

## PANORAMA ECOLÓGICO DE CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN UN VIÑEDO DE LA REGIÓN VINHO VERDE EN PORTUGAL

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

a Departamento de Biología, Centro de Biología, Universidade do Minho, Braga, Portugal

b Institut National de la Recherche Agronomique, UMR Sciences pour l'Oenologie, Montpellier, Francia

### Introducción

La fermentación del vino tradicionalmente viene realizada de una manera espontánea por las levaduras indígenas presentes en las uvas en el momento de la vendimia o introducidas a través de las maquinarias y de la bodega durante el proceso de vinificación.

Todos los trabajos de investigación más recientes concuerdan en que las especies predominantes en las uvas sanas son levaduras apiculadas como *Hanseniaspora uvarum* (y su forma imperfecta *Kloeckera apiculata*) y especies oxidativas tales como *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Rhodotorula* [1]. Por el contrario, especies fermentativas del género *Saccharomyces*, predominantemente *Saccharomyces cerevisiae*, se encuentran presentes en las bayas sanas e intactas o en la tierra en concentraciones extremadamente bajas [2–4], mientras que se considera que las uvas dañadas son una fuente importante de *S. cerevisiae* [5]. El predominio de cepas pertenecientes a estas especies en la flora presente en las bodegas está bien documentado [6–10].

La flora de levaduras presente en las uvas depende de una gran variedad de factores tales como las condiciones climáticas, temperatura y precipitaciones incluidas, la localización geográfica del viñedo [4,9], los tratamientos con fungicidas [11], la variedad de uva y la edad del viñedo [12–14], así como el tipo de suelo [15]. Varios estudios ecológicos, utilizando métodos de identificación moleculares, han obtenido una gran diversidad de patrones genéticos entre la flora de las fermentaciones vínicas. En una región vitícola dada las cepas *S. cerevisiae* parece ser que están muy distribuidas [16–19], se pueden encontrar en años consecutivos [20,21] y existen también cepas predominantes en la flora fermentativa [2,22], lo que respalda la teoría de que cepas nativas específicas pueden ser asociadas a un *terroir*.

Los starters de levaduras seleccionadas son muy utilizados hoy en día ya que poseen características fermentativas y enológicas muy buenas, contribuyendo a la estandarización del proceso fermentativo y de la calidad del vino. En los años que siguieron la publicación de la secuencia del genoma de *S. cerevisiae* [23], se demostró la existencia de diferencias genéticas sustanciales entre las cepas de levaduras del vino. [24–26]. Por lo tanto, explorar la biodiversidad de cepas fermentativas indígenas puede representar una contribución importante para la comprensión y selección de cepas con fenotipos específicos.

La diversidad genética de las cepas de *S. cerevisiae* ha sido analizada con varios métodos tales como el análisis cariotípico por electroforesis en gel de campo pulsante [27], el análisis de restricción del DNA mitocondrial (RFLP de mtDNA) [28–31], la huella genética basada en el análisis de secuencias repetitivas delta [32,33] y la genotipificación microsatélite [34–36]. Schuller et al. [37] demostraron recientemente que la genotipificación microsatélite, usando 6 loci diferentes [36], el análisis optimizado de la secuencia delta [33] y el RFLP de DNA mitocondrial generado por la enzima *Hinfl* tienen la misma capacidad discriminatoria. En este trabajo se aplicó el análisis RFLP de mtDNA utilizando la enzima *Hinfl* como marcador genético para distinguir las cepas de *S. cerevisiae*. El objetivo del presente trabajo era determinar la

biodiversidad de la flora fermentativa que se encuentra en viñedos localizados en la Región “Vinho Verde” para definir las estrategias de los futuros programas de selección de cepas vínicas. Otra meta era definir una colección de cepas para contribuir a la conservación de los recursos genéticos de *S. Cerevisiae*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Muestreo

El esquema de muestreo incluyó un total de 18 emplazamientos en tres viñedos que rodean una bodega situada en el noroeste de Portugal (“Região Demarcada dos Vinhos Verdes”). En cada viñedo se definieron seis puntos de muestreo de acuerdo con la geografía del viñedo, y la distancia entre la bodega y los puntos de muestreo varió entre 20 y 400 m, como muestra la Fig. 1.

Se realizaron dos campañas de muestreo antes (primera etapa) y después (última etapa) de la vendimia, con un intervalo de tiempo de cerca 2 semanas, para determinar la diversidad entre las poblaciones de levaduras fermentativas de la última etapa de maduración de las uvas y de la vendimia. Esta experimentación se repitió durante tres años consecutivos (2001–2003). Las muestras no fueron recogidas siempre de la misma planta, sino del mismo área ( $\pm 1-2$  m). Las variedades de vid muestreadas fueron Loureiro (viñedo A), Alvarinho (viñedo P) y Avesso (viñedo C), son todas uvas blancas utilizadas en la Región de Vinhos Verdes.

### 2.2. Fermentación y aislamiento de las cepas

Se recogieron en modo aséptico aproximadamente 2 kg de uva en cada punto de muestreo, y el mosto de uva extraído fermentó a 20 °C en pequeños volúmenes (500 ml), con agitación mecánica (20 rpm). Se realizó un seguimiento de la fermentación mediante determinaciones diarias de la pérdida de peso del mosto. Cuando se observó una reducción de 70 g/l, correspondiente a un consumo de cerca 2/3 del contenido de azúcar, se dispersaron muestras diluidas ( $10^{-4}$  and  $10^{-5}$ ) sobre placas YPD (extracto de levadura, 1% p/v, peptone, 1% p/v, glucosa 2% p/v, agar 2%, p/v), y después de la incubación (2 días, 28°C) se tomaron 30 colonias elegidas aleatoriamente. Las colonias aisladas obtenidas de cada una de las fermentaciones se almacenaron en glicerol (30%, v/v) a -80 °C.

### 2.3. Aislamiento de DNA

Las células de levadura fueron cultivadas en 1 ml de medio nutritivo YPD (36 h, 28 °C, 160 rpm) y el aislamiento de DNA fue realizado como descrito en [28] con un procedimiento modificado de lisis celular, usando 25 U de Zimolasa (SIGMA). La lisis celular dependió de la cepa y duró entre 20 min y 1 h (37 °C). El DNA fue utilizado en el análisis RPFL mitocondrial.

### 2.4. RFLP de DNA mitocondrial

Las reacciones de restricción fueron llevadas a cabo como descrito en [37]. Las designaciones atribuidas a los diferentes patrones observados fueron A1–A93, C1–C62 y P1–P135, que corresponden a las colonias aisladas de los viñedos A, C y P, respectivamente. La designación de los patrones ACP10 se refiere a una cepa común a todos los viñedos y C69P77 y C42P80 fueron asignadas a cepas comunes a los viñedos C y P. Los perfiles de los patrones que eran idénticos a los de los starters de levaduras comerciales usados en las bodegas se designaron como S1–S6. Una cepa representativa de cada uno de los 297 patrones fue usada para realizar

una prueba de crecimiento en un medio que contenía lisina como única fuente de nitrógeno [38].

## 2.5. Métodos analíticos

La concentración de azúcar fue determinada con el método dinitrosalicílico ya descrito en bibliografía [39].

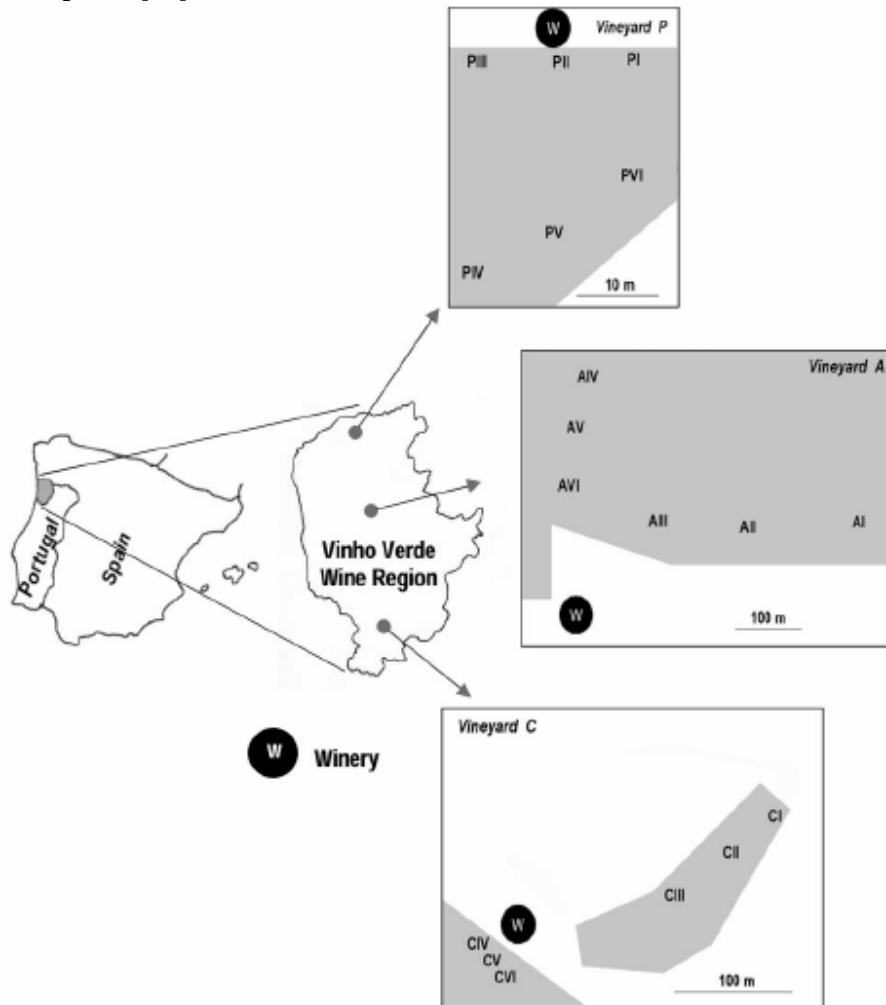


Fig. 1. Localización geográfica de los tres viñedos A, C y P en la Región Vinícola de Vinho Verde con la indicación de las bodegas y de los puntos de muestreo correspondientes PI–PVI, AI–AVI y CI–CVI.

## 3. Resultados

En este trabajo se muestrearon tres viñedos situados en la Región Vinho Verde, en el noroeste de Portugal, durante las temporadas de vendimia 2001–2003 (Fig. 1). Para obtener un cuadro más detallado de la distribución temporal de las levaduras fermentativas, se realizaron dos recogidas de muestras, una antes y otra después de la vendimia, en un intervalo de tiempo de dos semanas. Fueron programadas un total de 108 muestras de uva (seis puntos de muestreo · dos recogidas de muestras · tres viñedos, tres años), de las cuales 54 comenzaron la fermentación de forma espontánea, 36 no fueron capaces de iniciar la fermentación después de

30 días de incubación, mientras 18 muestras no fueron recogidas a causa de unas condiciones atmosféricas desfavorables y de un mal estado sanitario de las uvas durante el 2002. De las 54 fermentaciones se aislaron 620 levaduras. A todos los microorganismos aislados se les analizó su mtDNA por RFLP (Hinfl) y se atribuyó un perfil de patrón a cada levadura aislada, resultando un total de 297 perfiles diferentes.

La cuenta total de levaduras (ufc en medio nutritivo YPD) osciló entre  $1.0 \times 10^6$  y  $8.0 \times 10^7$  ufc/ml de mosto, que corresponden a los valores descritos generalmente para las fermentaciones del mosto. Todos los microorganismos aislados pertenecían a las especies *S. cerevisiae* debido a la incapacidad de crecer en un medio que contenía lisina como única fuente nitrogenada y a la capacidad de *S. cerevisiae* de amplificar seis loci microsatelites específicos. Ninguno o sólo 1 de los loci fue amplificado en otra especie de *Saccharomyces* presente en el vino tales como *S. paradoxus* y *S. Bayanus*, respectivamente. No se observó amplificación en especies que generalmente se encuentran presentes durante las primeras etapas de la fermentación, tales como *Candida stellata*, *Pichia membranifaciens* y *Kloeckera apiculata*.

Los resultados del RFLP de mtDNA de las 1620 cepas aisladas están resumidos en la Tabla 1. De las 450 células aisladas en el viñedo A, 93 corresponden a patrones únicos mientras en C y P fueron aisladas un total de 450 y 690 cepas, correspondiéndoles 62 y 135 cepas con patrones únicos, respectivamente.

Para 11 patrones comunes, encontrados en más de una fermentación (Tabla 1 y Fig. 2), y también para seis starters comerciales de cepas de levaduras (S1–S6), se confirmó una distribución geográfica y temporal más amplia.

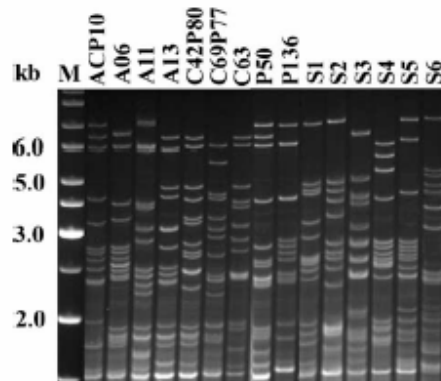


Fig. 2. Ejemplos de patrones comunes de RFLP de DNA mitocondrial (Hinfl), como catalogados en la Tabla 1, encontrados en cepas de levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de mostos y recogidas como descrito en la Sección 2.

Los patrones S1–S6 corresponden a starters comerciales de levaduras que habían sido usadas en las bodegas durante los últimos años. Cepas perennes fueron asociadas a más de un punto dentro de un mismo viñedo (patrones A06 y S6, P136, P50), pero mostraron también una distribución más amplia al encontrarse en múltiples puntos de muestreo en dos o tres viñedos (patrones S3, S4, y ACP10). Los patrones S1, S2, C63, A11, A13, P03 y P24 fueron encontrados sólo un año pero en varios puntos de muestreo dentro del mismo viñedo, mientras la cepa S5 tuvo una distribución más amplia en varios puntos de muestreo de los viñedos C y P. Los patrones C42P80 y C69P77 aparecieron sólo en un único punto de muestreo de los viñedos C y P en 2003. El patrón ACP10 corresponde a la única cepa “regional” aislada con una distribución geográfica más amplia mientras A06, A11, A13, C63, P03, P27, P50 y P136 se

pueden considerar “cepas del viñedo” debido a su presencia en múltiples puntos de muestreo y/o años.

El clima húmedo del verano 2002 dio lugar a fuertes infestaciones de hongos y a aplicaciones importantes de aerosoles químicos. Ésta fue posiblemente la razón por la que simplemente fueron identificados 12 patrones únicos entre las 150 cepas recogidas en la última etapa del muestreo en 2002 en el viñedo P. En 2003 esta relación fue otra vez más parecida a la encontrada en 2001 (47 y 62 patrones únicos de cada 180 cepas aisladas en la última etapa de muestreo del viñedo P).

Como muestra la Fig. 3, tuvo lugar un inicio de fermentación espontánea en casi todas las muestras de uva recogidas en la última campaña de muestreo.

Esto ocurrió raramente en la mayoría de las muestras recogidas algunos días antes de la vendimia. Los mostos preparados con uvas recogidas en la primera etapa de muestreo en el viñedo A, no comenzaron nunca la fermentación espontánea. En 2001 tuvo lugar una sobredosificación agroquímica accidental que produjo un retraso del inicio de la fermentación espontánea en tres de las cuatro muestras postvendimia (II, III y VI). En los dos años siguientes, los perfiles de fermentación fueron similares en las muestras de C y P, lo que sugiere la recuperación de la flora.

La fermentación comenzó después de seis-doce días llevada a cabo por una-veinte cepas. Aparentemente no se encontró ninguna correlación entre el número de cepas implicadas en la fermentación y el punto de muestreo, año o viñedo. La cepa con una distribución más amplia (ACP10) fue dominante en seis fermentaciones (AII-2002, AI-2003, AII-2003, CIII-2003, PIII-2002, PVI-2002) contribuyendo con el 77–100% (23–30 cepas) al total de la flora de levaduras, pero tuvo menos importancia en cinco fermentaciones (AI-2002, PII-2001, PII-2002, PI-2003, PVI-2003), contabilizando sólo el 3–10% (de una a tres cepas), y estando acompañada por una-seis cepas diferentes. La distribución de las cepas no está asociada a la capacidad para ejercer la dominancia de la fermentación, en cambio la competición con las cepas que le acompañan parece ser el factor determinante.

Los patrones viñedo-específicos de las muestras recogidas en la primera etapa, al cabo de dos semanas no aparecieron en el mismo punto (P, 2001 y 2003, C, 2001) con la excepción de los patrones más generalizados S1, S2, S3, S4, S5, ACP10 y P136, lo que pone de manifiesto la existencia de una flora muy diversificada.

#### 4. Discusión

Los panoramas biogeográficos a gran escala y los estudios sobre diversidad genética de cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de fermentaciones espontáneas han permitido documentar la naturaleza dinámica de estas poblaciones. En este estudio se encontraron 297 patrones genéticos diferentes entre los 1620 aislados obtenidos a partir de 54 fermentaciones a pequeña escala realizadas con uvas de tres viñedos localizados en la Región Vinho Verde, durante un período de tres años. La gran mayoría de los patrones fueron únicos, demostrando la existencia de una enorme biodiversidad de cepas de *S. cerevisiae* en la Región Vinho Verde.

Considerando el cociente entre el número de cepas aisladas y el número de patrones como una estimación aproximativa de la biodiversidad, nuestros resultados muestran valores parecidos a los panoramas, publicados con anterioridad, de diversidad genética de cepas autóctonas vnicas de *S. cerevisiae* en otras regiones con tradición vitícola tales como Burdeos [2],

Charentes [17,45], Campagne y Valle del Loire [21], en Francia; El Penedés[46], Tarragona [7], Priorato [20,22] y La Rioja [47] en España; Alemania y Suiza [41]; Toscana, Sicilia [48] y Collio [49] en Italia; Amyndeon y Santorini [42] en Grecia; Western Cape [16,18,43] en Sudáfrica; y Patagonia [19] en Argentina.

El actual estudio fue llevado a cabo en una región vitícola que nunca había sido caracterizada antes e incluye aspectos que no habían sido considerados en trabajos anteriores, tales como la aparición de varias cepas de levaduras comerciales, y la comparación entre las poblaciones de levadura que se encuentran en las uvas antes y después de la vendimia.

La mayor parte de las cepas no manifestó un comportamiento perenne, estando caracterizada la flora de cada año por la aparición de numerosos nuevos patrones. Esto se puede atribuir al muestreo de sólo 12 · 2 kg de uvas por viñedo y año, no suficiente para abarcar toda la enorme biodiversidad de un área determinada. Otra de las razones de la aparición de nuevos patrones podría ser atribuida a la recombinación y a las fuerzas evolutivas, pero parece inverosímil que tales cambios ocurran de un año para otro y justifiquen la presencia de muchos patrones distintos en años consecutivos. Los patrones del RFLP del ADN mitocondrial son estables cuando las células de *S. cerevisiae* experimentan cerca de cinco a siete divisiones durante la fermentación alcohólica (datos nuestros no publicados).

Entre todos los patrones solamente ACP10 mostró una amplia distribución regional con un comportamiento perenne que proporcionaba pruebas preliminares de la existencia de un cepo que representa un "terroir" como descrito en [17,21]. Sin embargo, la amplia distribución de una cepa no está necesariamente relacionada con una mejor aptitud enológica. Esto tiene sentido desde un punto de vista enológico, puesto que las fuerzas selectivas que actúan en un viñedo son totalmente diferentes de las que la levadura puede encontrar en un mosto de uva durante la fermentación. Para evaluar las potencialidades de estas cepas es necesario realizar una caracterización fisiológica adicional en las condiciones de vinificación. La aparición de estas cepas no obedeció a una pauta generalizada, sino más bien a una presencia, ausencia y reaparición esporádicas, debidas a fluctuaciones naturales de las poblaciones. La aparición perenne del patrón ACP10 es una consecuencia de su predominio en la microflora local. En diversas fermentaciones, ACP10 fue dominante o no, demostrando que el resultado final de la fermentación dependía de la composición específica de la comunidad de levaduras en el mosto, que a su vez está influida por diferentes factores tales como el comportamiento killer el cual depende fuertemente del cociente, al inicio de la fermentación, entre levaduras killer y células sensibles [50].

La variedad de uva de la viña A era Loureiro, mientras que las variedades de los viñedos P y C eran Alvarinho y Avesso, respectivamente, lo que indica que la variedad de uva podría contribuir a encontrar tantos patrones distintivos. Las prácticas de vinificación tradicionales son muy parecidas en A, C y P, la influencia de las diferencias climáticas parece ser insignificante puesto que los tres viñedos están geográficamente cercanos. Sin embargo no se pueden excluir influencias microclimáticas, no registradas en el presente estudio.

Una primera campaña de muestreo se realizó algunos días antes de la vendimia; la segunda se efectuó algunos días después del final de la vendimia. Esto se llevó a cabo en un intervalo de tiempo de cerca dos semanas, para obtener un cuadro más detallado de la distribución temporal de las poblaciones de levaduras fermentativas durante la vendimia. Cuando las uvas alcanzaron la madurez completa, las levaduras fueron más abundantes. La última etapa de la maduración de las uvas puede favorecer la proliferación de levaduras fermentativas sobre la superficie de

las bayas, debido a una disminución de la integridad de los hollejos y a la salida de mosto de las bayas. Los insectos son la probable fuente de levaduras en las uvas dañadas.

La colonización de las uvas por parte de las levaduras puede alcanzar valores de cerca  $10^5$ – $10^6$  ufc/baya [51]. Antes de la cosecha, sólo el 5% de las uvas son sede de levaduras, mientras que este número es mucho mayor (60%) durante la cosecha [52]. Según lo esperado, sólo 11 de 42 muestras pre-vendimia (26%) fueron capaces de fermentar de forma espontánea en contraste con las 43 de 48 muestras postvendimia (90%). Las cepas asociadas fueron también mucho más diversificadas en la última campaña de muestreo (267 patrones de las 1260 cepas aisladas) comparadas con la primera etapa (30 patrones de las 360 cepas aisladas). Con una única excepción (patrón P136), los patrones de cepas autóctonas de la primera etapa de muestreo no aparecieron en la última etapa de muestreo, lo que confirma la existencia de una sucesión de cepas *S. cerevisiae*. Alternativamente, las diferencias pueden ser atribuidas al hecho de que fueron cosechados diversos racimos de uva, que pueden tener una flora distinta, incluso estando cercanos uno del otro. Parece inverosímil que el aumento enorme de la variabilidad de las cepas en el momento de la vendimia sea debido a una propagación de la flora presente en la bodega, a través de la maquinaria de la vendimia.

Las fermentaciones espontáneas fueron realizadas por una o más cepas predominantes acompañadas por ninguna, pocas o muchas cepas “secundarias”, o por una comunidad muy heterogénea de levaduras sin una cepa(s) predominante. Esto concuerda con otros estudios que observaron la presencia de una o dos cepas predominantes que constituían más del 50% de la biomasa total, y un número variable de cepas secundarias [7,17,19,29,40,41], o la presencia de muchas cepas diferentes sin ser predominantes [22,42]. También ha sido observada la existencia de las dos situaciones en otros trabajos [16,18,43].

Considerando que el origen de las levaduras del vino sigue siendo controvertido [3,5,8,44], nuestros resultados indican claramente que el número de células de *S. cerevisiae* presentes en los ecosistemas del viñedo de la Región Vinho Verde es suficientemente alto como para conducir una fermentación espontánea en un mosto obtenido con aproximadamente dos kg de uva.

Sin embargo, es necesario realizar algunas consideraciones referentes a nuestro enfoque experimental. El mosto crea unas condiciones selectivas y muy estresantes para las levaduras, totalmente distintas de las influencias medioambientales. Está claro por lo tanto que nuestros datos se refieren sólo a cepas de *S. cerevisiae* capaces de sobrevivir en las condiciones impuestas por una fermentación realizada según nuestras condiciones experimentales, dando por lo tanto un cuadro no exacto (subestimado) del tipo de cepas que realmente se encuentran en el vino. Al ser el límite de detección de nuestro enfoque experimental 3,3% (una cepa de 30 aisladas), podrían haber sido detectadas cepas raras aunque capaces de sobrevivir durante la fermentación. La búsqueda de *S. cerevisiae* en 18 puntos, en dos campañas y durante tres años usando técnicas directas de cultivo para cada baya individualmente, como descrito en [3] necesitaría mucha mano de obra. Por lo tanto consideramos nuestro enfoque como un compromiso aceptable, permitiendo una buena estimación de la composición de la población, pero evitando una descripción precisa en términos de abundancia relativa de cepas en la naturaleza

El presente trabajo es el primer enfoque a gran escala sobre cepas viñedo-asociadas de la Región de Vinho Verde en Portugal, siendo un enfoque útil para obtener una percepción más exhaustiva de la ecología y biogeografía de las cepas *S. cerevisiae*, uniformes entre regiones geográficamente cercanas. Consideramos estos estudios indispensables para el desarrollo de

estrategias cuyo objetivo es la preservación de la biodiversidad y de los recursos genéticos como base para un mayor desarrollo de las cepas.

**Agradecimientos**

*Este estudio fue apoyado por el proyecto ENOSAFE (No. 762, Programa AGRO, medida 8) y la subvención no. 657 C2 del acuerdo de cooperación entre el Instituto Portugués para la Cooperación Internacional Científica y tecnológica (ICCTI) y la embajada francesa en Lisboa. Los autores agradecen la amable ayuda de los enólogos Rui Cunha, Anselmo Mendes, Euclides Rodrigues y José Domingues por facilitar las campañas de muestreo en los tres viñedos. A Ana Rodrigues, Luis Quintas y Carlos Rocha les agradecemos la ayuda en la recolección de las uvas y en el tratamiento de las muestras.*

**Artículo publicado en FEMS Microbiology Ecology 51 (2005) 167-177, traducido y publicado con la autorización del autor.**



	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	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 – primera etapa de muestreo; L – última etapa de muestreo; NF –fermentación no espontánea; NC – no recogida.

*Tabla 1 Análisis RFLP de MtDNA de 1620 levaduras aisladas de mostos fermentados preparados con uvas recogidas en los viñedos A, C y P de la Región Vinho Verde, señaladas en la Fig. 1, durante las vendimias 2001, 2002 y 2003*

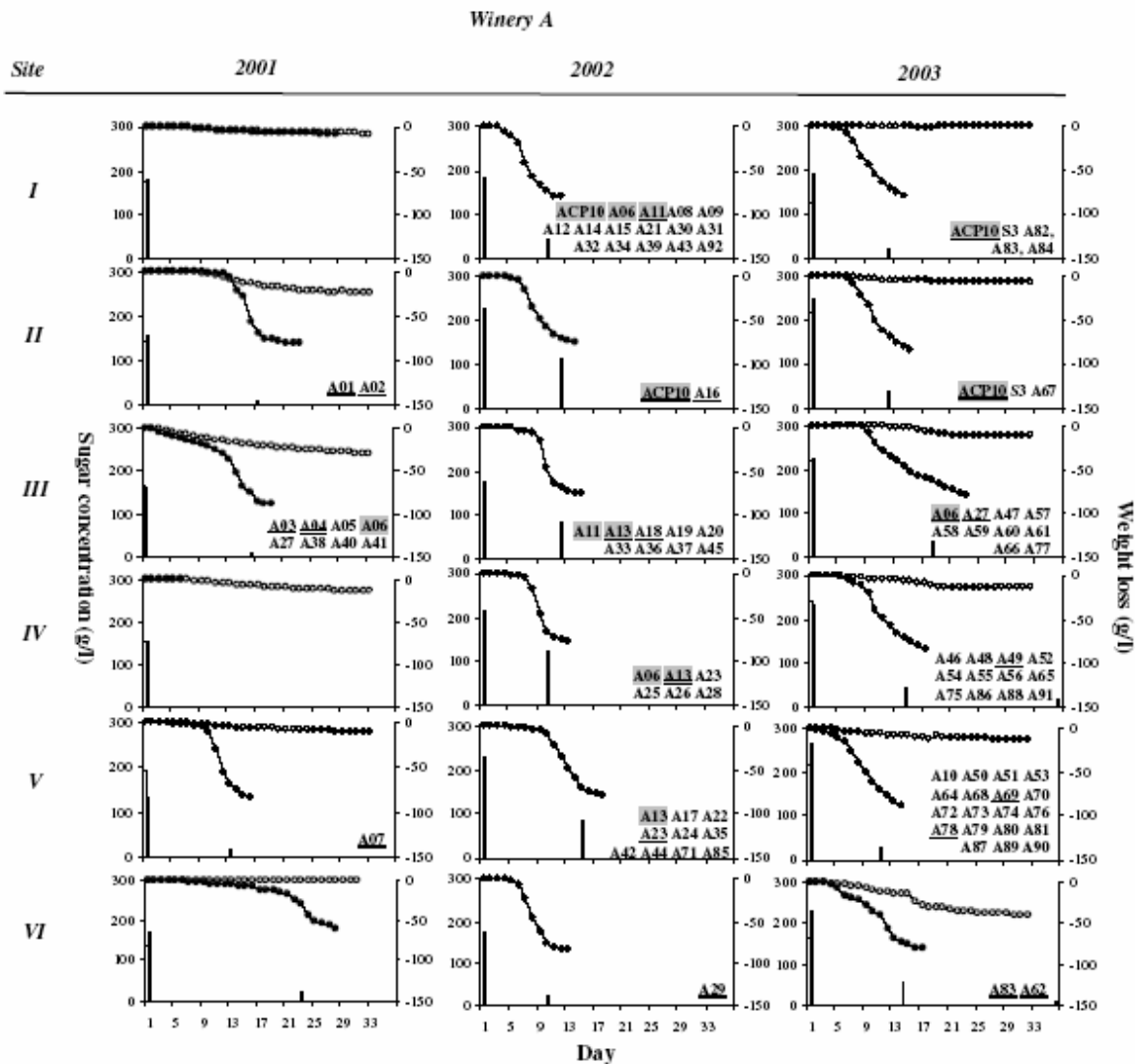


Fig. 3. Perfil de la fermentación (líneas) y contenido de azúcar (barras) de muestras de mostos tomadas en la primera (círculos abiertos y barras) y última (círculos cerrados y barras) campaña de muestreo de las que fueron aisladas las cepas analizadas en este trabajo. En cada diagrama están incluidas las designaciones de los patrones obtenidos con RFLP mtDNA de las levaduras aisladas. Las cepas predominantes están subrayadas con una línea doble (P50%) o simple (20–50%). Las designaciones de los patrones post-vendimia están en negrita. Los patrones comunes están desatacados en cuadros grises.

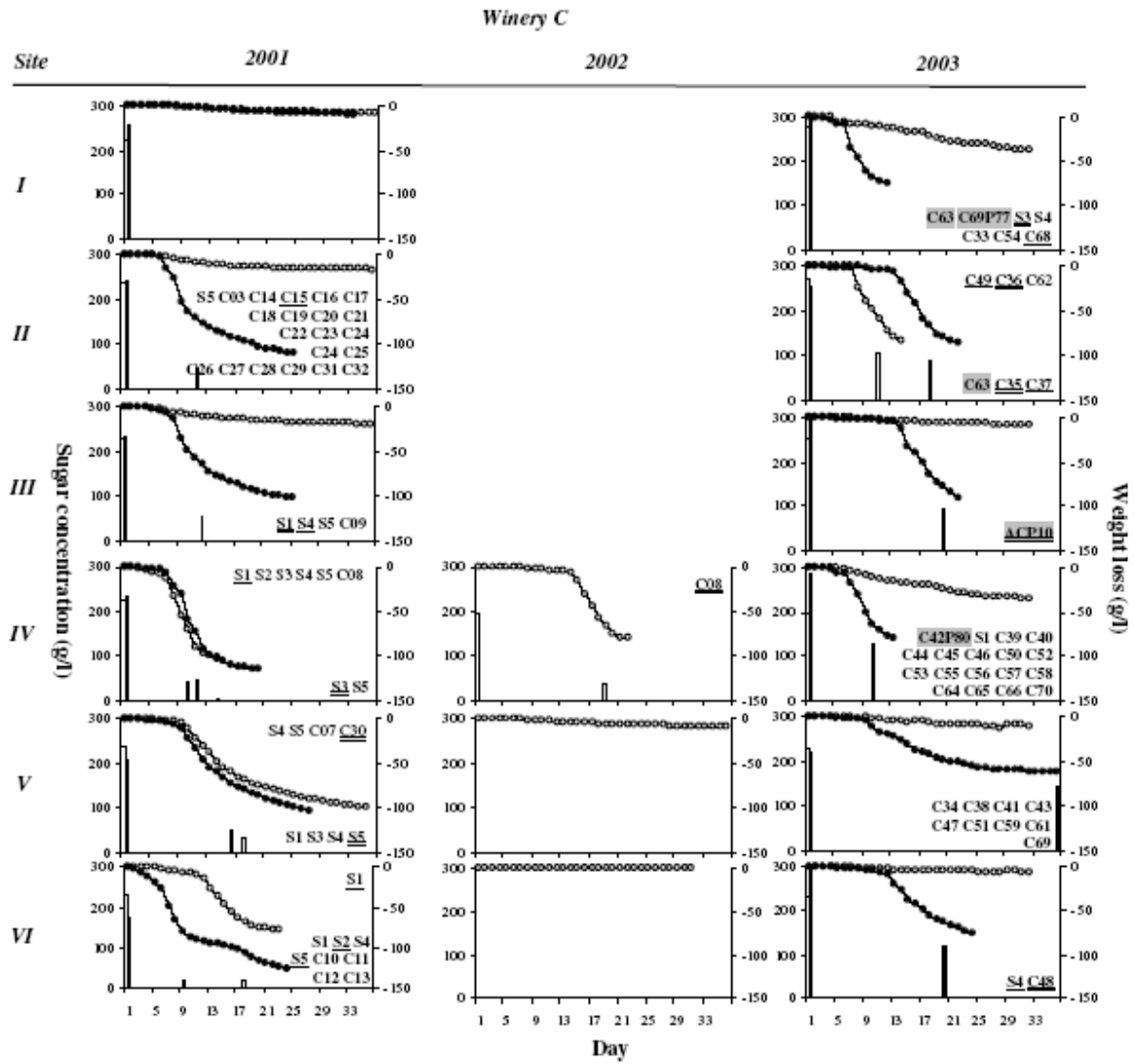


Fig.3 (continúa)

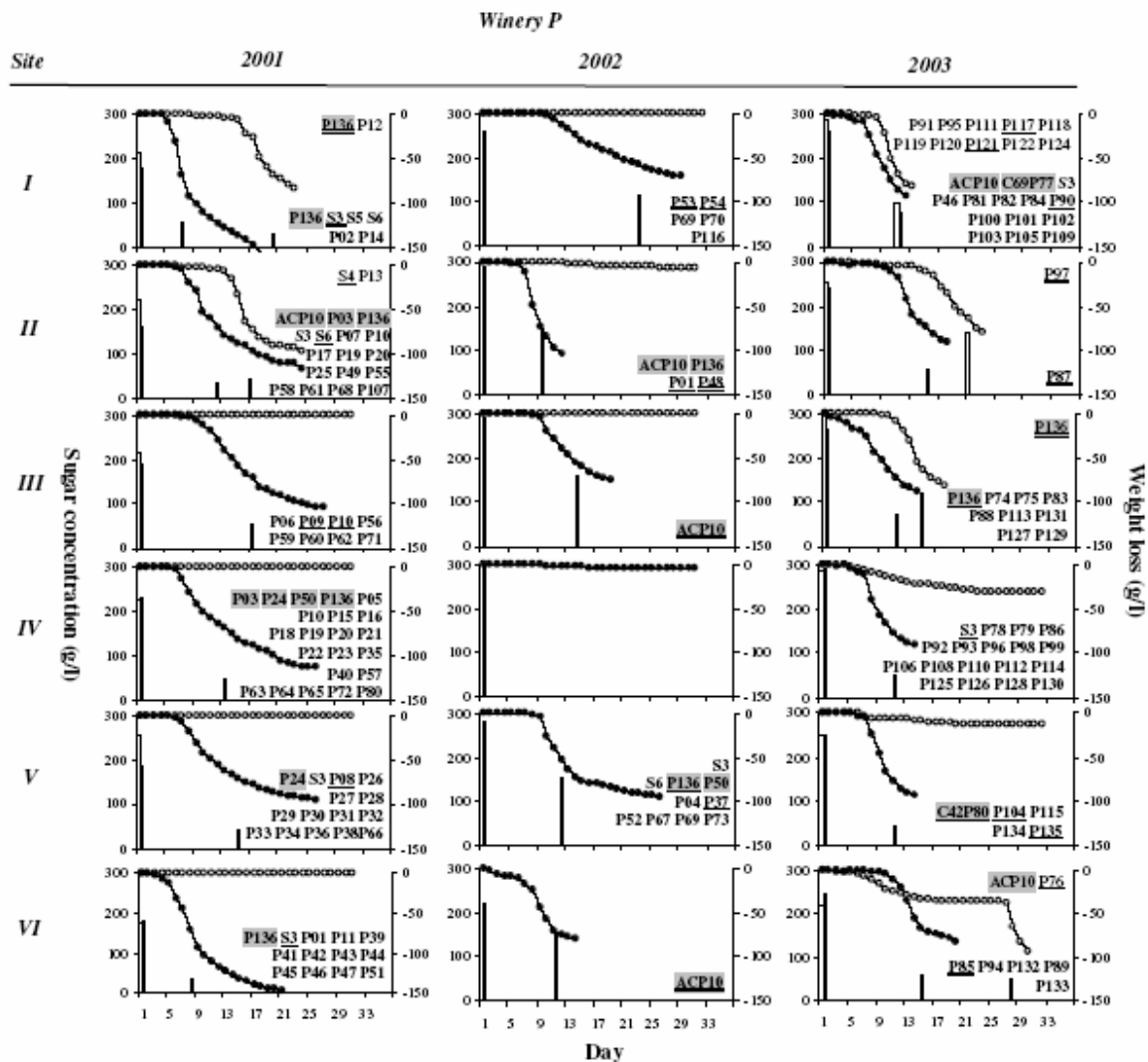


Fig.3 (continúa)

Bibliografía

- [1] Fleet, G.H. , 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. , 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. , Scorzetti, G. (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.* 47, 435–440.
- [4] Parish, M.E. , Carroll, D.E. (1985) Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 165–169.
- [5] Mortimer, R. , Polsinelli, M. (1999) On the origins of wine yeast. *Res. Microbiol.* 150, 199–204.

- [6] Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274, 546.

[24] Carro, D., Garcia-Martinez, J., Pe´rez-Ortin, J.E., 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., 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., 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., 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., 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., 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., 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., Ramon, D. (1992) A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Syst Appl. Microbiol.* 15, 439–446.

[32] Ness, F., Lavalley´e, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., Dulau, L. (1993) Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 62, 89–94.

[33] Legras, J.L., 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., 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., Dujon, B. (2001) Microsatellite typing as a new tool for identification of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J. Clin. Microbiol.* 39, 551–559.

[36] Pe´rez, M.A., Gallego, F.J., Martinez, I., 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., 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. , 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. , 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. , 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. , 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. , 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. , Hallet, J.-N. (1993) Etude écológique de la microflore levurienne spontané e du vignoble des Charentes et approche mole´culaire de la diversite´ infraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Fr. Oenol.* 142, 20–29.
- [46] Esteve-Zarzoso, B., Gostincar, A., Bobet, R., Uruburu, F. , 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. , Lopez, R. (1999) Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 411–415.
- [48] Cavallieri, D., Barberio, C., Casalone, E., Pinzauti, F., Sebastiani, F., Mortimer, R. , 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. , 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. , 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. , Martini, A. (1982) Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbiol. Ecol.* 8, 83–89.