

## RECENSEMENT ECOLOGIQUE DES SOUCHES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE PRESENTES DANS DES VIGNOBLES DE LA REGION DU VINHO VERDE (PORTUGAL)

Dorit Schuller <sup>a</sup>, Hugo Alves <sup>a</sup>, Sylvie Dequin <sup>b</sup>, Margarida Casal <sup>a</sup>,

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Centro de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal

<sup>b</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Sciences pour l'Oenologie, Montpellier, France

*NDLR* : - Pour ne pas surcharger le texte, le tableau 1 et la figure 3 se trouvent à la fin de l'article.

- Les chiffres entre crochets [xx] font références à la bibliographie, en fin d'article

### 1. Introduction

La fermentation du vin était traditionnellement réalisée de façon spontanée par des levures indigènes, soit présentes sur les raisins au moment de la récolte, soit introduites par l'équipement et le chai au cours du processus de vinification. Les recherches actuelles s'accordent toutes sur le fait que les espèces prédominantes rencontrées sur des raisins sains sont des levures apiculées telles que *Hanseniaspora uvarum* (et sa forme anamorphe *Kloeckera apiculata*) ou des espèces oxydatives telles que *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* and *Rhodotorula* [1]. Les espèces fermentaires du genre *Saccharomyces*, notamment les *Saccharomyces cerevisiae*, n'apparaissent au contraire qu'en très petit nombre sur les baies saines en bon état et dans les sols [2-4]. On pense qu'à l'inverse les baies abîmées sont une importante source de *S. cerevisiae* [5]. La prévalence des souches appartenant à cette espèce là est bien documentée parmi la flore indigène des caves [6-10]. La flore levurienne des raisins dépend de facteurs nombreux et variés, tels que les conditions climatiques (température et hauteur des précipitations comprises), la localisation géographique du vignoble [4,9], les applications d'antifongiques, le cépage, l'âge du vignoble [12-14], ou encore le type de sol [15]. Plusieurs recensements écologiques, réalisés avec des méthodes d'identification moléculaire, font état d'une grande diversité de profils génétiques au sein de la flore fermentaire œnologique. Les souches de *S. cerevisiae* semblent être largement répandues dans une région viticole donnée [16-19] et peuvent être rencontrées d'une année sur l'autre [20-21]. En outre, l'existence de souches de *S. cerevisiae* prédominantes dans la flore de fermentation [2,22], vient soutenir l'hypothèse selon laquelle des souches indigènes spécifiques peuvent être associées avec un *terroir* spécifique.

L'utilisation de levains sélectionnés est de nos jours une pratique très répandue, en raison de leurs très bonnes capacités fermentaires et œnologiques. Cela participe à la standardisation des procédés de fermentation et à la qualité du vin. Au cours des années qui ont suivi la publication de la séquence génomique de *S. cerevisiae* [23], de nombreuses preuves ont été apportées quant à l'existence de différences génétiques substantielles entre les souches de levures œnologiques [24-26]. En conséquence, l'exploration de la biodiversité des souches indigènes de fermentation peut contribuer grandement à la compréhension et à la sélection de souches présentant des phénotypes spécifiques.

La diversité génétique des souches de *S. cerevisiae* a été analysée à l'aide de plusieurs méthodes telles que la détermination du caryotype des souches par électrophorèse sur gel en champ pulsé, l'analyse de restriction de l'ADN mitochondrial (ADNmt RFLP) [28-31], les empreintes basées sur des séquences répétitives [32, 33] et le génotypage de marqueurs microsatellites. Schuller et al. [37] ont récemment démontré que le génotypage microsatellite, en utilisant 6 loci différents [6], l'analyse séquentielle interdelta optimisée [33] et la RFLP d'ADN

mitochondrial générée par l'enzyme HinfI avaient le même pouvoir discriminant. Dans la présente étude, c'est l'analyse RFLP de l'ADNmt avec utilisation de l'enzyme HinfI qui a été choisie comme marqueur génétique pour la distinction des souches de *S. cerevisiae*. Cette étude tend à évaluer la biodiversité de la flore de fermentation rencontrée dans les vignobles de la région du Vinho Verde, afin de permettre la définition de stratégies pour la mise au point des programmes de sélection de levures œnologiques à venir. Un des autres objectifs de cette étude est d'établir une collection de souches pour contribuer à préserver les ressources génétiques de *S. cerevisiae*.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Echantillonnage

Le programme d'échantillonnage comprenait 18 sites au total, répartis sur 3 vignobles situés aux alentours d'une cave du Nord Ouest du Portugal (Região Demarcada dos Vinhos Verdes). Dans chacun des vignobles, six points d'échantillonnage ont été définis en fonction de la topographie du vignoble. Les lieux d'échantillonnage étaient distants de la cave de 20m pour le plus proche à 400m pour le plus éloigné, tel que montré dans la figure 1. Deux campagnes d'échantillonnage ont été menées avant la récolte (campagne précoce) et après la récolte (campagne tardive) dans un laps de temps de 2 semaines environ, et ce afin d'évaluer la diversité au sein des communautés de levures de fermentation au cours de la dernière étape de maturation du raisin et à la récolte. Cette expérience a été répétée 3 ans de suite (de 2001 à 2003). Les échantillons n'ont pas été tout le temps ramassés sur le même cep, mais néanmoins toujours dans le même secteur ( $\pm 1-2$  m). Les cépages utilisés pour l'échantillonnage ont été le Loureiro (vignoble A), Alvarinho (Vignoble P) et Avesso (vignoble C), c'est-à-dire des raisins blancs uniquement, de la région du Vinho Verde.

### 2.2. Fermentation et isolement des souches

2 kgs de raisin environ ont été ramassés de façon aseptique à partir de chacun des points d'échantillonnage. Le jus qui en a été extrait a été fermenté à 20°C en petit volume (500 ml), et soumis à une agitation mécanique (20 tpm). Le déroulement de la fermentation a été contrôlé quotidiennement en déterminant la perte volumique des moûts. Une fois une réduction de 70g/l observée, correspondant à la consommation d'environ 2/3 du contenu en sucres, des échantillons dilués ( $10^{-4}$  et  $10^{-5}$ ) ont été étalés sur des lames YPD (extrait de levure, 1% poids/volume, peptone, 1% poids/volume, glucose 2%, poids/volume, agar, 2% poids/volume) et 30 colonies choisies au hasard ont été ramassées après incubation (2 jours à 28°C). Les isolats obtenus à partir de toutes les fermentations ont été conservés dans du glycérol (30% ; v/v) à -80°C.

### 2.3. Isolement de l'ADN

Les cellules de levure ont été cultivées dans un 1ml de milieu YPD (36h, 28°C, 160 tpm) et l'ADN a été isolé tel que décrit [28], avec une procédure de lyse cellulaire modifiée, en utilisant 25 U de Zymolase (SIGMA). Le déroulement de la lyse des cellules a varié selon la souche et a duré entre 20 minutes et 1 h (37°C). L'ADN a été ensuite utilisé pour le RFLP mitochondrial.

### 2.4. RFLP d'ADN mitochondrial

Les réactions de restriction se sont déroulées tel que décrit [37]. Les désignations attribuées pour les profils distincts observés vont de A1–A93, de C1–C62 et de P1–P135, ce qui correspond aux isolats des vignobles A, C et P respectivement. La désignation de profil ACP10 fait référence à une souche commune à tous les vignobles et C69P77 et C42P80 font référence à des souches communes aux vignobles C et P. Les profils identiques à ceux des levures commerciales utilisées par les producteurs sont désignés par les profils allant de S1–S6. Une souche représentative de chacun des 297 profils a été retirée et sa croissance a été testée dans un milieu contenant de la lysine comme unique source d’azote [38].

## 2.5. Méthodes analytiques

La concentration en sucres a été déterminée par la méthode à l’acide dinitrosalicylique décrite plus haut [39]

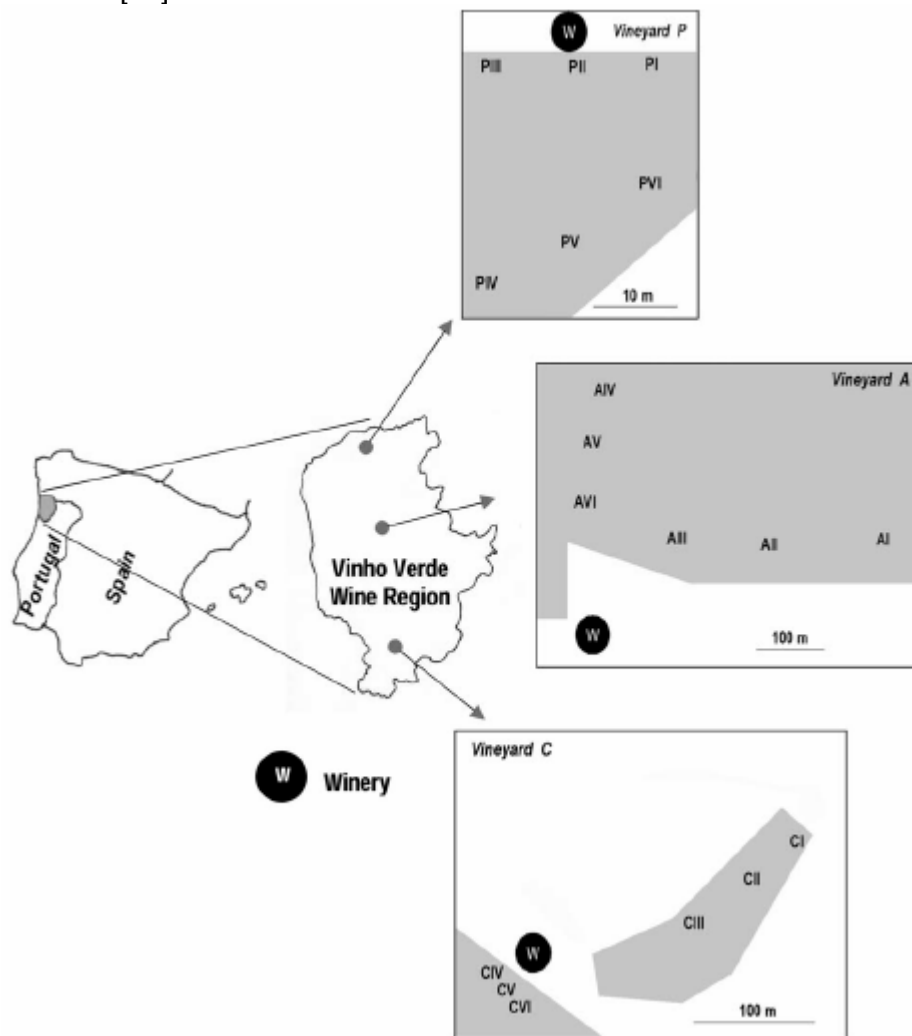


Fig. 1. Situation géographique des trois vignobles A, C et P dans la région du vin de Vinho Verde avec indication des caves et des sites d’échantillonnage correspondants PI–PVI, AI–AVI et CI–CVI.

### 3. Résultats

Pour cette étude, des échantillons de raisin ont été prélevés dans trois vignobles, situés dans la région du Vin de Vinho Verde, au Nord-Ouest du Portugal pendant la saison des vendanges, en 2001, 2002 et 2003 (Fig. 1). Afin d'avoir une vision plus détaillée de la distribution temporelle des levures de fermentation, deux campagnes d'échantillonnage ont été menées, une avant les vendanges, et l'autre après, donc dans un laps de temps de 2 semaines environ. Un prélèvement de 108 échantillons au total était prévu au départ (6 points d'échantillonnage, deux campagnes, trois vignobles, trois ans). 54 d'entre eux ont démarré spontanément la fermentation, 36 n'ont pas démarré la fermentation, après 30 jours d'incubation et 18 échantillons n'ont pas pu être ramassés en raison de conditions météorologiques défavorables et d'un mauvais état sanitaire des raisins en 2002. A partir des 54 fermentations, 1620 isolats de levure ont été obtenus. Tous les isolats ont été analysés par leur ADNmt RFLP (HinfI) et un profil a été attribué à chacun d'entre eux, ce qui a donné un total de 297 profils différents.

Le dénombrement total des levures (cfu dans un milieu YPD) s'étale entre  $1.0 \times 10^6$  et  $8.0 \times 10^7$  cfu/ml de moût, ce qui correspond aux valeurs généralement données pour les fermentations de moût de raisin. Tous les isolats appartiennent à l'espèce *S. cerevisiae*, en raison de leur incapacité à se développer dans un milieu avec la lysine comme unique source d'azote et de leur capacité à amplifier six loci microsattellites spécifiques de *S. cerevisiae*. 1 locus seulement a été amplifié dans une autre espèce de *Saccharomyces* retrouvée dans le vin : *S. bayanus*. Aucun locus n'a été amplifié dans cette autre espèce de *Saccharomyces* présente dans le vin, l'espèce *S. paradoxus*. Aucune amplification n'a été observée pour les espèces généralement présentes dans les premières étapes de la fermentation, à savoir *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens* et *Kloeckera apiculata* (non montrées).

Les résultats de l'analyse RFLP de l'ADNmt des 1620 isolats sont résumés dans le tableau 1. Parmi les 450 isolats collectés dans le vignoble A, 93 correspondaient à un profil unique. Dans le vignoble C, ce sont 450 souches qui ont été isolées, avec 62 profils uniques et dans le vignoble P, c'est un total de 690 souches qui ont été isolées, correspondant à 135 profils uniques.

Pour 11 profils communs, relevés dans plus d'une fermentation (tableau 1 et Fig.2) et également pour six souches de levures commerciales (S1-S6), une distribution géographique et temporelle plus large a été vérifiée.

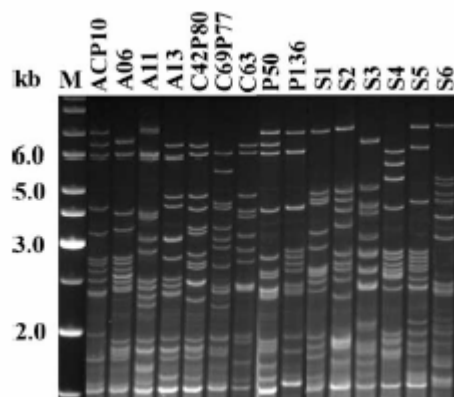


Fig. 2. Exemples de profils communs d'ADN mitochondrial (HinfI), tels que listés dans le Tableau 1, trouvés dans des souches de levures isolées à partir de fermentations spontanées de moûts, telles que décrites dans la Section 2.

Les profils S1-S6 correspondent aux levures commerciales utilisées dans les caves au cours des dernières années. Les souches pérennes sont associées avec de plus nombreux points d'échantillonnage répartis sur un seul vignoble (profils A06, S6, P136, P50). Leur répartition à travers les sites d'échantillonnage sur deux ou trois vignobles est également plus large (profils S3, S4 et ACP10). Les profils S1, S2, C63, A11, A13, P03 et P24 ont été relevés 1 année uniquement mais sur plusieurs sites d'échantillonnage répartis sur un seul vignoble. La souche S5, quant à elle, est distribuée de façon plus importante sur plusieurs sites d'échantillonnage des vignobles C et P. Les profils C42P80 et C69P77 n'apparaissent que dans un seul site d'échantillonnage en 2003, et ce dans deux vignobles. Le profil ACP10 est le seul isolat « régional » dont la répartition géographique est plus large, tandis que A06, A11, A13, C6, P03, P27, P50 et P136 peuvent être considérées comme des « souches de vignobles » car elles ont été retrouvées sur des sites d'échantillonnage multiples et/ou sur plusieurs années.

Les conditions climatiques humides de l'été 2002 ont eu comme conséquence des infections fongiques graves et ont poussé à une utilisation à grande échelle de sprays chimiques. C'est sans doute la raison pour laquelle en 2002 seulement 12 profils uniques ont été identifiés parmi les 150 souches ramassées lors de l'échantillonnage d'après vendanges dans le vignoble P. En 2003, le rapport isolats/profils uniques est similaire à celui de 2001 (47 et 62 profils uniques parmi chacun des 180 isolats identifiés à partir de l'échantillonnage réalisé après vendanges dans le vignoble P).

Tel que montré dans la Fig. 3, le démarrage spontané de la fermentation a été vérifié dans presque tous les échantillons de raisin prélevés après les vendanges.

A l'inverse, cela a été rarement le cas pour la plupart des échantillons prélevés quelques jours avant la vendange. Dans les moûts préparés avec des raisins prélevés avant la vendange dans le vignoble A la fermentation n'a jamais démarré spontanément. Un surdosage agrochimique accidentel s'est produit en 2001, ce qui a eu pour effet de retarder le départ spontané en fermentation pour 3 des 4 échantillons prélevés après vendange (II, III et VI). Au cours des deux années suivantes, les profils de fermentation ont été similaires aux échantillons prélevés dans C et P, ce qui suggère la reconstitution de la flore intervenante.

La fermentation a démarré après six à douze jours et ce généralement avec de une à vingt souches. Apparemment, aucune corrélation entre le nombre de souches impliquées dans une fermentation et le site d'échantillonnage, l'année ou le vignoble n'a pu être trouvée. La souche la plus largement distribuée (ACP10) a également été la souche dominante dans six fermentations (AII-2002, AI-2003, AII-2003, CIII-2003, PIII-2002, PVI-2002), contribuant à hauteur de 77 à 100% (23-30 souches) de la flore levurienne totale. Cependant, son importance a été négligeable dans 5 fermentations (AI-2002, PII-2001, PII-2002, PI-2003, PVI-2003), contribuant seulement à hauteur de 3 à 10% (une à trois souches) et s'accompagnant de 1 à 16 souches différentes. La distribution de cette souche n'est pas associée avec la capacité à prédominer dans la fermentation, et la concurrence avec les souches qui l'accompagnent semble jouer le rôle clé.

Les profils d'échantillons propres à un seul vignoble et prélevés avant la vendange ne sont pas apparus sur le même site deux semaines après (P, 2001 et 2003, C, 2001) à l'exception des profils plus généralisés S1, S2, S3, S4, S5, ACP10 et P136, ce qui semble démontrer l'existence d'une flore *S. cerevisiae* très diversifiée.

#### 4. Discussion

Des enquêtes et études biogéographiques sur la diversité génétique des souches de *S. cerevisiae* isolées à partir de fermentations spontanées et menées à grande échelle démontrent la nature dynamique de ces populations. Dans l'étude présente, 297 profils génétiques différents ont été relevés parmi les 1620 isolats obtenus à partir des 54 fermentations menées à petite échelle et réalisées avec des raisins provenant de trois vignobles situés dans la Région du Vinho Verde, sur une période de 3 ans. La grande majorité des profils relevés est unique, cela démontrant la biodiversité très importante des souches de *S. cerevisiae* dans la région du Vinho Verde. Si l'on considère le rapport entre le nombre d'isolats et le nombre de profils comme étant une estimation approximative de la biodiversité de *S. cerevisiae*, nous obtenons des valeurs similaires à celles publiées précédemment dans des études portant sur la diversité génétique des souches œnologiques autochtones de *S. cerevisiae* dans d'autres régions de tradition viticole telles que Bordeaux [2], la Charente [17,45], Vallée de la Champagne et de la Loire [21], en France; El Penedéz [46], Tarragone [7], la région du Priorato [20,22] et de La Rioja [47] en Espagne; L'Allemagne et la Suisse [41]; la Toscane, la Sicile [48] et la région du Collio [49] en Italie; la région de l'Amyndeon et du Santorin[42] en Grèce; Cap ouest [16,18,43] en Afrique du Sud; et la Patagonie [19] en Argentine.

Cette étude a été menée dans une région viticole qui n'avait jamais été caractérisée avant et montrent des aspects jamais considérés dans des travaux réalisés précédemment, tel que la présentation de souches de levures commerciales et la comparaison de populations levuriennes relevées dans des échantillons de raisin prélevés avant et après la vendange.

La grande majorité des souches ne présentent pas de comportement pérenne, car la flore est caractérisée par l'apparition de nombreux nouveaux profils chaque année. Cela peut être dû à l'échantillonnage de seulement 12 x 2 kg de raisin par vignoble et année, ce qui n'est sans doute pas suffisant pour appréhender toute la richesse de la biodiversité d'une zone donnée. Une autre raison de l'apparition de nouveaux profils pourrait être attribuée aux forces de recombinaison et d'évolution, mais il semble peu vraisemblable que de tels changements se produisent d'une année sur l'autre et justifient ainsi la présence de nombreux profils distincts entre deux années consécutives. Les profils analysés par RFLP d'ADNmt sont stables quand les cellules de *S. cerevisiae* subissent de 5 à 7 divisions lors de la fermentation alcoolique (données de notre fait non publiées).

Parmi tous les profils, le ACP10 uniquement a montré une distribution régionale large avec un comportement pérenne ce qui apporte ainsi une preuve préliminaire de l'existence d'une souche propre à un terroir tel que décrit précédemment [17, 21]. Cependant, la plus large distribution d'une souche n'est pas nécessairement corrélée avec une meilleure aptitude technologique. Cela a du sens d'un point de vue écologique, étant donné que les forces sélectives qui entrent en jeu dans un vignoble sont complètement différentes de celles que la levure peut rencontrer dans un moût de raisin en fermentation. Une caractérisation physiologique plus poussée, en conditions de vinification, est nécessaire pour évaluer les potentialités de cette souche. L'apparition de cette souche n'obéit pas à un profil généralisé, mais plutôt à une présence, à une absence et à une réapparition sporadique, due aux fluctuations naturelles de population. La présence pérenne du profil ACP10 est la conséquence de sa prévalence dans la microflore locale. Au cours des différentes fermentations, la souche ACP10 s'est montrée soit dominante soit non dominante, ce qui montre que le résultat final de la fermentation dépend de la composition spécifique de la communauté levurienne dans le moût, qui est influencée par de nombreux facteurs, tel que l'effet killer. Ce dernier dépend par ailleurs grandement du ratio cellules killer/cellules sensibles au début de la fermentation [50].

Le cépage du vignoble A était le Loureiro, celui du vignoble P était l'Alvarinho et enfin, celui du vignoble C était l'Avesso. Ceci semble qu'indiquer que le cépage lui-même pourrait avoir une influence sur le grand nombre de profils différents relevés. Les pratiques œnologiques traditionnelles sont très similaires dans les 3 vignobles et les différences d'influences climatiques semblent avoir une influence mineure étant donné que les trois vignobles sont très rapprochés au niveau géographique. Cependant, les influences microclimatiques ne peuvent pas être écartées, et elles n'ont pas été enregistrées pour l'étude présente.

Une première campagne d'échantillonnage a été menée quelques jours avant la vendange, une seconde, quelques jours après la fin de la vendange. Cela a été réalisé dans un laps de temps de deux semaines environ, afin d'obtenir une vision plus détaillée de la répartition temporelle des populations de levures de fermentation lors des vendanges. Quand les raisins sont à pleine maturité, les levures sont plus abondantes. La dernière étape de la maturation du raisin peut favoriser la prolifération de levures de fermentation à la surface des baies, en raison d'une diminution d'intégrité des pellicules et de l'écoulement du moût. Les insectes sont probablement responsables des levures relevées sur les baies abîmées. La colonisation levurienne des fruits peut atteindre des valeurs d'environ 105-106 cfu/baie [51]. Avant la vendange, seulement 5% des raisins abritent des levures, tandis que ce nombre est beaucoup plus important (60%) pendant la vendange. Tel que prévu, seulement 11 des 42 échantillons prélevés avant la vendange ont fermenté spontanément. Pour les échantillons prélevés post-vendanges, ce sont 43 des 48 d'entre eux qui ont fermenté spontanément. Les souches associées sont également bien plus diversifiées dans la campagne d'échantillonnage réalisée post-vendanges (267 profils parmi 1260 isolats), comparées aux 30 profils dans les 360 isolats issus des échantillons pré-vendanges. A une exception près (profil P136), les profils de souches autochtones issues de la campagne d'échantillonnage pré-vendanges n'ont pas été retrouvés dans la campagne post-vendanges. Cela appuie ainsi l'hypothèse d'une succession variable de souches *S. cerevisiae*. Des différences peuvent être attribuées au fait que ce sont des grappes de raisin différentes qui ont été vendangées et qu'elles ont pu avoir, bien que situées très proches les unes des autres, une flore différente. Il semble improbable que l'augmentation très importante dans la variabilité des souches lors des vendanges soit due à une transmission de la flore résidente de la cave par le biais de l'équipement utilisé pour les vendanges.

Des fermentations spontanées ont été menées par une ou plusieurs souches prédominantes, seules, ou accompagnées par quelques-unes "souches" secondaires mais par de nombreuses souches" secondaires, ou encore par une communauté levurienne très hétérogène sans souche prévalente. Cela est en accord avec d'autres études qui rapportent soit la présence d'une ou deux souches prédominantes constituant plus de 50% de la biomasse totale et d'un nombre varié de souches « secondaires » [7,17,19,29,40,41] soit la présence de nombreuses souches différentes sans prévalence [22, 42]. L'apparition de ces deux situations fait également l'objet de rapports [16,18,43].

Si l'on considère que l'origine des levures œnologiques est toujours controversée [3,5,8,44], nos résultats indiquent clairement que *S. cerevisiae* apparaît dans des écosystèmes viticoles de la région du Vinho Verde en nombre suffisamment important pour mener spontanément des fermentations de moûts préparés avec approximativement 2 kg de raisins. Il faut néanmoins souligner certains points de l'approche expérimentale. Le moût de raisin crée des conditions sélectives et de stress intense pour la levure, qui sont complètement distinctes des influences environnementales de la nature. Il est ainsi clair que nos données font uniquement référence aux souches de *S. cerevisiae* capable de survivre aux conditions imposées par la fermentation, dans des conditions expérimentales, ce qui donne une vision déformée (sous estimation) du

type de souches réellement présentes dans la vigne. Etant donné que la limite de détection de notre approche expérimentale est de 3.3% (1 souche dans 30 isolats), quelques rares souches, bien que capables de survivre à la fermentation, peuvent ne pas avoir été non plus détectées. Chercher *S. cerevisiae* dans 18 sites, deux campagnes et 3 années consécutives, en utilisant la méthode d'étalement direct pour les baies d'un seul raisin, tel que décrit [3] serait un travail très laborieux. Nous considérons donc notre approche comme un compromis acceptable, donnant une bonne estimation de la composition de la population levurienne. Notre approche ne permet cependant pas de donner une description précise en termes d'abondance relative des souches dans la nature.

Cette étude est la première approche à grande échelle sur les souches associées à un vignoble spécifique dans la région du Vinho Verde au Portugal. Il s'agit d'une approche utile qui apporte une vision plus approfondie de l'écologie et la biogéographie des souches de *S. cerevisiae*, même dans des zones proches géographiquement. Nous considérons ce type d'études comme indispensables au développement de stratégies visant à préserver la biodiversité et les ressources génétiques car elles peuvent servir de base au développement de nouvelles souches.

### **Remerciements**

*Cette étude a été soutenue par le projet ENOSAFE (N° 762, Programme AGRO, medida 8) et la subvention n°657 C2 de l'accord de coopération signé entre l'Institut Portugais pour la Coopération Scientifique et Technologique Internationale (ICCTI) et l'Ambassade Française de Lisbonne. Nous avons grandement apprécié l'aide apportée aimablement par les œnologues Rui Cunha, Anselmo Mendes, Euclides Rodrigues et José Domingues, qui ont facilité les campagnes d'échantillonnage menées dans les trois vignobles. Nous remercions également Ana Rodrigues, Luis Quintas et Carlos Rocha pour nous avoir aidés à ramasser les raisins et traiter les échantillons.*



SCHULLER, RECENSEMENT ECOLOGIQUE DE SOUCHES DE LEVURES, 9

	Site	Number of isolates	Number of distinct patterns	Number of unique patterns	Common patterns		
<i>Vineyard A</i>							
2001	E	AI AII AIII AIV AV AVI	NF	-	-		
	L	AI AIV AVI AII AIII AV	90	2 8 1	10	A06	
2002	E	AI AII AIII AIV AV AVI	NC	-	-		
	L	AI AII AIII AIV AV AVI	180	16 2 9 6 9 1	34	ACP10 A06 A11 ACP10 A11 A13 A06 A13 A13	
	E	AI AII AIII AIV AV AVI	NF	-	-		
	L	AI AII AIII AIV AV AVI	180	3 1 9 12 19 2	41	ACP10 S3 ACP10 S3 A06	
	E	AI AII AIII AIV AV AVI	NF	-	-		
	L	AI AII AIII AIV AV AVI	180	3 1 9 12 19 2	41	ACP10 S3 ACP10 S3 A06	
<i>Vineyard C</i>							
2001	E	CI CII CIII CIV CV CVI	90	- 5 4 1	2	- S1 S2 S3 S4 S5 S4 S5 S1	
	L	CI CII CIII CIV CV CVI	150	- 20 4 2 4 8	24	- S5 S1 S4 S5 S3 S5 S1 S3 S4 S5 S1 S2 S4 S5	
	E	CI CII CIII CIV CV CVI	NC	- 30 -	- 1 -	- 1 -	
	L	CI CII CIII CIV CV CVI	NC	- -	- -	- -	
	2003	E	CI CIII CIV CV CVI	NF	-	-	
		L	CI CII CIII CIV CV CVI	180	3 8 3 1 18 9 2	32	- S3 S4 C69P77 C63 C63 ACP10 S1, C42P80 - S4
		E	PI PII PIII PIV PV PVI	60	2 2 -	2	P136 P136 -
		L	PI PII PIII PIV PV PVI	180	6 17 8 21 15 13	62	S3 S5 S6 P136 S3 S6 ACP10 P03 P136 - P03 P24 P50 P136 S3 P24 S3 S6 P136
E		PI PII PIII PIV PV PVI	NC	- -	- -	- -	
L		PIV	NF	-	-	-	
<i>Vineyard P</i>							

	Site	Number of isolates	Number of distinct patterns	Number of unique patterns	Common patterns	
2003	E	P1	150	5	12	
		P11		4		ACP10 S6 P136
		P111		1		ACP10
		PV		10		S3 S6 P50 P136
		PVI		1		ACP10
		P1V PV	NF	-	-	-
	L	P1	120	10	12	-
		P11		1		-
		P111		1		P136
		PVI		2		ACP10
		P1	180	15	47	ACP10, S3 C69P77
		P11		1		-
		P111		9		P136
		P1V		18		S3
PV		5		C42P80		
PVI		5		-		

E – Pré-vendanges; L – Post-vendanges; NF – Pas de fermentation spontanée; NC – non ramassé

Tableau 1 Analyse MtDNA RFLP de 1620 isolats de levure de moût fermenté préparés avec des raisins ramassés dans les vignobles A, C et P de la Région du Vinho Verde, indiqué dans la Fig. 1, lors des vendanges de 2001, 2002 et 2003

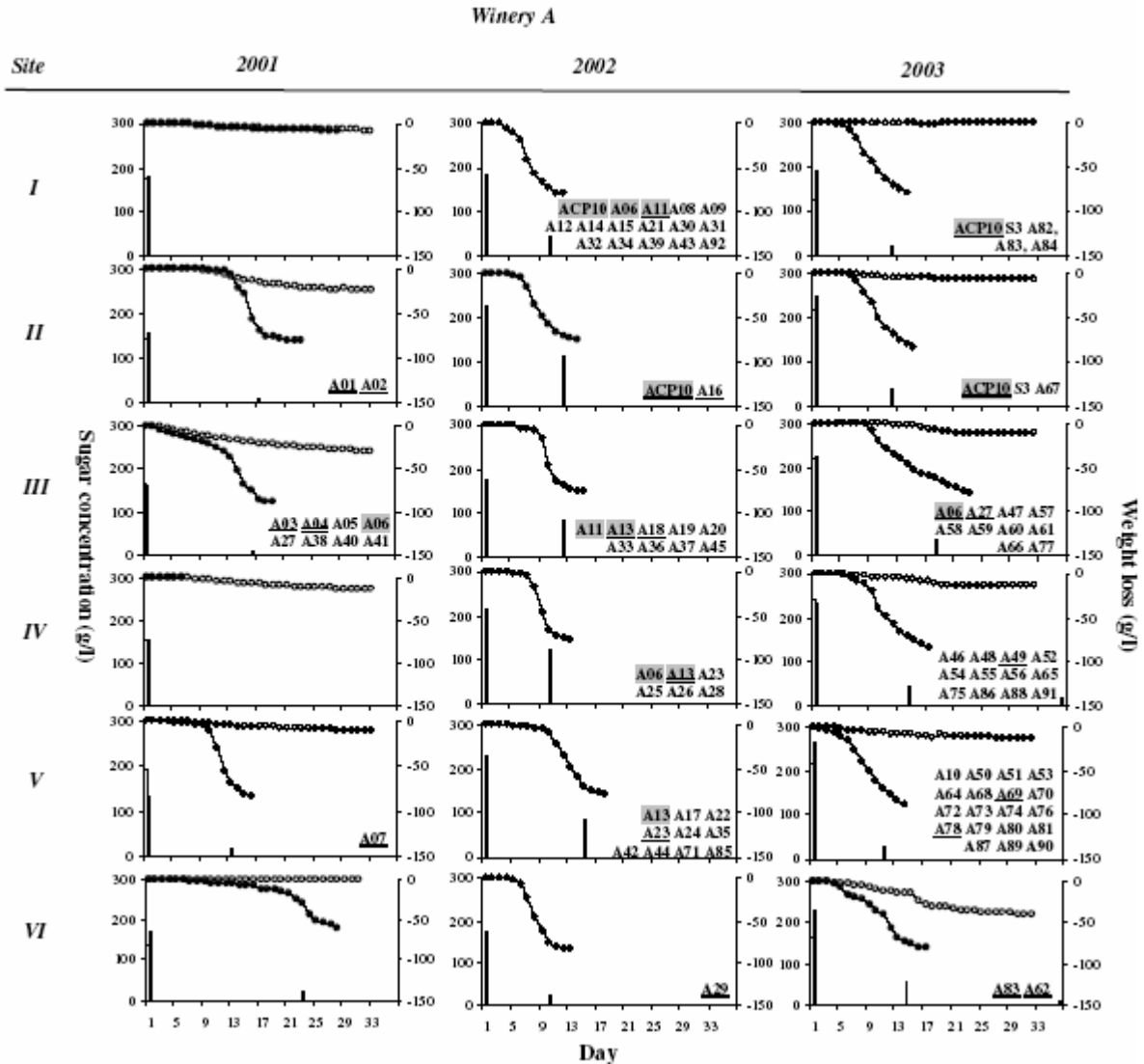


Fig. 3. Profil de fermentation (lignes) et contenu en sucre (barres) de moûts réalisées avec des échantillons prélevés en période pré-vendanges (cercles ouverts et barres) et post-vendanges (cercles fermés et barres) à partir desquels les souches analysées dans cette étude ont été isolées. Pour chacun des lots, les désignations de profils ADNmt RFLP des isolats de levure sont insérées. Les souches prédominantes sont soulignées deux fois (P50%) ou une fois (20-50%). Les désignations de profils des fermentations réalisées avec des échantillons prélevés en période post-vendanges sont en gras. Les profils communs sont surlignés en gris.

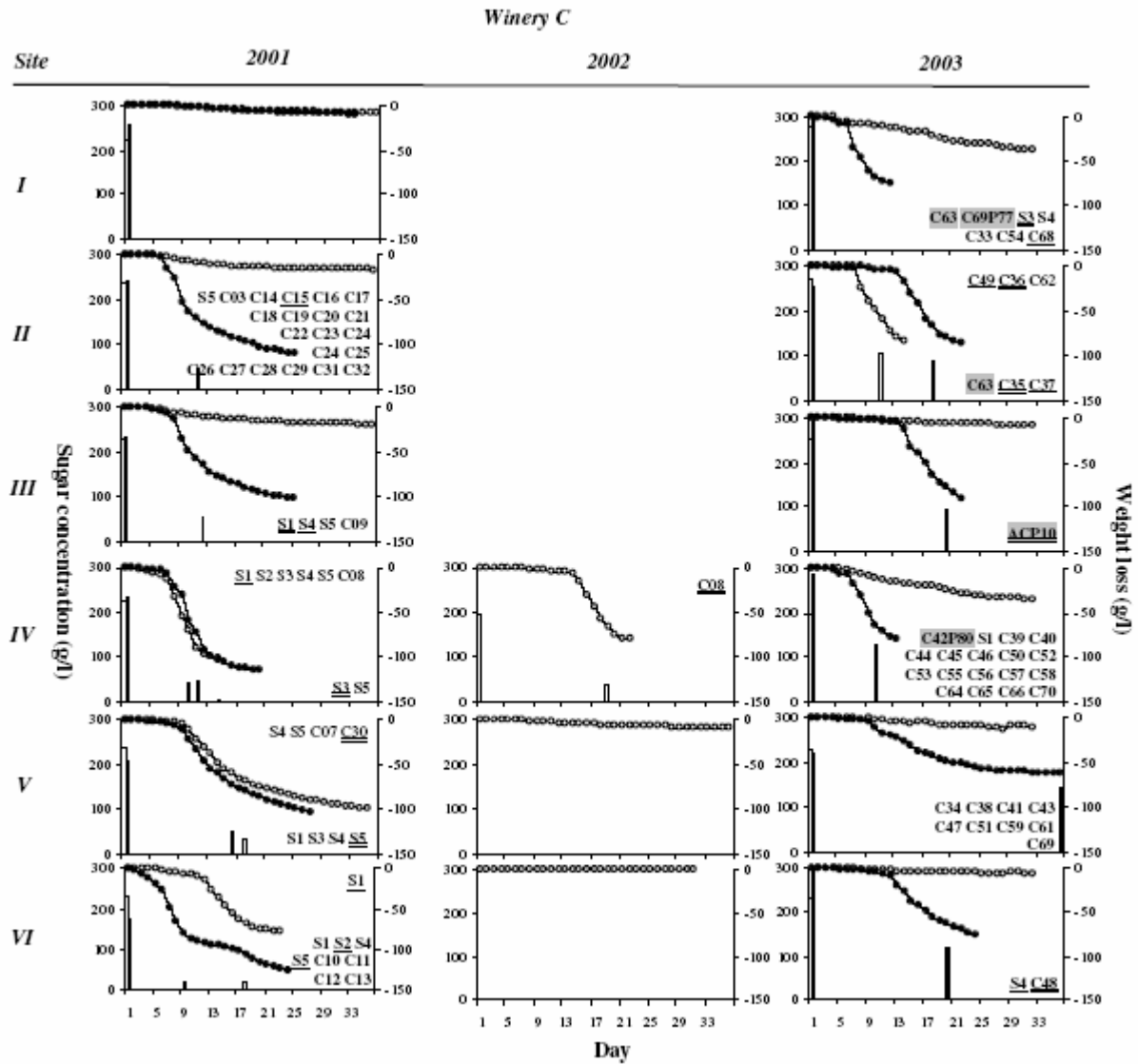


Fig.3 (suite)

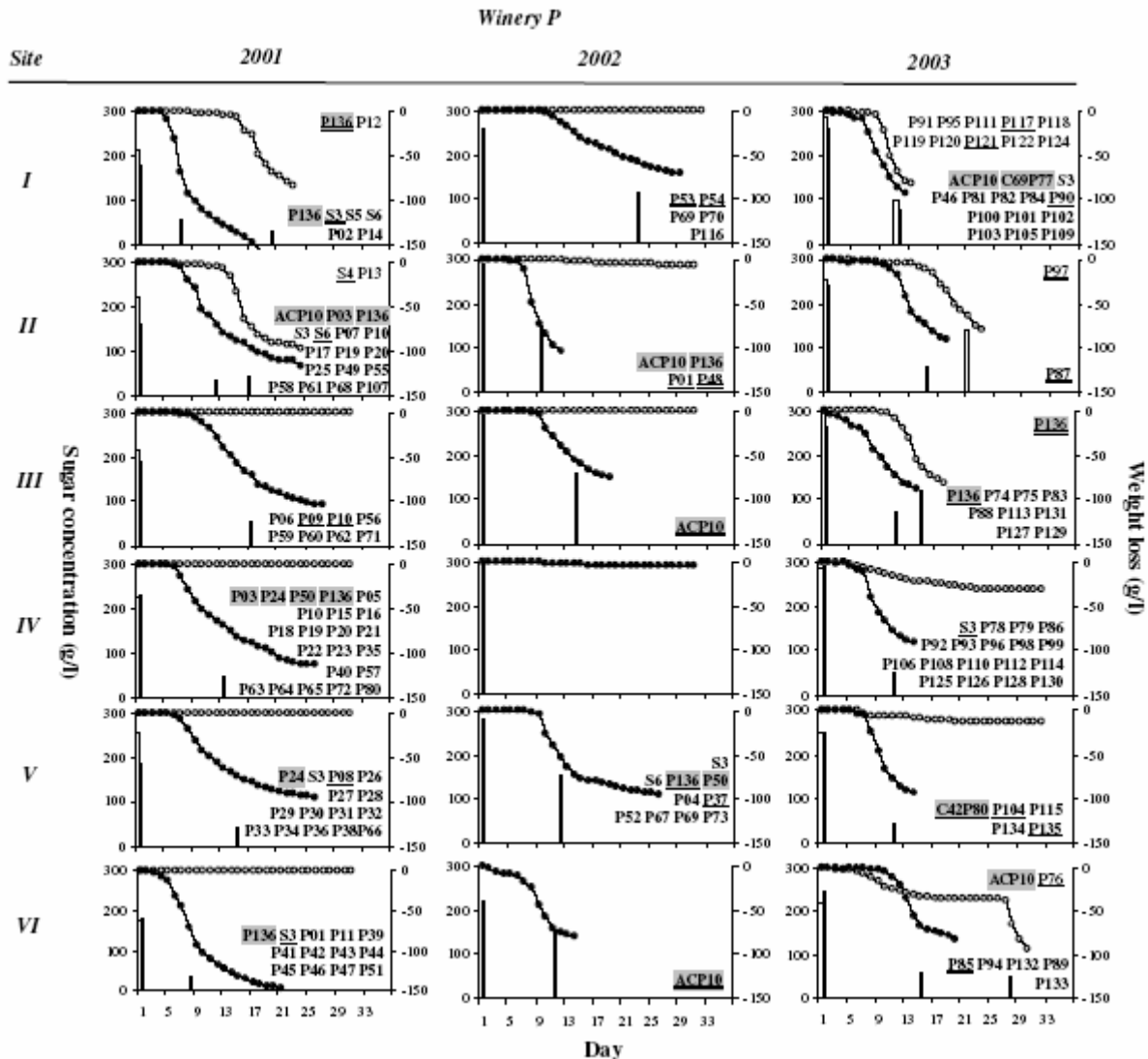


Fig.3 (suite)

**Bibliographie**

- [1] Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeasts: growth during fermentation In: Wine Microbiology and Biotechnology (Fleet, G.H., Ed.), pp. 27–55. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- [2] Frezier, V. and Dubourdieu, D. (1992) Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 375–380.
- [3] Martini, A., Ciani, M. and Scorzetti, G. (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435–440.
- [4] Parish, M.E. and Carroll, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165–169.
- [5] Mortimer, R. and Polsinelli, M. (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199–204.
- [6] Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. and Guillamon, J.M. (2002) Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* 157, 267–274.
- [7] Constanti, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A. and Guillamon, J.M. (1997) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am. J. Enol. Vitic.* 48, 339–344.

- [8] Vaughan-Martini, A. and Martini, A. (1995) Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 14, 514–522.
- [9] Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. and Villa, T.G. (1991) Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from northwest Spain. *Am. J. Enol. Vitic.* 42, 141–144.
- [10] Beltran, G., Torija, M.J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J.M., Rozes, N. and Mas, A. (2002) Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst. Appl. Microbiol.* 25, 287–293.
- [11] Monteil, H., Blazy-Mangen, F. and Michel, G. (1986) Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Science des Aliments* 6, 349–360.
- [12] Rosini, G. (1982) Influenza della microflora saccaromicetica della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva. *Vigne Vini* 9, 43–46.
- [13] Pretorius, I.S., van der Westhuizen, T.J. and Augustyn, O.H.P. (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 20, 61–74.
- [14] Martini, A., Frederichi, F. and Rosini, G. (1980) A new approach to the study of yeast ecology on natural substrates. *Can. J. Microbiol.* 26, 856–859.
- [15] Farris, G.A., Budroni, M., Vodret, T. and Deiana, P. (1990) Sull'origine dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, delle foglie e degli acini di alcuni vigneti sardi. *L'Enotecnico* 6, 99–108.
- [16] van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.H.P., Khan, W. and Pretorius, I.S. (2000) Seasonal variation of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 10–16.
- [17] Versavaud, A., Courcoux, P., Roulland, C., Dulau, L. and Hallet, J.-N. (1995) Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from the wine-producing area of Charentes, France. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3521–3529.
- [18] van der Westhuizen, T.J., Augustyn, O.H.P. and Pretorius, I.S. (2000) Geographical distribution of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the coastal regions of the western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 3–9.
- [19] Lopes, C.A., van Broock, M., Querol, A. and Caballero, A.C. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast populations in a cold region in Argentinean Patagonia. A study at different fermentation scales. *J. Appl. Microbiol.* 93, 608–615.
- [20] Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M. and Mas, A. (2001) Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 79, 345–352.
- [21] Vezinhet, F., Hallet, J.-N., Valade, M. and Poulard, A. (1992) Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43, 83–86.
- [22] Sabate, J., Cano, J., Querol, A. and Guillamon, J.M. (1998) Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: analysis for two consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 452–455.
- [23] Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274, 546.
- [24] Carro, D., Garcia-Martinez, J., Pe´rez-Ortin, J.E. and Pina, B. (2003) Structural characterization of chromosome I size variants from a natural yeast strain. *Yeast* 20, 171–183.
- [25] Pe´rez-Ortin, J.E., Garcia-Martinez, J. and Alberola, T.M. (2002) DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J. Biotechnol.* 98, 227–241.
- [26] Pe´rez-Ortin, J.E., Querol, A., Puig, S. and Barrio, E. (2002) Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptive evolution of yeast strains. *Genome Res.* 12, 1533–1539.
- [27] Blondin, B. and Vezinhet, F. (1988) Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus en e´lectrophorese en champs pulse´e. *Rev. Fr. Oenol.* 28, 7–11.
- [28] Lopez, V., Querol, A., Ramon, D. and Fernandez-Espinar, M.T. (2001) A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 75–81.
- [29] Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramon, D. (1992) Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2948–2953.
- [30] Fernandez-Espinar, M.T., Querol, A. and Ramon, D. (2000) Molecular characterization of yeast strains by mitochondrial DNA restriction analysis In: *Methods in Biotechnology* (Spencer, J.F.T. and Ragout de Spencer, A.L., Eds.), pp. 329–333. Humana Press, Totawa.

- [31] Querol, A., Barrio, E. and Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst Appl. Microbiol.* 15, 439–446.
- [32] Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. and Dulau, L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89–94.
- [33] Legras, J.L. and Karst, F. (2003) Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249–255.
- [34] Gallego, F.J., Perez, M.A., Martinez, I. and Hidalgo, P. (1998) Microsatellites obtained from database sequences are useful to characterize *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 350–351.
- [35] Hennequin, C., Thierry, A., Richard, G.F., Lecointre, G., Nguyen, H.V., Gaillardin, C. and Dujon, B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 551–559.
- [36] Pérez, M.A., Gallego, F.J., Martinez, I. and Hidalgo, P. (2001) Detection, distribution and selection of microsatellites (SSRs) in the genome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as molecular markers. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 461–466.
- [37] Schuller, D., Valero, E., Dequin, S. and Casal, M. (2004) Survey of molecular methods for the typing of wine yeast strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 19–26.
- [38] Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (1990) *Yeast. Characteristics and Identification.* Cambridge University Press, New York.
- [39] Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428.
- [40] Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. and Ramon, D. (1992) Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante Wines – selection and DNA patterns. *J. Food Sci.* 57, 183.
- [41] Schüttz, M. and Gafner, J. (1993) Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 551–558.
- [42] Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. and Typas, M.A. (2000) Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J. Appl. Microbiol.* 89, 236–248.
- [43] Khan, W., Augustyn, O.H.P., van der Westhuizen, T.J., Lambrechts, M.G. and Pretorius, I.S. (2000) Geographic distribution and evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from vineyards in the warmer, inland regions of the Western Cape in South Africa. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 17–31.
- [44] Martini, A. (2003) Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Microbiol.* 6, 207–209.
- [45] Versavaud, A., Dulau, L. and Hallet, J.-N. (1993) Etude écologique de la microflore levurienne spontanée du vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenol.* 142, 20–29.
- [46] Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F. and Querol, A. (2000) Selection and molecular characterization of wine yeasts isolated from the «El Penedes» area (Spain). *Food Microbiol.* 17, 553–562. 176 D. Schuller et al. / *FEMS Microbiology Ecology* 51 (2005) 167–177
- [47] Gutierrez, A.R., Santamaria, P., Epifanio, S., Garijo, P. and Lopez, R. (1999) Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 411–415.
- [48] Cavalleri, D., Barberio, C., Casalone, E., Pinzauti, F., Sebastiani, F., Mortimer, R. and Polsinelli, M. (1998) Genetic and molecular diversity in *Saccharomyces cerevisiae* natural populations. *Food Technol. Biotechnol.* 36, 45–50.
- [49] Comi, G., Maifreni, M., Manzano, M., Lagazio, C. and Cocolin, L. (2000) Mitochondrial DNA restriction enzyme analysis and evaluation of the enological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from grapes of the wine-producing area of Collio (Italy). *Int. J. Food Microbiol.* 58, 117–121.
- [50] Heard, G.M. and Fleet, G.H. (1986) Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol. Austral.* 38, 22–25.
- [51] Fleet, G.H. (2002) The yeast ecology of wine grapes In: *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts* (Ciani, M., Ed.), pp. 1–19. Research Signpost, Trivandrum, India.
- [52] Rosini, G., Frederichi, F. and Martini, A. (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8, 83–89.