. Não existe consenso nos parâmetros acima descritos, contribuindo para fraca reprodutibilidade da técnica e comprometendo qualquer comparação entre os resultados.

Para os dois tipos de substratos analisados (vinhos envasados e vinhedos), espécies não relacionadas foram agrupadas no mesmo grupo pela técnica de (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting*. Além disso, linhagens *P. membranifaciens* tiveram o mesmo padrão de bandas, no entanto diferiram na intensidade da fluorescência da banda. Portanto, a variável intensidade da banda não foi usada para formar agrupamentos dos isolados em nosso estudo. Os resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do domínio LSU do gene rRNA foram usados para avaliar o impacto das espécies de leveduras na diversidade e riqueza dos vinhedos.

Um total de 106 linhagens isoladas correspondendo a 22 espécies de leveduras foram isolados nos três vinhedos de leveduras. Foram isoladas apenas do vinhedo mais antigo (Pinheiro Preto) as seguintes espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Trichomonascus ciferrii* e *Candida allociferrii*, enquanto *Saccharomyces* ssp., *Pichia manshurica*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia membranifaciens*, *Zygosaccharomyces bailii* e *Pichia* sp. foram detectadas apenas no vinhedo na Serra do Marari. Outras três espécies (*Candida zemplinina*, *Candida intermedia* e *Zygoascus meyeriae*) foram isoladas apenas do vinhedo em Campos Novos.

Notavelmente, espécies de *Saccharomyces* só foram obtidas nas áreas amostradas na Serra do Marari e Pinheiro Preto, e as leveduras isoladas da Serra do Marari foram identificadas como *Saccharomyces* spp. por apresentarem características fenotípicas atípicas para a espécie *S. cerevisiae*.

As espécies encontradas nestes locais já foram anteriormente observadas nos estudos de ZOTT *et al.* (2010); CORDERO-BUESO *et al.* (2011). Os vinhedos localizados na Serra do Marari e Campos Novos têm uma comunidade diversa e alta riqueza de espécies, o que é evidenciado pelos índices de riqueza e diversidade obtidos. A comparação em termos de diversidade taxonômica usando o índice de Simpson recíproco mostrou uma diferença significativa entre os vinhedos de Pinheiro Preto, Serra do Marari e Campos Novos. Além disso, o número de espécies mais comuns foi maior na Serra do Marari do que em Campos Novos. Na análise de diversidade funcional, os vinhedos diferem entre si.

Os estudos realizados por PINTO *et al.* (2014) mostraram a alta biodiversidade, o balanço entre os diferentes microrganismos e a dinâmica da maturação da videira, porém ainda há uma imensa lacuna no conhecimento da diversidade funcional e significado da interação microbiana dos vinhedos. De fato, a coexistência de diferentes populações microbianas gera competição por nutrientes, as diferentes interações são estabelecidas e compostos enzimáticos são produzidos. Com efeito, este último pode ter um efeito tóxico como produção de álcool, produção de sulfeto de hidrogênio e secretoras de toxinas *killer* sobre as outras espécies, portanto possuem propriedades antifúngicas (FLEET, 2003).

Saccharomyces cerevisiae foi isolada a partir da cantina (equipamentos e efluentes) e parreiral (solo, folhas e bagos de uva) no vinhedo de Pinheiro Preto. Dos três vinhedos, Pinheiro Preto é o mais antigo (cerca de 80 anos de idade) e a presença disseminada de *S. cerevisiae* é consistente com uma possível propagação da levedura a partir da vinícola. Esta espécie é relatada como rara na natureza (VALERO *et al.*, 2007; CLAVIJO *et al.*, 2010).

Por fim, as linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas foram testadas em relação a características fenotípicas e genotípicas. Através da determinação da tolerância a condições de estresse testadas, todas as linhagens apresentaram menos de 50% de sobrevivência, com exceção da linhagem 13PP. Foi observado que os isolados 06CE, 11CE e 33CE não foram capazes de assimilar maltose como fonte de carbono, o que sugere que estas linhagens podem ser clones, uma vez que têm a mesma procedência. Outra hipótese é que possam pertencer a outra espécie, mas tenham perdido a capacidade de assimilar maltose. Através da análise fenotípica (assimilação e fermentação de fontes de carbono), sugere-se que os isolados 06CE, 11CE e 33CE pertençam à espécie *S. cariocanus*. Quando isolados de vinhedos são esporulados e os seus descendentes testados para assimilação de açúcares como sacarose, maltose e galactose, aproximadamente 67% dos isolados segregados são incapazes de utilizar pelo menos um destes açúcares (BOSCH-FUSTÉ *et al.*, 2009).

Através da análise de ploidia, a maioria das células gerou picos duplos de fluorescência, com o segundo pico gerado correspondendo à síntese de DNA, consistentes com a linhagem diplóide BY4743. As células da linhagem 01PP e 12M geraram um único pico com a metade da fluorescência da linhagem diplóide (BY4743), sendo que a suspensão de células utilizada no experimento continha células em divisão, o que pode indicar problemas na obtenção de células em fase G1 do ciclo celular. A seleção de leveduras para uso em vinificação para algumas características, como produção de etanol e tolerância ao etanol, resistência ao dióxido de enxofre, fermentação rápida e eficiente do mosto, têm favorecido genótipos deficientes para reprodução sexual (aneuplóide, homotálico, apomítico), onde mutações recessivas são eliminadas do genótipo como um resultado da constituição cromossômica (poliploidia e/ou aneuploidia) (GUIJO *et al.*, 1997).

Para seleção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação, são avaliados fenótipos em função da capacidade relativa de produzir ésteres, álcoois superiores e ácidos graxos voláteis. A linhagem de levedura causa um grande impacto na composição de éster em vinhos (GAMMACURTA & REVEL, 2014). Variáveis importantes foram observadas para diferenciação das linhagens do

genero *Saccharomyces* nos dois tipos de mosto, com diferentes níveis de ácido butanóico, acetato de etila (frutado, solvente), hexanoato de etila (frutado) e α -pineno.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram as seguintes conclusões:

- O método de (GTG)₅ MSP-PCR *fingerprinting* não foi adequado para o agrupamento prévio dos isolados obtidos, tendo sido necessária a identificação por sequenciamento de todas as linhagens.
- Um total de 106 linhagens foram isolados de vinhedos em Santa Catarina, correspondendo a 22 espécies de leveduras. Foram avaliadas informações adicionais sobre a diversidade taxonômica e funcional das espécies encontradas;
- Por meio da análise fenotípica (assimilação e fermentação de fontes de carbono), sugere-se que os isolados 06CE, 11 CE e 33CE sejam de *Saccharomyces cariocanus*.
- Foram obtidos 4 perfis genotípicos diferentes com o *primer* E11 entre as 9 linhagens do gênero *Saccharomyces* analisadas, o que permite constatar a baixa variabilidade genética. Isso é reforçado pela existência de linhagens de *Saccharomyces* consistentes com uma possível dispersão da vinícola para o vinhedo.
- Foi possível separar as linhagens em grupos de acordo com o perfil de compostos voláteis produzidos, sendo a influência do mosto da uva Vermentino mais evidente por ser naturalmente um meio complexo.
- Foi possível constatar a sensibilidade das linhagens de *Saccharomyces* em relação ao estresse osmótico, não estando relacionada com o conteúdo de DNA, consistente com a linhagem diploide BY4743.

PERSPECTIVAS

A informação obtida neste estudo da diversidade de leveduras associadas irá servir para implementar estudos futuros focados na melhoria da produção de vinhos locais.

- Neste contexto, estudar a comunidade de leveduras em outras regiões de vinhedos aprofundando o conhecimento de diversidade funcional para entender melhor as relações das comunidades de leveduras e as práticas agrícolas intensivas.

- Avaliar as linhagens em diferentes condições de estresse oxidativo crescidas na presença de agentes antifúngicos aplicados a campo, diferentes concentrações de etanol em períodos variando de 24 a 48 horas. Esses experimentos poderão esclarecer a resposta ao estresse oxidativo neste ambiente.

- Avaliar o potencial enológico e realizar ensaios de produção de ester e enzimas em linhagens do gênero *Saccharomyces* isoladas neste estudo.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. A.; ARAUJO, R. Highlights on molecular identification of closely related species. Infection, genetics and evolution: **Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 13, p. 67–75, 2013.

BALEIRAS-COUTO, M. M.; EIJSMA, B.; HOFSTRA, H.; IN'T VELD, J. H.; VOSSSEN, J. M. VAN DER. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 41–6, 1996.

BARATA, A; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 243–59, 2012.

BARROS LOPES, M. DE; RAINIERI, S.; HENSCHKE, P. A; LANGRIDGE, P. AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49 Pt 2, p. 915–24, 1999.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.; BARRIO, E.; *et al.* Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 2, p. 89–96, 2011.

BISSON, L. F. Geographic Origin and Diversity of Wine Strains of *Saccharomyces*. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 63, n. 2, p. 165–176, 2012. doi/10.5344/ajev.2012.11083

BISSON, L. F.; KARPEL, J. E. Genetics of yeast impacting wine quality. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 139–62, 2010.

BORNEMAN, A. R.; DESANY, B. A; RICHES, D.; *et al.* Whole-genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 2, p. e1001287, 2011.

BORNEMAN, A. R.; DESANY, B. A; RICHES, D.; *et al.* The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 1, p. 88–96, 2012.

BOSCH-FUSTÉ, J.; SARTINI, E.; FLORES-RUBIO, C.; *et al.* Viability of total phenol index value as quality marker of sparkling wines, “cavas.” **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 782–790, 2009.

CADEZ, N.; ZUPAN, J.; RASPOR, P. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 5, p. 619–30, 2010.

CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 33–39, 2003.

CAPPELLO, M. S.; BLEVE, G.; GRIECO, F.; DELLAGLIO, F.; ZACHEO, G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1274–1280, 2004.

CARON, D. A.; COUNTWAY, P. D.; SAVAI, P.; *et al.* Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5797–808, 2009.

CARRETO, L.; EIRIZ, M. F.; DOMINGUES, I.; *et al.* Expression variability of co-regulated genes differentiates *Saccharomyces cerevisiae* strains. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 201, 2011.

CARUSO, M.; CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 323–8, 2002.

CIANI, M.; BECO, L.; COMITINI, F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 239–245, 2006.

CIANI, M.; COMITINI, F.; MANNAZZU, I.; DOMIZIO, P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 2, p. 123–33, 2010.

CORDENTE, A. G.; CURTIN, C. D.; VARELA, C.; PRETORIUS, I. S. Flavour-active wine yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 601–18, 2012.

CORDERO-BUESO, G.; ARROYO, T.; SERRANO, A.; TELLO, J.; *et al.* Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 132–9, 2011.

CORDERO-BUESO, G.; ARROYO, T.; SERRANO, A.; VALERO, E. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, n. 2, p. 429–37, 2011b.

COSMA, M. P. Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. **EMBO Reports**, v. 5, n. 10, p. 953–7, 2004.

DEGRASSI, G.; UOTILA, L.; KLIMA, R.; VENTURI, V. Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3470–2, 1999.

DELOBEL, P.; TESNIÈRE, C. A simple FCM method to avoid misinterpretation in *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle assessment between G0 and sub-G1. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e84645, 2014.

DUJON, B. Yeast evolutionary genomics. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 7, p. 512–24, 2010.

ERNY, C.; RAOULT, P.; ALAIS, A.; *et al.* Ecological Success of a Group of *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces kudriavzevii* Hybrids in the Northern European Wine-Making Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3256–3265, 2012.

EZOV, T. K.; BOGER-NADJAR, E.; FRENKEL, Z.; *et al.* Molecular-genetic biodiversity in a natural population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* from “Evolution Canyon”: microsatellite polymorphism, ploidy and controversial sexual status. **Genetics**, v. 174, n. 3, p. 1455–68, 2006.

FAY, J. C.; BENAVIDES, J. A. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 1, n. 1, p. 66–71, 2005.

FERNÁNDEZ-ESPINAR, M.T., LLOPIS, S., QUEROL, A., BARRIO, E. Molecular identification and characterization of wine yeasts. In: CARRASCOSA, A.V., MUÑOZ, R., GONZÁLEZ, R. (Eds.), **Molecular Wine Microbiology**, 1st ed. Elsevier, Academic Press, London,UK, pp. 111–141. 2011.

FLEET, G. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 11–22, 2003.

FLEET, G. H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 979–95, 2008.

GANGA, M. A.; MARTINEZ, C. Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 76–83, 2004.

GAMMACURTA, M.; REVEL, G. DE. Impact of Yeast Strain on Ester Levels and Fruity Aroma Persistence. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62 n.23, p. 5378-89, 2014.doi.org/10.1021/jf500707e

GERSTEIN, A. C.; CHUN, H.-J. E.; GRANT, A.; OTTO, S. P. Genomic convergence toward diploidy in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 9, p. e145, 2006.

GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205,31-36. 2001.

GONÇALVES, P.; VALÉRIO, E.; CORREIA, C.; ALMEIDA, J. M. G. C. F. DE; SAMPAIO, J. P. Evidence for divergent evolution of growth temperature preference in sympatric *Saccharomyces* species. **PloS One**, v. 6, n. 6, p. e20739, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; SCHMIDT, A. B.; COSTA E SILVA, C.; *et al.* Brazilian population database for the 13 STR loci of the AmpFISTR® Profiler Plus™ and Cofiler™ multiplex kits. **Forensic Science International**, v. 118, n. 1, p. 91–94, 2001.

Guerra, J. B.; Araújo, R. A.; Pataro, C.; Franco, G. R.; Moreira, E. S.; Mendonça-Hagler, L. C.; & Rosa, C. A. Genetic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains during the 24 h fermentative cycle for the production of the artisanal Brazilian cachaça. *Letters in Applied Microbiology*, v.33,n.2, p106–11, 2001.

GUIMARÃES, T.; MORIEL, D. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.119-126, 2006.

GUIJO, S.; MAURICIO, J.; SALMON, J.; ORTEGA, J. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and “Flor”film ageing of dry sherry-type wines. **Yeast**, v. 117, p. 101–117, 1997. doi/10.1002/(SICI)1097-0061(199702)13:2

HAMMOND, J. Microbiological techniques to confirm CIP effectiveness. **The Brewer**, v. 86 p. 332-338, 1996.

HERSKOWITZ, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 536–53, 1988.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J.; BASEHOAR-POWERS, E. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 6, p. 939–54, 2008.

KURTZMAN, C.; ROBNETT, C. Phylogenetic relationships among yeasts of the complex? determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 417–432, 2003.

LILLY, M.; BAUER, F. F.; LAMBRECHTS, M. G.; et al. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. **Yeast**, p. 641–659, 2006.

LITI, G.; BARTON, D. B. H.; LOUIS, E. J. Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. **Genetics**, v. 174, n. 2, p. 839–50, 2006.

LIECKFIELDT, E., MEYER, W., & BÖRN, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, p. 413-426. 1993.

LÓPEZ-MALO, M.; QUEROL, A.; GUILLAMON, J. M. Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e60135, 2013.

MARINI, L.; FONTANA, P.; SCOTTON, M.; KLIMEK, S. Vascular plant and Orthoptera diversity in relation to grassland management and landscape composition in the European Alps. **Journal of Applied Ecology**, v. 45, n. 1, p. 361–370, 2007.

MARTINI, A.; CIANI, M.; SCORZETTI, G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surface. **American Journal of Enology and Viticulture**.v. 47, p. 435–440, 1996.

MEYER, W., MITCHELL, T.G. Polymerase chain reaction fingerprinting in fungi using single primers specific to minisatellites and simple repetitive DNA sequences: strain variation in *Cryptococcus neoformans*. **Electrophoresis**, v.16. n.9, p.1648-56. 1995.

MCGOVERN, P. E.; ZHANG, J.; TANG, J.; *et al.* Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 51, p. 17593–8, 2004.

MOUCHET, M. A.; VILLÉGER, S.; MASON, N. W. H.; MOUILLOT, D. Functional diversity measures: an overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. **Functional Ecology**, v. 24, n. 4, p. 867–876, 2010.

MUIR, A.; HARRISON, E.; WHEALS, A. A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 7, p. 552–63, 2011.

NASCIMBENE, J.; MARINI, L.; IVAN, D.; ZOTTINI, M. Management intensity and topography determined plant diversity in vineyards. **PloS One**, v. 8, n. 10, p. e76167, 2013.

NAUMOV, G. I.; LEE, C.-F.; NAUMOVA, E. S. Molecular genetic diversity of the *Saccharomyces* yeasts in Taiwan: *Saccharomyces arboricola*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 1, p. 217–28, 2013.

NAUMOV, G. I.; MASNEUF, I.; NAUMOVA, E. S.; AIGLE, M.; DUBOURDIEU, D. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines:

genetic analysis of yeast populations. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 683–91, 2000.

NAUMOV, G. I.; NAUMOVA, E. S.; MASNEUF-POMARÈDE, I. Genetic identification of new biological species *Saccharomyces arboricolus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 1, p. 1–7, 2010.

NAUMOVA, E. S.; NAUMOV, G. I.; MICHAILOVA, Y. V; MARTYNENKO, N. N.; MASNEUF-POMARÈDE, I. Genetic diversity study of the yeast *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* reveals introgressed subtelomeric *Saccharomyces cerevisiae* genes. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 204–13, 2011.

PÉREZ-ORTÍN, J. E.; GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ALBEROLA, T. M. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. **Journal of Biotechnology**, v. 98, n. 2-3, p. 227–41, 2002.

PERIS, D.; LOPES, C. A; BELLOCH, C.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 407, 2012.

PRETORIUS, S.; WESTHUIZEN, T. J. VAN DER; AUGUSTYN, O. P. H. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry. **A Review**, v. 20, n. 2, p. 61–70, 1999.

RIBEREAU-GAYON, P. *et al.* The Handbook of Enology: Microbiology of Wine. JOHN WILEY and SONS, LTD ed., v. 1, 2° ed., 497 p., 2006.

RICHARDS, K. D.; GODDARD, M. R.; GARDNER, R. C. A database of microsatellite genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 3, p. 355–9, 2009. Disponível em:

ROMANO, P. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 1-2, p. 169–180, 2003.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F. R.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J. M. Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 165–77, 2010.

SAERENS, S. M. G.; DELVAUX, F.; VERSTREPEN, K. J.; *et al.* Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 454–61, 2008.

SALINAS, F.; CUBILLOS, F. A.; SOTO, D.; *et al.* The genetic basis of natural variation in oenological traits in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49640, 2012.

SAMPAIO, J. P.; GONÇALVES, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2144–52, 2008.

SILVA-FILHO, E.A., SANTOS, S.K.B., RESENDE, A.M., MORAIS, J.O.F., MORAIS JR., M.A., SIMÕES, D.A. Yeast population dynamics of industrial fuel–ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 88, p.13 – 23. 2005.

SETATI, M.; JACOBSON, D.; ANDONG, U.; BAUER, F. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52609, 2012.

SETTANNI, L.; SANNINO, C.; FRANCESCA, N.; GUARCELLO, R.; MOSCHETTI, G. Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 6, p. 606–14, 2012.

SICARD, D.; LEGRAS, J.-L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 3, p. 229–36, 2011.

SNIEGOWSKI, P. D.; DOMBROWSKI, P. G.; FINGERMAN, E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 299–306, 2002.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 1–16, 2010.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **Trends in Genetics : TIG**, v. 22, n. 9, p. 511–9, 2006.

TOFALO, R.; CHAVES-LÓPEZ, C.; FABIO, F. DI; *et al.* Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. *International journal of food microbiology*, v. 130, n. 3, p. 179–87, 2009.

TOFALO, R.; PERPETUINI, G.; SCHIRONE, M.; *et al.* Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. June, p. 166, 2013.

VALERO, E.; CAMBON, B.; SCHULLER, D.; CASAL, M.; DEQUIN, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 2, p. 317–29, 2007.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; *et al.* Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VÁZQUEZ-LIMA, F.; SILVA, P.; BARREIRO, A.; *et al.* Use of chemostat cultures mimicking different phases of wine fermentations as a tool for quantitative physiological analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 85, 2014.

VERSAVAUD, A.; COURCOUX, P.; ROULLAND, C.; *et al.* Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. These include: **Genetic Diversity and Geographical Distribution of Wild *Saccharomyces cerevisiae* Strains from the .** , v. 61, n. 10, 1995.

VERSTREPEN, K. J.; LAERE, S. D. M. VAN; VANDERHAEGEN, B. M. P.; *et al.* Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5228–5237, 2003.

WANG, C.; LIU, Y. Dynamic study of yeast species and *Saccharomyces cerevisiae* strains during the spontaneous fermentations of Muscat blanc in Jingyang, China. **Food Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 172–7, 2013.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Species accumulation curves and incidence-based species richness estimators to appraise the diversity of cultivable yeasts from beech forest soils. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e23671, 2011.

ZECHMEISTER, H. .; SCHMITZBERGER, I.; STEURER, B.; PETERSEIL, J.; WRBKA, T. The influence of land-use practices and economics on plant species richness in meadows. **Biological Conservation**, v. 114, n. 2, p. 165–177, 2003.

ZHANG, H.; SKELTON, A.; GARDNER, R. C.; GODDARD, M. R. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 7, p. 941–7, 2010.

ZÖRGÖ, E.; CHWIALKOWSKA, K.; GJUVSLAND, A. B.; *et al.* Ancient evolutionary trade-offs between yeast ploidy states. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003388, 2013. Public Library of Science.

ZOTT, K.; CLAISSE, O.; LUCAS, P.; *et al.* Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 559–67, 2010.

APÊNDICES

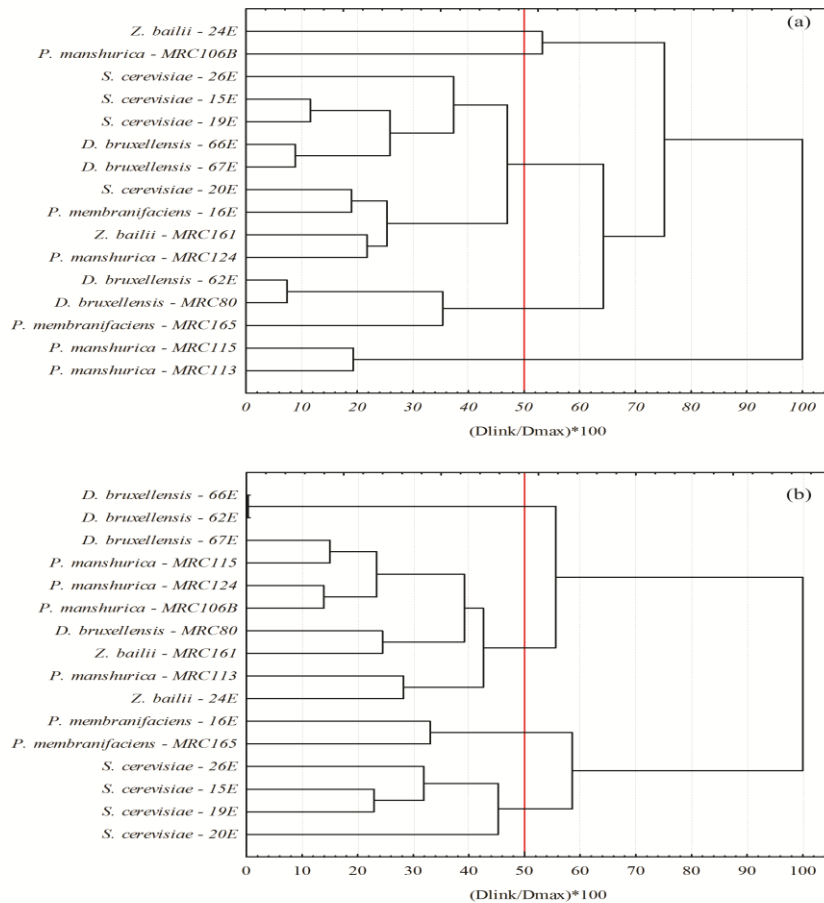


Figure S1. Dendrograms of the MSP-PCR fingerprinting profiles with the primers M13 (a) and (GTG)5 (b) of a subset of 16 strains from the "lower diversity" dataset for the analysis of the discriminatory power of the primers. The dendrograms were constructed by the Hierarchical Clustering using the Wards method, and the distance was computed using the Euclidean distance between the genetic profiles. We used a cut-off of 50% for the calculation of the discriminatory power.

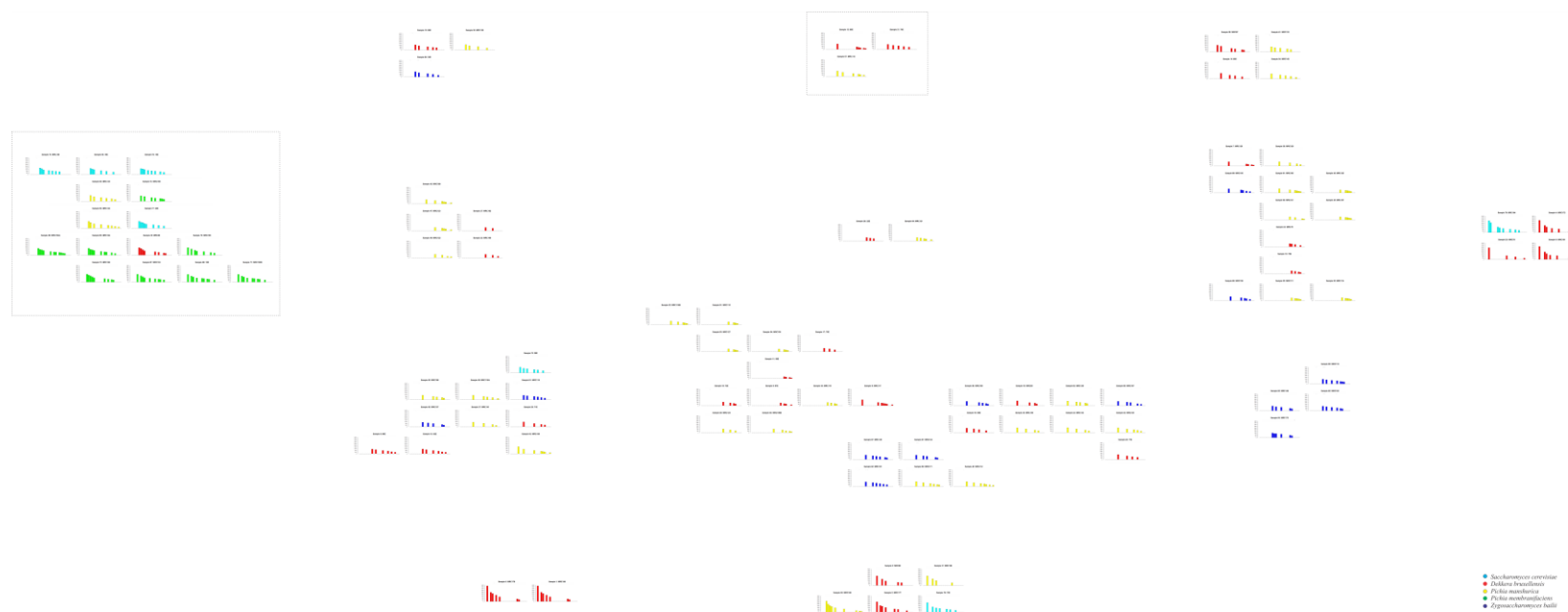


Figure S2. QAPGrid layout for the clustering of the strains from the "lower diversity" dataset. The distance was computed using the Euclidean distance between the genetic profiles based on the MSP-PCR fingerprinting with the primer GTG₅. Each strain is represented as a bar chart. The colors represent the different species based on the molecular identification, and the legend is the same as in Figs. 1A and 1B. Each barre presents one band in the fingerprinting profile of each strain, the horizontal axis shows the band position in the fingerprinting, and the vertical axis represents the size of the band (bp). The dashed lines indicate the two clusters (smaller and bigger) used for the calculation of the probability of misidentification and consequent underestimation of the species richness.

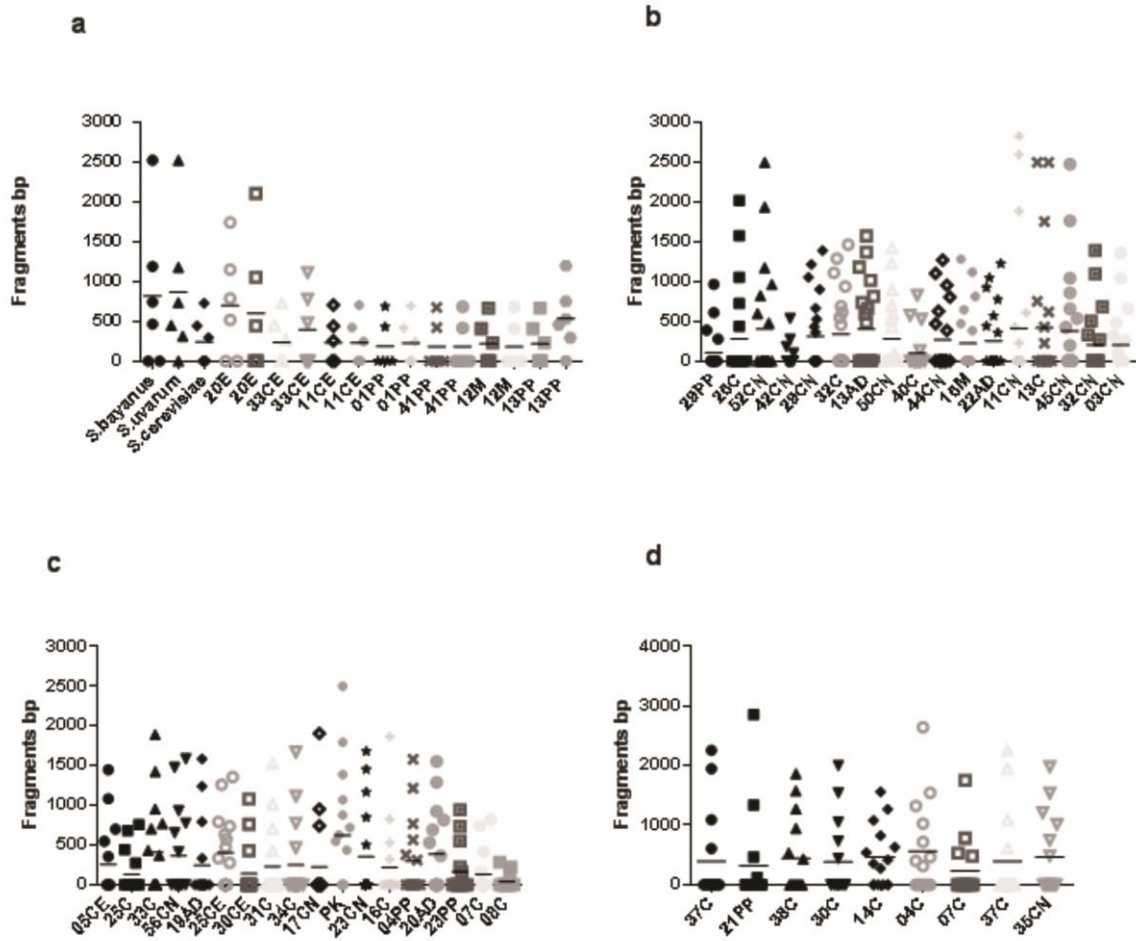


Figure S3. Layout of the MSP-PCR fingerprinting profiles with the primer (GTG)₅ of the most abundant species within the "higher diversity" dataset. Each symbol represents one band in the fingerprinting profile. *S. cerevisiae* (a) *H. uvarum* (b), *P.kudriavzevii* (c) and *P. occidentalis* (d). The profiles of the reference strains *S.bayanus* CLIB 2033 *S. uvarum* CLIB 2028 and *S. Cerevisiae* CLIB 2048 are shown in Fig. S2a. Each symbol represents one band in the fingerprinting profile of each strain, and the vertical axis shows the size of the band (bp).

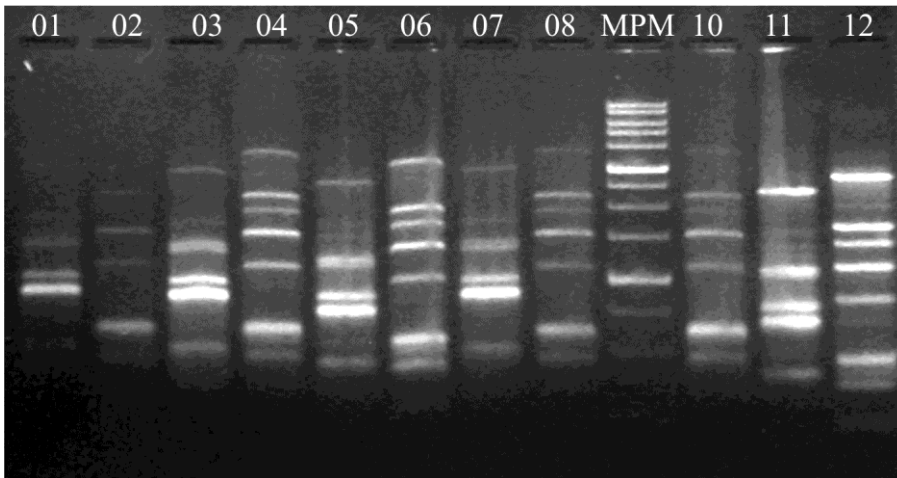


Figure S4. Representative agarose gel of MSP-PCR fingerprinting using the primer (GTG)₅. 01: *Dekkera bruxellensis* MRC181; 02: *Pichia manshurica* MRC163; 03: *D.bruxellensis* MRC172; 04: *Pichia membranifaciens* MRC152A; 05: *D. bruxellensis* MRC177; 06: *Torulaspota delbrueckii* MRC183; 7: *Zygosaccharomyces bailii* MRC162; 08: *D. bruxellensis* MRC178; 10: *D. bruxellensis* MRC180; 11: *D. bruxellensis* MRC88; 12: *P. manshurica* MRC188. 1Kb Plus was used as Molecular Weight Marker (MPM).

Table S1. Yeast species from the vineyard and winery environments collected in Santa Catarina, Brazil.

Species	Number of strains
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	32
<i>Pichia kudriavzevii</i>	19
<i>Pichia occidentalis</i>	11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	5
<i>Pichia manshurica</i>	3
<i>Meyerozyma caribbica</i>	3
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	3
<i>Metschnikowia chrysoperlae</i>	2
<i>Clavispora lusitaniae</i>	2
<i>Hanseniaspora clermontiae</i>	2
<i>Candida zemplinina</i>	2
<i>Candida allociferri</i>	1
<i>Trichomonascus ciferri</i>	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	1
<i>Zygoascus meyeriae</i>	1
<i>Candida intermedia</i>	1
<i>Pichia membranifaciens</i>	1
<i>Pichia aff fermentans</i>	1
Non identified	38
Total	139

Table S2. Discriminatory power of each band obtained by the MSP-PCR fingerprinting with (GTG)₅ for the five most abundant species from the "lower diversity" dataset.

Species	Discriminatory Index (D)		
	Number of Strains	D Value of bands	C. Interval ¹
<i>D. bruxellensis</i>	30	0.065-1.000	0.181-1.000
<i>P. manshurica</i>	36	0.053-0.973	0.151-0.950
<i>P. membranifaciens</i>	9	0.180-0.880	0.478-0.930
<i>S. cerevisiae</i>	7	0.118-1.000	0.308-0.950
<i>Z. bailii</i>	14	0.124-0.933	0.343-0.950

Confidence Interval¹ = Precision of the Discriminatory Index, expressed as 95% upper and lower boundaries.

Table S3. Discriminatory power of each band obtained by the MSP-PCR fingerprinting with (GTG)₅ for the five most abundant species from the "higher diversity" dataset.

Species	Discriminatory Index (D)		
	Number of Strains	D Value of bands	C. Interval ¹
<i>H. uvarum</i>	32	0.048-1.000	0.135-1.000
<i>P. kudriavzevii</i>	19	0.080-1.000	0.221-1.000
<i>P. occidentalis</i>	11	0.222-1.000	0.542-1.000
<i>S. cerevisiae</i>	9	0.118-1.000	0.308-0.950
<i>M. guilliermondii</i>	5	0.250-0.964	0.594-1.000

Confidence Interval¹ = Precision of the Discriminatory Index, expressed as 95% upper and lower boundaries.

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome -Sandra Denise Camargo Mendes

Endereço residencial - Rua José Formighieri, 63

Alvorada - Videira

89560000, SC - Brasil

Telefone: 48 33571643

Endereço profissional: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres

Rua João Zardo, 1660

Campo Experimental - Videira

89560000, SC - Brasil

Telefone: 49 35335619

Endereço eletrônico: E-mail para contato: mendes@epagri.sc.gov.br

E-mail alternativo: smendesbr@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2010 Doutorado em Biologia Celular e Molecular.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Diversidade Molecular de Linhagens de Leveduras e a influência de Antimicrobianos Durante o Processo de Fermentação. Orientador: Patricia Valente da Silva

Bolsista do(a): Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

1998 - 2000 Mestrado em Ciências dos Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil. Título: Detecção de *Listeria* spp em Frango Resfriado pelo Método Convencional em Condições de Aerobiose e Microaerofilia, Ano de obtenção: 2000. Orientador: Cleide Rosana Batista Vieira
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2002 - 2002 Especialização em Biossegurança. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

1988 - 1995 Graduação em Farmacia Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil

1987 - 1992 Graduação em Administração e Gerência. Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Florianópolis, Brasil

1. Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Soares, P. A., Zucco, E, Mendes, S. D. C. Uso de biofiltro aerado submerso com material alternativo para o tratamento de efluente vinícola: sistema em batelada. HOLOS Environment (Online), v.10, p.42 - 53, 2010.

2. Pelisser, Márcia R., MENDES, S. D. C., Sutherland, Alastair D., Batista, Cleide R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso), v.32, p.113 - 116, 2001.

3. Raupp, Dorivaldo da Silva, Carrijo, Kelly Cristina Rebonato, Costa, Léa Luzia Freitas, Mendes, Sandra Denise Camargo, Banzatto, David Arioaldo, MENDES, S. D. C. Propriedades funcionais-digestivas e nutricionais de polpa-refinada de maçã. Scientia Agrícola (USP. Impresso), v.57, p.395 - 402, 2000.

4. MENDES, S. D. C., BORGES, A., BATISTA, C. R.V. Inidência de *Listeria* ssp. em produtos marinhos adquiridos em estabelecimentos comerciais de Florianópolis - SC. Higiene Alimentar. , v.13, p.20 - 21, 1999.

5. DABOIT, T. C., MAGAGNIN, C. M., HEIDRICH, D., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., VETTORATO, G., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. A Case of Relapsed Chromoblastomycosis Due to *Fonsecaea monophora*: Antifungal Susceptibility and Phylogenetic Analysis. Mycopathologia (1975. Print). v.175, p.6 -13, 2013.

6. DABOIT, T. C., DUQUIA, R. P., MAGAGNIN, C. M.I, MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., STEGLICH, R., DOS SANTOS, I. S., VETTORATO, G., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology Case Reports.*, v.1, p.72 - 75, 2012.

7. STOPIGLIA, C. D. O., MAGAGNIN, C. M., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., HEIDRICH, D., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology (Oxford. Print).* , v.52, p.56 - 64, 2014.

8. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., INOSTROZA-PONTA, M., VALENTE, P. (GTG)₅ MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated Yeasts?. *Plos One.* , v.9, p.e105870 - , 2014.

9. POLI, J. S., ROSA, P. D., SENTER, L, MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências (Impresso, v.11, p.203 - , 2013.*

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. ZUCCO, E, SOARES, P. A., MENDES, S. D. C. Uso de biofiltro aerado submerso no tratamento de efluente vinícola com meio suporte de caroços de pêssegos (ESTUDO DE CASO NA REGIÃO DO MEIO-OESTE CATARINENSE) In: 25 Congresso Brasileiro de Engenharia Ambiental, 2009, Recife. 25 congresso Brasileiro de Engenharia Ambiental. ABES, 2009.

2. ORTIGARA, A. R. C, SEZERINO, P. H., BENTO, A. P, SCARATTI, D, CALIARI, Vinícius, MENDES, S. D. C., SANT'ANNA, F. S. P. Caracterização qualitativa do efluente de uma vinícola localizada na região Meio-Oeste do estado

de Santa Catarina, sul do Brasil In: XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2008, Santiago.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ROSA, P. D., MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., VALENTE, P. Avaliando com Vermelho de Nilo o melhoramento da produção de lipídeo pela levedura *Candida zeylanoides* QU33 com peptona limitante In: VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. VIII Congreso Latinoamericano de Micología. Colombia: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.197 – 198

2. MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., FELDBERG, N. P., BERTOLDI, F. C., VALENTE, P. Comunidade funcional de leveduras em ambiente de parreirais de Santa Catarina, Brasil In: VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.232 - 233

3. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., VALENTE, P. Levaduras asociadas a vinos finos y coloniales de los estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina (sur de Brasil) In: VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.228 – 228

4. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., PONTA, M. I., VALENTE, P. ¿MSP-PCR fingerprinting usando el primer (GTG)₅ realmente funciona como técnica de agrupamiento de levaduras asociadas a vinos? In: VIII Congreso Latinoamericano de Micología, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.210 - 210

5. MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., HEIDRICH, D., SCROFERNEKER, M. L., VALENTE, P. *Saccharomyces sensu stricto* asociadas a vinhedos de Santa Catarina (sur de Brasil) In: VIII Congreso Latinoamericano de

Micologia, 2014, Medellín. Actualidades Biológicas. Medellín: Universidad de Antioquia, 2014. v.36. p.204 – 205

6. MENDES, S. D. C., HEIDRICH, D., BERTOLDI, F. C., DABOIT, T. C., VIGOLO, S., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Composição e Atividade Antifúngica de Óleos Essências (OE) de um Banco Ativo de Germoplasma em Itajaí (SC) In: VII Congresso Brasileiro de Micologia, 2013, Belém. LIVRO DE RESUMOS VII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2013. v.VII. p.444 - 444

7. SCROFERNEKER, M. L., DABOIT, T. C., MAGAGNIN, C. M., HEIDRICH, D., CASTRILLÓN, RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., Valente, P., VETTORATO, G. Cromoblastomicose por *Fonsecaea monophora*: Relato de um caso In: XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013, Campo Grande. XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013. v. XLIX. p.347 - 347

8. MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., RAMÍREZ, VALENTE, P. Diversidade de Leveduras associadas a vinhos do Sul do Brasil In: VII Congresso Brasileiro de Micologia, 2013, Belém. Livro de Resumos do VII do Congresso Brasileiro de Micologia, 2013. v.VII. p.316 – 316

9. SCROFERNEKER, M. L., DABOIT, T. C., DUQUIA, R. P., MAGAGNIN, C. M., MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., STEGLICH, R., VALENTE, PATRICIA, SANTOS, I. S., VETTORATO, G. Um Caso de infecção por *Exophiala spinifera* no sul do Brasil: Identificação Molecular e Suscetibilidade aos Antifúngicos In: XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013, Campo Grande. XLIX Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2013. p.641 - 641

10. MAGAGNIN, C. M., VIGOLO, S., ALVES, K., MEIRELLES, L. C., STOPIGLIA, C. D. O., DABOIT, T. C., MENDES, S. D. C., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Caracterização de Dermatófitos Isolados no Estado do Rio

Grande do Sul In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos.XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012.

11. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., INOSTROZA-PONTA, M., VALENTE, P. Tipagem molecular de leveduras associadas a vinhos do Sul do Brasil: Padronização do MSP-PCR Fingerprinting usando o primer (GTG)₅. In: XXI Congresso Latino Americano de Microbiologia, 2012, Santos.XXI ALAM. , 2012. v.1. p.68 - 68

12. Feldberg, N. P., DALLAZEM, S., DAMBROS, R., MENDES, S. D. C. Caracterização físico-química de cultivares novas para suco na região de Santa Catarina In: Ciência de Alimentos e Qualidade de Vida: Saúde, Meio Ambiente e Sustentabilidade, 2011, Campinas.IX Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011. v.v. p.11573 - 11573

13. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., TOSTA, A., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Diversidade e Fingerprinting de leveduras associadas a vinhos In: XIII Reunião anual PPGBCM, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos XIII Reunião anual PPGBCM, 2011. v.1. p.92 - 92

14. MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., ALVES, M. K., VALENTE, P. Estudo da Dinâmica de Leveduras Associadas a Vinhos do Sul do Brasil e Chichas Colombiana. In: 9 Simposio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas.SLACA, 2011. v. 9. p.11574 - 11574

15. ROSA, P. D., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., LANDEL, M., TOSTA, A., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Identificação Molecular de leveduras oleaginosas isoladas de queijo colonial artesanal In: V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 2011, Porto Alegre. ANAIS DO V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA APLICADA, 2011, p.69 - 69

16. MENDES, S. D. C., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. TOSTA, A., ROSA, P. D., FELDBERG, N. P., GIOVANNI, R. N, BERTOLDI, F. C., VAINSTEIN, M. H.,

VALENTE, PATRÍCIA. Potencial biotecnológico de leveduras selvagens provenientes de regiões vinícola de altitude de In: XIII Reunião anual PPGBCM, 2011, Porto Alegre. Livro de Resumos XIII Reunião anual PPGBCM, 2011. v.1. p.119 - 119

17. SENTER, L, POLI, J. S., PINHEIRO, M. S., RIBAS, R.K.C., LOPES, B. S., MENDES, S. D. C., VALENTE, P. Halotolerância de leveduras aquáticas isoladas de animais marinhos incrustantes In: II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010, Caxias do Sul. II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010.

18. LOPES, B. S., SENTER, L, MENDES, S. D. C., POLI, J. S., VALENTE, P. Influência do NaCl no crescimento da lvedura aquática TR08 isolada do estuário do Rio Tramandaí, RS In: II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010, Caxias do Sul. II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010.

19. RIBAS, R.K.C., SENTER, L, MENDES, S. D. CAMARGO, POLI, J. S., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, P. Seleção de leveduras isoladas de queijo produtoras de lipases In: II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010, Caxias do Sul. II Encontro Gáucho de Micologia, 2010.

20. POLI, J. S., SENTER, L, MENDES, S. D. C., RIBAS, R.K.C., KANAN, J. H.C.C, VALENTE, P. Seleção de leveduras isoladas de queijo produtoras de óleo microbiano In: II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010, Caxias do Sul. II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010.

21. POLI, J. S., SENTER, L, ROSA, P. D., MENDES, S. D. C., RIBAS, R.K.C., VAINSTEIN, M. H., VALENTE, PATRÍCIA. Triagem de Leveduras Acumuladoras de Lipídeos Por Meio da Utilização do Corante Vermelho de Nilo In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasilia. VI Congresso Brasileiro de Micologia. 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., VALENTE, P. Diversidade de Leveduras Associadas a Vinhos do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (BRASIL In: II Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2014, Porto Alegre.

2. MENDES, S. D. C., HEIDRICH, D., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., SCROFERNEKER, M. L., VALENTE, P. Linhagens de *Saccharomyces* Associadas a Vinhedos DE SANTA CATARINA In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia e Encontro Nacional dos Estudantes de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente,, 2014, Porto Alegre.

3. ROSA, P. D., CARBONI, D. S., MATTANA, P., RICHARDS, N. S., KANAN, J. H. C., MENDES, SANDRA DENISE CAMARGO, Valente, P. Diferentes Respostas Para Acúmulo de Lipídeo Variando as Fontes de Nitrogênio na Levedura QU33. In: VI Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada & II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2012, Porto Alegre.

4. DABOIT, T. C., DUQUIA, R. P., MAGAGNIN, C. M., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., MENDES, S. D. C., STEGLICH, R.L, SANTOS, I. S., VETTORATO, G., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Um Caso de Infecção por *Exophiala spinifera* no Sul do Brasil: Identificação Molecular e Suscetibilidade aos Antifúngicos In: VI Simpósio de Microbiologia Aplicada & II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2012, Porto Alegre.

5. FELDBERG, N. P., MENDES, S. D. C., DALLAZEM, S., DALBO, M. A., GARDIN, J. P., CALIARI, V. Caracterização físico-química e sensorial de variedades de *Vitis rotundifolia*. In: XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enología, 2009, Montivideo.

6. MENDES, S. D. C., FELDBERG, N. P., DALLAZEM, S., CALIARI, V., DALBO, M. A., GARDIN, J. P. Determinação da composição fenólica e da atividade antioxidante de variedades de *Vitis rotundifolia*. In: XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enologia, 2009, Montivideo.

7. Savi, C.C., CALIARI, Vinícius, MENDES, S. D. C. Elaboração de vinho espumante Niagara pelo método Champenoise com caseinato de potássio e polivinilpirrolidona In: XII Congresso Latinoamericano de Viticultura y Enologia, 2009, Montevideo.

8. BLAUTH, P. L., MENDES, S. D. C., GELINSKI, J. L. N Isolamento de microrganismos de efluente de curtume In: III Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2007, Rio Claro.

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Evelyn Zucco. Isolamento de Microrganismos Formadores de Biofilme em Biofiltros Aerados Submersos (BAS) com Material Suporte Alternativo em Batelada com Alimentação de Efluente Vinícola. 2008. Curso (Engenharia Ambiental) - Fundação Universidade do Contestado - Campus Caçador.

2. Petrick Anderson Soares. Potencial Uso de Biofiltros Aerados Submersos (BAS) com Material Suporte Alternativo Para o Tratamento de Efluente Vinícola: Sistema em Batelada. 2008. Curso (Engenharia Ambiental) - Fundação Universidade do Contestado - Campus Caçador.

3. Daiana Biachin. Determinação da Curva de Crescimento de Bactérias Gram Negativas Resistentes ao Cromo (VI) Previamente Isoladas de Efluentes de Curtume. 2006. Curso (Ciências Biológicas) - Universidade do Oeste de Santa Catarina.

4. Aline de Souza Machado. Avaliação Sensorial de Maçã Cultivar Gala Armazenada em Condição Comercial a Temperatura Ambiente. 2005. Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade do Oeste de Santa Catarina.

5. Elecir de Souza. Gerenciamento de Resíduos Químicos no Laboratório de Análises de Bebidas e Vinagres. 2005. Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade do Oeste de Santa Catarina.

6. Pricila Lidiane Blauth. Isolamento e Identificação de Bactérias para Biossorção de Cromo (VI) em Efluentes de Curtume. 2005. Curso (Biotecnologia Industrial) - Universidade do Oeste de Santa Catarina.

7. Barbara Tressoldi. Seleção e Treinamento de um Painel de Degustadores da Estação Experimental de Videira. 2004. Curso (Tecnologia de Alimentos) - Universidade do Oeste de Santa Catarina.

8. Patricia Davila. Implantação de Sistema de Qualidade no Laboratório de Bebidas e Vinagres. 2004. Curso (Tecnologia de Alimentos) – Universidade Universidade do Oeste de Santa Catarina.