



A microbiota do bago de uva - abordagens moleculares para compreender a contribuição da cultivar na sua diversidade

UMINHO | 2022

Carolina Silva Moreira



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Carolina Silva Moreira

**A microbiota do bago de uva -
abordagens moleculares para
compreender a contribuição da
cultivar na sua diversidade**

Outubro 2022



Universidade do Minho

Escola de Ciências

Carolina Silva Moreira

**A microbiota do bago de uva -
abordagens moleculares para
compreender a contribuição da
cultivar na sua diversidade**

Dissertação de Mestrado

Mestrado Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação do(a)

Doutora Viviana Maria Varajão Martins

Doutor António da Costa Teixeira

Outubro 2022

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do Repositório da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgal

CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, a Doutora Viviana Martins e o Doutor António Teixeira, um obrigada enorme pelo acompanhamento, pela disponibilidade, e, principalmente, pela amabilidade. É difícil encontrar orientadores tão disponíveis e tão encorajadores e eu tive uma sorte gigante. A todos os membros do Laboratório de Biologia Vegetal, em especial ao Professor Hernâni Gerós pela ajuda e ao Peter Ayogu pela companhia e trabalho conjunto no laboratório.

À Bia e ao André por todas as conversas, desabafos, crises existenciais, com stickers caóticos e fofuques pelo meio. Foram um grande apoio neste processo e nesta altura importante da minha vida e agradeço-vos do fundo do coração. Aos amigos que fiz neste mestrado e nesta universidade Catarina, Nelson e Vítor, um obrigada por enfrentarmos isto juntos. Aos Veggie Lovers, Ana, Joka e Rafa, por estarem sempre lá prontos para relaxar e rir. Agradeço também às pessoas que me ajudaram imenso num certo período do meu percurso, mesmo que agora já não estejam ao meu lado.

À melhor tuna do mundo Cientuna pelos momentos inesquecíveis ao longo destes anos, por me fazer e ver crescer enquanto pessoa, por ser um escape do stress do dia e pelas amizades mais bonitas e caóticas que podia arranjar. Em especial agradeço à Blondie, Coxa, Lacri, Manny, Pipa, São e Strx por terem vivido estas aventuras comigo, e à Lara por me ter ensinado e ajudado tanto. Às BioUrsas (em especial às do wha**up), o melhor ano, obrigada por sofrermos os maiores dramas juntos.

À minha professora de yoga, Vanessa, por me ter ajudado, sem perceber, neste ano especial com muitas emoções à mistura. As aulas foram sem dúvida um ponto crucial para a minha saúde mental e um local onde me sentia bem e eu mesma.

Por último, à minha família por todo o amor e apoio, apesar de deixar a mesa da sala toda desarrumada. Em especial agradeço à minha mãe por ter estado sempre disponível para me ouvir, para me acalmar, para me ajudar, para tudo o que eu precisasse. Dedico esta dissertação e este marco da minha vida a ti. Muito obrigada a todos!

APOIO FINANCEIRO



Este trabalho foi apoiado pelo “Contrato-Programa” UIDB/04050/2020 financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT I.P. O trabalho contou ainda com o apoio da FCT, CCDR-N (Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte de Portugal) e Fundos Europeus (FEDER/POCI/COMPETE2020) através dos projetos GrapeMicrobiota (PTDC /BAA-AGR/2691/2020). Este trabalho beneficiou das atividades em rede do laboratório colaborativo CoLAB VINES & WINES e do projeto Fleurs locales (SOE4/P5/F1011).

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

A microbiota do bago de uva - abordagens moleculares para compreender a contribuição da cultivar na sua diversidade

RESUMO

A superfície do bago de uva é colonizada por uma comunidade microbiana complexa, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos que condicionam a qualidade do fruto e do vinho e cuja diversidade e dinâmica são fortemente influenciadas pela localização geográfica da vinha, pelos tratamentos fitossanitários e por vários fatores edafoclimáticos. No entanto, a origem da microbiota e a forma como a composição química do fruto afeta a sua diversidade são temas de investigação relevantes com implicações importantes na biotecnologia dos vinhos. Deste modo, o principal objetivo do presente trabalho consistiu em compreender a interação entre a composição química do bago de uva e a sua comunidade microbiana, nas cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho da região DOC Douro, visando avaliar a contribuição da cultivar para a microbiota superficial do fruto. Duas metodologias complementares de identificação e caracterização da microbiota dos bagos de uva foram utilizadas, a primeira dependente de cultura baseada na sequenciação de Sanger e a segunda independente de cultura baseada na análise de NGS *metabarcoding*. Dezasseis espécies de levedura foram identificadas através do método dependente de cultura em meio diferencial WL o que permitiu construir um catálogo. *Aureobasidium pullulans*, *Curvibasidium pallidicorallinum*, *Filobasidium wieringae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Holtermanniella festucosa* e *Sporobolomyces roseus* foram encontradas nas 3 cultivares. Através do método de NGS *metabarcoding* foram identificadas 380 OTUs de fungos e 390 de bactérias, das quais 47% e 34%, respetivamente, foram detetadas em todas as cultivares, podendo refletir o núcleo microbiano da vinha. De acordo com os índices de *Chao1* e *Shannon*, verificou-se ainda que a diversidade alfa foi superior em Viosinho, seguido de Sousão e Touriga Nacional, mostrando que Viosinho é a cultivar com maior biodiversidade de espécies, destacando-se Ascomycota, Proteobacteria e Actinobacteria como os filos mais abundantes. Da análise PCA entre a microbiota e os parâmetros bioquímicos do bago de uva, foi possível associar os níveis de acidez titulável e pH com a expressão dos filos raros Armatimonadota, Chytridiomycota, Mortierellomycota e Chloroflexi. Para os filos mais abundantes Proteobacteria, Ascomycota e Basidiomycota não se observou uma relação direta com os parâmetros bioquímicos, sugerindo que outros fatores específicos de cada cultivar poderão determinar as proporções dos diferentes taxa. O presente trabalho desenvolveu-se no âmbito do projeto FCT GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020) que prevê também estudos de metabolómica que permitirão obter uma descrição mais detalhada da contribuição da composição do bago para a estrutura das comunidades microbianas.

Palavras-chave: Bago de uva; Diversidade alfa; Leveduras cultiváveis; *Metabarcoding*, *Vitis vinifera*

The grape berry microbiota - molecular approaches to understand the contribution of the cultivar to its diversity

ABSTRACT

The surface of the grape berry is colonized by a complex microbial community, including bacteria, yeasts and filamentous fungi that affect the quality of the fruit and wine and whose diversity and dynamics are strongly influenced by the geographical location of the vineyard, by phytosanitary treatments and by various edaphoclimatic factors. However, the origin of the microbiota and the way in which the chemical composition of the fruit affects its diversity are relevant research topics with important implications for wine biotechnology. Thus, the main objective of the present work was to understand the interaction between the chemical composition of the grape berry and its microbial community, in the cultivars Sousão, Touriga Nacional and Viosinho of the DOC Douro region, in order to evaluate the contribution of the cultivar to the microbiota of the surface of the fruit. Two complementary methodologies for identifying and characterizing the microbiota of grape berries were used, the first culture-dependent based on Sanger sequencing and the second culture-independent based on NGS metabarcoding analysis. Sixteen yeast species were identified through the culture-dependent method in WL differential medium, which allowed the construction of a catalogue. *Aureobasidium pullulans*, *Curvibasidium pallidicorallinum*, *Filobasidium wieringae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Holtermanniella festucosa* and *Sporobolomyces roseus* were found in the 3 cultivars. Through the NGS metabarcoding method, 380 OTUs of fungi and 390 of bacteria were identified, of which 47% and 34%, respectively, were detected in all cultivars, which may reflect the microbial nucleus of the vineyard. According to the indices of Chao1 and Shannon, it was also verified that the alpha diversity was higher in Viosinho, followed by Sousão and Touriga Nacional, showing that Viosinho is the cultivar with the greatest biodiversity of species, with Ascomycota, Proteobacteria and Actinobacteria comprising the most abundant phyla. From the PCA analysis between the microbiota and the biochemical parameters of the grape berry, it was possible to associate the levels of titratable acidity and pH with the expression of the rare phyla Armatimonadota, Chytridiomycota, Mortierellomycota and Chloroflexi. For the most abundant phyla Proteobacteria, Ascomycota and Basidiomycota no direct relationship with the biochemical parameters was observed, suggesting that other specific factors of each cultivar may determine the proportions of the different taxa. The present work was carried out within the scope of the FCT GrapeMicrobiota project (PTDC/BAA-AGR/2691/2020) which also includes metabolomics studies that will allow a more detailed description of the contribution of the berry composition to the structure of microbial communities.

Keywords: Alpha diversity; Cultivable yeasts; Grape berry; *Metabarcoding*; *Vitis vinifera*

ÍNDICE

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS	I
AGRADECIMENTOS	II
APOIO FINANCEIRO.....	II
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE.....	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE.....	VI
1. Introdução	1
1.1. Impacto económico da videira e do vinho	1
1.2. Fases de desenvolvimento do bago de uva e solutos-chave para a sua qualidade	2
1.3. A microbiota do bago de uva	6
1.3.1. Evolução da microbiota durante o desenvolvimento do bago de uva.....	7
1.3.2. Fatores que modelam a diversidade da microbiota	8
1.3.3. Relevância da microbiota do bago para a produção do vinho	10
1.4. Objetivos.....	12
2. Material e Métodos	14
2.1. Colheita dos bagos de uva das cultivares Viosinho, Sousão e Touriga Nacional da região DOC Douro	14
2.2. Caracterização de parâmetros biométricos e bioquímicos-chave do bago de uva	14
2.2.1. Determinação do peso seco e do diâmetro dos bagos	14
2.2.2. Quantificação de açúcares redutores.....	14
2.2.3. Determinação do pH e da acidez titulável.....	15
2.2.4. Quantificação de fenólicos totais	15
2.2.5. Quantificação de antocianinas.....	15
2.2.6. Análise estatística	16
2.3. Isolamento e identificação de leveduras cultiváveis do bago de uva	16
2.3.1. Isolamento de leveduras cultiváveis em meio diferencial WL	16
2.3.2. Identificação das espécies de levedura através da amplificação e sequenciação da região ITS16	

2.4.	Caracterização da microbiota do bago de uva por NGS <i>metabarcoding</i>	18
2.4.1.	Isolamento da microbiota e extração de DNA microbiano	18
2.4.2.	Preparação das bibliotecas de DNA, sequenciação <i>Illumina</i> e análise bioinformática dos dados em bruto	18
2.4.3.	Análise bioinformática dos dados de microbiota	19
3.	Resultados.....	20
3.1.	Caracterização dos parâmetros biométricos e bioquímicos do bago de uva	20
3.2.	Isolamento e identificação de leveduras cultiváveis do bago de uva	21
3.3.	Caracterização da comunidade microbiana do bago de uva através de análise NGS <i>metabarcoding</i>	26
3.4.	Associações entre os parâmetros bioquímicos e a microbiota do bago de uva	31
4.	Discussão.....	33
4.1.	O método de NGS <i>metabarcoding</i> e o método dependente de cultura são complementares na caracterização da microbiota do bago de uva	33
4.2.	O consórcio de leveduras cultiváveis do bago de uva varia entre cultivares e tem um elevado potencial biotecnológico.....	34
4.3.	Viosinho é a cultivar com maior biodiversidade de microrganismos na superfície dos bagos de uva	36
4.4.	As comunidades microbianas poderão ser afetadas pela composição química do bago	38
4.5.	Conclusão e perspectivas futuras	39
5.	Referências Bibliográficas	40

1. Introdução

1.1. Impacto económico da videira e do vinho

Em Portugal, a viticultura e a produção de vinho assumem grande importância do ponto de vista económico, contribuindo significativamente para as exportações nacionais e apoiando as atividades associadas ao vinho, incluindo o enoturismo. Segundo dados de 2019 da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), em Portugal foram produzidos cerca de 6,5 milhões de hl de vinho correspondendo a 2,6% do valor produzido globalmente (248 milhões de hl). Em paralelo, Portugal exportou 2,963 milhões de hl de vinho, dos 107,335 milhões de hl exportados globalmente, classificando-se como o 11º produtor e o 10º exportador de vinho do mundo (OIV, 2019). *Vitis vinifera*, que pertence à família Vitaceae, é a espécie responsável pela maior parte do vinho produzido globalmente. Em Portugal, estão descritas 240 cultivares de videira autóctones e 103 pertencentes a germoplasma externo/não nativo, contemplando um total de 343 cultivares legalmente aceites para a produção de vinho (Conde et al., 2007; Mamaot, 2012; Cunha et al., 2016). A área de vinha plantada em Portugal é de 192,028 ha, distribuídos por 14 regiões vitivinícolas (**Figura 1**), sendo a DOC Douro/Porto a mais antiga, com 44,180 ha, correspondendo a 23% da área total de vinha (Fraga et al., 2017; Instituto da Vinha e do Vinho [IVV], 2021). Ainda, segundo o *ranking* de 2017 das cultivares mais utilizadas para a produção de vinho em Portugal, Touriga Nacional é a 3ª cultivar mais plantada, abrangendo uma área de 13 032 ha e contribuindo com 7% para a produção nacional de vinho. As cultivares Sousão/Vinhão e Viosinho estão igualmente incluídas no *ranking*, abarcando uma área de 3 894 ha e 1 038 ha, contribuindo com 2% e 1% da produção nacional de vinho, respetivamente (IVV, 2017).

Vinhos produzidos a partir das mesmas cultivares cultivadas em diferentes regiões têm uma grande procura entre consumidores e colecionadores devido às suas características autóctones específicas e distintas, que leva a um incremento do valor económico de muitos produtos regionais. Estas características são determinadas por vários fatores como a composição do solo, a topografia, as condições climáticas e as técnicas de viticultura e enologia, que em conjunto estabelecem o conceito de *terroir* (Knight et al., 2015; Bokulich et al., 2016; Belda et al., 2017; Mezzasalma et al., 2017). Como detalhado em secções posteriores desta dissertação, para além destas variáveis, estudos destacam o contributo da microbiota nativa da videira para a identidade do vinho, num processo que se inicia nas vinhas e evolui ao longo das diferentes fases de fermentação na adega durante a produção do vinho. As propriedades organoléticas do vinho emergem assim da complexa interação entre fatores abióticos e

bióticos, tanto nas vinhas como na adega (Pinto et al., 2015; Belda et al., 2017; Mezzasalma et al., 2017).

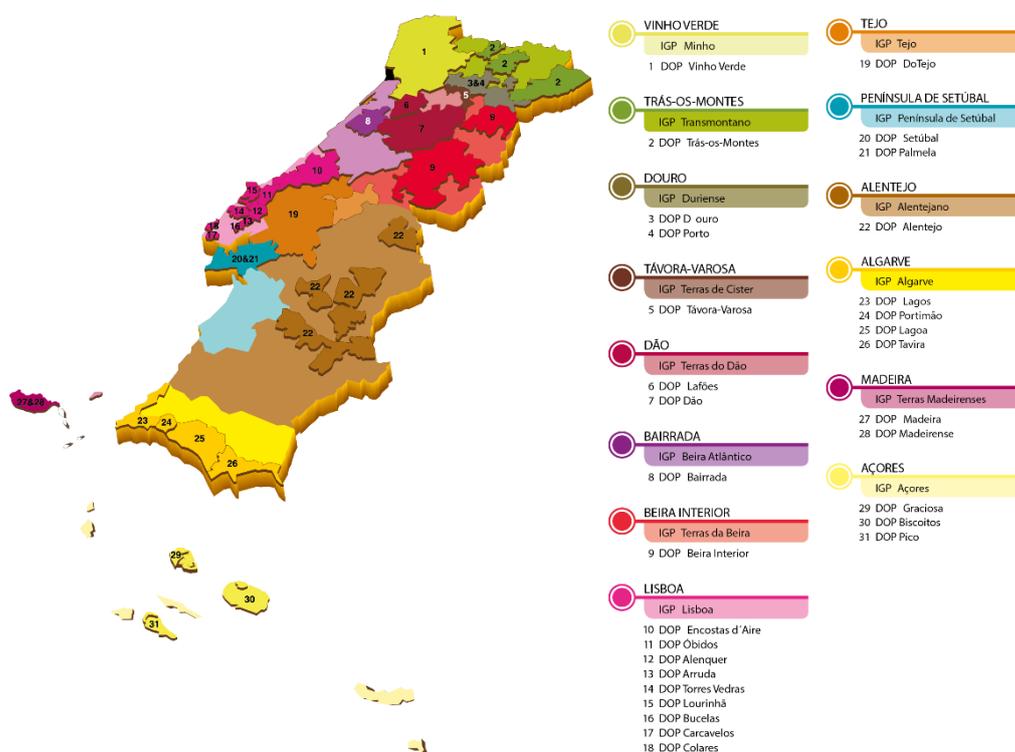


Figura 1. Regiões vitivinícolas de Portugal (adaptado do IVV). IGP – Indicação Geográfica Protegida; DOP – Denominação de Origem Protegida

1.2. Fases de desenvolvimento do bago de uva e solutos-chave para a sua qualidade

O bago de uva é composto por três tecidos principais, sendo estes a película, a polpa e a semente. À medida que o bago se desenvolve, características como o sabor, a cor, a textura, o tamanho e a suscetibilidade a agentes patogénicos são modificadas (Conde et al., 2007). O desenvolvimento do bago de uva pode ser descrito por uma curva dupla sigmoide (Coombe, 1992), com duas fases de crescimento, em que inicialmente o crescimento ocorre maioritariamente através de divisão celular e posteriormente através de expansão celular (Conde et al., 2007).

A primeira fase de crescimento dura cerca de 60 dias após a floração (Coombe, 1995), onde ocorre uma acumulação de vários compostos, incluindo ácidos tartárico e málico relevantes para a acidez do vinho, ácidos hidroxicinâmicos envolvidos na oxidação de compostos fenólicos e produção de

pigmentos escuros (reações de escurecimento), e taninos responsáveis pela adstringência (Romeyer et al., 1983; Macheix et al., 1991; Conde et al., 2007). Aminoácidos, compostos aromáticos, micronutrientes e minerais também são acumulados durante esta fase de crescimento, afetando também a qualidade do bago de uva e por sua vez do vinho. De seguida, ocorre uma fase de latência, onde não ocorre crescimento do fruto. A duração desta fase é específica para cada cultivar e termina aquando do final da fase herbácea do fruto (Ollat et al., 2002; Conde et al., 2007). A segunda fase de crescimento é iniciada pelo estado de pintor (ou *véraison* em francês), que indica a alteração da cor da película do bago, mais evidente nas cultivares tintas. A partir deste ponto, o bago começa a amadurecer até atingir o grau de maturidade total, num processo que dura cerca de 45 dias. Esta é a fase em que ocorrem as alterações mais evidentes, onde os bagos se tornam maiores, mais macios, mais doces, menos ácidos e fortemente aromáticos. Muitos dos solutos acumulados na primeira fase de crescimento do bago permanecem na segunda, no entanto a sua concentração varia, uma vez que o aumento do volume do bago leva a uma diluição destes solutos. Relativamente a outros compostos, ocorre uma acumulação significativa de açúcares, glucose e frutose, de vários compostos aromáticos e de pigmentos que conferem cor como as antocianinas (**Figura 2**) (Teixeira et al., 2013). Estes solutos são particularmente relevantes no processo de vinificação, pois os açúcares são consumidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica, enquanto as antocianinas são responsáveis pela cor do vinho tinto (Ollat et al., 2002; Conde et al., 2007).

O equilíbrio entre os conteúdos em açúcar e ácidos orgânicos influencia a qualidade organolética do bago. Os níveis de ácidos orgânicos são decisivos na determinação do potencial do mosto para produzir um vinho bom e estável. O valor do pH do vinho reflete a quantidade e a força dos ácidos, em particular os níveis e rácio entre ácido málico e ácido tartárico, bem como a quantidade de potássio, que é mais abundante nos vinhos tintos por se concentrar na película do bago. Se a acidez do vinho for demasiado baixa este adquire um sabor maçador e se for demasiado elevada adquire um trago azedo. Por sua vez, a elevada acidez do mosto (pH entre 3 e 4) previne o desenvolvimento de bactérias contaminantes, contudo, uma vez que a ação das leveduras necessita de um pH ideal entre 4 e 6, prejudica os principais processos de fermentação alcoólica. O teor de acidez titulável ideal dos bagos deve rondar os 0,65 a 0,85%, no entanto o teor de acidez do vinho depende do estilo do vinho que se deseja produzir e da quantidade de açúcar residual que resta no mesmo. Em geral, frutos que amadurecem a temperaturas mais baixas apresentam uma acidez total superior aos frutos de regiões mais quentes, como é o caso da região do Douro, uma vez que temperaturas mais elevadas estimulam

a degradação do ácido málico (Dokoozlian, 2000; Conde et al., 2007; Dai et al., 2011; Robles et al., 2019).

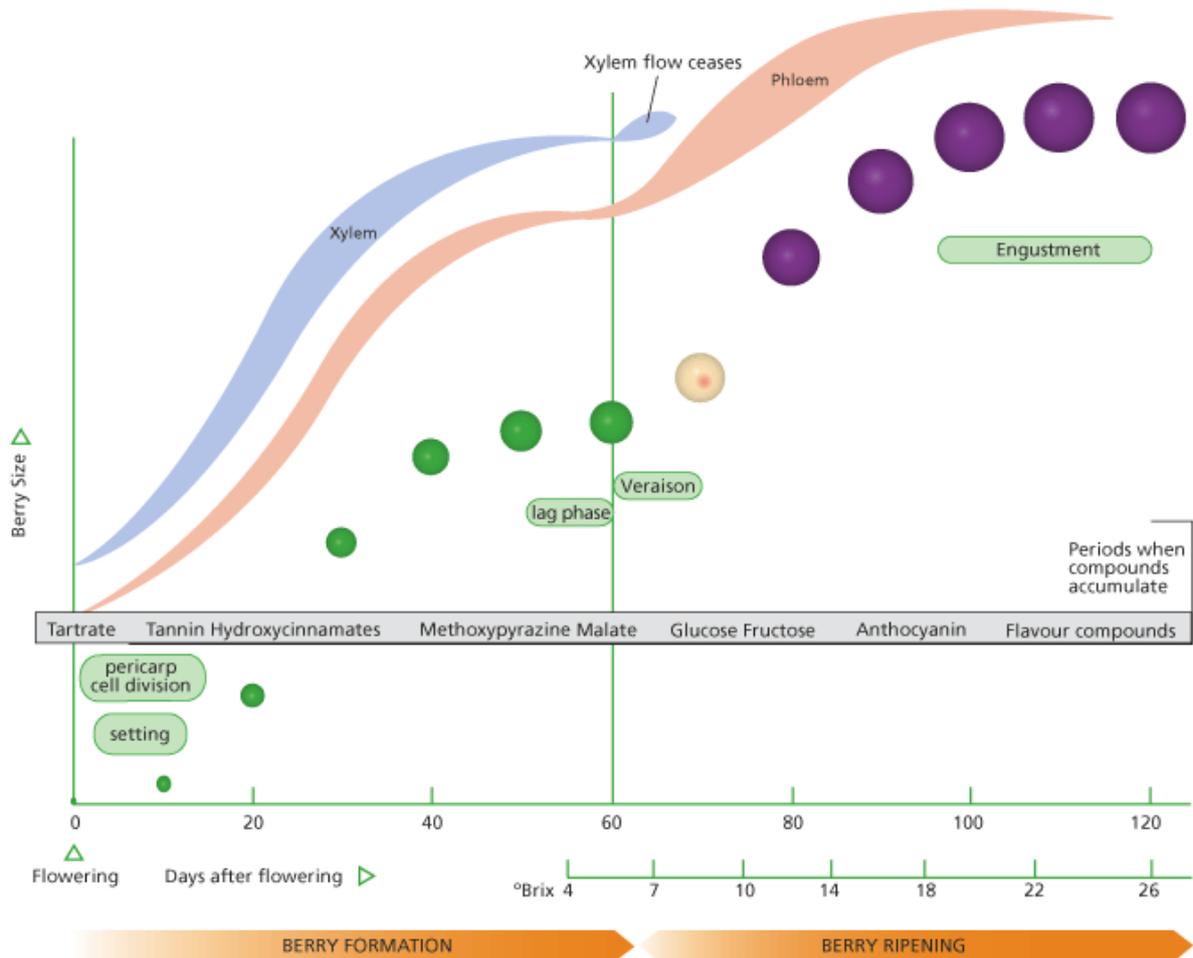


Figura 2. Diagrama representando o tamanho relativo e a cor dos bagos de uva em intervalos de 10 dias após a floração, passando pelos principais eventos de desenvolvimento (caixas arredondadas). Também são mostrados os períodos em que os compostos se acumulam, os níveis de brix do mosto, bem como os fluxos floémicos e xilêmicos. Ilustração de Jordan Koutroumanidis, Winetitles.

Os bagos de uva, de forma a suportarem o seu crescimento e desenvolvimento, dependem de recursos energéticos disponíveis produzidos pela fotossíntese, nomeadamente de hidratos de carbono como a sacarose. Não obstante, os plastídeos da película que conferem a cor ao bago verde permanecem funcionais no bago maduro (quando a cor das clorofilas é mascarada pelas antocianinas nas cultivares tintas), pelo que têm um papel importante na produção de energia e na síntese de diversos compostos orgânicos (Teixeira et al., 2022). A sacarose que é transportada dos tecidos fotossintéticos para o fruto, é maioritariamente convertida em glucose e fructose, mas pode ser também transportada por

transportadores de dissacarídeos e acumulada. Como abordado anteriormente, após a fase de pintar ocorre uma acumulação significativa de glicose e frutose no bago (nos vacúolos das células do mesocarpo) e após 20 dias, o teor de hexoses no bago atinge o valor de 1 M, com um rácio glicose/frutose de 1. O teor em açúcar é um indicador utilizado frequentemente para avaliar a maturação e a altura ideal para a vindima, uma vez que permite o teor alcoólico do vinho (Fillion et al., 1999; Conde et al., 2007; Dai et al., 2011). Além dos açúcares e dos ácidos orgânicos, outros constituintes influenciam fortemente a qualidade do vinho, como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos do vinho são moléculas naturalmente derivadas de plantas ou de microrganismos e a sua estrutura principal consiste num anel fenólico com um grupo hidroxilo associado, com várias possibilidades de substituição. Desempenham frequentemente funções proteção, agindo como inibidores biológicos ativos de crescimento de outros microrganismos ou protegendo contra a radiação UV. Além disso, são também fortes antioxidantes, sendo as catequinas, os taninos e as antocianinas, os antioxidantes naturais mais concentrados presentes nos bagos e no vinho (Mattivi et al., 2002; Conde et al., 2007; Teixeira et al., 2013). Os compostos fenólicos do bago são categorizados como não-flavonoides, onde se incluem os ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico, e como flavonoides, que incluem as antocianinas, os taninos e os monómeros flavan-3-ol. Os taninos estão presentes na película e na semente do bago enquanto as antocianinas estão geralmente presentes na película dos bagos de cultivares tintas (Conde et al., 2007; Topalovic & Mikulic-Petkovsek, 2010) (**Figura 3**).

As antocianinas absorvem luz visível e protegem contra a radiação UV e, como referido anteriormente, são responsáveis pela pigmentação dos bagos e também por muitas das cores observadas em outros tecidos vegetais, variando do vermelho ao azul. Normalmente, estas moléculas não estão presentes na sua forma livre nos bagos e no vinho, mas antes glicosiladas, o que aumenta a sua estabilidade. A malvidina-3-*O*-glucosídeo é a antocianina mais abundante do bago de uva, assim como as suas formas aciladas (Conde et al., 2007; Dai et al., 2011; Flamini et al., 2013; Teixeira et al., 2013).

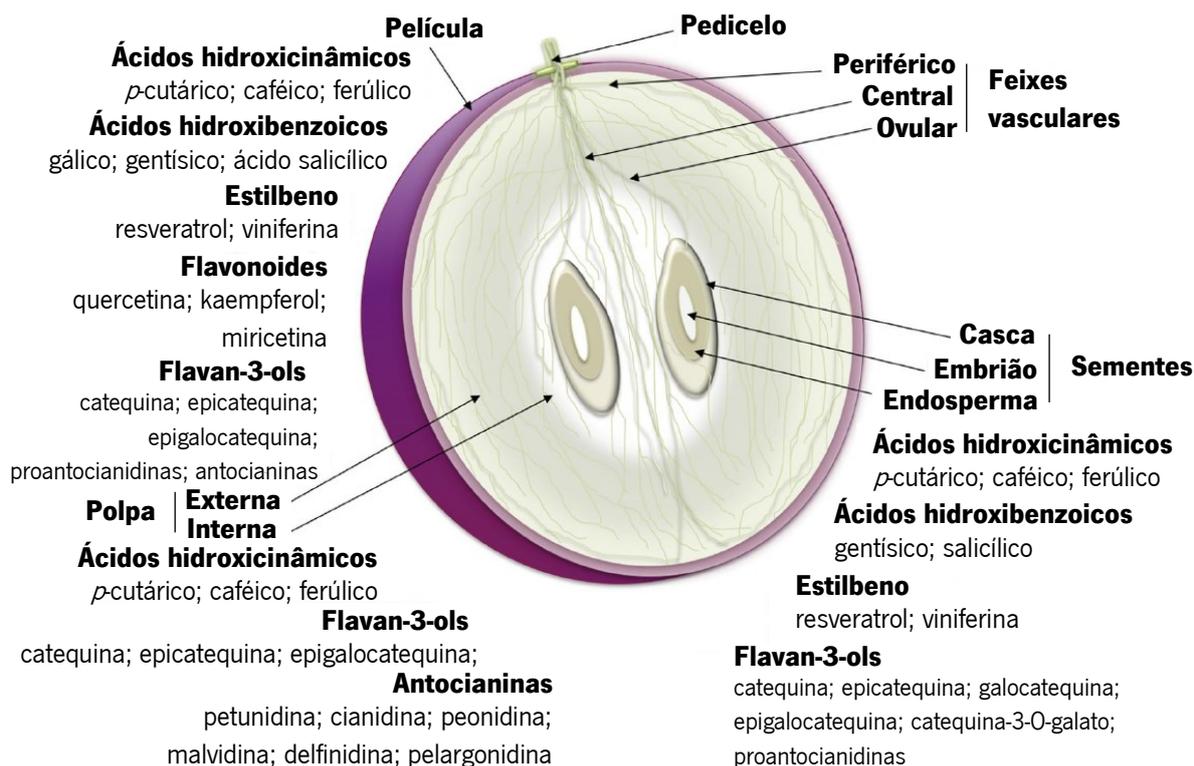


Figura 3. Estrutura esquemática de um bago de uva maduro com distribuição dos compostos fenólicos nos diferentes órgãos e tecidos (indicado por setas). Adaptado de Teixeira et al. (2013).

1.3. A microbiota do bago de uva

Os microambientes associados às plantas e frutos são colonizados por comunidades complexas de bactérias e fungos. Em particular, a superfície dos frutos fornece um ambiente rico em nutrientes para os microrganismos, cuja predominância é determinada pelo pH do fruto e pelos níveis de compostos de carbono e azoto, como os açúcares e os aminoácidos (Martins et al., 2012; Zhang et al., 2019). Os bagos de uva albergam uma ampla gama de microrganismos provenientes do ambiente da vinha, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos, muitos dos quais podem afetar significativamente a saúde e o desenvolvimento da videira e do bago, assim como influenciar o processo de vinificação (Barata et al., 2012; Mezzasalma et al., 2017). Desta forma, o estudo da comunidade microbiana indígena associada a determinadas cultivares em locais específicos pode representar uma importante fonte de metabolitos distintos, contribuindo para preservar a autenticidade do *terroir* de cada região (Pinto et al., 2015), como descrito nas próximas secções.

1.3.1. Evolução da microbiota durante o desenvolvimento do bago de uva

A comunidade microbiana do bago de uva evolui durante o seu desenvolvimento, atingindo o pico de abundância quando o tamanho e a elasticidade do bago são maiores, isto é, na fase madura (Coombe & Bishop, 1980). As duas fases principais do desenvolvimento do bago têm influência direta na dinâmica das comunidades microbianas, devido às alterações de natureza química que ocorrem na primeira fase e de natureza física na segunda fase. Na fase verde decorrem variações metabólicas no bago de uva e na fase madura ocorrem ruturas da película que levam a uma libertação gradual de compostos orgânicos voláteis e de outros nutrientes (Loureiro et al., 2012).

Alguns Basidiomicetos estão presentes em todas as fases de desenvolvimento do fruto (Renouf et al. 2005). Por exemplo, *Aureobasidium pullulans* é a levedura mais abundante na fase verde, diminuindo após o estado de pintor, juntamente com outras espécies com atividades celulolíticas e pectolíticas, até ser quase indetetável na fase de colheita. Pelo contrário, a proporção de espécies fermentativas, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia anomala*, aumenta após o estado de pintor (**Tabela 1**). Assim, esta etapa provou ser um ponto de viragem crucial para a colonização microbiana. Quanto às bactérias, *Oenococcus oeni* é detetada na frutificação e, juntamente com *Gluconobacter oxydans*, na colheita, embora não tenham sido encontradas correlações evidentes quanto à evolução das populações de bactérias com o desenvolvimento do bago (Renouf et al., 2005; Barata et al., 2012).

Tabela 1. Evolução das espécies de levedura da superfície do bago de uva ao longo do seu desenvolvimento (Adaptado de Renouf et al., 2005).

Fase de desenvolvimento do bago de uva	Espécie e proporção
Verde	<i>Aureobasidium pullulans</i> 62%
	<i>Cryptococcus sp.</i> 14%
	<i>Rhodotorula sp.</i> 12%
	<i>Rhodospordium</i> 10%
	<i>Candida sp.</i> , <i>Sporobolomyces sp.</i> , <i>Hanseniaspora sp.</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> 2%
Pintor (véraison)	<i>Candida sp.</i> 24%
	<i>Sporobolomyces sp.</i> 18%
	<i>Cryptococcus sp.</i> 16%
	<i>Rhodotorula sp.</i> 16%
	<i>Aureobasidium pullulans</i> 14%
	<i>Rhodospordium</i> 10%
	<i>Metschnikowia sp.</i> , <i>Bulleromyces albus</i> , <i>Lipomyces spencer matinsa</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia sp.</i> 2%
Maduro	<i>Cryptococcus sp.</i> 34%
	<i>Candida sp.</i> 30%
	<i>Pichia sp.</i> 16%
	<i>Rhodotorula sp.</i> 10%
	<i>Hanseniaspora sp.</i> 8%
	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Sporobolomyces sp.</i> , <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Issatchenkia sp.</i> 2%

1.3.2. Fatores que modelam a diversidade da microbiota

A localização geográfica da vinha e vários fatores edafoclimáticos, como temperatura, radiação UV, humidade e tipo de solo, influenciam a diversidade da microbiota do bago e a sua dinâmica (Renouf

et al., 2005; Dai et al., 2011). Estudos comparativos em 6 regiões DOC portuguesas mostraram uma correlação biogeográfica para populações de fungos e bactérias, expondo assim comunidades microbianas específicas de cada uma delas (Pinto et al., 2015). No entanto, a contribuição da cultivar para a microbiota dos frutos nessas regiões ainda não foi investigada. Os pesticidas e fungicidas aplicados rotineiramente na vinha para combater pragas e prevenir doenças também afetam a microbiota, que por sua vez incluiu fungos causadores de doenças como o mildio (*Plasmopara viticola*) e a podridão cinzenta (*Botrytis cinerea*) (Cordero-Bueso et al., 2011). Por sua vez, a viticultura orgânica recorre a moléculas à base de cobre e enxofre para substituir os pesticidas químicos sintéticos utilizados nos tratamentos convencionais, que demonstraram reduzir a quantidade e a heterogeneidade das leveduras. No entanto, o cobre também tem impacto negativo na diversidade e abundância da microbiota presente na superfície do bago, devido ao seu amplo espectro bactericida e fungicida, para além de ser um metal pesado contaminante do ambiente. Neste contexto, têm sido propostas outras formulações alternativas, incluindo à base de minerais e agentes biológicos (Comitini et al., 2017; Belda et al., 2020). Estudos recentes do nosso grupo de investigação mostraram que a aplicação de cálcio nas vinhas aumenta a firmeza dos bagos e reduz a incidência de fissuras na película, limitando o acesso dos microrganismos aos nutrientes do interior do fruto (Martins et al., 2020c), diminuindo a sua biodiversidade e favorecendo o crescimento de Basidiomicetos que conseguem crescer em condições de oligotrofia (Martins et al., 2021a).

Os estudos disponíveis sobre os efeitos da combinação de diversos fatores abióticos e bióticos na microbiota do fruto têm revelado resultados pouco consistentes. Em anos particularmente chuvosos e com radiação UV reduzida conduzem a um maior uso de fitoquímicos e, conseqüentemente, a uma maior proliferação de fungos e a maiores danos nos bagos. De facto, em anos com maior pluviosidade verificaram-se contagens totais de leveduras mais elevadas, devido provavelmente ao aumento do volume do bago que permite uma maior libertação de nutrientes por exosmose (Combina et al., 2005; Čadež et al. 2010; Barata et al., 2012). Contrariamente, outros estudos reportaram que em anos mais quentes e secos se verificou um maior número de leveduras no bago (Rementeria et al., 2003; Comitini & Ciani, 2006; Čadež et al., 2010; Barata et al., 2012).

Fatores bióticos também desempenham um papel relevante na diversidade da microbiota. Por exemplo, as drosófilas transportam leveduras e bactérias acéticas para os frutos, podendo desencadear a podridão azeda. Adicionalmente, foram isoladas bactérias lácticas do trato intestinal de *Drosophila simulans* recolhidas de uma adega, principalmente *Lactobacillus plantarum* (Groenewald et al., 2006;

Barata et al., 2012). Além dos invertebrados, as aves também podem contribuir para o transporte de microrganismos. Com efeito, o bico e a parte inicial do trato digestivo das aves são reservatórios de diversas espécies de contaminação dos bagos, como *Hanseniaspora uvarum* (Francesca et al., 2010; Barata et al., 2012).

1.3.3. Relevância da microbiota do bago para a produção do vinho

A microbiota complexa dos bagos de uva tem um grande impacto no sabor, qualidade e valor do vinho, pois desempenha um papel vital na fermentação. Os microrganismos metabolizam os açúcares dos bagos em vários metabolitos secundários, através de diferentes tipos de fermentação (Fleet, 2003) **(Figura 4)**.

As espécies do consórcio microbiano do vinho, que inclui leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas, podem ser agrupadas em 3 categorias: espécies facilmente controláveis ou inocentes, sem a capacidade de deteriorar o vinho quando aplicadas as boas práticas de produção; espécies fermentativas, responsáveis pela conversão de açúcar e de ácido málico; espécies de deterioração, responsáveis pela alteração do vinho mesmo quando as boas práticas de fabricação são aplicadas (Barata et al., 2012; Loureiro et al., 2012).

Relativamente às leveduras, o grupo inocente inclui espécies de Basidiomicetos que não são consideradas relevantes para a vinificação, uma vez que não conseguem fermentar os açúcares do mosto nem sobreviver nos vinhos. *A. pullulans*, um fungo Ascomiceto dimórfico comum semelhante a levedura, é também tecnologicamente irrelevante. Já as espécies de Ascomicetos oxidativas, fracamente fermentativas ou fermentativas (*Candida spp.*, *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia spp.*, *Pichia spp.*) estão presentes nas etapas de pré-fermentação ou no início da fermentação. As leveduras fermentativas são as responsáveis pela fermentação do vinho, sendo a mais importante a *S. cerevisiae*. No entanto, algumas espécies fermentativas podem se tornar de deterioração se a sua atividade persistir além das etapas fermentativas do vinho, podendo, por exemplo, produzir sabores indesejáveis (*Dekkera bruxellensis*), ou até formar sedimentos e causar turbidez (*Zygosaccharomyces bailii*) (Barata et al., 2012).

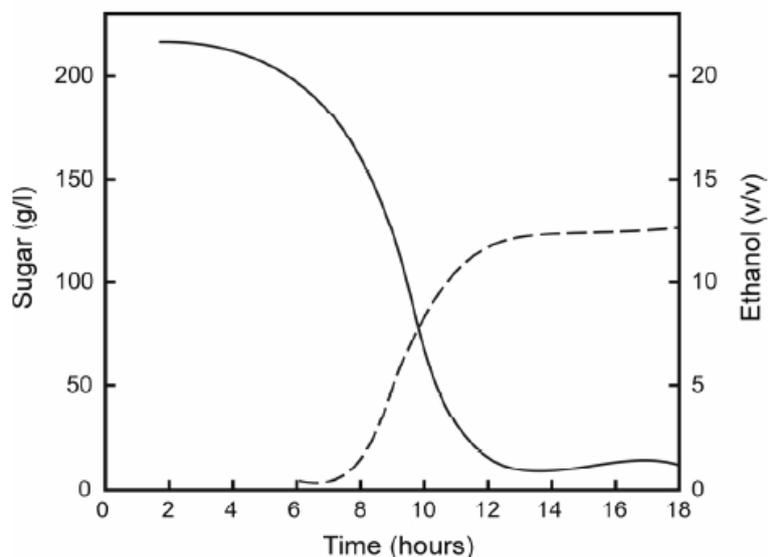


Figura 4. Consumo de açúcar (linha preenchida) e a produção de etanol (linha tracejada) durante a fermentação alcoólica conduzida por leveduras (adaptado de Conde et al., 2007).

Uma vez que bactérias acéticas são facilmente controláveis pelas boas práticas de produção na adega, estas são consideradas inocentes. Já a diversidade fisiológica das bactérias lácticas, que transformam o ácido málico em ácido láctico, não permite uma avaliação precisa do seu impacto tecnológico. Esta conversão de ácido málico em ácido láctico decorre durante a fermentação malolática, uma fermentação secundária que ocorre 2 a 3 semanas depois da fermentação alcoólica acabar, resultando num decréscimo da acidez e no realce do sabor do vinho (Fleet, 2003). *O. oeni* é a bactéria típica desta fermentação, mas *Lactobacillus spp.* e *Pediococcus spp.* também podem ser responsáveis por fermentações espontâneas. À semelhança das leveduras, estas bactérias podem produzir aromas desagradáveis ou aminas biogénicas e deteriorar o vinho se a sua atividade for para além da conversão málica, particularmente em vinhos com pH elevado (Barata et al., 2012; Martins et al., 2012).

A diversidade de fungos é maior nos bagos de uva do que no vinho, uma vez que vários taxa detetados no fruto não resistem ao processo de fermentação, devido à elevada pressão osmótica do mosto e à pressão seletiva exercida pelo etanol formado pelas espécies fermentativas. Em particular, muitas espécies fermentativas como *S. cerevisiae* predominam no vinho, mas são pouco abundantes no bago. De igual forma, muitos taxa bacterianos não conseguem resistir à transição das condições aeróbicas do bago para as anaeróbicas do mosto, além de serem muitas vezes suscetíveis ao efeito antimicrobiano de metabolitos secundários libertados do bago e do etanol presente no vinho (Mezzasalma et al., 2017).

A importância biotecnológica de leveduras e bactérias do bago e do vinho tem sido cada vez mais explorada (**Tabela 2**), e o papel das leveduras não-*Saccharomyces* para melhorar as propriedades organolépticas do produto final foi recentemente reconhecido (Loureiro et al., 2012; Pinto et al., 2015; Varela & Borneman, 2017).

Tabela 2. Espécies não-*Saccharomyces* comumente encontradas em vinhas e adegas e as suas potenciais aplicações biotecnológicas. Adaptado de Varela & Borneman, 2017.

Espécie de levedura	Características biotecnológicas relevantes	Usos potenciais
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Produção de enzimas; agente de biocontrole; produção de polissacarídeos; consumo de poluentes	Vinificação, biocontrole, indústria alimentar, farmacêutica, biorremediação
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Fermentação do mosto de uva, cacau, sumo de laranja e sumo de maçã; produção de enzimas; agente de biocontrole	Vinificação, produção de sidra, indústria alimentar, biocontrole
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Capacidade de fermentação; agente de biocontrole	Vinificação, biocontrole
<i>Rhodotorula glutinis</i>	Produção de arabinofuranosidase; acúmulo de lipídios; produção de carotenóides	Vinificação, aditivos alimentares, produção de biocombustíveis, farmacêutica, química

1.4. Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo compreender a interação entre a composição química do bago de uva e a sua comunidade microbiana, no sentido de validar a hipótese formulada que a quantidade e diversidade da microbiota superficial do bago de uva é dependente da cultivar. No seu conjunto, pretendemos contribuir para o avanço do estado da arte num tema científico ainda pouco explorado, mas que comporta importantes dimensões biotecnológicas. O estudo foi realizado em três

cultivares importantes do DOC Douro, nomeadamente, Touriga Nacional, Sousão e Viosinho sujeitas ao mesmo microclima. O estudo da microbiota foi realizado com duas abordagens complementares, baseadas no isolamento de espécies de levedura cultiváveis do bago de uva e na caracterização da comunidade de bactérias e fungos por *metabarcoding*. Os objetivos do trabalho enquadram-se no projeto FCT GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020) que visa a exploração do *terroir* microbiano e a utilização de estirpes nativas para produção de vinhos regionais de excelência com elevada tipicidade.

2. Material e Métodos

2.1. Colheita dos bagos de uva das cultivares Viosinho, Sousão e Touriga Nacional da região DOC Douro

Vinte cachos maduros (EL-38; Coombe, 1995) foram aleatoriamente colhidos de videiras das cultivares Viosinho, Sousão e Touriga Nacional, localizadas na Quinta de S. Luiz da região DOC Douro (41.16N, -7.62W). As videiras de todas as cultivares estavam expostas ao mesmo microclima e sujeitas aos mesmos tratamentos fitossanitários. Os bagos foram transportados para o laboratório em sacos de refrigeração contendo blocos de congelação.

2.2. Caracterização de parâmetros biométricos e bioquímicos-chave do bago de uva

2.2.1. Determinação do peso seco e do diâmetro dos bagos

O peso seco dos bagos de uva foi determinado após pesagem de 24 frutos frescos numa balança de precisão *Metler Toledo*, seguida de secagem a 60 °C durante 3 dias e posterior pesagem do material seco. O diâmetro dos bagos foi estimado utilizando um paquímetro.

2.2.2. Quantificação de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores presente nos bagos foi determinada através do método de Miller (1959), com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para o efeito, os bagos foram macerados em azoto líquido e a 200 mg de peso fresco foram adicionados 1,5 mL de H₂O. A extração dos açúcares foi feita por homogeneização das amostras num vórtex durante 5 min. Os extratos foram centrifugados a 10 000 *xg* durante 5 min, e diluídos 20 x em H₂O. A 250 µL de extrato diluído foram adicionados 250 µL do reagente DNS. De seguida, os tubos foram fervidos em banho-maria durante 3 min e arrefecidos em água fria. A absorvância das amostras foi medida a 540 nm num espectrofotómetro *Genesys 20*, e a concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva de calibração construída a partir dos valores de absorvância obtidos pela reação do DNS com soluções de glucose de concentrações pré-definidas. Os resultados foram expressos em mg de açúcares redutores (em equivalentes de glucose) por mg de peso fresco, e representados pela média ± desvio padrão de 4 réplicas biológicas.

2.2.3. Determinação do pH e da acidez titulável

Os bagos de uva foram esmagados para extração do mosto, e o pH foi determinado com um analisador multiparamétrico *Consort C-860*. A acidez titulável foi determinada através do método de Amerine e Ough (1980). A 4 mL de mosto foi adicionada, gota a gota, uma solução de NaOH (0,1 N) até se atingir o pH de 8,2 (Martins et al., 2015). A acidez titulável foi expressa em equivalentes de ácido tartárico através da fórmula: $TA (\%) = (\text{volume de NaOH adicionado} \times \text{molaridade da solução de NaOH} \times 75) / \text{volume da amostra de mosto}$. As quantificações foram realizadas em 4 réplicas biológicas por cultivar.

2.2.4. Quantificação de fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais foi realizada através do método de colorimetria *Folin-Ciocalteu* (Waterhouse, 2002). Para o efeito, os bagos foram macerados em azoto líquido e a 200 mg de peso fresco foi adicionado 1 mL de metanol. As amostras foram homogeneizadas durante 5 min no vórtex e centrifugadas a 10 000 $\times g$ durante 10 min. Recolheu-se 10 μL do sobrenadante para um novo tubo, no caso das cultivares Sousão e Touriga Nacional, e 50 μL , no caso de Viosinho, aos quais se adicionou 1,5 mL e 1,45 mL de H_2O , respetivamente, e 100 μL de reagente *Folin*. As misturas foram homogeneizadas no vórtex e a cada tubo foram ainda adicionados 300 μL de Na_2CO_3 (2 M). Após incubação das amostras à temperatura ambiente durante 15 min, no escuro, foi medida a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro *Genesys 20*. A concentração de fenólicos totais foi determinada através de uma curva de calibração construída com soluções de ácido gálico de concentrações pré-definidas. Os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais (em equivalentes de ácido gálico) por mg de peso fresco, e representados pela média \pm desvio padrão de 4 réplicas biológicas.

2.2.5. Quantificação de antocianinas

A quantificação das antocianinas foi efetuada através de uma simplificação do método de pH diferencial (Nicoué et al., 2007; Martins et al., 2020a). A extração dos metabolitos foi realizada por adição de 1 mL de metanol a 200 mg de peso fresco e o homogeneizado foi centrifugado a 10 000 $\times g$ durante 10 min. O sobrenadante foi diluído 5 x. A cada amostra foram adicionados 900 μL de KCl (25 mM) pH 1.0 e a absorvância foi medida a 520 nm, num espectrofotómetro *Genesys 20*. A concentração de

antocianinas totais foi determinada através do coeficiente de extinção molar da malvidina-3-*O*-glucosídeo (Nicoué et al., 2007), e os resultados foram expressos em mg de antocianinas totais (em equivalentes de malvidina-3-*O*-glucosídeo) por mg de peso fresco, e representados pela média \pm desvio padrão de 4 réplicas biológicas.

2.2.6. Análise estatística

O teste ANOVA foi utilizado para analisar os resultados, no software Prism®6 (GraphPad Software, Inc.). As diferenças estatisticamente significativas entre cultivares estão assinaladas com letras diferentes (a, b, c), para um valor de $P \leq 0.05$.

2.3. Isolamento e identificação de leveduras cultiváveis do bago de uva

2.3.1. Isolamento de leveduras cultiváveis em meio diferencial WL

Os bagos foram retirados dos cachos e esmagados manualmente em recipientes estéreis. Para cada cultivar foram realizadas 4 réplicas biológicas, com 500 mL de mosto. Aliquotas de cada um dos mostos foram diluídas 2 x em dH₂O estéril e, 100 μ L de cada amostra foram plaqueados em meio sólido diferencial WL (*Wallerstein Laboratory Medium*), composto por 0,45 g/L de hidrolisado de caseína, 4 g/L de extrato de levedura, 50 g/L de glucose, 0,57 g/L de KH₂PO₄, 0,43 g/L de KCl, 35 mg de CaCl₂.2H₂O, 0,12 g/L de MgSO₄.7H₂O, 0,25 g/L de FeCl₃.7H₂O, 0,25 g/L de MnSO₄.H₂O, 0,22 g/L de corante verde de bromocresol e 20 g/L de agar, suplementado com 0,005% do antibiótico cloranfenicol, de modo a inibir o crescimento de bactérias, e 0,02% de bifenil para inibir o crescimento de fungos filamentosos (Pallmann et al., 2001). As placas foram incubadas a 24 °C e após 5 dias procedeu-se ao isolamento de colónias para meio WL fresco. Para cada tipo de colónia (distinguida pela sua coloração e morfologia), foram selecionados vários exemplares, a fim de se obterem diferentes isolados para cada uma das espécies (Pallmann et al., 2001).

2.3.2. Identificação das espécies de levedura através da amplificação e sequenciação da região ITS

Para a identificação das espécies de levedura isoladas anteriormente, procedeu-se à amplificação por PCR da região da unidade de repetição de rDNA, que engloba o gene de rRNA 5,8S e

os espaçadores transcritos internos ITS1 e ITS2, utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Foram diretamente recolhidas porções das colónias isoladas para tubos de PCR, recorrendo-se ao método de *colony PCR*. Depois de incubadas durante 1 min no microondas a 600 W para disrupção das células, adicionou-se a cada tubo 30 µL de uma mistura de reação PCR contendo 15 µL de *NZYTaq II 2x Green Master Mix* (NZYtech, Lda.), 0,45 µL do *primer forward* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), 0,45 µL do *primer reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), ambos de soluções stock a 10 µM, e 14,1 µL de H₂O ultrapura estéril. Simultaneamente, preparou-se uma reação de controlo negativo, composta apenas pela mistura de reação PCR. As condições de PCR aplicadas foram as seguintes: desnaturação inicial da cadeia dupla de DNA a 95 °C durante 15 min + 35 ciclos x [desnaturação a 94 °C durante 30 s + hibridação dos *primers* a 55,5 °C durante 30 s + extensão da cadeia a 72 °C durante 1 min] + extensão final a 72 °C durante 10 min.

De modo a confirmar que as regiões esperadas tinham sido amplificadas com sucesso, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TAE 0.5 x contendo o corante de DNA *Xpert Green* (Grisp Research Solutions), onde 5 µL de cada produto de PCR e 5 µL de marcador de DNA (Grisp Research Solutions) foram carregados. Submetendo os géis a luz UV, foi possível visualizar as bandas de DNA e confirmar a amplificação da região pretendida.

Os produtos de PCR foram posteriormente purificados pela adição de 80 µL de isopropanol a 75% (v/v) a 20 µL de produto de PCR. Após incubação à temperatura ambiente durante 15 min, as amostras foram centrifugadas a 10 000 *xg* durante 30 min e, invertendo cuidadosamente os tubos em papel absorvente, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado em 150 µL de isopropanol a 75% (v/v) e deixado secar durante 30 min. Por fim, ressuspendeu-se o *pellet* em 10 µL de H₂O ultrapura e determinou-se a concentração de DNA e o respetivo grau de pureza, com o auxílio de um espectrofotómetro *Nanodrop™ 2000*. As amostras de DNA foram enviadas para sequenciação de Sanger por uma empresa especializada, utilizando o *primer reverse* ITS4. As espécies de levedura foram identificadas por comparação das sequências ITS obtidas com as depositadas na base de dados NCBI, utilizando o programa BLASTN.

2.4. Caracterização da microbiota do bago de uva por NGS *metabarcoding*

2.4.1. Isolamento da microbiota e extração de DNA microbiano

A biomassa microbiana presente na superfície dos bagos foi recolhida através da lavagem de 200 bagos frescos em 300 mL de solução isotónica (NaCl a 0,9% m/v), durante 3 horas em agitação horizontal a 150 r.p.m. (Mezzasalma et al., 2017; Martins et al., 2021a). A suspensão celular foi centrifugada a 4500 $\times g$ durante 5 min e os *pellets* foram armazenados a -80 °C até a extração do DNA ser realizada. O DNA genómico foi extraído dos *pellets* microbianos utilizando o kit *DNeasy PowerSoil* (Qiagen), de acordo com as instruções descritas pelo fabricante. A integridade do DNA foi confirmada através de uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE 0.5 x contendo corante de DNA *Xpert Green* (Grisp Research Solutions).

2.4.2. Preparação das bibliotecas de DNA, sequenciação *Illumina* e análise bioinformática dos dados em bruto

A preparação das bibliotecas de DNA, a sequenciação *Illumina* e a análise bioinformática inicial foram realizadas pela empresa especializada StabVida (Caparica, Portugal), em 4 réplicas biológicas por cultivar, no total de 12 amostras (Martins et al., 2021a). Para cada amostra de DNA, foram preparadas duas bibliotecas de DNA independentes, para fungos e bactérias, seguindo as instruções do manual *Illumina (Fungal Metagenomic Sequencing Demonstrated Protocol e 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol)*. Para a identificação de microrganismos eucariontes, foi amplificada a região ITS1 de rRNA e, para a identificação de microrganismos procariontes, as regiões V3 e V4 do gene 16S de rRNA. Os fragmentos de DNA obtidos foram sequenciados com o kit de reagentes v3 de *MiSeq* na plataforma *MiSeq* da *Illumina*, utilizando leituras de sequenciação *paired-end* de 300 bp (100 000 leituras). A análise dos dados em bruto foi realizada usando o programa QIIME2 v2020.6 e a qualidade dos dados produzidos foi determinada pelo índice de qualidade *Phred*, em cada ciclo. As sequências foram selecionadas usando o *plugin* DADA2, cortando e truncando regiões de baixa qualidade, eliminando leituras replicadas e filtrando quimeras. As sequências foram organizadas em Unidades Taxonómicas Operacionais (OTUs) e classificadas por taxa. As sequências anotadas como pertencendo a mitocôndrias ou cloroplastos do hospedeiro não foram consideradas na lista final de OTUs microbianos.

2.4.3. Análise bioinformática dos dados de microbiota

A informação das OTUs foi importada para o programa R versão 4.0.3 (<https://cran.r-project.org/>) e analisada com os pacotes *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) e *vegan* (Oksanen et al., 2013). A diversidade alfa de cada amostra foi calculada através dos índices *Chao1* e *Shannon-Weaver* e as diferenças estatisticamente significativas foram avaliadas com os testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis* e *Dunn*. Por sua vez, a diversidade beta foi avaliada com a análise de escala multidimensional (PCoA) e ANOVA baseada em permutações (PerMANOVA), usando o índice de *Bray-Curtis* como medida de dissimilaridade e a função de *adonis2* (pacote *vegan*, v. 2.5–7) (Martins et al., 2021a). Os gráficos de barras detalhando a distribuição das OTUs por filo em cada cultivar foram feitos usando o pacote *ggplot*. Por fim, foi efetuada uma análise de componentes principais (PCA) *Bi-Plot* dos filios identificados e dos parâmetros bioquímicos quantificados na secção 2.2, usando o pacote *FactoMineR*.

3. Resultados

3.1. Caracterização dos parâmetros biométricos e bioquímicos do bago de uva

A análise dos parâmetros biométricos mostrou que os bagos de uva da cultivar Sousão têm um peso seco superior aos bagos das cultivares Touriga Nacional e Viosinho, apesar de não se terem verificado diferenças no diâmetro dos bagos entre cultivares (**Tabela 3**). A análise dos parâmetros bioquímicos revelou que os bagos de uva das cultivares Sousão e Touriga Nacional possuem um teor significativamente maior em açúcares redutores e fenólicos totais do que os bagos da cultivar Viosinho. Por outro lado, os bagos das cultivares Sousão e Viosinho apresentaram uma menor acidez titulável do que os bagos da cultivar Touriga Nacional. A concentração de antocianinas foi semelhante entre as cultivares tintas, sendo que estes pigmentos não foram detetados na cultivar branca (**Tabela 3**).

Tabela 3. Parâmetros biométricos e bioquímicos dos bagos de uva das cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho. Os resultados indicam a média \pm desvio padrão. Diferenças estatisticamente significativas entre cultivares estão indicadas por letras diferentes ($P \leq 0,05$). N.D. – *não detetado*.

		CULTIVARES		
		Sousão	Touriga Nacional	Viosinho
PARÂMETROS	Peso seco (mg)	472,20 \pm 34,65 ^a	384,45 \pm 50,60 ^b	359,32 \pm 44,07 ^b
	Diâmetro (mm)	13,03 \pm 2,04 ^a	12,45 \pm 0,96 ^a	13,03 \pm 0,60 ^a
	Açúcares redutores ($\mu\text{g mg}^{-1}$ P.F.)	157,33 \pm 11,15 ^a	153,51 \pm 1,65 ^a	136,15 \pm 4,95 ^b
	pH	3,41 \pm 0,03 ^a	3,88 \pm 0,03 ^b	3,70 \pm 0,03 ^c
	Acidez titulável (g L^{-1})	5,34 \pm 0,08 ^a	6,10 \pm 0,38 ^b	4,97 \pm 0,11 ^a
	Fenólicos totais ($\mu\text{g mg}^{-1}$ P.F.)	359,55 \pm 34,87 ^a	320,68 \pm 21,25 ^a	85,25 \pm 14,78 ^b
	Antocianinas ($\mu\text{g mg}^{-1}$ P.F.)	1,56 \pm 0,26 ^a	1,42 \pm 0,09 ^a	N.D.

3.2. Isolamento e identificação de leveduras cultiváveis do bago de uva

A inoculação de meio diferencial WL com mosto obtido a partir de bagos de uva de cada cultivar resultou no crescimento de diversos tipos de colónias de levedura, após 5 dias de incubação a 24 °C (**Figura 5**).

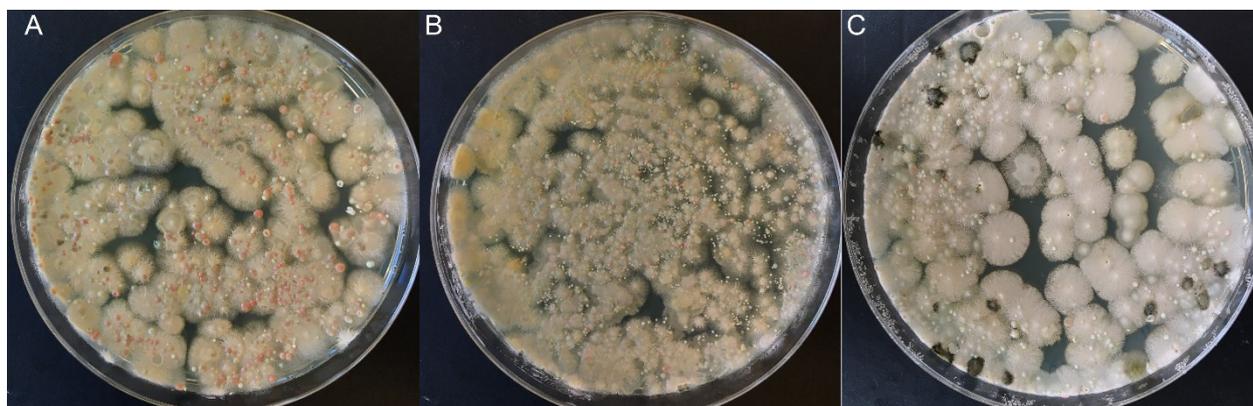


Figura 5. Colónias de levedura obtidas após inoculação de meio diferencial WL com 100 µl de mosto das cultivares Sousão (A), Touriga Nacional (B) e Viosinho (C), e incubação durante 5 dias a 24 °C. Imagens representativas de 4 réplicas biológicas.

Vários exemplares de cada tipo de colónia observada foram então isolados e, usando os *primers* universais ITS1 e ITS4, as suas regiões ITS foram amplificadas por PCR. Para confirmar que a amplificação ocorreu como desejado, os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (**Figura 6**). Os resultados mostraram que a região pretendida foi amplificada em todos os isolados, exceto nos isolados nº 6, 7, 13, 101, 102, 218 e 226, pelo que a reação de PCR foi repetida e nalguns casos recorreu-se também ao método de *nested* PCR, em que a amostra de PCR anterior foi utilizada como molde de DNA na nova reação (**Figura 6**). Desta forma, confirmou-se que a região ITS de todos os isolados foi amplificada com sucesso. Verificou-se ainda, através do controlo negativo, que não houve amplificação de produto PCR na ausência de molde de DNA (resultado não apresentado).

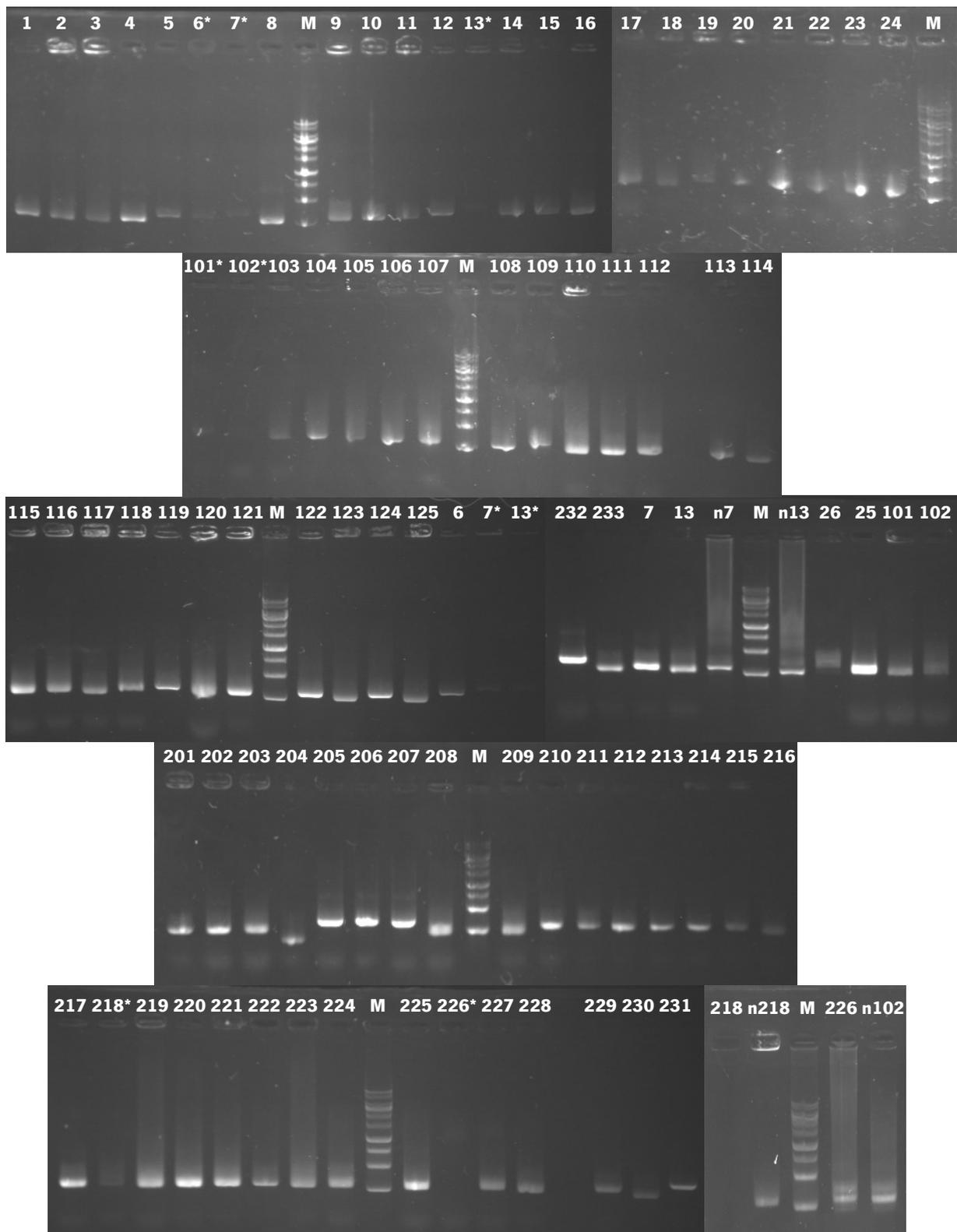


Figura 6. Produtos de PCR da região ITS de diferentes isolados de levedura das cultivares Viosinho (1 a 25), Sousão (101 a 125 + n102) e Touriga Nacional (201 a 233 + n218) visualizados em géis de agarose a 1% (m/v). M – Marcador de DNA; n – *nested* PCR ; * – Isolados para os quais a reação de PCR foi repetida.

Após sequenciação de *Sanger* dos produtos de PCR purificados, a espécie correspondente a cada isolado foi identificada, recorrendo à ferramenta BLASTN do NCBI, onde foram comparadas as sequências obtidas com a informação disponível na base de dados. A identificação foi realizada com base no critério de melhor *ranking* (melhor grau de homologia), sustentado pelos valores de *max score*, *query coverage*, *E value* e *percentage identity*. No total, foram identificadas 16 espécies diferentes de levedura, para as quais um exemplo de resultado da análise BLASTN se encontra apresentado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Espécies identificadas por *Blast* das sequências ITS amplificadas, no programa BLASTN do NCBI. Para cada espécie, está apresentado um exemplo de um isolado e os valores correspondentes de *max score*, *query coverage*, *E value* e *percentage identity* obtidos.

Nome da espécie	Nº do Isolado	Max Score	Query Cover	E Value	Percent Identity
<i>Aureobasidium pullulans</i>	101	1000	97%	0,0	99,64%
<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	119	1026	46%	0,0	100,00%
<i>Filobasidium magnum</i>	121	1057	95%	0,0	100,00%
<i>Filobasidium stepposum</i>	107	1081	46%	0,0	99,33%
<i>Filobasidium wieringae</i>	124	1042	94%	0,0	100,00%
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	207	1275	67%	0,0	99,86%
<i>Holtermanniella festucosa</i>	125	939	46%	0,0	99,23%
<i>Holtermanniella takashimae</i>	117	942	47%	0,0	99,42%
<i>Metschnikowia sp.</i>	204	558	37%	3e-154	96,21%
<i>Rhodosporidium babjevae</i>	12	1051	98%	0,0	99,83%
<i>Rhodotorula babjevae</i>	105	972	45%	0,0	97,54%
<i>Rhodotorula glutinis</i>	7	1020	94%	0,0	100,00%
<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	103	1033	96%	0,0	99,82%
<i>Sporobolomyces roseus</i>	226	1038	97%	0,0	99,48%
<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>	8	1016	95%	0,0	99,82%
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	209	870	93%	0,0	100,00%

Após a identificação das espécies de levedura pode verificar-se a presença de espécies ubíquas nas três cultivares, incluindo *A. pullulans*, *C. pallidicorallinum*, *F. wieringae*, *H. festucosa*, *H. uvarum* e

S. roseus (**Tabela 5**), assim como espécies obtidas unicamente a partir de uma cultivar, como é o caso de *Rhodosporidium babjevae*, *R. glutinis* e *S. ruberrimus* em Viosinho, de *F. magnum*, *H. takashimae* e *S. metaroseus* em Sousão, e de *Metschnikowia sp.* em Touriga Nacional (**Tabela 5**).

Tabela 5. Lista de espécies isoladas das cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho.

		CULTIVARES		
		Sousão	Touriga Nacional	Viosinho
ESPECIES	<i>Aureobasidium pullulans</i>	X	X	X
	<i>Curvibasidium pallidicorallinum</i>	X	X	X
	<i>Filobasidium magnum</i>	X		
	<i>Filobasidium stepposum</i>	X		X
	<i>Filobasidium wieringae</i>	X	X	X
	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	X	X	X
	<i>Holtermanniella festucosa</i>	X	X	X
	<i>Holtermanniella takashimae</i>	X		
	<i>Metschnikowia sp.</i>		X	
	<i>Rhodosporidium babjevae</i>			X
	<i>Rhodotorula babjevae</i>	X	X	
	<i>Rhodotorula glutinis</i>			X
	<i>Sporidiobolus metaroseus</i>	X		
	<i>Sporobolomyces roseus</i>	X	X	X
	<i>Sporobolomyces ruberrimus</i>			X
	<i>Vishniacozyma victoriae</i>		X	X

Foi ainda possível a construção de um catálogo das diferentes espécies de levedura com a sua caracterização fenotípica, no plano macroscópico e microscópico (**Figura 7**). Ao nível macroscópico, é possível destacar as colónias dos géneros *Rhodosporidium*, *Rhodotorula* e *Sporidiobolus* pela sua cor rosa e aspeto gelatinoso e do género *Sporobolomyces*, também, pela sua cor rosa, mas aspeto arbuscular. Por sua vez, *Hanseniaspora uvarum* diferencia-se pelo seu tom esverdeado, enquanto *Metschnikowia sp.* pelo seu tom rosado e halo circundante mais intenso. As restantes colónias apresentam uma coloração mais comum, branca ou bege, no entanto possuem relevos distintos entre

si. Já microscopicamente, salientam-se as células de *F. magnum*, *F. wieringae*, *H. festucosa*, *H. takashimae* e *Metschnikowia sp.* pelo seu formato circular e esta última, ainda, pela presença de um *oil droplet* no seu interior. Com formato oval são evidentes as células de *A. pullulans*, *C. pallidicorallinum*, *Rhodosporidium babjevae*, *Rhodotorula babjevae* e *R. glutinis* (**Figura 7**).

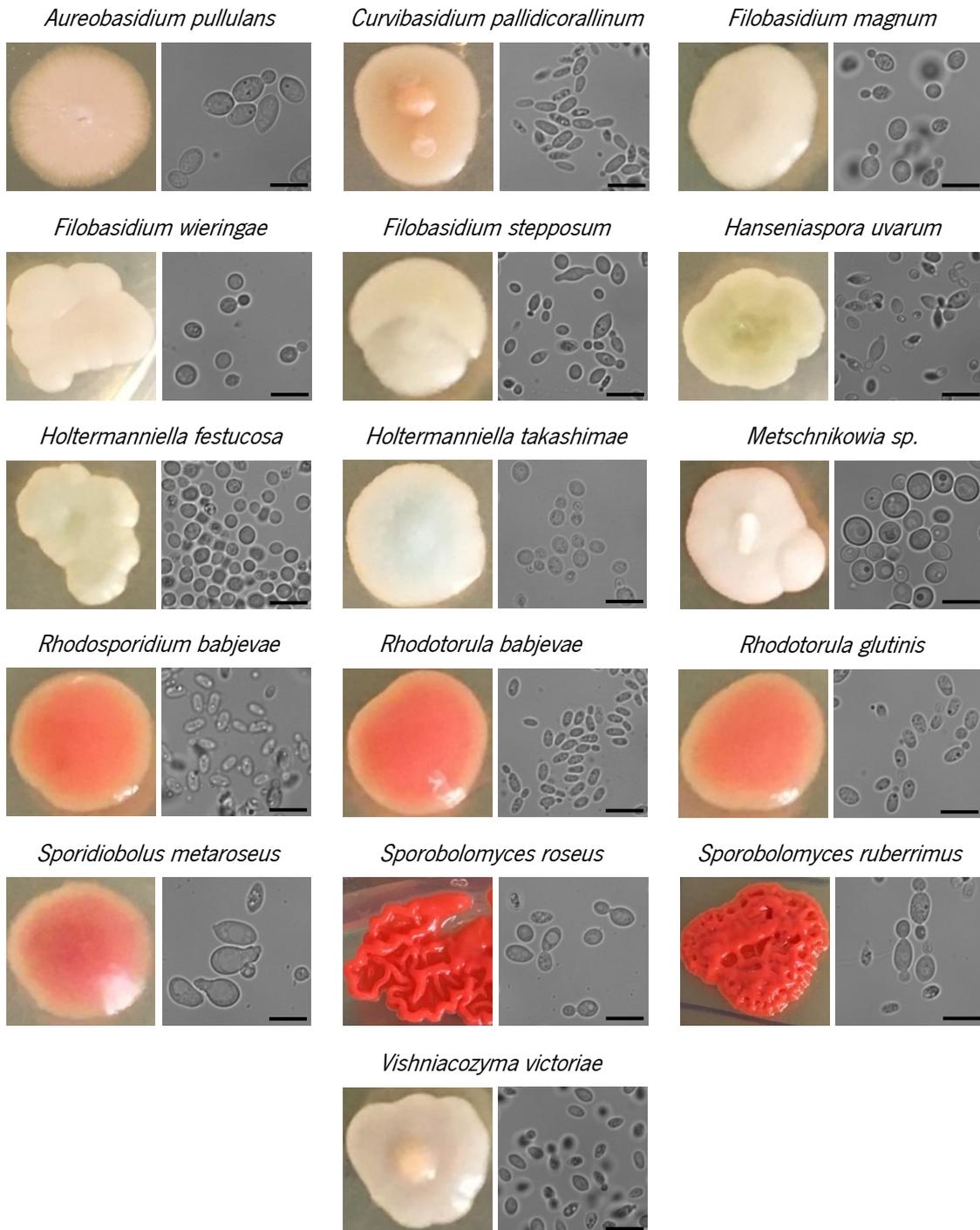


Figura 7. Catálogo das diferentes espécies de levedura obtidas a partir do mosto das cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho. Para cada levedura está apresentada uma fotografia da colónia (aspeto macroscópico) em meio WL (esquerda) e das células (aspeto microscópico) com ampliação de 1000 x no microscópio ótico composto (direita; escala = 10 µm).

3.3. Caracterização da comunidade microbiana do bago de uva através de análise NGS *metabarcoding*

Uma caracterização extensiva da comunidade de fungos e bactérias que coloniza o bago de uva foi realizada através de um método que não requereu cultivo de microrganismos (*culture-independent*). Como descrito na secção 2.4, este método foi iniciado com a lavagem dos bagos de uva com uma solução isotónica e recuperação dos microrganismos que colonizam a sua superfície por centrifugação desta solução. Foi então extraído o DNA microbiano total, cuja integridade foi avaliada através de uma eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) (Figura 8).

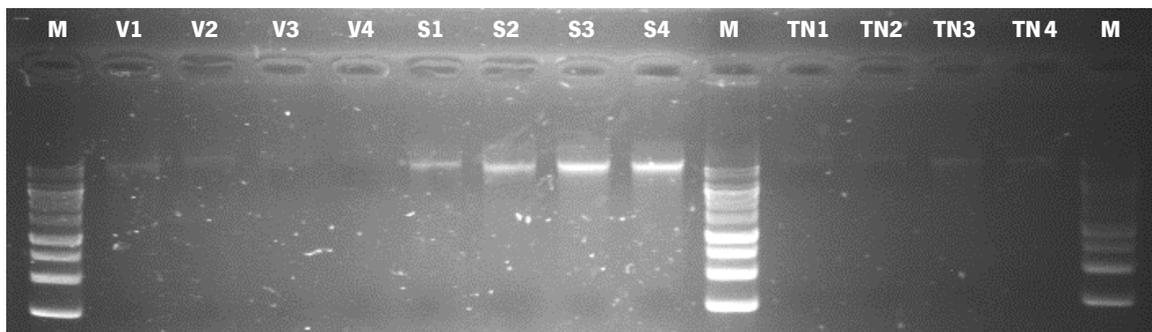


Figura 8. DNA total extraído dos microrganismos que colonizam a superfície de bagos de uva das cultivares Viosinho (V), Sousão (S) e Touriga Nacional (TN), visualizado em gel de agarose a 1% (m/v). A extração foi realizada para 4 réplicas biológicas por cultivar (1-4). M – Marcador de DNA.

As amostras de DNA foram enviadas para uma empresa especializada que realizou sequenciação *Illumina* das regiões ITS1 e 16S para identificação de fungos e bactérias, respetivamente, como descrito na secção 2.4, tendo sido geradas 247920 a 490762 e 125008 a 253342 sequências em bruto, respetivamente. Foram identificadas 390 e 380 OTUs (*Organized Taxonomic Units*) para bactérias e fungos, respetivamente. Os índices *Chao1* e *Shannon-Weaver* foram aplicados para calcular a diversidade alfa. As curvas de rarefação alfa calculadas através destes índices permitiram a confirmação de profundidade suficiente de sequenciação e de representatividade da amostragem quanto à diversidade de microrganismos (Figura 9).

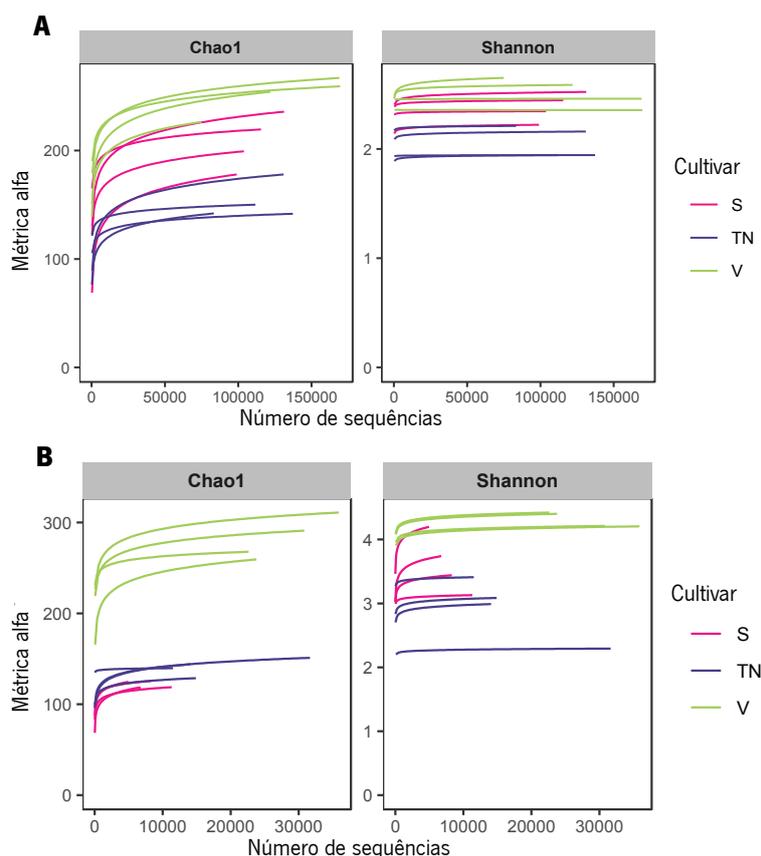


Figura 9. Curvas de rarefação alfa das leituras 16S (A) e ITS (B) das cultivares Sousão (S), Touriga Nacional (TN) e Viosinho (V).

A análise de diversidade alfa mostrou que Viosinho é, de um modo geral, a cultivar com maior biodiversidade de espécies, tanto para bactérias como para fungos, seguida de Sousão e Touriga Nacional (**Figura 10A e 10B**). O teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Bonferonni* permitiu identificar as diferenças estatisticamente significativas na diversidade alfa das cultivares (**Figura 10C a 10F**). Em particular, verificou-se uma diferença significativa no índice de riqueza (*Chao1*), valorizando as espécies raras, entre as cultivares Viosinho e Touriga Nacional, no caso das bactérias, e entre Viosinho e Sousão, no caso dos fungos. Quanto ao índice de *Shannon-Weaver*, que valoriza o equilíbrio das comunidades microbianas na amostra, Viosinho apresentou, tanto para as bactérias como para os fungos, um valor significativamente maior do que Touriga Nacional (**Figura 10**).

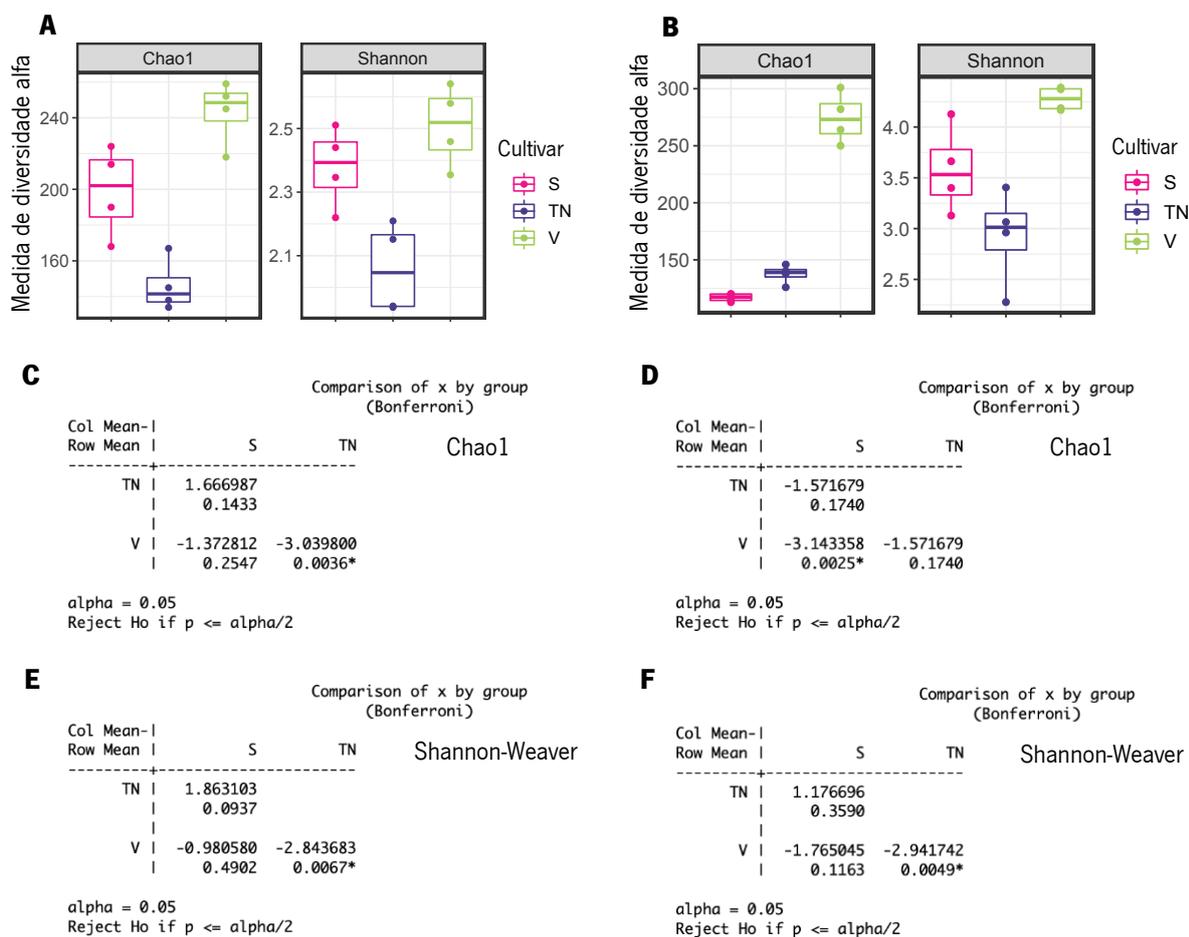


Figura 10. Diversidade alfa das comunidades de bactérias (A, C e E) e de fungos (B, D e F) dos bagos de uva das cultivares Sousão (S), Touriga Nacional (TN) e Viosinho (V). Os valores de diversidade alfa estão representados através de caixas de bigodes (A e B) e o teste de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Bonferroni* foi realizado para identificar as diferenças estatisticamente significativas para o índice de *Chao1* (C e D) e para o de *Shannon-Weaver* (E e F).

As análises de diversidade beta (*Bray Curtis*) expressaram as diferenças na composição das comunidades de bactérias e fungos entre as amostras (**Figura 11**). Na figura 11A é possível verificar que a componente 1 do PCoA mostrou uma separação clara entre todas as cultivares, e que a componente 2 (PCoA2) mostrou uma separação entre a cultivar Touriga Nacional e as duas restantes, tanto para a comunidade de bactérias como de fungos. Verificou-se ainda que a variabilidade entre réplicas da cultivar Touriga Nacional é inferior à das restantes cultivares, para a comunidade de bactérias (**Figura 11A**), observando-se o efeito inverso para a comunidade de fungos (**Figura 11C**). As análises de perMANOVA (**Figura 11B e 11D**) mostraram que as diferenças entre as comunidades de bactérias e fungos das 3 cultivares são estatisticamente significativas ($\text{Pr}(>F) < 0.001$).

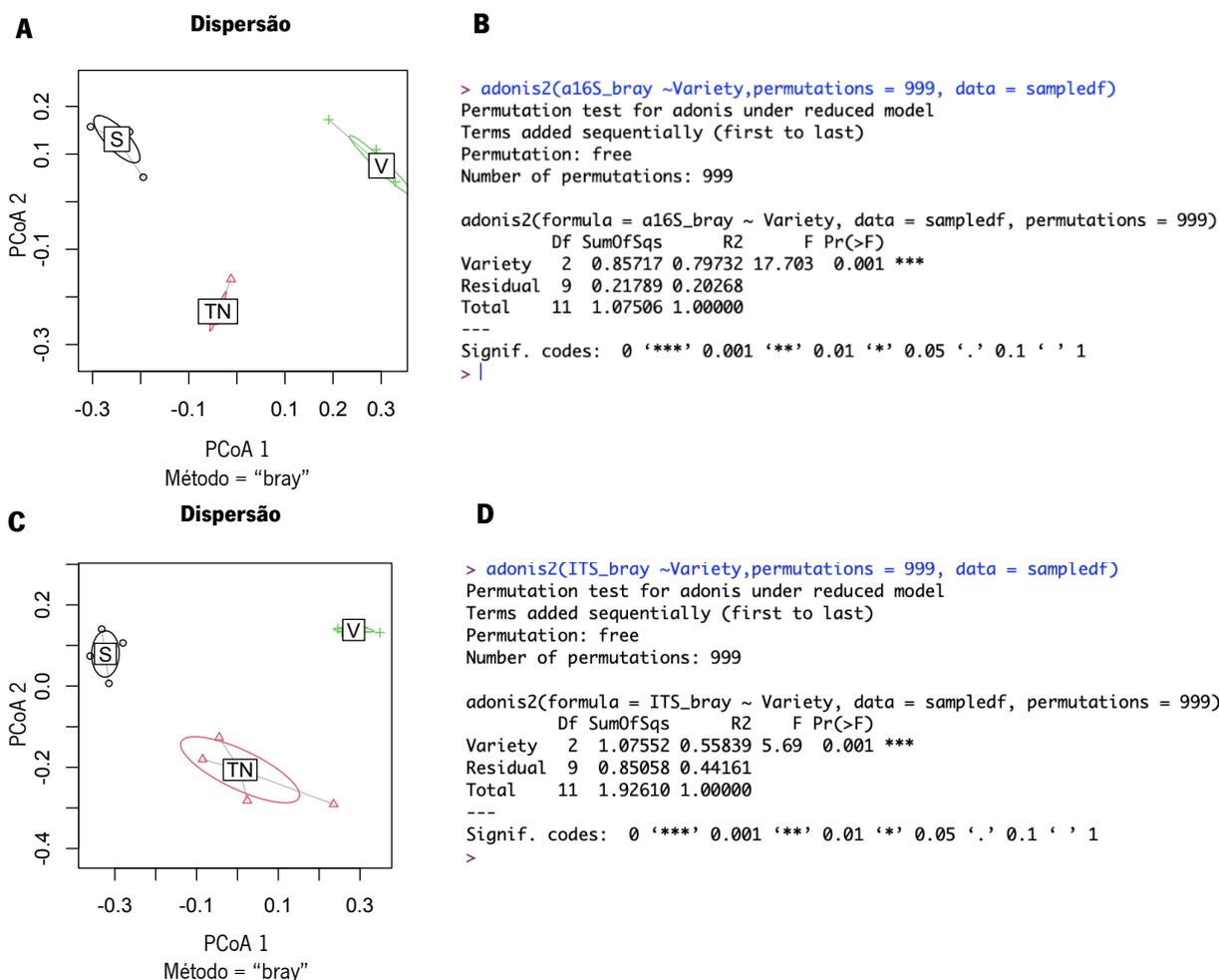


Figura 11. Diversidade beta das comunidades de bactérias (A e B) e de fungos (C e D) dos bagos de uva das cultivares Sousão (S), Touriga Nacional (TN) e Viosinho (V). Os valores de diversidade beta estão representados através de gráficos de dispersão (A e C) e o teste de *Adonis* foi realizado para identificar diferenças estatisticamente significativas entre cultivares (B e D).

O agrupamento das OTUs ao nível do filo permitiu a visualização do perfil geral da microbiota dos bagos de uva das cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho (**Figura 12**). As OTUs de bactérias pertencem a 14 filós que incluem 28 classes, 79 ordens, 113 famílias e 198 géneros, e as OTUs de fungos pertencem a 5 filós que incluem 21 classes, 59 ordens, 115 famílias e 213 géneros. Proteobacteria demonstrou ser o filo de bactérias predominante nas 3 cultivares, representando cerca de 61% das OTUs de Sousão, 77% das de Touriga Nacional e 64% das de Viosinho. Os seguintes filós mais abundantes, Actinobacteriota e Bacteroidota, representam aproximadamente 11% e 7% das OTUs de Touriga Nacional e 21% e 7% das OTUs de Viosinho, respetivamente. Já em Sousão, Firmicutes representa cerca de 12% das OTUs, seguido de Actinobacteriota e Bacteroidota, cada um representado

11% das OTUs (**Figura 12A**). Relativamente à comunidade de fungos, Ascomycota é o filo predominante, representando 66% das OTUs em Sousão, 94% em Touriga Nacional e 95% em Viosinho (**Figura 12B**). Basidiomycota é o segundo filo mais representado, englobando 34% das OTUs de Sousão, 6% das de Touriga Nacional e 5% das de Viosinho. Os restantes filios representam, no seu conjunto, uma percentagem inferior a 0.05% das OTUs.

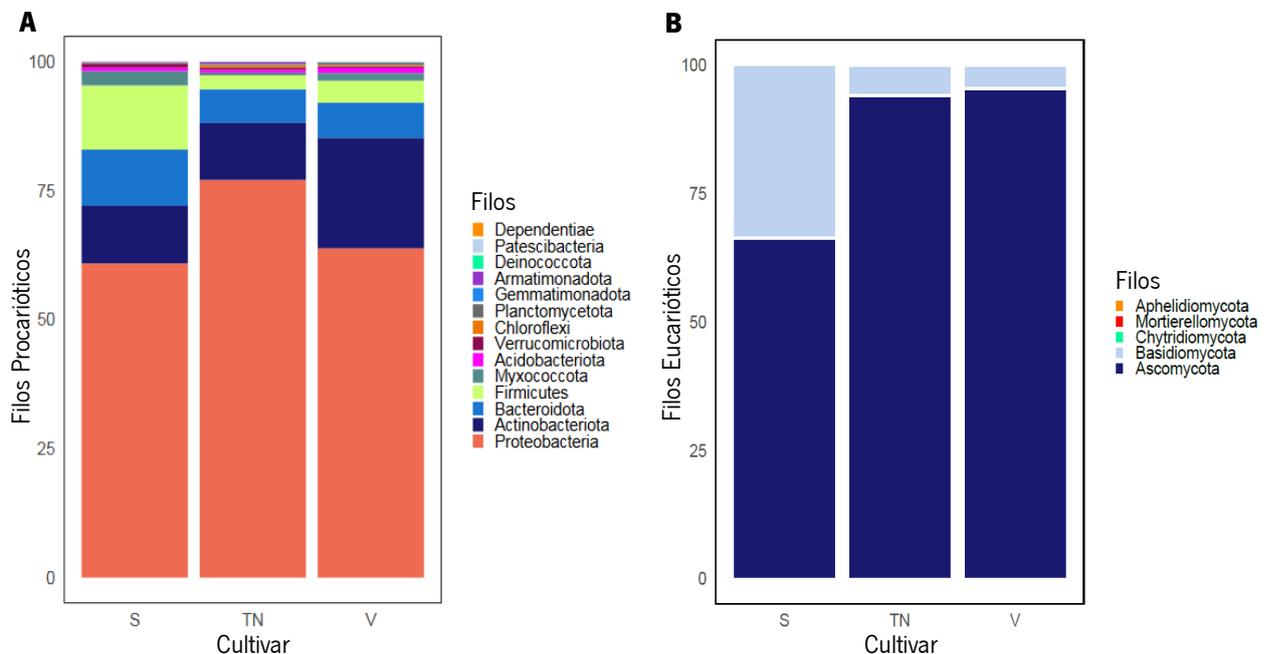


Figura 12. Distribuição em percentagem das OTUs de bactérias (A) e fungos (B) por filo (%), em bagos de uvas das cultivares Sousão (S), Touriga Nacional (TN) e Viosinho (V).

Foi ainda realizada uma comparação entre os géneros de levedura isolados com o método cultivável (secção **3.2**) e os géneros identificados nesta análise de *metabarcoding*. Os 6 géneros em comum identificados em ambas as abordagens consistem em *Aureobasidium*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Vishniacozyma* (**Tabela 6**). Dentro destes, os géneros *Filobasidium* e *Vishniacozyma* representam o maior número de OTUs encontradas nas 3 cultivares (**Tabela 6**).

Tabela 6. Géneros de levedura isolados pelo método cultivável e identificados pelo método de *metabarcoding*, e número de OTUs detetadas em cada cultivar.

Género de levedura	Nº de OTUs por cultivar		
	Sousão	Touriga Nacional	Viosinho
<i>Aureobasidium</i>	2	1	2
<i>Filobasidium</i>	5	5	5
<i>Holtermanniella</i>	1	1	1
<i>Rhodotorula</i>	1	1	1
<i>Sporobolomyces</i>	1	2	1
<i>Vishniacozyma</i>	4	4	4

3.4. Associações entre os parâmetros bioquímicos e a microbiota do bago de uva

Num ensaio preliminar para averiguar possíveis relações entre os parâmetros bioquímicos e a microbiota dos bagos de uva de cada cultivar, foi realizada uma análise de Componentes Principais (PCA) (**Figura 13**) integrando os resultados apresentados nas secções **3.1** e **3.3**. O componente principal 1 do PCA (eixo Dim1) contribuiu com 45% da variabilidade, separando as amostras de Sousão e Viosinho. O componente principal 2 do PCA (eixo Dim2) contribuiu com 18% de variabilidade, separando as amostras de Touriga Nacional das restantes cultivares. Foi possível verificar que todos os parâmetros bioquímicos estão mais pronunciados nas cultivares tintas, traduzindo-se em níveis mais elevados de açúcares redutores, fenólicos totais, antocianinas totais, acidez titulável e pH. Em particular, níveis mais elevados de acidez titulável e pH foram coincidentes com uma maior expressão dos filos raros Armatimonadota, Chytridiomycota, Mortierellomycota e Chloroflexi (**Figura 12, Figura 13**). Adicionalmente, observou-se uma relação inversa entre os parâmetros bioquímicos e 9 outros filos, mais representados na cultivar Viosinho, incluindo Actinobacteriota e Firmicutes (**Figura 13**). Para os filos

mais abundantes, Proteobacteria, Ascomycota e Basidiomycota, (**Figura 12**) não se observou uma relação direta aparente com os parâmetros bioquímicos analisados (**Figura 13**).

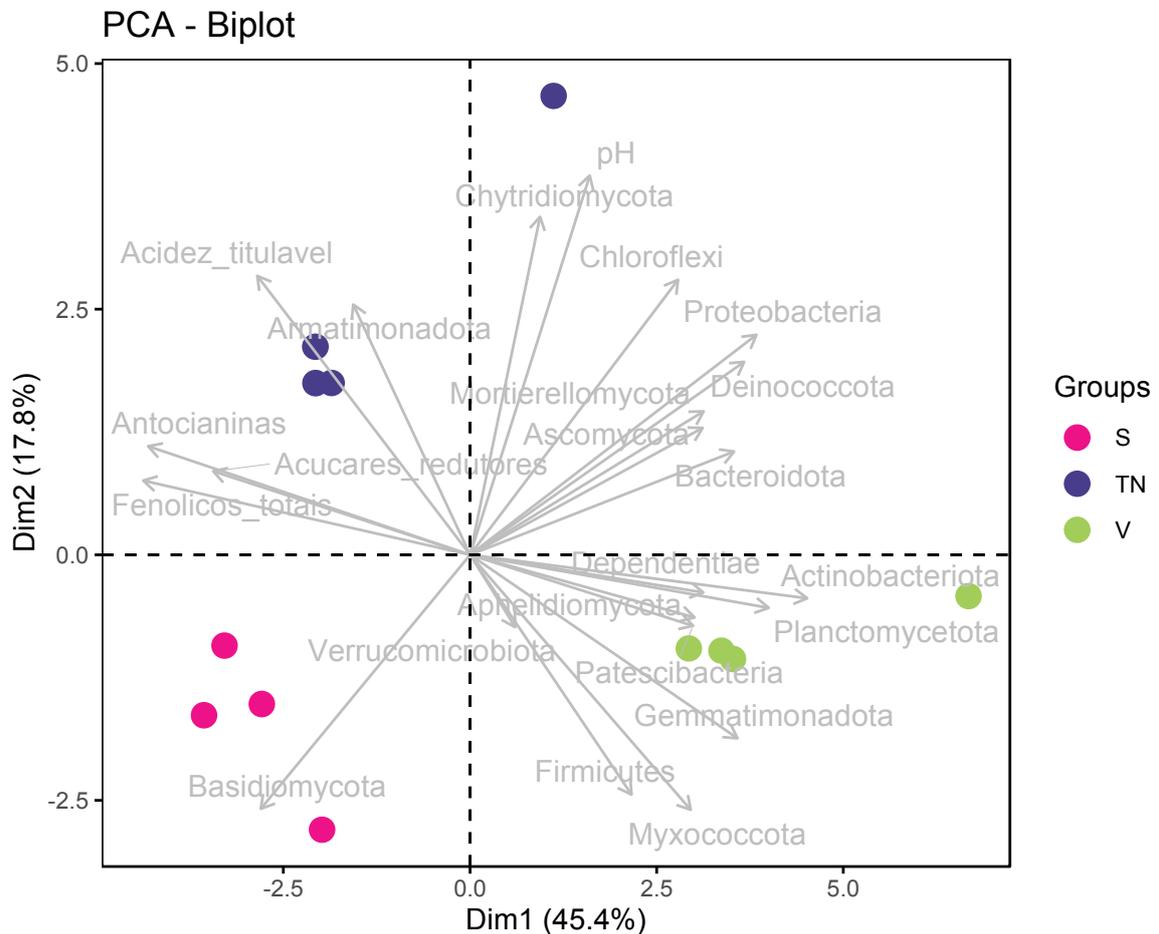


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) *BiPlot* dos parâmetros bioquímicos e dos filos identificados pelo método de *metabarcoding*, dos bagos de uva das cultivares Sousão (S), Touriga Nacional (TN) e Viosinho (V).

4. Discussão

4.1. O método de NGS *metabarcoding* e o método dependente de cultura são complementares na caracterização da microbiota do bago de uva

No presente estudo foram adotadas duas metodologias distintas de identificação e caracterização da microbiota dos bagos de uva, a primeira dependente de cultura baseada na sequenciação de *Sanger* e a segunda baseada na análise de NGS *metabarcoding*. Foram identificadas 16 espécies de levedura nas cultivares em estudo através do método dependente de cultura, enquanto 380 OTUs de fungos, pertencentes a 213 géneros, foram detetadas através do método de *metabarcoding*. Estes valores estão de acordo com a estudos anteriores (Pallmann et al., 2001; Renouf et al., 2005; Pinto et al., 2015; Martins et al., 2021a, 2022), e são explicados pelo facto de os métodos dependentes de cultura apenas permitirem o isolamento e identificação das espécies capazes de crescer nos meios e condições de cultura selecionados, negligenciando as espécies de baixa abundância. Em contrapartida, as técnicas de NGS são muito mais sensíveis e permitem a caracterização extensiva das comunidades microbianas a partir da extração do DNA da microbiota total dos bagos de uva (Mezzasalma et al., 2017; Morgan et al., 2017). Não obstante, as abordagens baseadas em cultura permanecem relevantes, uma vez que as espécies e estirpes microbianas recuperadas podem ser preservadas em laboratório para explorar o seu potencial biotecnológico, incluindo enológico. Atualmente, existem mais de 100 estirpes comerciais de levedura seca ativa (ADY) de *S. cerevisiae* que são utilizadas para fermentações controladas como culturas iniciadoras (Fernandez-Espinar et al., 2001; Guzzon et al., 2014; Morgan et al., 2017). Neste sentido, as espécies de levedura isoladas no presente trabalho poderão ter diversas aplicações biotecnológicas, incluindo a sua utilização como culturas *starter* para a produção de vinhos regionais de elevada tipicidade, contribuindo para a manutenção da biodiversidade e preservação da autenticidade dos vinhos, de acordo com os objetivos do projeto FCT GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020).

Em 3 vinhas da cultivar Barbera localizadas em 3 locais diferentes de Nizza Monferrato, foram igualmente aplicadas metodologias de identificação de fungos do bago de uva, dependentes e independentes de cultura (Costantini et al. 2022). Os resultados mostraram que método NGS permitiu uma visão quase completa da população fúngica presente nos bagos, no entanto é apenas confiável para a identificação de grupos taxonómicos acima do nível de espécie, pelo que a sua combinação com o método dependente de cultura apresenta diversas vantagens. Adicionalmente, a correspondência da OTU

com as espécies não é linear, pois espécies diferentes podem possuir genes que são 97% semelhantes, o que resultará em OTUs complexas contendo várias espécies (Dissanayake et al., 2018; Jayawardena et al., 2018; Costantini et al., 2022; Martins et al., 2022). Adicionalmente, a interseção dos resultados das duas metodologias utilizadas no presente trabalho mostrou que apenas 6 géneros de levedura foram identificados em ambas as técnicas, nomeadamente *Aureobasidium*, *Filobasidium*, *Holtermanniella*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Vishniacozyma*. Os restantes 5 géneros identificados através do método cultivável (*Curvibasidium*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Rhodospordium*, *Sporidiobolus*) não foram identificados pelo método de *metabarcoding*. Com efeito, as leveduras destes géneros poderiam estar sub-representadas nas populações dos bagos, limitando a sua identificação por *metabarcoding*, mas crescer bem no meio de isolamento, possibilitando a sua identificação em placa. Como referido anteriormente, a seleção de espécies pelo método dependente de cultura pode basear-se na utilização de meios de cultura específicos, como o meio de lisina que suprime o crescimento de leveduras proeminentes, ou até da própria pressão osmótica do mosto após o esmagamento dos bagos de uva (Jolly et al., 2014; Martins et al., 2022). Estas observações reforçam que a combinação do método dependente de cultura com o método de *metabarcoding* consiste na abordagem ideal para a caracterização da comunidade microbiana dos bagos de uva.

4.2. O consórcio de leveduras cultiváveis do bago de uva varia entre cultivares e tem um elevado potencial biotecnológico

O método de identificação de leveduras cultiváveis baseada na sequenciação de *Sanger*, utilizado no presente estudo mostrou que *Aureobasidium pullulans* e *Hanseniaspora uvarum* foram detetadas nas três cultivares selecionadas, resultados que suportam estudos anteriores em outras cultivares (Agarbatl et al., 2019; Costantini et al., 2022; Martins et al., 2022). *A. pullulans* é classificado como um *yeast-like fungus*, ubíquo e com alto grau de polimorfismo que está presente no ar e vive como saprófito em vários substratos como solo, água de rio e material vegetal (Barata et al., 2012; Bokulich et al., 2014). É frequentemente a espécie dominante em bagos de uva saudáveis (Barata et al., 2012; Bokulich et al., 2014; Dissanayake et al., 2018), tendo sido demonstrada uma predominância de 75% nos bagos de uva da região DOC Douro (Pinto et al., 2015). Este microrganismo, pode atuar como antagonista eficaz contra microrganismos promotores de doenças na videira, como *Botrytis cinerea* (Gao et al., 2019; Costantini et al., 2022). *H. uvarum* tem sido frequentemente detetada no bago de uva e noutros frutos como o morango e a cereja (Santo et al., 2012; Zhang et al., 2021), participando nas primeiras etapas da

fermentação alcoólica do vinho na maioria das regiões vinícolas do mundo (Liu et al., 2021; Costantini et al., 2022).

Os resultados do presente estudo mostraram que as espécies isoladas de *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Sporidiobolus* diferiram entre cultivares, tendo sido *Sporobolomyces roseus* a única detetada nas três cultivares selecionadas. Estudos anteriores na região DOC Vinhos Verdes mostraram que esta espécie também está presente em bagos da cultivar Vinhão/Sousão, mas não em Loureiro (Martins et al., 2022). As leveduras *Rhodotorula babjevae*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporobolomyces roseus* e *Sporobolomyces ruberrimus* pertencem a dois géneros de Basidiomycetes característicos pela sua oligotrofia, que lhes permite sobreviver num ambiente hostil e pobre em nutrientes, como a cutícula intacta do bago de uva. Desta forma, à semelhança de *A. pullulans*, são considerados colonizadores comuns de bagos de uva saudáveis (Barata et al., 2012; Martins et al., 2022). Estudos recentes mostraram que várias espécies dos géneros acima referidos prevalecem em bagos de uva tratados com suplementos à base de cálcio, possivelmente porque estes contêm menos microfissuras na cutícula (Martins et al. (2020b, 2021a, 2022). Este resultado está de acordo com a elevada tolerância ao cálcio das espécies isoladas em ensaios *in vitro*. Apesar de não apresentar um metabolismo fermentativo, *R. glutinis* poderá ser útil na produção de vinho uma vez que produz enzimas hidrolíticas que podem ter um impacto nas propriedades sensoriais e tecnologias do produto final (Varela & Borneman, 2017; Martins et al., 2022).

Curvibasidium pallidicorallinum, *Holtermanniella festucosa*, *Holtermanniella takashimae*, *Sporidiobolus metaroseus* e *Rhodosporidium babjevae* foram também detetadas numa vinha no centro do estado de Washington e a primeira e a última na maior parte das amostras de bagos de uva de vinhas de duas regiões vinícolas alemãs, sugerindo que estas espécies são parte integral da flora de leveduras do bago de uva (Bourret et al., 2013; Brysch-Herzberg & Seidel, 2015). Em bagos de Cabernet Sauvignon foi identificada a espécie *C. pallidicorallinum*, que persistiu durante a fermentação e não foi suprimida pelo sulfito presente no mosto. A persistência desta espécie aliada à sua capacidade de produção de poligalacturonase facilita a quebra da parede celular dos bagos durante a fermentação (Claus & Mojsov, 2018; Wang et al., 2021). No mesmo estudo foi identificada a espécie *Vishniacozyma victoriae*, isolada também de bagos de Touriga Nacional e Viosinho no presente trabalho, que, devido à sua atividade esterásica, poderá ter impacto no desenvolvimento do sabor do vinho. Adicionalmente, esta espécie é conhecida como agente de biocontrolo de *Penicillium expansum*, causador da podridão pós-colheita de uvas de mesa (Mokhtarnejad et al., 2016; Wang et al., 2021).

Espécies de *Filobasidium* foram detetadas em amostras de folha e de bagos numa vinha do Texas (Bougreau et al., 2019), em bagos de Cabernet Sauvignon no estado de Washington (Wang et al., 2021) e em bagos de vinhas da cultivar Barbera (Costantini et al., 2022). No presente estudo foram identificadas particularmente as espécies *F. magnum*, *F. stepposum* e *F. weringae*, sendo a última ubíqua nas três cultivares. Estudos recentes mostraram que *F. magnum* possui atividade de controlo biológico contra *B. cinerea* e outros fungos patógenos do bago de uva e da maçã (Wang et al., 2021).

Por último, *Metschnikowia* foi apenas encontrada na cultivar Touriga Nacional, apesar dos inúmeros relatos da presença deste género nos bagos de uva, principalmente da espécie *Metschnikowia pulcherrima*, a mais relevante deste género associada à viticultura pela sua capacidade fermentativa, e pela sua atividade antagonista contra fungos filamentosos (Varela & Borneman, 2017; Martins et al., 2022). Neste estudo não foi possível proceder à identificação ao nível da espécie, uma vez que o *E value*, aquando da identificação por *Blast*, mostrou-se irregular (**Tabela 4**), possivelmente porque a sequência ITS da espécie isolada não está ainda bem anotada no NCBI. Assim, para determinar a espécie deste isolado, poderá ser vantajosa a sequenciação de outra região do genoma desta estirpe, nomeadamente o domínio D1/D2 da subunidade maior do rDNA.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* não foi detetada em bagos de uva de nenhuma das cultivares selecionadas, nem outras espécies do mesmo género, o que está de acordo com observações relatadas por vários autores. Esta levedura é raramente encontrada na vinha e em uvas intactas, uma vez que apenas prospera na presença de elevadas concentrações de açúcar disponíveis durante o processo de vinificação ou em bagos danificados (Renouf et al., 2005; Barata et al., 2012; Pinto et al., 2015; Martins et al., 2022).

4.3. Viosinho é a cultivar com maior biodiversidade de microrganismos na superfície dos bagos de uva

A partir da análise de *metabarcoding* da microbiota dos bagos de uvas das cultivares Sousão, Touriga Nacional e Viosinho, foi possível concluir que ~34% das OTUs de bactérias e 47% das OTUs de fungos foram detetados em todas as amostras, sendo, portanto, comuns às três cultivares. Este conjunto de microrganismos comuns, que não é afetado pela cultivar, pode ser considerado o núcleo microbiano da vinha e encarado como um elemento biótico basal do bago (Mezzasalma et al., 2017; Martins et al., 2022). As percentagens de OTUs apresentadas sugerem o predomínio de um grupo sólido e estável de

comunidades fúngicas intrínsecas na superfície do bago, menos suscetível a fatores externos do que a comunidade bacteriana (Mezzasalma et al., 2017; Martins et al., 2021a). Além disso, como foi revisto na Introdução, as comunidades de fungos seguem um padrão de evolução definido ao longo do amadurecimento do bago, independentemente da cultivar ou da vinha, em que determinadas espécies são dominantes em determinadas etapas deste amadurecimento (Renouf et al., 2005). Assim, no presente estudo, os filões de fungos Ascomycota e Basidiomycota apresentaram-se como os mais abundantes em bagos maduros de Sousão, Touriga Nacional e Viosinho, sendo o núcleo específico da cultivar evidenciado pelas suas proporções relativas, em analogia ao observado nas cultivares Vinhão/Sousão e Loureiro de uma vinha da região DOC Vinhos Verdes (Martins et al., 2021a). A predominância destes filões nos bagos de uva está de acordo com estudos anteriores na região DOC Douro (Pinto et al., 2015). Quanto aos filões de bactérias, Proteobacteria é o mais abundante nas três cultivares, no entanto, em Touriga Nacional e Viosinho, Actinobacteriota e Bacteroidota são os seguintes filões mais abundantes, enquanto que em Sousão, Firmicutes mostrou-se ligeiramente mais abundante que os últimos dois. Estudos comparativos entre diferentes regiões DOC portuguesas mostraram que Proteobacteria e Actinobacteriota são dominantes na região DOC Douro, seguidos de Firmicutes (Pinto et al., 2015). Estudos na região DOC Vinhos Verdes mostraram ainda que Proteobacteria é o filo mais abundante em bagos Vinhão/Sousão e Loureiro, estando os restantes filões distribuídos de forma diversa entre as cultivares (Martins et al., 2021a).

No presente estudo, aproximadamente 29%, 6% e 3% das OTUs de bactérias e 14%, 7% e 3% das OTUs de fungos foram identificadas exclusivamente em Viosinho, Sousão e Touriga Nacional, respetivamente, traduzindo os valores de diversidade alfa estimados pelos índices de *Chao1* e *Shannon*, que mostraram que Viosinho é a cultivar com maior biodiversidade de espécies na superfície dos bagos de uva. A análise da diversidade beta confirmou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre a composição das comunidades de bactérias e fungos das três cultivares, reforçando que a cultivar é um dos fatores que afeta a microbiota do bago na região DOC Douro. A contribuição da cultivar para a composição do bago de uva está ainda pouco estudada, mas estudos recentes indicaram este facto em cultivares Vinhão/Sousão e Loureiro na região DOC Vinhos Verdes, onde a composição do fruto tem um papel preponderante (Martins et al., 2021a), como discutido nas secções seguintes.

4.4. As comunidades microbianas poderão ser afetadas pela composição química do bago

Ensaio preliminares mostraram algumas diferenças na composição química dos bagos de uva, que poderão influenciar em parte as comunidades microbianas existentes em cada cultivar. Como apresentado na Introdução, outros fatores como as condições climáticas e a aplicação de fungicidas nas vinhas influenciam a microbiota dos frutos; no entanto, estes fatores foram constantes para as três cultivares em estudo, pelo que a composição dos frutos inerente a cada cultivar poderá estar na base das diferenças observadas nas comunidades de fungos e de bactérias. Todos os valores de parâmetros bioquímicos e biométricos obtidos no presente estudo são equivalentes aos reportados em estudos anteriores (Costa et al., 2020; Martins et al., 2020a). Particularmente em Viosinho não foram detetadas antocianinas pelo método colorimétrico utilizado para a sua quantificação, devido à sua baixa sensibilidade comparativamente aos métodos de cromatografia líquida, como exposto anteriormente (Martins et al., 2021b). Para filos raros como Armatimonadota, Chytridiomycota, Mortierellomycota e Chloroflexi foi encontrada uma relação direta com os níveis de acidez titulável e pH, mas para os filos mais abundantes Proteobacteria, Ascomycota e Basidiomycota não se observou uma relação direta aparente com os parâmetros bioquímicos analisados, sugerindo que outros metabolitos e outros parâmetros específicos de cada cultivar, como a espessura da película, poderão determinar as proporções dos diferentes taxa (Martins et al., 2022). De acordo com esta observação, estudos recentes mostraram que a composição das ceras cuticulares do bago de uva influencia as comunidades microbianas da superfície do fruto, uma vez que muitos metabolitos que as constituem são substrato e fator de crescimento de várias espécies (Martins et al., 2021a). Em particular, foi encontrada uma forte correlação entre os níveis dos triterpenóides estigmasterol, tremulona e ácido oleanólico e as comunidades de fungos e bactérias dos bagos de uva Vinhão/Sousão e Loureiro na região DOC Vinhos Verdes (Martins et al., 2021a). No entanto, ainda não foram estudados os potenciais efeitos de outras classes de metabolitos como os compostos fenólicos na microbiota do bago de uva. Muitos destes compostos têm atividade antimicrobiana, pelo que o estudo mais detalhado do seu efeito na microbiota do bago reveste-se de um elevado interesse científico.

4.5. Conclusão e perspectivas futuras

O presente estudo contribuiu para caracterizar a comunidade microbiana dos bagos de uva de três cultivares de elevado interesse económico, particularmente na região DOC Douro, e para a elaboração de um catálogo de espécies de levedura cultiváveis que permitirá a prossecução dos objetivos do projeto FCT GrapeMicrobiota (PTDC/BAA-AGR/2691/2020), onde diversas espécies nativas serão testadas como culturas *starter* na produção de vinhos regionais de elevada tipicidade. Adicionalmente, o estudo das espécies isoladas como potenciais agentes de biocontrolo de fungos filamentosos causadores de doenças na vinha encontra-se em curso no grupo de investigação, sendo que os resultados já obtidos são muito promissores. No âmbito do referido projeto encontram-se em curso análises de metabolómica que permitirão estabelecer com maior precisão correlações entre a composição química dos bagos das três cultivares e a sua microbiota.

5. Referências Bibliográficas

- Agarbatl, A., Canonico, L., Mancabelli, L., Milani, C., Ventura, M., Ciani, M., & Comitini, F.** (2019). The influence of fungicide treatments on mycobiota of grapes and its evolution during fermentation evaluated by metagenomic and culture-dependent methods. *Microorganisms*, 7(5), 114.
- Amerine, M. A., & C. S. Ough.** (1980). *Methods for Analysis of Musts and Wines*. J. Wiley and Sons, New York, N.Y.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V.** (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243–259.
- Belda, I., Gobbi, A., Ruiz, J., de Celis, M., Ortiz-Alvarez, R., Acedo, A., & Santos, A.** (2020). Microbiomics to Define Wine Terroir. *Comprehensive Foodomics 1*, 438–451.
- Belda, I., Zarraonaindia, I., Perisin, M., Palacios, A., & Acedo, A.** (2017). From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” Concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–12.
- Bokulich, N. A., Collins, T. S., Masarweh, C., Allen, G., Heymann, H., Ebeler, S. E., & Millsa, D. A.** (2016). Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *MBio*, 7(3), e00631-16.
- Bokulich, N. A., Thorngate, J. H., Richardson, P. M., & Mills, D. A.** (2014). Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(1), 139–48.
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K., & Loneragan, G.** (2019). Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLoS ONE*, 14(5), e0216246.
- Bourret, T. B., Grove, G. G., Vandemark, G. J., Henick-Kling, T., & Glawe, D. A.** (2013). Diversity and molecular determination of wild yeasts in a central Washington State vineyard. *North American Fungi*, 8(15), 1–32.
- Brysch-Herzberg, M., & Seidel, M.** (2015). Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 137–144.

- Čadež, N., Zupan, J., & Raspor, P.** (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, *10*(5), 619–630.
- Claus, H., & Mojsov, K.** (2018). Enzymes for wine fermentation: Current and perspective applications. *Fermentation*, *4*(3), 52.
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martinez, C., & Catania, C.** (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(5), 1055–1061.
- Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., & Romano, P.** (2017). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science*, *13*, 44–49.
- Comitini, F., & Ciani, M.** (2006). Survival of inoculated *Saccharomyces cerevisiae* strain on wine grapes during two vintages. *Letters in Applied Microbiology*, *42*(3), 248–253.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S., & Gerós H.** (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, *1*, 1-22.
- Coombe, B. G.** (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, *43*(1), 101-110.
- Coombe, B. G.** (1995). Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian journal of grape and wine research*, *1*(2), 104-110.
- Coombe, B. G., & Bishop, G. R.** (1980). Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research*, *31*(3), 499-509.
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D., & Valero, E.** (2011). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *145*(1), 132–139.
- Costa, C., Graça, A., Fontes, N., Teixeira, M., Gerós, H., & Santos, J. A.** (2020). The interplay between atmospheric conditions and grape berry quality parameters in Portugal. *Applied Sciences (Switzerland)*, *10*(14), 4943.

- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Boatti, L., Gamalero, E., & Garcia-Moruno, E.** (2022). Yeast Biodiversity in Vineyard during Grape Ripening: Comparison between Culture Dependent and NGS Analysis. *Processes*, *10*(5), 901.
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Feveheiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E.** (2016). Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *22*(3), 504–516.
- Dai, Z. W., Ollat, N., Gomès, E., Decroocq, S., Tandonnet, J. P., Bordenave, L., Pieri, P., Hilbert, G., Kappel, C., van Leeuwen, C., Vivin, P., & Delrot, S.** (2011). Ecophysiological, genetic, and molecular causes of variation in grape berry weight and composition: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *62*(4), 413–425.
- Dissanayake, A. J., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K. D., Zhang, W., Xu, H., Zhang, G., Fu, C., Liu, M., Xing, Q., Li, X., & Yan, J.** (2018). Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). *Fungal Diversity*, *90*(1), 85–107.
- Dokoozlian, N. K.** (2000). Grape berry growth and development. *Raisin Production Manual*, *3393*, 30.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburul, F., & Querol, A.** (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *49*(1), 329-337.
- Fernandez-Espinar, M. T., Lopez, V., Ramon, D., Bartra, E., & Querol, A.** (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, *70*(1-2), 1-10.
- Fillion, L., Ageorges, A., Picaud, S., Coutos-Thévenot, P., Lemoine, R., Romieu, C., & Delrot, S.** (1999). Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiology*, *120*(4), 1083-1094.
- Flamini, R., Mattivi, F., de Rosso, M., Arapitsas, P., & Bavaresco, L.** (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(10), 19651–19669.
- Fleet, G. H.** (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 11–22.

- Fraga, H., de Cortázar Atauri, I. G., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., & Santos, J. A.** (2017). Viticulture in Portugal: A review of recent trends and climate change projections. *Oeno One*, *51*(2), 61–69.
- Francesca, N., Chiurazzi, M., Romano, R., Aponte, M., Settanni, L., & Moschetti, G.** (2010). Indigenous yeast communities in the environment of “Rovello bianco” grape variety and their use in commercial white wine fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *26*(2), 337–351.
- Gao, F., Chen, J., Xiao, J., Cheng, W., Zheng, X., Wang, B., & Shi, X.** (2019). Microbial community composition on grape surface controlled by geographical factors of different wine regions in Xinjiang, China. *Food Research International*, *122*, 348–360.
- Groenewald, W. H., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T.** (2006). Strains of *Lactobacillus plantarum* in Grape Must are also Present in the Intestinal Tract of Vinegar Flies. *Journal of Enology and Viticulture*, *27*(1), 46-50.
- Guzzon, R., Nicolini, G., Nardin, T., Malacarne, M., & Larcher, R.** (2014). Survey about the microbiological features, the oenological performance and the influence on the character of wine of active dry yeast employed as starters of wine fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(9), 2142–2148.
- Instituto da Vinha e do Vinho.** (2020). Dados estatísticos do sector vitivinícola. Consultado a 1 de junho de 2022, de <https://www.ivv.gov.pt/np4/estatistica/>.
- International Organisation of Vine and Wine.** (2016). Advanced Search on Database. Consultado a 1 de junho de 2022, de <https://www.oiv.int/en/statistiques/recherche>.
- Jayawardena, R. S., Purahong, W., Zhang, W., Wubet, T., Li, X. H., Liu, M., Zhao, W., Hyde, K. D., Liu, J. H., & Yan, J.** (2018). Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Diversity*, *90*(1), 1–84.
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S.** (2014). Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, *14*(2), 215–237.
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B., & Goddard, M. R.** (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Scientific Reports*, *5*(1), 1-10.

- Liu, D., & Howell, K.** (2021). Community succession of the grapevine fungal microbiome in the annual growth cycle. *Environmental microbiology*, 23(4), 1842-1857.
- Loureiro, V., Ferreira, M. M., Monteiro, S., & Ferreira, R. B.** (2012). The microbial community of grape berry. *The Biochemistry of the Grape Berry*, Gerós, H., Chaves, M.M, Delrot, S. (Eds), 241-268.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Sapis, J. C., & Lee, C. Y.** (1991). Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4), 441–486.
- Mamaot** (2012). Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Portaria n.o 380/2012 de 22 de novembro.
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I.** (2012). Grape berry bacterial microbiota: Impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 93–100.
- Martins, V., Billet, K., Garcia, A., Lanoue, A., & Gerós, H.** (2020a). Exogenous calcium deflects grape berry metabolism towards the production of more stilbenoids and less anthocyanins. *Food Chemistry*, 313, 126123.
- Martins, V., Costa, L., Soares, R., Ayogu, P., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2022). A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. *Oeno One*, 56(3), 247–260.
- Martins, V., Garcia, A., Alinho, A. T., Costa, P., Lanceros-Méndez, S., Costa, M. M. R., & Gerós, H.** (2020c). Vineyard calcium sprays induce changes in grape berry skin, firmness, cell wall composition and expression of cell wall-related genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 49–55.
- Martins, V., Lopez, R., Garcia, A., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2020b). Vineyard calcium sprays shift the volatile profile of young red wine produced by induced and spontaneous fermentation. *Food Research International*, 131, 108983.
- Martins, V., Szakiel, A., Pączkowski, C., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2021a). The restructuring of grape berry waxes by calcium changes the surface microbiota. *Food Research International*, 150, 110812.

- Martins, V., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2015). Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: A laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*(3), 425–429.
- Martins, V., Unlubayir, M., Teixeira, A., Lanoue, A., & Gerós, H.** (2021b). Exogenous Calcium Delays Grape Berry Maturation in the White cv. Loureiro While Increasing Fruit Firmness and Flavonol Content. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 742887.
- Mattivi, F., Zulian, C., Nicolini, G., & Valenti, L.** (2002). Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *957*(1), 37-56.
- McMurdie, P. J., & Holmes, S.** (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217.
- Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Bruni, I., Bruno, A., Lovicu, G., Casiraghi, M., & Labra, M.** (2017). Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS ONE*, *12*(9), e0184615.
- Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Mokhtarnejad, L., Arzanlou, M., Babai-Ahari, A., di Mauro, S., Onofri, A., Buzzini, P., & Turchetti, B.** (2016). Characterization of basidiomycetous yeasts in hypersaline soils of the Urmia Lake National Park, Iran. *Extremophiles*, *20*(6), 915–928.
- Morgan, H. H., du Toit, M., & Setati, M. E.** (2017). The grapevine and wine microbiome: Insights from high-throughput amplicon sequencing. *Frontiers in Microbiology*, *8*(MAY), 820.
- Nicoué, E. É., Savard, S., & Belkacemi, K.** (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: Extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(14), 5626–5635.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J.** (2013). Package 'vegan'. *Community Ecology Package version 2.5-7*, 1-295.
- Ollat, N., Carde, J. P., Gaudillère, J. P., Barrieu, F., Diakou-Verdin, P., & Moing, A.** (2002). Grape berry development: a review. *Oeno One*, *36*(3), 109-131.

- Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., & Bisson, L. F.** (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 198-203.
- Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C.** (2015). Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 905.
- Rementeria, A., Rodriguez, J. A., Cadaval, A., Amenabar, R., Muguruza, J. R., Hernando, F. L., & Sevilla, M. J.** (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the “Txakoli de Bizkaia” region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1–2), 201–207.
- Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A.** (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(3), 316-327.
- Robles, A., Fabjanowicz, M., Chmiel, T., & Płotka-Wasyłka, J.** (2019). Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *120*, 115630.
- Romeyer, F. M., Macheix, J. J., Goiffon, J. P., Reminiac, C. C., & Sapis, J. C.** (1983). The Browning Capacity of Grapes. 3. Changes and Importance of Hydroxycinnamic Acid-Tartaric Acid Esters during Development and Maturation of the Fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*, *31*(2), 346-349.
- Santo, D. E., Galego, L., Gonçalves, T., & Quintas, C.** (2012). Yeast diversity in the Mediterranean strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) fruits' fermentations. *Food Research International*, *47*(1), 45–50.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Gerós, H.** (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(9), 18711–18739.
- Teixeira A, Noronha H, Sebastiana M, Fortes AM & Gerós H** (2022) A proteomic analysis shows the stimulation of light reactions and inhibition of the calvin cycle in the skin chloroplasts of ripe red grape berries. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1014532.

- Topalovic, A., & Mikulic-Petkovsek, M.** (2010). Changes in sugars, organic acids and phenolics of grape berries of cultivar Cardinal during ripening. *Agriculture & Environment*, *8*(3), 223-227.
- Varela, C., & Borneman, A. R.** (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, *34*(3), 111–128.
- Wang, X., Schlatter, D. C., Glawe, D. A., Edwards, C. G., Weller, D. M., Paulitz, T. C., Abatzoglou, J. T., & Okubara, P. A.** (2021). Native yeast and non-yeast fungal communities of Cabernet Sauvignon berries from two Washington State vineyards, and persistence in spontaneous fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *350*, 109225.
- Waterhouse, A. L.** (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *6*(1), 11-1.
- Zhang, J., Wang, E. T., Singh, R. P., Guo, C., Shang, Y., Chen, J., & Liu, C.** (2019). Grape berry surface bacterial microbiome: impact from the varieties and clones in the same vineyard from central China. *Journal of Applied Microbiology*, *126*(1), 204–214.
- Zhang, Q., Shi, W., Zhou, B., Du, H., Xi, L., Zou, M., Zou, H., Xin, L., Gao, Z., & Chen, Y.** (2021). Variable characteristics of microbial communities on the surface of sweet cherries under different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, *173*, 111408.