

ESTUDO ECOLÓGICO DAS ESTIRPES *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* NUMA VINHA DA REGIÃO DOS VINHOS VERDES EM PORTUGAL

Dorit Schuller^a, Hugo Alves^a, Sylvie Dequin^b, Margarida Casal^a

^a Departamento de Biologia, Centro de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal

^b Institute National de la Recherche Agronomique, UMR Sciences pour l'Oenologie, Montpellier, France

Para não sobrecarregar o texto, o Quadro 1 e a Figura 3 encontram-se no fim do artigo

Os valores entre parêntesis fazem referência à bibliografia no fim do artigo.

1. Introdução

Tradicionalmente a fermentação ocorre com as leveduras autóctones que ou estão presentes nas uvas durante a vindima ou são introduzidas pelo equipamento na adega durante o processo de vinificação.

Estudos recentes indicam que as espécies predominantes nas uvas são leveduras apiculadas como *Hanseniaspora uvarum* (e a sua forma anamórfica *Kloeckera apiculata*) e espécies oxidativas como *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* e *Rhodotorula* [1].

Contrariamente as espécies fermentativas do género *Saccharomyces*, sobretudo *Saccharomyces cerevisiae*, em bagos são, intactos e nos solos aparecem em números extremamente baixos enquanto que as uvas danificadas são uma fonte importante de *S. cerevisiae* [5].

O predomínio de estirpes pertencentes a esta espécie está bem documentado na flora residente das adegas [6–10].

A flora de leveduras presente nas uvas depende de uma vasta gama de factores tais como as condições climáticas entre as quais temperatura e queda de chuva, localização geográfica da vinha [4,9], aplicações de fungicidas [11] e variedade e idade da vinha [12–14] bem como o tipo de solo [15].

Vários estudos de âmbito ecológico usando métodos de identificação molecular relatam uma grande diversidade de padrões genéticos na flora de fermentação enológica. Numa certa região as estirpes *S. cerevisiae* estão largamente distribuídas [16-19] e podem ser encontradas em anos consecutivos [20-21] e há ainda estirpes predominantes na flora de fermentação [2,22] o que apoia a ideia que estirpes específicas estão associadas ao conceito de “terroir”.

Algumas leveduras de arranque “starters” são hoje largamente utilizadas uma vez que possuem boas capacidades fermentativas e enológicas, contribuindo para a padronização do processo de fermentação e aumento da qualidade do vinho. Nos anos a seguir à publicação da sequência do genoma *S. cerevisiae* [23] foram demonstradas substanciais diferenças genéticas entre as estirpes de leveduras [24-26]. Por isso, a exploração da biodiversidade das estirpes de fermentação indígenas pode dar um importante contributo para a percepção e selecção de estirpes com fenótipos específicos.

A diversidade genética das estirpes *S. cerevisiae* tem sido analisada através de vários métodos tais como a análise dos cariótipos por electroforese em gel de campo pulsado [27], análises de restrição mitocondrial de DNA (mtDNA RFLP) [28-31], impressões digitais baseadas na repetição de sequências delta [32-33], genotipificação de microsatélite [34-36]. Schuller *et al.* [37] mostraram recentemente que o tipo microsatélite usando 6 *loci* [36] diferentes, uma análise de sequência interdelta optimizada e RFLP de DNA mitocondrial gerado pela enzima *Hinfl* tinham o mesmo poder discriminatório. No presente trabalho as análises mtDNA RFLP usando *Hinfl* foram aplicadas como marcador genético de diferenciação de estirpes *S. cerevisiae*. O objectivo do presente trabalho é determinar a biodiversidade da flora de fermentação nas vinhas da Região de Vinho Verde, no sentido de definir estratégias em futuros

programas de selecção de estirpes. Outro objectivo é definir uma colecção de estirpes que possa contribuir para a preservação dos recursos genéticos de *S. cerevisiae*.

2. Material e Métodos

2.1. Amostragem

A amostragem incluiu um total de 18 pontos em três vinhas próximas de uma adega localizada no noroeste de Portugal (Região Demarcada dos Vinhos Verdes). Em cada vinha foram definidos seis pontos de amostragem tendo em conta a geografia da vinha, a distância entre a adega e os pontos de amostragem variava entre 20 e 400 m, como se mostra na Fig.1. Foram realizadas duas campanhas de amostragem antes (primeira etapa) e depois (última etapa) da vindima, com um intervalo temporal de cerca de 2 semanas, de modo a determinar a diversidade entre as comunidades de leveduras de fermentação no último estágio de maturação das uvas e na vindima. Esta experiência foi repetida em três anos consecutivos (2001-2003). As amostras não foram sempre colhidas da mesma planta, mas sim da mesma área ($\pm 1-2$ m). As castas utilizadas foram Loureiro (Vinha A), Alvarinho (Vinha P) e Avesso (Vinha C), sendo todas castas brancas usadas na Região do Vinho Verde.

2.2. Fermentação e isolamento de estirpes

Foram asepticamente colhidas cerca de 2 Kgs de uvas de cada ponto de amostra, e o mosto extraído fermentou a 20 °C em pequenos depósitos (500 ml) com rotação mecânica (20 rpm). A evolução da fermentação foi monitorizada com determinações da perda diária de mosto. Quando se observava uma redução de 70 g/L correspondendo a um consumo de cerca de 2/3 dos açúcares, foram distribuídas amostras diluídas (10^{-4} e 10^{-5}) em placas com meio YPD (*extracto de levedura, 1% p/v, peptona, 1% p/v, glucose 2% p/v, agar 2%, p/v*), tendo sido recuperadas após incubação (2 dias, 28°C) 30 colónias aleatoriamente escolhidas. Os isolamentos obtidos da fermentação foram conservados em glicerol (30%, v/v) a -80 °C durante o estudo.

2.3. Isolamento de DNA

As células de leveduras foram cultivadas num meio YPD (36 h, 28 °C, 160 rpm), e o isolamento de DNA decorreu como descrito [28] com um procedimento modificado de lise celular, usando 25 U de zymolase (SIGMA). A lise celular dependeu da estirpe e durou entre 20m e 1 h (37°C). O DNA foi utilizado em análises RFLP mitocondrial.

2.4. RFLP de DNA mitocondrial

As reacções de restrição ocorreram como descrito [37]. As designações atribuídas aos diferentes padrões observados foram A1-A93, C1-C62, P1-P135, que correspondem aos isolamentos obtidos das vinhas A, C e P respectivamente. As designações dos padrões ACP10 referem-se a uma estirpe comum a todas as vinhas e C69P77 e C42P80 foram descritas em estirpes comuns às vinhas C e P. Os perfis dos padrões que eram idênticos aos das leveduras de arranque comerciais usadas nas adegas são designados S1-S6. Uma estirpe representativa de cada um dos 297 padrões foi concebida e testada para uma prova de crescimento num meio contendo lisina como a única fonte de azoto [38].

2.5. Métodos analíticos

A concentração de açúcar foi determinada pelo método dinitrosalicílico descrito anteriormente [39].

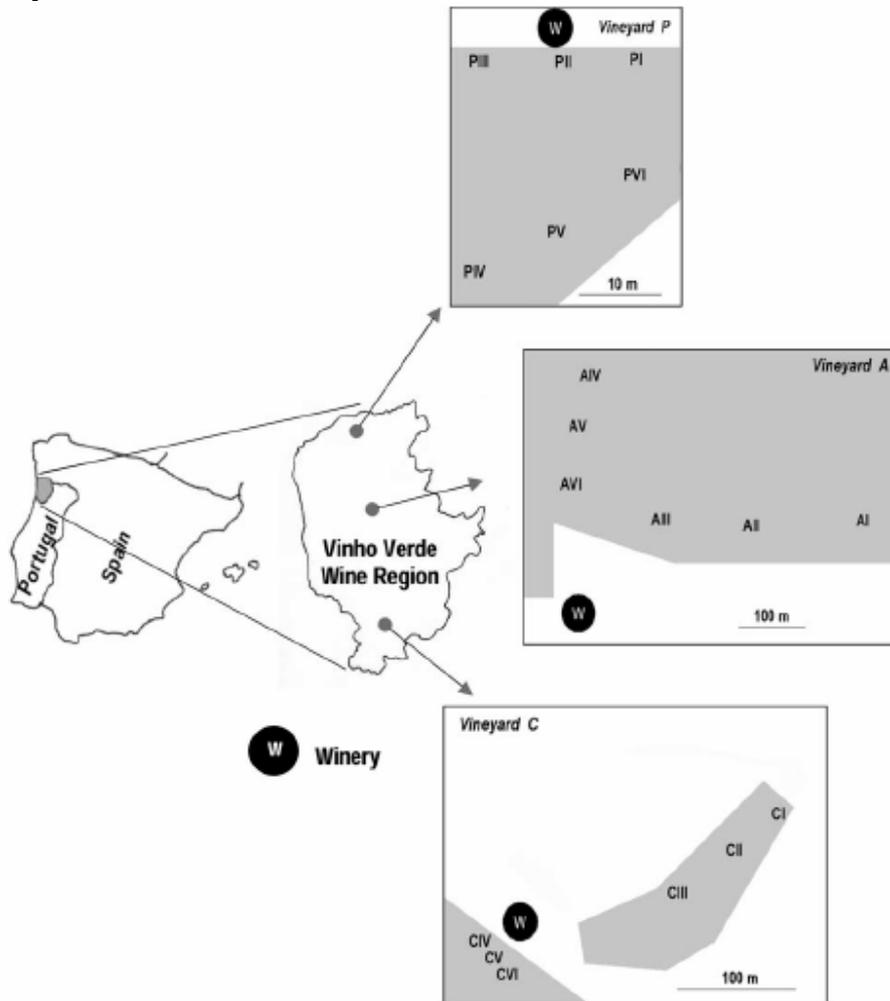


Fig.1. Localização geográfica das três vinhas A, C e P na Região dos Vinhos Verdes com indicação das adegas e dos correspondentes locais de amostra PI–PVI, AI–AVI e CI–CVI.

3. Resultados

Neste estudo, foram acompanhadas 3 vinhas situadas na Região dos Vinhos Verdes no noroeste de Portugal durante as Vindimas 2001-2003 (Fig.1). De modo a obter um quadro mais detalhado da distribuição temporal das leveduras de fermentação, realizaram-se duas recolhas de amostras, uma antes e outra depois da vindima, com um intervalo de tempo de duas semanas. Foram programadas um total de 108 amostras de uvas (seis pontos de amostra, duas recolhas de amostra, três vinhas, três anos), das quais 54 começaram espontaneamente a fermentação, 36 não foram capazes de iniciar a fermentação após 30 dias de incubação, enquanto que 18 não foram recolhidas devido a más condições climáticas e mau estado sanitário das uvas em 2002. Das 54 fermentações isolaram-se 1620 leveduras. Todos os

organismos isolados foram analisados pelo seu mtDNA RFLP (*Hinf*I) e um perfil de padrão foi atribuído a cada caso isolado, resultando um total de 297 perfis diferentes.

A contagem total das leveduras (ufc em meio YDP) variou entre 1.0×10^6 e 8.0×10^7 ufc/ml mosto, correspondendo a valores genericamente descritos para a fermentação de mostos. Todos os microrganismos isolados pertenciam à espécie *S. cerevisiae* devido à sua incapacidade para crescer num meio contendo lisina como única fonte de azoto e à sua capacidade de amplificar 6 *loci* microsátélites específicos. Nenhum ou apenas 1 *loci* foi amplificado noutra espécie de *Saccharomyces* presente no vinho como a *S. paradoxus* e *S. bayanus* respectivamente. Não foi observada nenhuma amplificação nas espécies que estão presentes geralmente no primeiro estágio de fermentação, tal como a *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens* e *Kloeckera apiculata* (não mostradas).

Os resultados de mtDNA RFLP para os 1620 casos isolados estão resumidos no Quadro 1. Do total de 450 casos isolados recolhidos na vinha A, 93 correspondem a padrões únicos, enquanto que na C e P um total de 450 e 690 estirpes foram isoladas, correspondendo a 62 e 135 padrões únicos respectivamente.

Para 11 padrões comuns encontrados em mais de uma fermentação (Quadro 1, Fig 2) e também para 6 leveduras de arranque comerciais (S1-S6), confirma-se uma distribuição geográfica e temporal mais ampla.

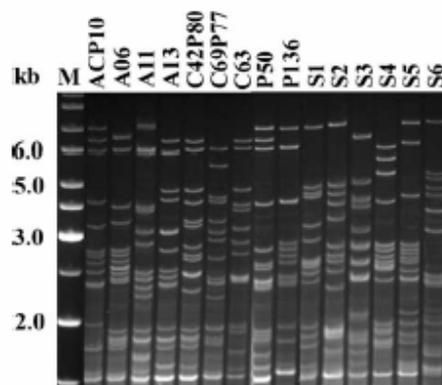


Fig. 2 Exemplos de padrões comuns de DNA RFLP (*hin*fI) mitocondrial, como descrito no Quadro 1 encontrado em estirpes de leveduras isoladas de fermentação espontânea de mostos colhidos conforme descrito na secção 2.

Os padrões S1-S6 correspondem a leveduras de arranque comerciais que tinham sido usadas na adega nos últimos anos. Estirpes perenes foram associadas a vários pontos de uma mesma vinha (padrões A06 e S6, P136, P50), mas também mostraram uma distribuição mais ampla em 2 ou 3 vinhas (padrões S3, S4 e ACP10). Padrões S1, S2, C63, A11, A13, P03 e P24 foram encontrados apenas num ano, mas em vários pontos de amostra dentro da mesma vinha, enquanto que a cepa S5 tinha uma distribuição mais ampla em vários pontos de amostra nas vinhas C e P. O padrão ACP10 corresponde à única estirpe "regional" isolada com maior distribuição geográfica, enquanto que A06, A11, A13, C63, P03, P27, P50 e P136 podem ser consideradas como "estirpes de vinha" devido à sua presença em vários pontos e/ou anos. O clima húmido no Verão de 2002, deu origem a várias contaminações de fungos e fortes tratamentos químicos. Possivelmente foi esta a razão por apenas terem sido identificados 12 padrões únicos entre as 150 estirpes colhidas na última etapa de 2002 na vinha P. Em 2003 a relação foi novamente mais parecida com a encontrada em 2001 (47 e 62 padrões únicos entre cada 180 isolamentos da última etapa de amostra na vinha P).

Como se mostra na Fig. 3, verificou-se uma fermentação espontânea em todas as amostras de uvas colhidas na última recolha de amostras. Isto ocorreu raramente para a maioria das amostras colhidas alguns dias antes da vindima. O mosto preparado com uvas colhidas na primeira etapa na vinha A, nunca começou espontaneamente a fermentação. Em 2001 ocorreu uma sobre dosagem agroquímica acidental, resultando num atraso da fermentação espontânea em três ou quatro amostras pós-vindima (II,III,IV). Nos dois anos seguintes, o perfil de fermentação foi idêntico para as amostras C e P, dando a entender a recuperação da flora interveniente.

A fermentação começou após seis a doze dias, geralmente por uma ou 20 estirpes. Aparentemente não foi encontrada nenhuma correlação entre o nº de estirpes envolvidas na fermentação e o local de amostra, ano ou vinha. A estirpe mais amplamente distribuída (ACP10) foi dominante em seis fermentações (AII-2002, AI-2003, AII-2003, CIII-2003, PIII-2002, PVI-2002) contribuindo para 77-100% (23-30) estirpes do total da flora de leveduras, mas foi de menor importância em cinco fermentações (AI-2002, PII-2001, PII-2002, PI-2003, PVI-2003), contabilizando apenas 3-10% (uma ou três estirpes) e foi acompanhada por uma a dezasseis estirpes diferentes. A distribuição de estirpes não está associada à capacidade para dominar a fermentação mas a competição entre estirpes parece ter um papel preponderante. Padrões com características para determinadas vinhas das amostras colhidas na primeira etapa não apareceram após duas semanas no mesmo local (P, 2001 and 2003, C, 2001) com a excepção dos padrões mais generalizados S1, S2, S3, S4, S5, ACP10 e P136, apoiando a diversidade da flora *cerevisiae*.

3. Discussão

Os panoramas biogeográficos em grande escala e os estudos sobre diversidade genética de estirpes *S. cerevisiae* isoladas a partir de fermentação espontânea permitiram documentar a dinâmica natural destas populações. Neste estudo foram encontrados 297 padrões genéticos entre 1620 isolamentos, obtidos de 54 mini-fermentações ocorridas com uvas de três vinhas localizadas na região dos Vinhos Verdes, durante um período de 3 anos. A grande maioria de padrões foi única, demonstrando a enorme biodiversidade de estirpes *S. cerevisiae* na região dos vinhos verdes. Considerando a relação entre o nº de casos isolados e o nº de padrões como uma estimativa aproximada da biodiversidade, os nossos resultados mostram valores similares a estudos publicados anteriormente sobre diversidade genética de estirpes enológicas autóctones *S. cerevisiae* noutras regiões com tradição vitícola como Bordeaux [2], Charentes [17,45], Campagne e Vale do Loire [21], em França; El Penedéz [46], Tarragona [7], Priorato [20,22] e La Rioja [47] em Espanha; Alemanha e Suíça [41]; Toscana, Secília [48] e Collio [49] em Itália; Amyndeon e Santorini [42] na Grécia; Western Cape [16,18,43] na África do Sul; e Patagonia [19] na Argentina.

Este estudo ocorreu numa região vitícola que nunca tinha sido caracterizada antes e inclui aspectos que não foram considerados em trabalhos anteriores como o aparecimento de várias estirpes de leveduras comerciais e a comparação entre as populações de leveduras que podem ser encontradas nas uvas antes e após vindima.

A grande maioria de estirpes não mostrou um comportamento perene, sendo a flora de cada ano caracterizada pelo aparecimento de vários novos padrões. Isto pode ser atribuído à amostra de apenas 12.2 kg de uvas por vinha e por ano, não sendo suficiente para abranger toda a grande biodiversidade de uma dada área. Outra razão para o aparecimento de novos padrões poderá ser atribuída à recombinação e às forças evolutivas mas parece ser inverosímil

que estas mudanças ocorram de um ano para o outro para justificar a presença de vários padrões distintos em anos consecutivos. Os padrões de DNA RFLP mitocondrial são estáveis quando as células de *S. cerevisiae* experimentam cerca de 5 a 7 divisões durante a fermentação alcoólica (dados nossos não publicados).

Entre todos os padrões, apenas ACP10 mostrou uma ampla distribuição regional com um comportamento contínuo que proporciona provas preliminares da existência de uma estirpe que representa um “terroir” como descrito (17,21). Contudo, a ampla distribuição de uma estirpe não está necessariamente relacionada com uma melhor atitude tecnológica. Isto faz sentido do ponto de vista ecológico, uma vez que as forças selectivas que actuam numa vinha são completamente diferentes das que a levedura pode encontrar no mosto de fermentação das uvas. Para avaliar o potencial destas estirpes é necessário estudar melhor a caracterização fisiológica nas condições de vinificação. O aparecimento desta estirpe não obedeceu a um padrão generalizado, mas a aparecimentos, ausências e reaparecimentos esporádicos devido às flutuações naturais da população. O aparecimento perene do padrão ACP10 é consequência do seu predomínio na microflora local. Em diversas fermentações, ACP10 foi dominante ou não, mostrando que o resultado final da fermentação dependia da composição específica da comunidade de leveduras no mosto, que é influenciada por vários factores como o efeito *Killer* que depende fortemente da relação entre leveduras *Killer* e sensíveis no início da fermentação [50].

A casta da vinha A era Loureiro, sendo Alvarinho e Avesso as da vinha P e C respectivamente, o que indica que a variedade da casta pode contribuir para encontrar tantos padrões distintivos. As práticas de vinificação tradicionais são muito similares em A, C e P, e a influência das diferenças climáticas parece ser insignificante uma vez que as três vinhas são próximas. Contudo, as influências microclimáticas, não apresentadas no presente estudo, não podem ser esquecidas.,

Realizou-se uma primeira campanha de recolha de amostras alguns dias antes da vindima, e a segunda uns dias após o fim da vindima. Isto ocorreu com um intervalo de tempo de cerca de duas semanas, de modo a obter um quadro mais detalhado da distribuição temporal das populações de leveduras de fermentação durante a vindima.

Quando as uvas atingiram a maturação completa, as leveduras tornaram-se mais abundantes. O último estágio de maturação, pode favorecer a proliferação de leveduras de fermentação na superfície da uva, devido à diminuição da integridade da película da uva e à saída de mosto dos bagos. Os insectos são a fonte provável de leveduras nas uvas danificadas.

A colonização das leveduras nas uvas pode atingir valores na ordem de 10^5 - 10^6 ufc/bago [51]. Antes da vindima, apenas 5% das uvas são portadoras de leveduras, enquanto que este número é muito maior (60%) durante a vindima [52]. Como esperado, apenas 11 das 42 amostras pré-vindima (26%) conseguiram começar espontaneamente a fermentação, contrastando com 43 a 48 amostras pós-vindima (90%). As estirpes associadas eram também muito mais diversificadas na última campanha de amostra (267 padrões em 1260 isolados), comparando com a primeira campanha (30 padrões em 360 isolados). Apenas uma excepção (padrão P136), os padrões de estirpes autóctones da primeira campanha de amostra não apareceram na última, o que abona a favor da sucessão de estirpes *S. cerevisiae*. Como alternativa, as diferenças podem ser atribuídas ao facto de diferentes cachos de uvas vindimados terem uma flora distinta apesar da proximidade uns dos outros. Parece pouco provável que o enorme aumento na variedade de estirpes durante a vindima seja devido a uma propagação da flora presente na adega com o equipamento de vindima

As fermentações espontâneas foram realizadas por uma ou mais estirpes dominantes acompanhadas por nenhuma, algumas ou muitas estirpes “secundárias”, ou por uma comunidade heterogénea de leveduras sem estirpe(s) dominantes. Isto está de acordo com outros estudos que relatam a presença de uma ou duas estirpes predominantes, constituindo

mais de 50% da biomassa total e um número variável de estirpes “secundárias” [7,17,19,29,40,41]) ou a presença de muitas estirpes distintas sem serem predominantes [22,42]. Também foi relatada a ocorrência das duas situações. [16,18,43].

Considerando que a origem das leveduras do vinho é ainda controversa (3,5,8,44), os nossos resultados evidenciam claramente que o número de células *S. cerevisiae* presentes no ecossistema vínico da Região dos Vinhos Verdes é suficientemente alto para conduzir uma fermentação espontânea em mostos preparados com aproximadamente dois kg de uvas.

Contudo, devem se fazer algumas considerações relativamente à nossa abordagem experimental. No mosto criam-se condições selectivas e muito stressantes para as leveduras, totalmente distintas das influências ambientais da natureza. É pois claro que os nossos dados apenas se referem a estirpes *S. cerevisiae* capazes de sobreviver às condições impostas pela fermentação realizada sob as nossas condições de experimentação, fornecendo um quadro subestimado do tipo de estirpes que realmente se encontram na vinha.

Ao aproximarmo-nos do nosso limite de experimentação 3,3% (uma estirpe em 30 isoladas), estirpes raras poderão não ter sido detectadas apesar de capazes de sobreviver à fermentação. A procura de *S. cerevisiae* em 18 pontos, em duas campanhas e durante 3 anos usando um método de plantação directa para cada bago de uva como descrito [3] teria sido muito trabalhoso. Por isso, consideramos a nossa abordagem como um compromisso aceitável, possibilitando uma boa estimativa da composição da população, mas evitando uma descrição precisa em termos de abundância relativa de estirpes na natureza.

O presente estudo é o primeiro a grande escala acerca da associação de estirpes da Região dos Vinhos Verdes em Portugal, sendo uma abordagem útil para obter uma percepção mais profunda da ecologia e biogeografia das estirpes *S. cerevisiae*, mesmo entre regiões geograficamente próximas.

Consideramos este estudo indispensável para o desenvolvimento de estratégias cujo objectivo é a preservação da biodiversidade e de recursos genéticos como base para futuros desenvolvimentos de estirpes.

Agradecimentos:

Este estudo foi apoiado pelo projecto ENOSAFE(Nº 762, Programa AGRO, medida 8) e a concessão/subvenção nº 657 C2 do acordo de cooperação entre o Instituto Português para a Cooperação Científica e Tecnológica Internacional (ICCTI) e a Embaixada Francesa em Lisboa. Os autores agradecem a amável ajuda do enólogo Rui Cunha, Anselmo Mendes, Euclides Rodrigues e José Domingues pela facilidade demonstrada nas campanhas de amostra nas três vinhas. A Ana Rodrigues, Luís Quintas e Carlos Rocha agradecemos o apoio na recolha das uvas e no tratamento de amostras.

	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	NF 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 –
2003	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	NF 90	– 5 4 1	– 2	– S1 S2 S3 S4 S5 S4 S5 S1
	L	CI CII CIII CIV CV CVI	NF 150	– 20 4 2 4 8	– 24	– S5 S1 S4 S5 S3 S5 S1 S3 S4 S5 S1 S2 S4 S5
2002	E	CI CII CIII CIV CV CVI	NC 30 NF	– 1 –	– 1 –	– – –
	L	CI CII CIII CIV CV CVI	NC	–	–	–
2003	E	CI CIII CIV CV CVI	NF	–	–	–
	L	CII CI CII CIII CIV CV CVI	30 180	3 8 3 1 18 9 2	3 32	– S3 S4 C69P77 C63 C63 ACP10 S1, C42P80 – S4
<i>Vineyard P</i>						
2001	E	PI PII PIII PIV PV PVI	60 NF	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
2002	E	PI PII PIII PIV PV PVI	NF NC	– –	– –	– –
	L	PIV	NF	–	–	–

	Site	Number of isolates	Number of distinct patterns	Number of unique patterns	Common patterns		
2003	PI	150	5	12			
	PII		4		ACP10 S6 P136		
	PIII		1		ACP10		
	PV		10		S3 S6 P50 P136		
	PVI		1		ACP10		
	PIV PV		NF		–	–	
	PI	120	10	12	–		
	PII		1		–		
	PIII		1		P136		
	PVI		2		ACP10		
	PI		180		15	47	ACP10, S3 C69P77
	PII				1		–
	PIII	9		P136			
	PIV	18		S3			
PV	5	C42P80					
PVI	5	–					

E – primeira etapa de amostragem; L – última etapa de amostragem; NF – sem fermentação espontânea; NC – sem colheita.

Quadro 1 – Análise de MtDNA RFLP de 1620 leveduras isoladas de mosto fermentado obtido de uvas colhidas nas vinhas A, C e P na Região Dos Vinhos Verdes, indicada na Fig. 1, durante as vindimas de 2001, 2001 e 2003.

Winery A

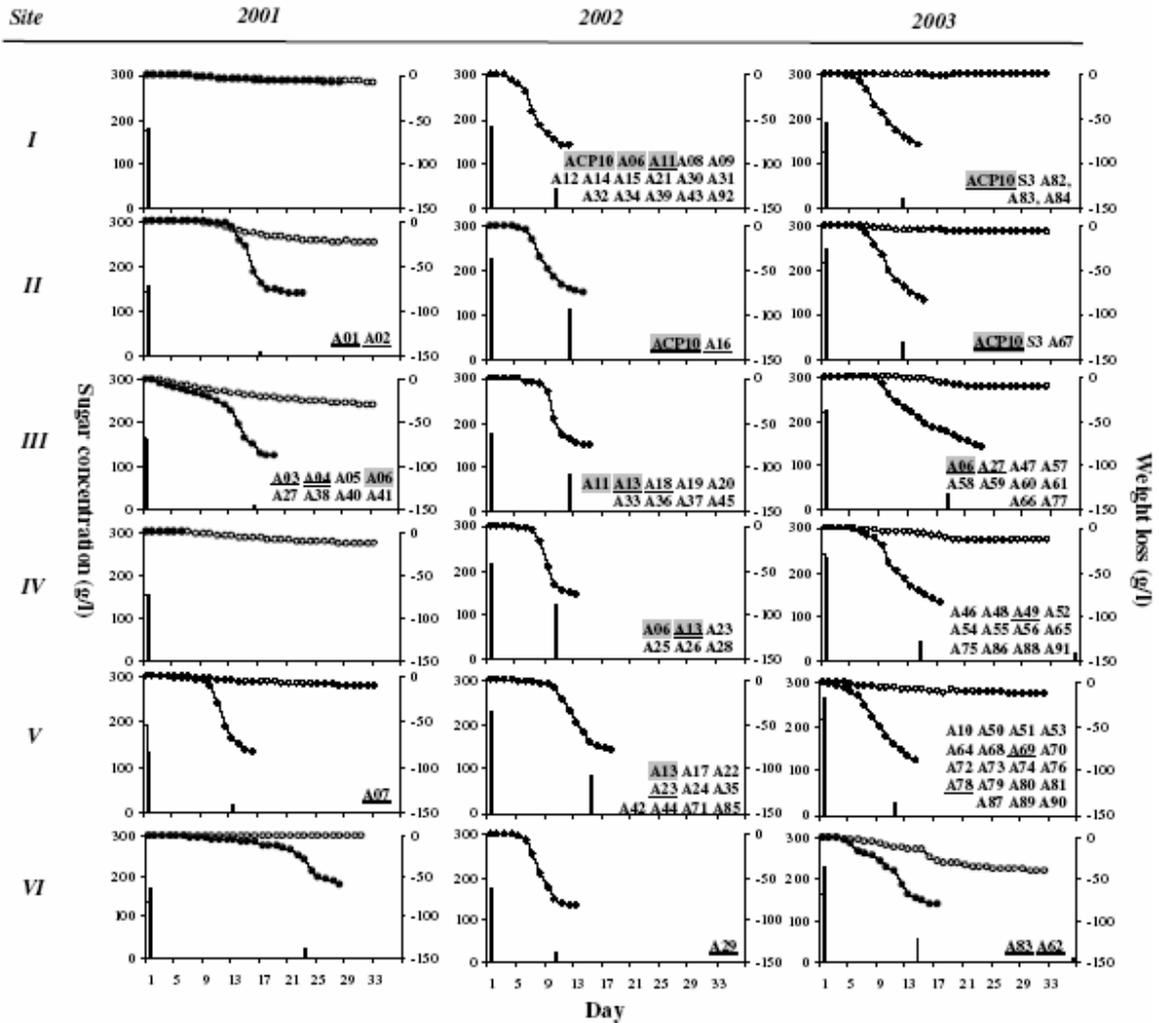


Fig. 3. Perfil de fermentação (linhas) e concentração em açúcares (barras) no mosto resultante das amostras colhidas na primeira (círculos abertos e barras) e última (círculos fechados e barras) etapas de amostragem das quais foram isoladas as estirpes de leveduras em análise neste trabalho. Em cada gráfico, foram inseridas as designações dos padrões correspondentes ao mtDNA RFLP das leveduras isoladas. As estirpes dominantes têm um sublinhado duplo (P50%) ou único (20-50%). Designações padrão do pós-vindima estão a negrito. Padrões comuns estão assinalados com sombreado cinzento

Winery C

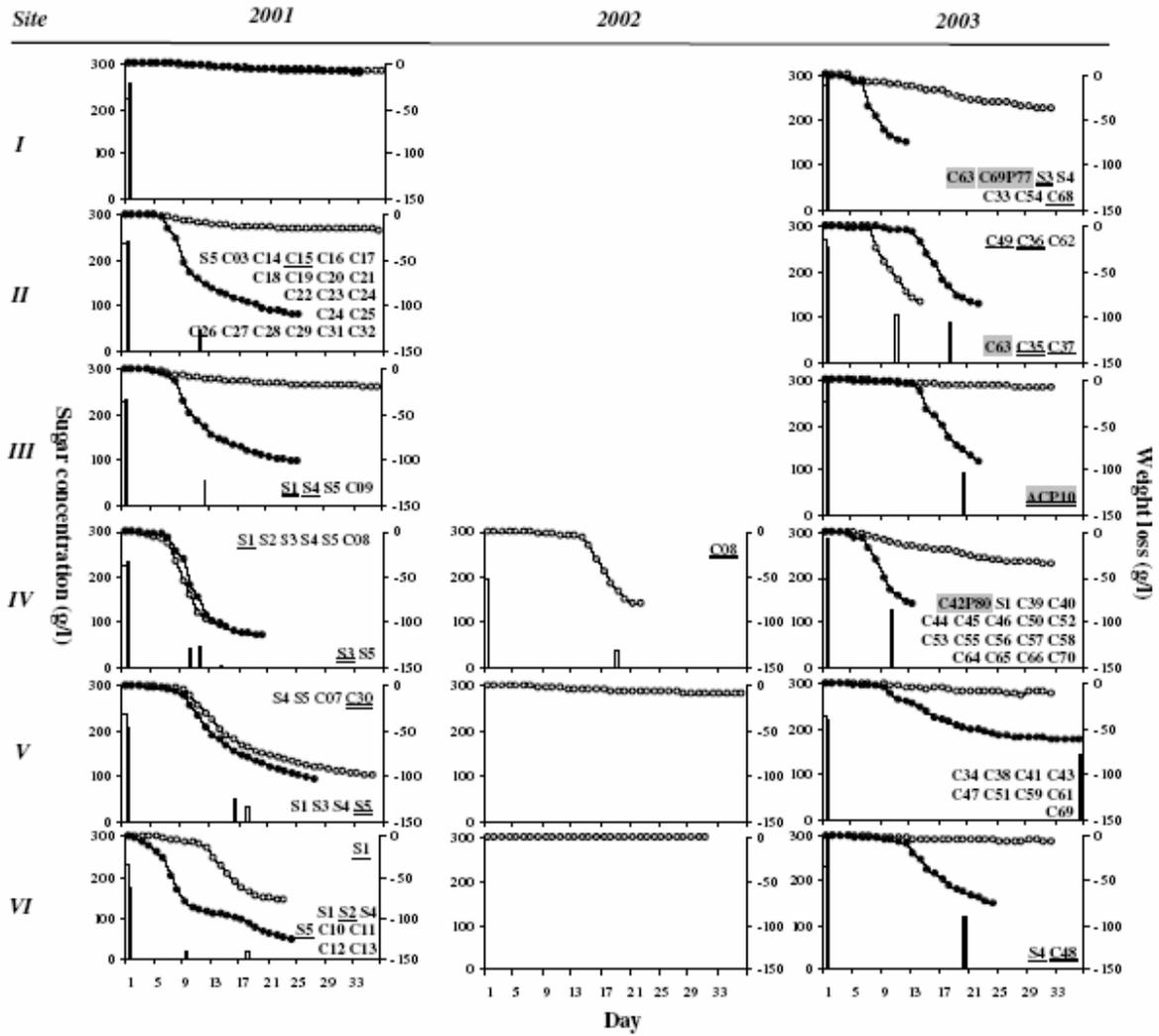


Fig.3 (continuação)

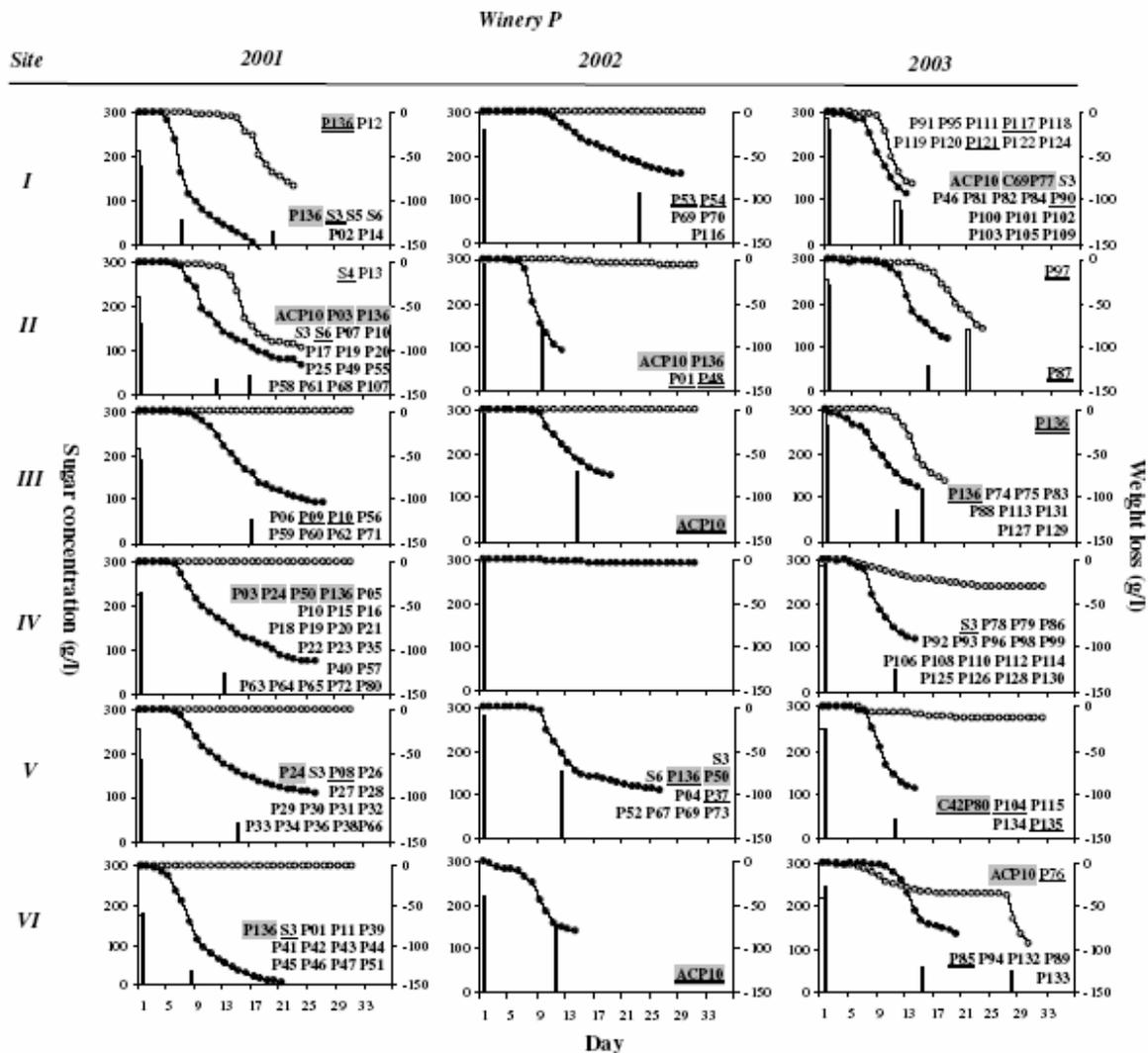


Fig.3 (continuação)

Referências

- [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'originr dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, delle foglie e degli acini di alcun 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´lectrophore'se 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. *Let. 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] Schu"tz, 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. *Let. Appl. Microbiol.* 29, 411–415.
- [48] Cavalieri, 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 Coccolin, 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.