

A colecção de estirpes autóctones de *Saccharomyces cerevisiae* das principais Regiões Vitivinícolas Portuguesas

E. Vieira^{1,6}; J. Drumonde-Neves^{1,5}; R. Machado¹; P. Silva¹; A.C. Gomes²; S. Sousa²;
P.T. Ramos³; F. Alemão³; M.T. Lima⁵; I. Araújo⁶; F.L. Duarte³; M.A. Santos^{2,4}; M.
Casal¹; D. Schuller¹

- (1) Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga
- (2) BIOCANT, Centro de Inovação em Biotecnologia, BIOCANT PARK - Parque Tecnológico de Cantanhede, Cantanhede
- (3) Instituto Nacional de Recursos Biológicos, IP, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Dois Portos
- (4) CESAM e Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro
- (5) Centro de Investigação de Tecnologias Agrárias – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores.
- (6) Vinalia - Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, *Spin-off* da Universidade do Minho, Braga

Introdução

Recorrer a leveduras secas activas (LSA) garante fermentações consistentes e homogeneidade da qualidade dos vinhos em anos consecutivos.

Das cerca de 200 LSA existentes no mercado apenas três estirpes de leveduras foram isoladas em Portugal (Vinho Verde, Dão e Bairrada)

O uso de espécies/estirpes autóctones é preferível porque:

- ❖ estão mais adaptadas ao micro-ecossistema e clima de cada região;
- ❖ possuem melhor capacidade de predominar sobre a flora microbiana não desejável;
- ❖ contribuem de forma favorável para o perfil característico dos vinhos de cada região.

Introdução

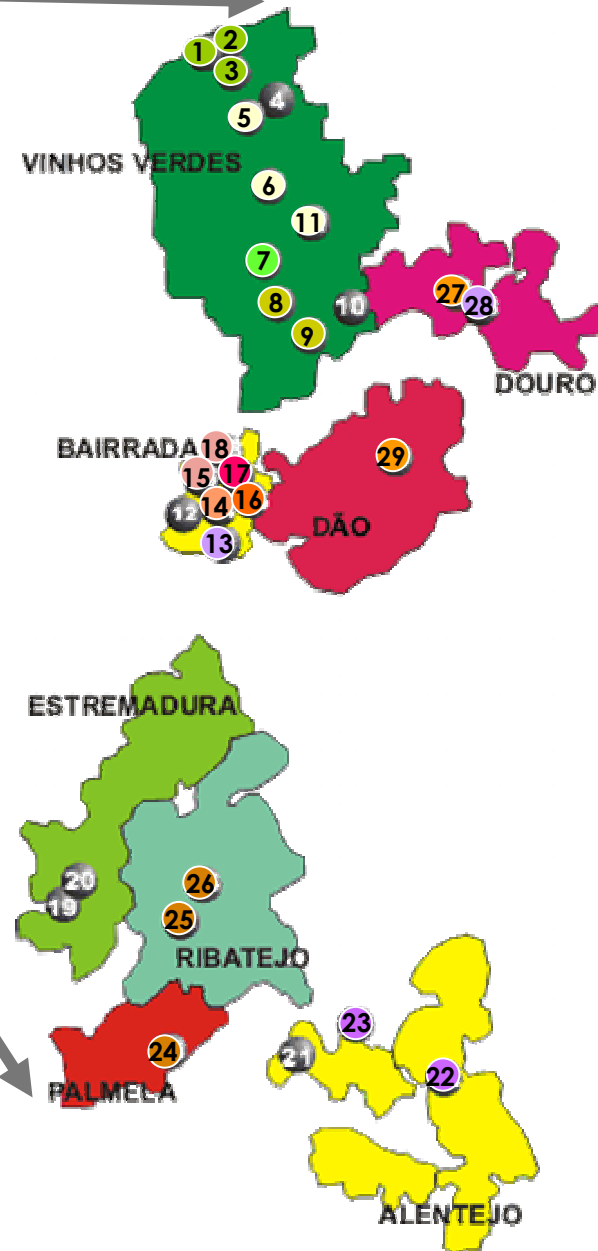
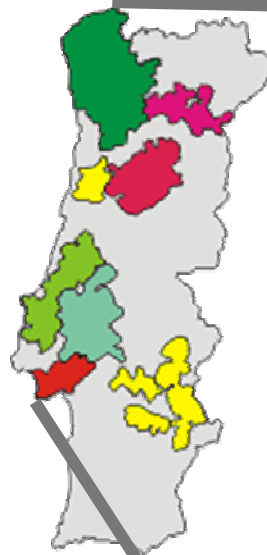
Estudos biogeográficos realizados em diferentes sub-regiões dos Vinhos Verdes, demonstraram uma elevada diversidade genética das estirpes de *S. cerevisiae* e verificou-se a ocorrência de estirpes indígenas características para cada vinha (Schuller *et al.*, 2005; Schuller *et al.*, 2007).

A compilação dos trabalhos efectuados levou à constituição de uma colecção de estirpes autóctones de *S. cerevisiae* para trabalhos futuros que visam:

- ❖ Conservar a biodiversidade de estirpes indígenas;
- ❖ Avaliar o potencial enológico das estirpes de acordo com critérios de selecção tecnológicos, organolépticos e de segurança alimentar.

Critérios Tecnológicos	Critérios Organolépticos	Critérios de Segurança Alimentar
Vigor, taxa e temperatura da fermentação Resistência ao SO ₂ e ao Cobre Floculação e produção de espuma Propriedade Killer	Compostos secundários e compostos aromáticos	Carbamato de etilo, aminas biogénicas e metanol.

Locais de Amostragem



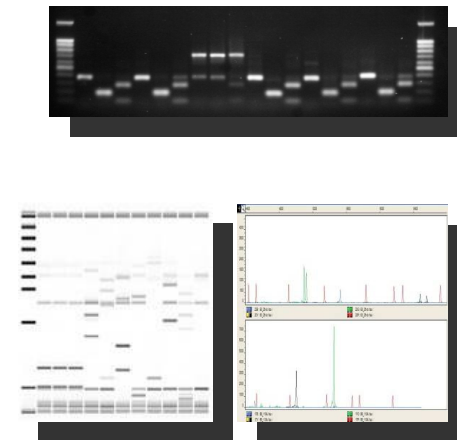
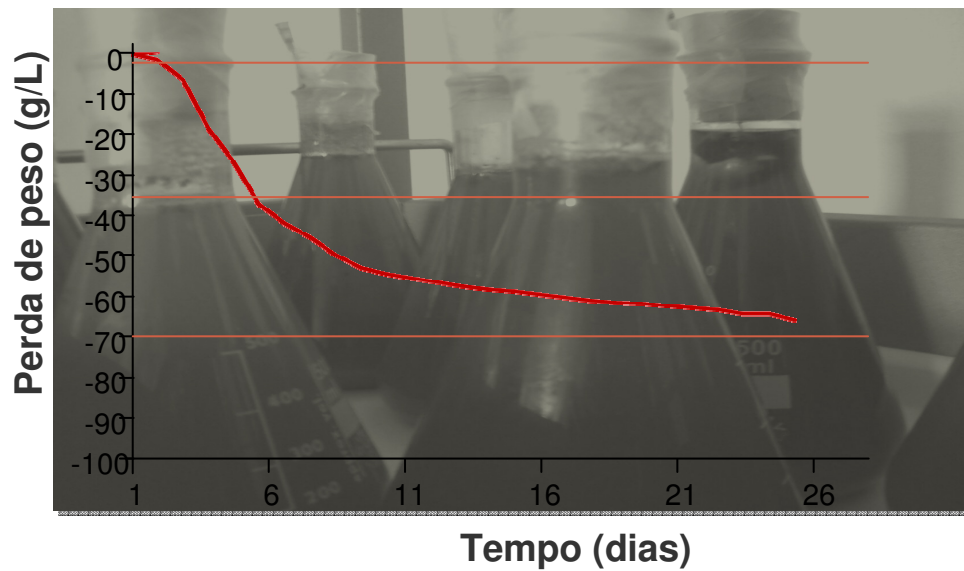
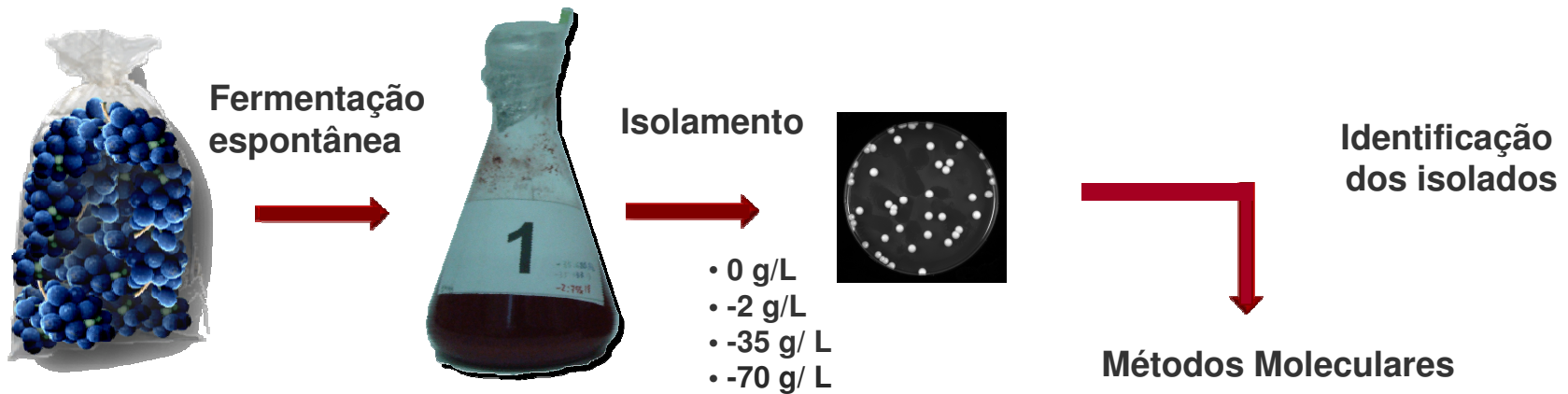
- Alvarinho
- Avesso
- Arinto
- Loureiro
- Aragonês
- Castelão
- T. Nacional
- Baga
- Bical
- M. Gomes
- Verdelho
- Terrantez

Desde 2001 foram recolhidas
623 amostras em

9 Regiões Vitivinícolas
12 Castas
37 vinhas

Materiais e Métodos

Isolamento de leveduras

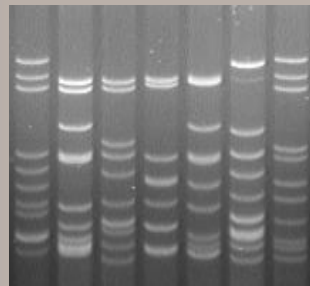


Materiais e Métodos

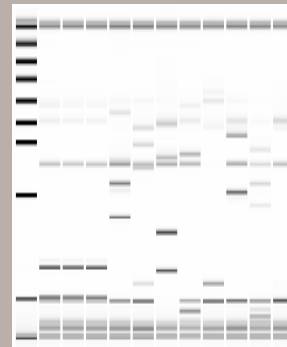
Métodos moleculares para identificação dos isolados

Análise preliminar

Perfis de restrição de DNA mitocondrial (mtDNA RFLP)



Amplificação de sequências Interdelta



Análise discriminatória

Análise de Microssatélites



Microssatélite	Crom.	Posição/ORF	Repet.
ScAAAT 1	XIII	86 901 – 87 129	ATT
ScAAAT 2	II	YBL084c	ATT
ScAAAT 3	IV	YDR160w	ATT
ScAAAT 4	VII	431 334 – 431 637	ATT
ScAAAT 5	XVI	897 028 - 897 259	TAA
ScAAAT 6	IX	105 661 – 105 926	TAA
YPL009	XV	YOR156c	TAA
ScYOR267C	XV	YOR267c	TGT
C4	XV	110 701-110 935	TAA+TAG
C5	VI	210 250-210 414	GT

Resultados

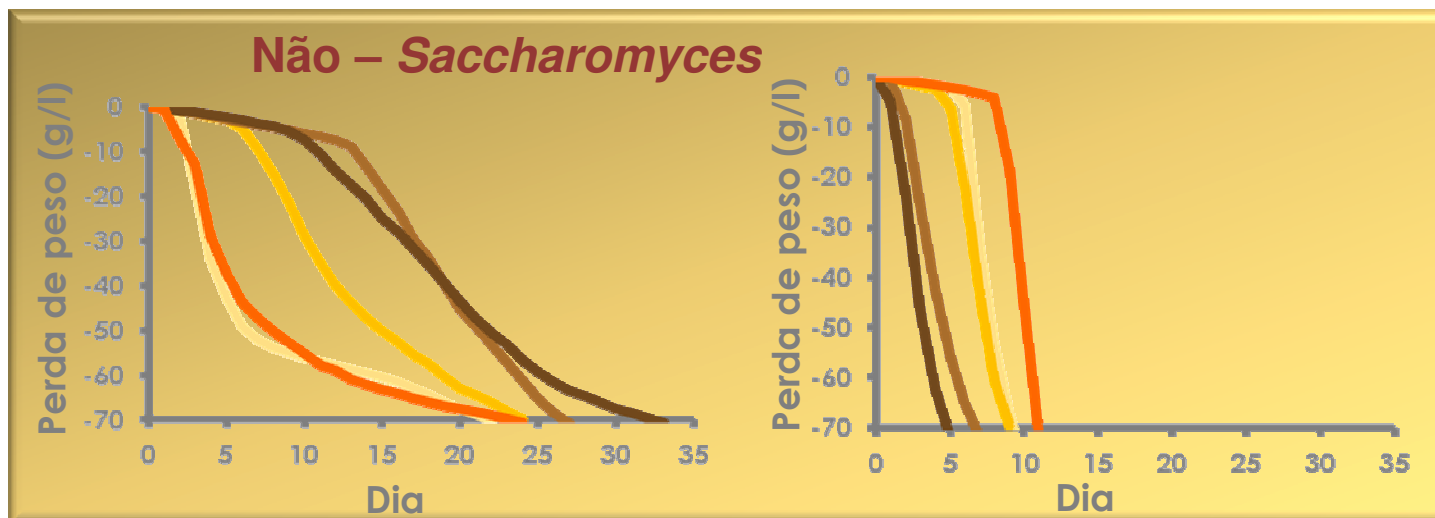
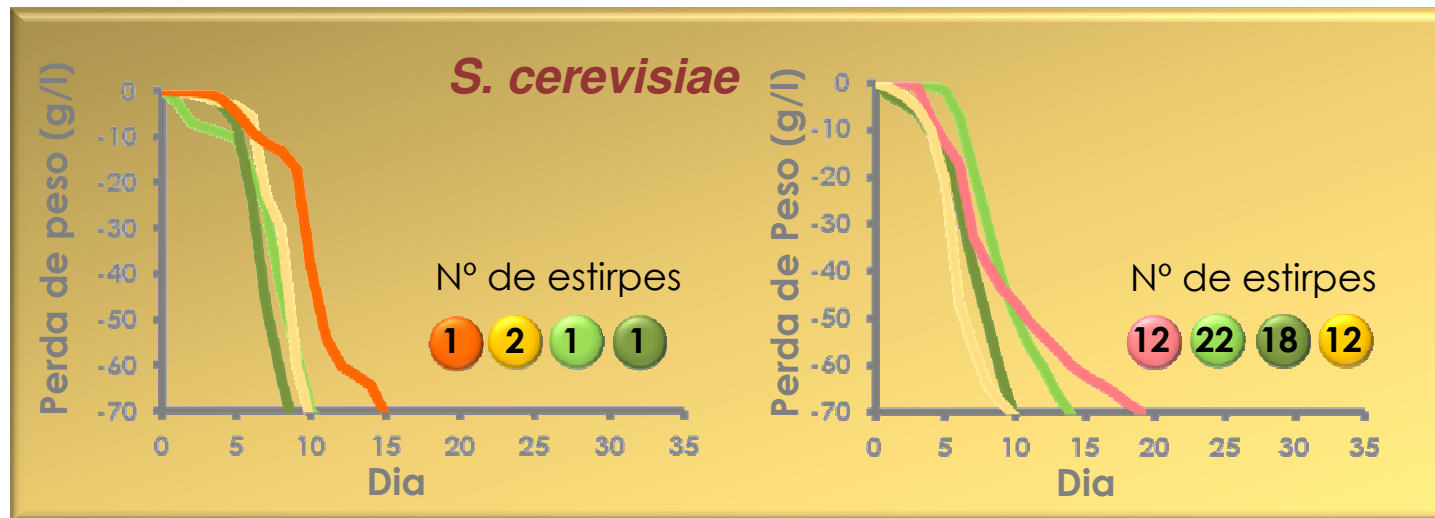
Estirpes de *S. cerevisiae* obtidas nas diferentes regiões

	Nº amostras recolhidas	Fermentações Espontâneas	Nº de Isolados	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Vinhos Verdes	282	115	3450	516
Bairrada	126	22	630	137 (*)
Estremadura	38	34	1020	9
Alentejo	53	34	1020	(*)
Palmela	6	5	150	0
Ribatejo	12	7	210	(*)
Douro	12	6	180	(*)
Dão	6	6	180	(*)
Açores	88	55	1650	(*)
Total	623	285	8520	662

(*) Análises em curso

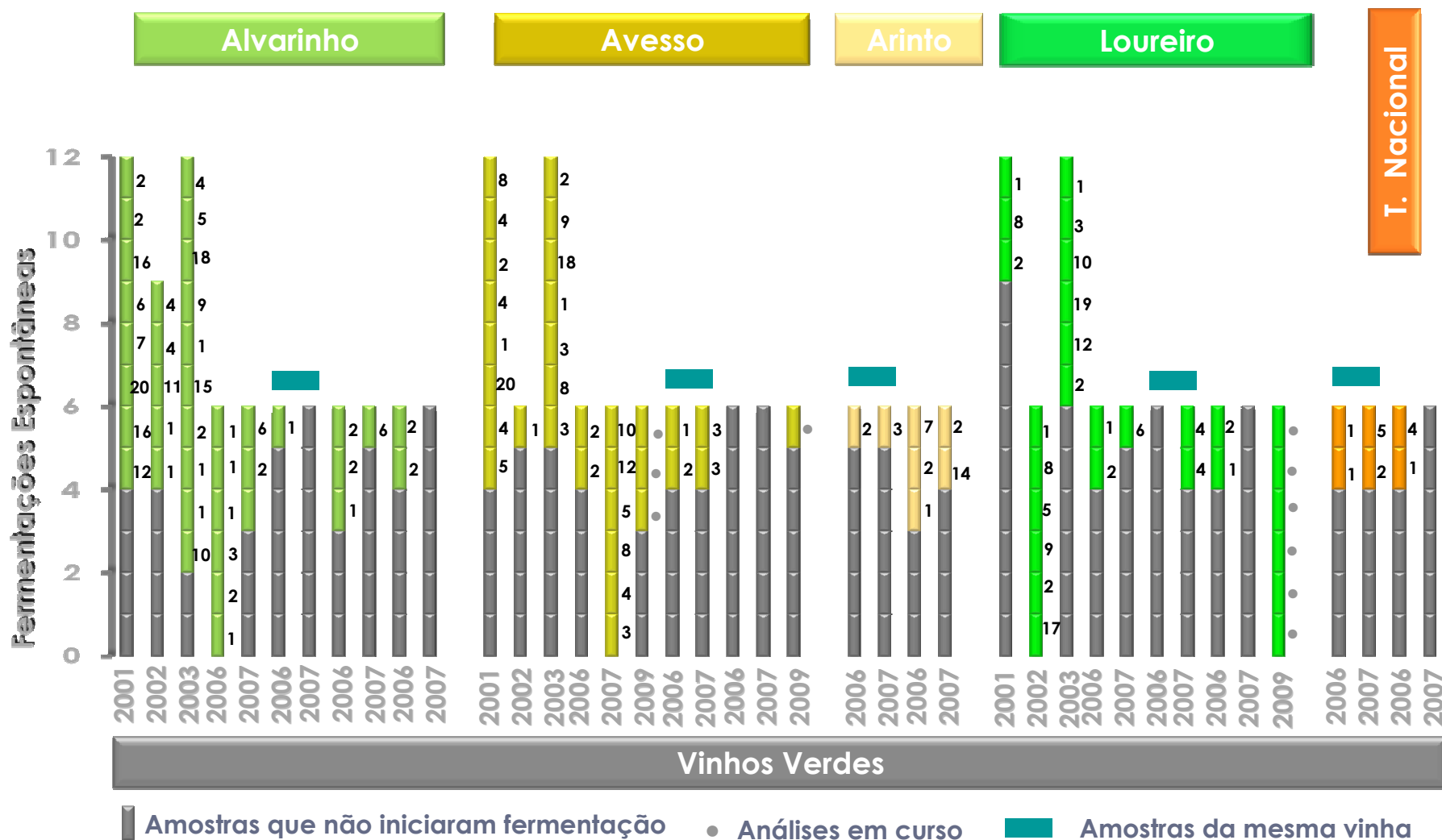
Resultados

Cinética de fermentação



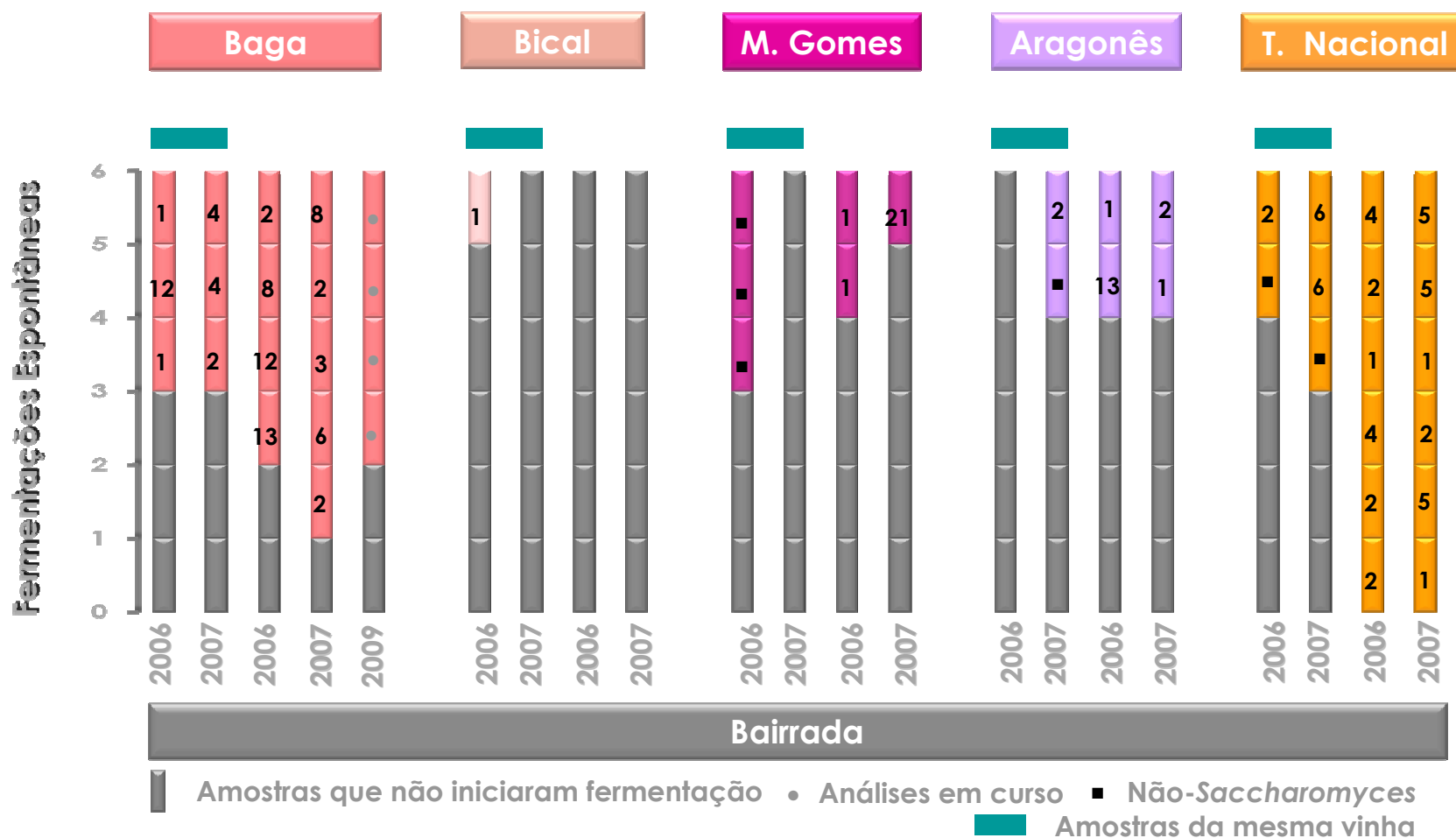
Resultados

Estirpes de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentações espontâneas



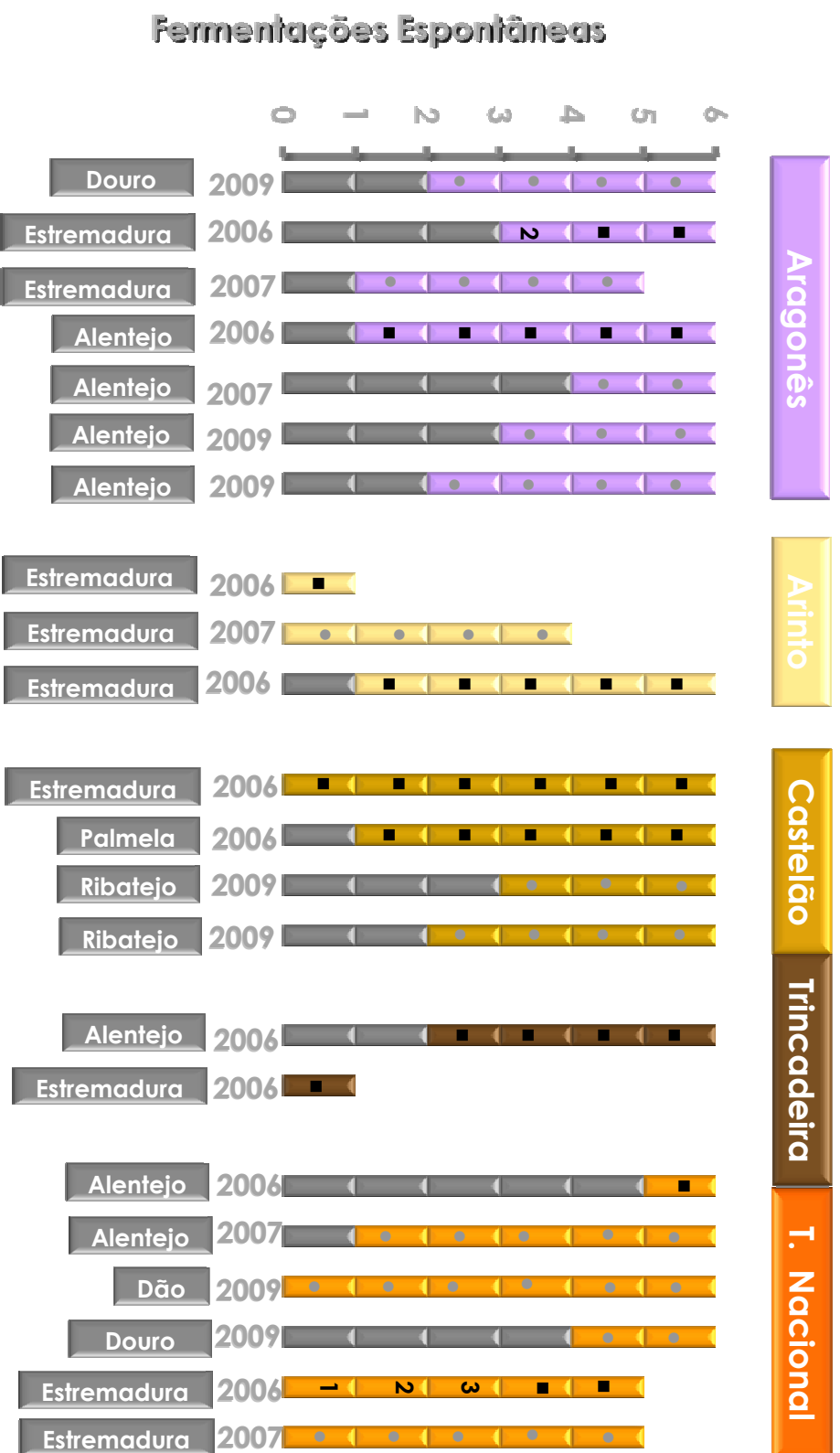
Resultados

Estirpes de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentações espontâneas



Resultados

Estirpes de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentações espontâneas



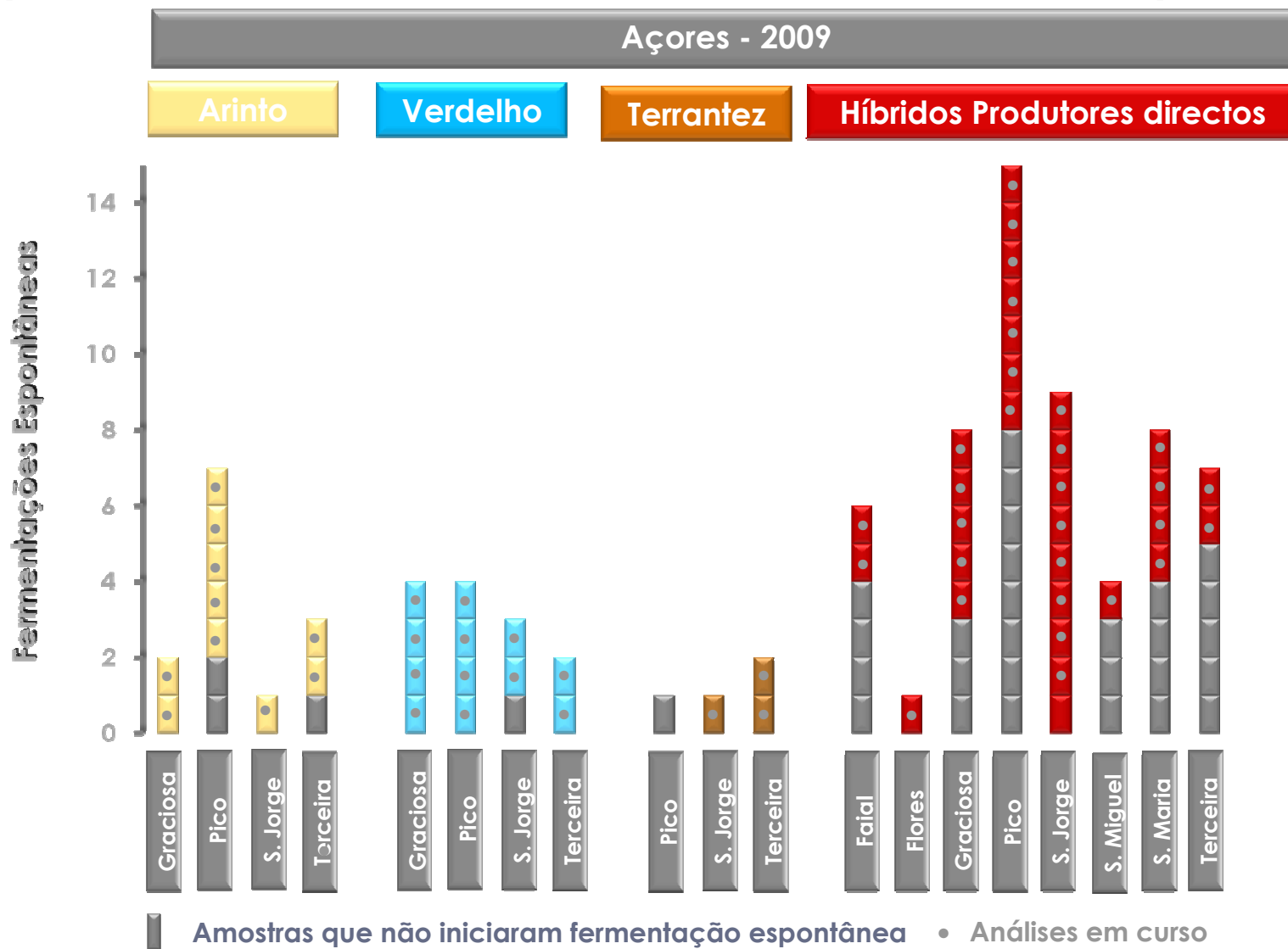
■ Não-*Saccharomyces*

■ Amostras que não iniciaram fermentação espontânea

• Análises em curso

Resultados

Estirpes de *S. cerevisiae* envolvidas em fermentações espontâneas



A base de dados de estirpes autóctones de *S. cerevisiae*

<http://scwsc.bio.uminho.pt>

Permite consultar informação sobre:

- Castas
- Regiões Vitivinícolas
- Métodos de identificação
- Estirpes/ Dados genéticos
- Publicações

Saccharomyces cerevisiae
wine strain collection

Home
Database
Yeast Strain Isolation >
Molecular analysis >
Methods >
Wine Regions >
Vineyards >
Grapes >
Our Publications
Acknowledgements

Saccharomyces cerevisiae is the yeast responsible for alcoholic fermentation that has been used for millenia in wine making, baking, brewing and distilling - as mankind's oldest domesticated organism. This species became the model organism par excellence, was the first eukaryotic genome to be completely sequenced, and provided a wealth of knowledge on its molecular and cellular biology, standing today at the forefront of molecular biology and functional analysis in genetics and genomics.

However, as for many other laboratory model organisms, understanding of the ecological, evolutionary and population genetic features that shaped the biology of *S. cerevisiae* is underscored by a wealth of knowledge on molecular and cellular biology, mainly obtained from a very limited number of reference laboratory strains. In the last few years yeast researchers developed a keen interest to identify genomic variability between wild-type yeast strains from different ecological niches or strains that are used for different technological applications.

Phenotypic variation among wine yeast is well-known among strains and was recognized by winemakers before being appreciated by geneticists. Significant heterogeneity is apparent among strains in the production of ethanol, acetic acid, sulfite, and other metabolic products. In this context emerged the *S. cerevisiae* wine yeast strain collection for the conservation of biodiversity, sustainable development of genetic resources and for an equitable sharing of genotypic data.

This *S. cerevisiae* strain collection was obtained from different winemaking regions in Portugal and France by collecting strains in yearly sampling campaigns from 2001 on. For each strain record, numerous characters are annotated, including metadata and allelic data for a set of highly polymorphic microsatellites.

This strain collection has been constituted at the Centro de Biologia Molecular e Ambiental (CBMA, Minho University, Braga, Portugal) in collaboration with the Unité Mixte de Recherche Sciences pour Oenologie of the Institut National de la Recherche Agronomique (Montpellier, France), BIOCANT, Centro de Inovação em Biotecnologia (Cantanhede, Portugal), CESAM and Biology Department of the Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal), L-INIA Dois Portos, INRB IP, (Dois Portos, Portugal) and the Centro de Investigação de Tecnologias Agrárias (Dep. Ciências Agrárias, University of the Açores).

Field work and research was funded by the programs POCI 2010 (FEDER/FCT, POCTI/AGR/56102/2004) and AGRO (ENOSAFE, N° 762). The research leading to this database has also received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 232454.

Saccharomyces cerevisiae
strains for winemaking
Molecular characterization
and genetic diversity

CBMA
VITIVINÍCOLAS

biocant
CENTRO DE INOVAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EYN

INRA

EUROPEAN UNION
SCIENCE AND INNOVATION
2010

FCT
FUNDAÇÃO PARA A CIÊNCIA E A TECNOLOGIA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Agro

GOVERNO DA REPÚBLICA PORTUGUESA

A base de dados de estirpes autóctones de *S. cerevisiae*

Possibilita pesquisar as estirpes isoladas por:

- N^o de isolado
- Regiões Vitivinícolas
- Vinha
- Castas

Collection Number	Country	Wine Region	Vineyard	Grape Variety	Location
GMY002	Portugal	Vinho Verde Wine Region [Info]	Quinta de Covela	Avezzo [Info]	41° 07' N 7° 58' W [Go]
GMY005	Portugal	Vinho Verde Wine Region [Info]	Quinta de Covela	Avezzo [Info]	41° 07' N 7° 58' W [Go]
GMY008	Portugal	Vinho Verde Wine Region [Info]	Quinta de Covela	Avezzo [Info]	41° 07' N 7° 58' W [Go]

Cada estirpe tem informação detalhada sobre a sua origem e isolamento e as suas combinações alélicas de microssatélites.

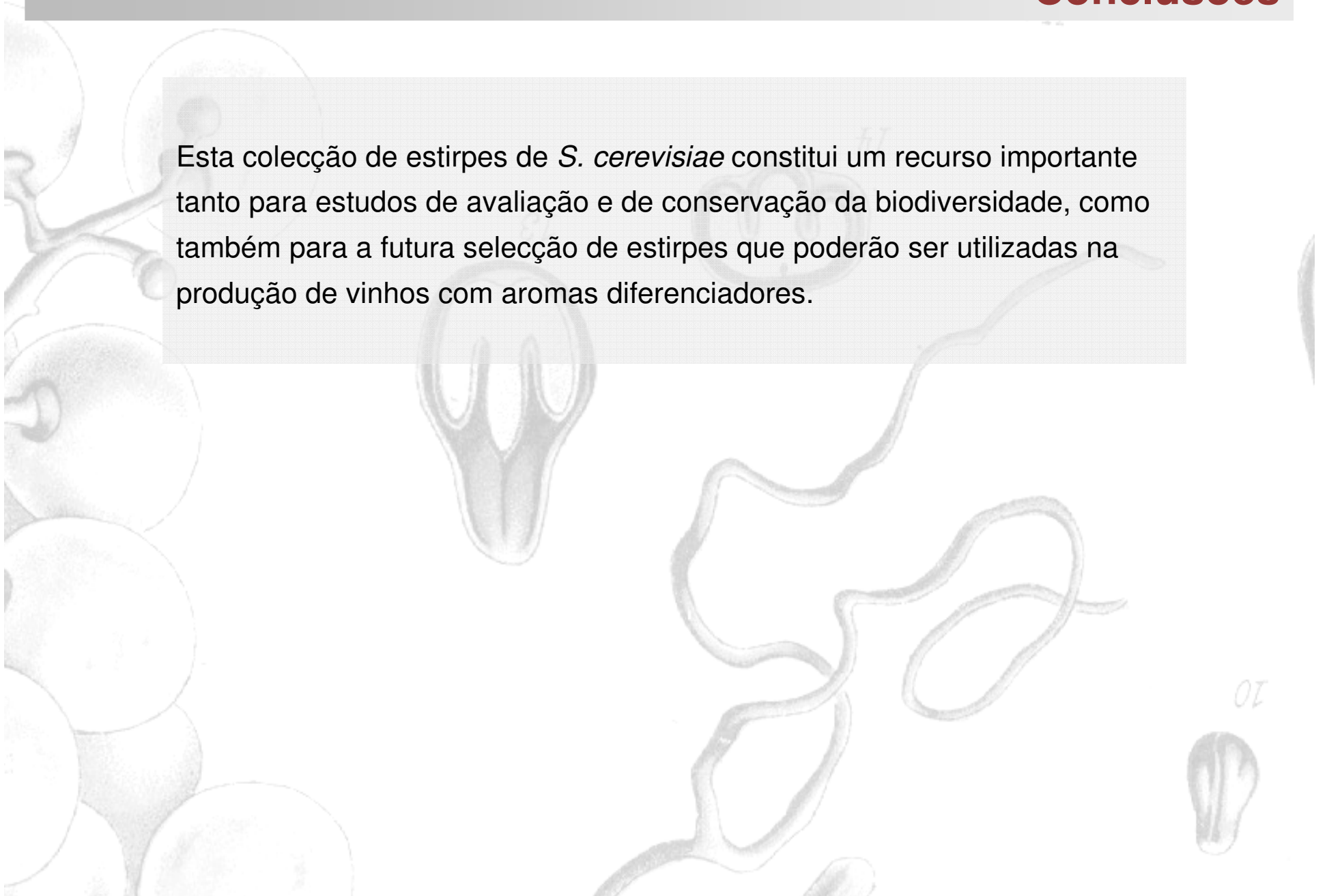
SCAAT1-1	SCAAT1-2	SCAAT2-1	SCAAT2-2	SCAAT3-1	SCAAT3-2	SCAAT4-1	SCAAT4-2
216	0	372	378	247	265	329	0

SCAAT5-1	SCAAT5-2	SCAAT6-1	SCAAT6-2	C4-1	C4-2	C5-1	C5-2
218	219	258	259	0	0	0	0

C11-1	C11-2	YPL009c-1	YPL009c-2	YOR267c-1	YOR267c-2

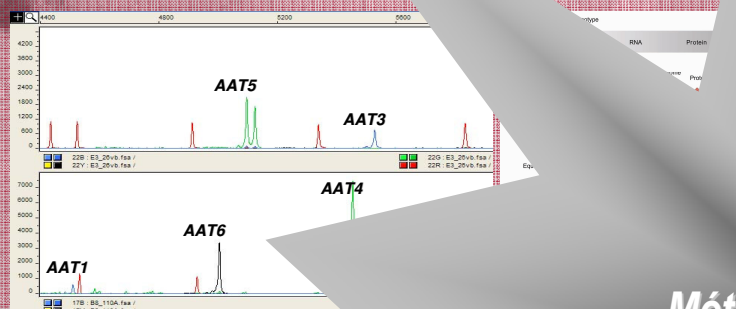
Conclusões

Esta colecção de estirpes de *S. cerevisiae* constitui um recurso importante tanto para estudos de avaliação e de conservação da biodiversidade, como também para a futura selecção de estirpes que poderão ser utilizadas na produção de vinhos com aromas diferenciadores.

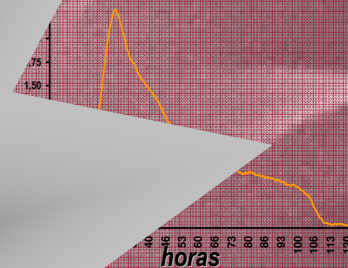


Abordagens futuras...

Comportamento fermentativo

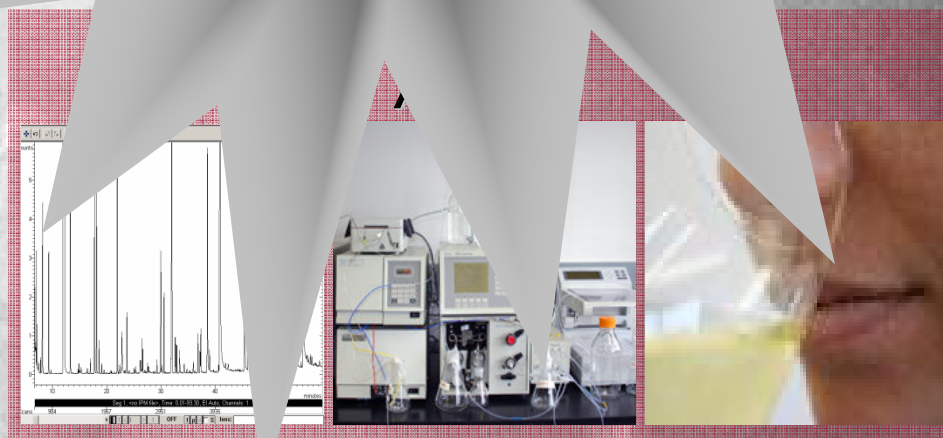


Perfil fermentativo



Bioinformática
Métodos computacionais

Previsão de características
a partir de dados genéticos



Agradecimentos

A todas as empresas e produtores que nos facultaram amostras

Este trabalho foi financiado pelos programas POCI 2010 (FEDER /FCT, POCTI/AGR/56102/2004), PTDC (AGR-ALI/103392/2008) e do Sétimo Programa Quadro da Comunidade Europeia (7PQ / 2007-2013) sob o contrato n.º 232454.

*Magda Silva Graça
Hugo Alves
Sofia Machado
Barbara Dellinger*

*Rui Cunha
Anselmo Mendes
Euclides Rodrigues
José Domingues
João Melícias
Frederico Gomes
Leonor Novais*