



LORENA DUTRA SILVA

**FUNGOS ASSOCIADOS À MICROBIOTA *TERROIR* DE VINHEDOS TROPICAIS
DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

**LAVRAS – MG
2018**

LORENA DUTRA SILVA

**FUNGOS ASSOCIADOS À MICROBIOTA *TERROIR* DE VINHEDOS TROPICAIS
DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

Coorientadores
Profa. Dra. Michelle Ferreira Terra
Dr. Giuliano Elias Pereira

**LAVRAS – MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Lorena Dutra.

Fungos associados à microbiota *terroir* de vinhedos tropicais
do Vale do Submédio São Francisco / Lorena Dutra Silva. - 2018.
94 p. : il.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Coorientador(a): Michelle Ferreira Terra, Giuliano Elias
Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Vitivinicultura. 2. Diversidade de fungos. 3. Metagenômica.
I. Batista, Luís Roberto. II. Terra, Michelle Ferreira. III. Pereira,
Giuliano Elias. IV. Título.

LORENA DUTRA SILVA

**FUNGOS ASSOCIADOS À MICROBIOTA *TERROIR* DE VINHEDOS TROPICAIS
DO VALE DO SUBMÉDIO SÃO FRANCISCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de junho de 2018.

Dr. Juliano de Carvalho Cury UFSJ

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Prof. Dr. Luís Roberto Batista
Orientador

Coorientadores
Profa. Dra. Michelle Ferreira Terra IFNMG
Dr. Giuliano Elias Pereira EMBRAPA Semiárido

**LAVRAS – MG
2018**

A Deus por me guiar, iluminar e fortalecer.

Aos meus pais Marízia pelo amor e esforços incondicionais e Altair que mesmo não mais presente fisicamente, sei do seu amor e do desejo de me ver bem.

A minha irmã Taízia, pelo carinho, suporte e estímulo.

Ao meu namorado Filipe pelos conselhos, dedicação e total apoio.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luís Roberto Batista pelos ensinamentos, orientações, disponibilidade e confiança depositada na minha capacidade de realização deste projeto. Muito obrigada por tudo!

À Prof. Dra. Michelle Ferreira Terra pela coorientação, amizade, conselhos e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao pesquisador da Embrapa Semiárido Dr. Giuliano Elias Pereira pela coorientação, receptividade, confiança, também pelo apoio financeiro e concessão das amostras para realização deste trabalho.

À Embrapa Semiárido, Vinícolas Santa Maria e Fazenda Ouro Verde pelas amostras concedidas, fundamentais para a realização deste experimento.

A todos os professores, colaboradores e colegas do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos ensinamentos e amizades.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxina de Alimentos: Michele, Anielli e Suzana pela amizade, convívio, ajuda, conselhos, paciência e deliciosos cafés. Em especial, à Elaine pela contribuição doada ao projeto, à Nathasha, Sirlei e Fabiana por todo apoio, auxílio nos experimentos e conhecimentos compartilhados.

Ao meu namorado Filipe pelo amor, carinho, atenção e paciência que trouxeram leveza aos meus dias. Agradeço também por toda ajuda em buscar as amostras e por transportá-las para análise molecular, as horas gastas me auxiliando com a análise de metagenômica e os valiosos conselhos e dicas.

Aos meus pais, a minha irmã e a todos os meus familiares por serem meu porto seguro e por todo amor, apoio e estímulos em meus estudos e na minha vida.

O meu profundo obrigada a todos vocês que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

RESUMO GERAL

A microbiota *terroir* desempenha um importante papel na qualidade e segurança dos alimentos, tanto na pré-colheita como na pós-colheita. Consequentemente, o entendimento de que fatores formam este consórcio microbiano nos produtos agrícolas pode aumentar os benefícios obtidos. Fatores como solo, micro-organismos, clima, localização geográfica do vinhedo e as práticas enológicas aplicadas são considerados importantes e desempenham papel fundamental na elaboração dos vinhos, uma vez que influenciam no desenvolvimento de cada variedade de uva, na sua qualidade e tipicidade, se tornando a identidade do vinho produzido em uma determinada região. A uva (*Vitis vinifera* L.) é considerada uma matriz complexa, fonte de diversos compostos que são substratos para o desenvolvimento de micro-organismos. O estudo da diversidade de espécies microbianas componentes do *terroir* presente nas uvas é importante para observar as influências, tanto positivas quanto negativas desses microrganismos nas características do vinho. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a diversidade de fungos filamentosos de uvas viníferas das variedades Syrah, Tempranillo e Touriga Nacional, como também do solo de cultivo de dois vinhedos localizados na região do Vale do Submédio São Francisco. Para isto, amostras de uvas viníferas e de solo foram coletadas em vinícolas localizadas nos municípios de Casa Nova-BA (vinícola 1) e Lagoa Grande-PE (vinícola 2) nos anos de 2016 e 2017. Técnicas de identificação morfológica em conjunto com uma abordagem molecular foram utilizadas. Os resultados obtidos mostram que nas uvas houve predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, representando 63,47 %, 26,67 % e 8,12 %, respectivamente. Pela abordagem de metagenômica, os perfis taxonômicos obtidos nas uvas foram, em sua maioria, os filós *Ascomycota*, seguido de *Basidiomycota*, e os gêneros encontrados foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Acremonium*, *Paramycospharella*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Saccharomycopsis*, *Campylocarpon*, *Talaromyces*, *Erysiphe*, *Aureobasidium* e *Hanseniaspora*. Pela mesma análise molecular, a amostra Syrah 2 apresentou maior diversidade em relação às demais, seguidas das amostras Syrah 1, Touriga Nacional e, com menor diversidade, Tempranillo. Algumas espécies foram caracterizadas como predominantes, dentre essas, a maioria foi identificada como espécies de *Aspergillus*. Nas amostras de solo dos vinhedos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* foram os mais prevalentes, com 63,83 %, 27,66 % e 5,85 %, respectivamente. A metagenômica dos solos revelou maior riqueza de UTOs do que nos frutos, indicando maior biodiversidade. Há prevalência da classe *Dothideomycetes* e da ordem *Pleosporales* em ambas amostras. Em conjunto, os dados encontrados neste trabalho revelam um panorama da diversidade fúngica em vinhedos do Vale do Submédio São Francisco e podem constituir a base para outros estudos direcionados nessa área.

Palavras- chave: Uva. Solo. Diversidade de fungos. Vitivinicultura. Metagenômica.

GENERAL ABSTRACT

The *terroir* microbiome plays an important role in quality and safety of food, both in pre-harvest and post-harvest. Consequently, the understanding of factors constituting this microbial consortium in agronomic products can increase its benefits. Factors as soil, microorganisms, climate, geographic location of the vineyard and applied oenological practices are considered relevant and perform key role in wine production, since it has influence in development of each wine variety, in its quality and tipicity, becoming wine's identity produced in a region. Grape (*Vitis vinifera* L.) is considered a complex matrix, source of several compounds, which constitute an ideal substract for microbial growth, thus being susceptible to contamination. The diversity study of microbial species of grape *terroir* is important to observe both positive or negative influences of these microorganisms into the characteristics of the final product. Thus, the objective of the present work was to evaluate the diversity of filamentous fungi in grape varieties of the Syrah, Tempranillo and Touriga Nacional, as well as the cultivation soil of two vineyards located in the Vale do Submédio São Francisco region. In order to do so, grapes and soil were collected in wineries located in the municipalities of Casa Nova-BA (winery 1) and Lagoa Grande-PE (winery 2) in the years 2016 and 2017. Morphological identification in association with a molecular molecular technique were used. The results show that, in the grapes, the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* were predominant, representing 63.47 %, 26.67 % and 8.12 %, respectively. Through metagenomics approach the most abundant phyla found were *Ascomycota*, followed by *Basidiomycota*, and genera were: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Acremonium*, *Paramycospharella*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Saccharomyces*, *Campylocarpon*, *Talaromyces*, *Erysiphe*, *Aureobasidium* and *Hanseniaspora*. By the same molecular analysis, the Syrah 2 sample presented greater diversity in relation to the others, followed by Syrah 1, Touriga Nacional and less Tempranillo diversity samples. Some species were characterized as predominant, among these, most were identified as species of *Aspergillus*. In the soil samples of the vineyards the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* were the most prevalent with 63.83 %, 27.66 % and 5.85 %, respectively. The soil metagenomics revealed a greater richness of OTUs than in the fruits, indicating greater biodiversity. There is prevalence of the *Dothideomycetes* class and the order *Pleosporales* in both samples. Together, the data found in this work reveal an overview of the fungal diversity in vineyards of the Submédio São Francisco Valley and may constitute the basis for other directed studies in this area.

Keywords: Grape. Soil. Fungal diversity. Viticulture. Metagenomic.

Esta pesquisa faz parte do projeto “Desenvolvimento de tecnologias e uso da agricultura de precisão para colaborar com a certificação dos vinhos e com a sustentabilidade do setor vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco” do CNPq N° 403438/2013-6.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Localização da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco.....	17
Figura 2 – Fluxograma dos processos básicos da produção dos vinhos.....	23
Figura 3 - Biomassa microbiana global encontrada no solo.	26

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Região vitivinícola do VSMSF em que foram coletadas as amostras de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.) e solos de videira.....	43
Figura 2 - Esquema de coleta das bagas de uvas.....	45
Figura 3 - Esquema dos pontos de coleta de amostras do solo.....	45
Figura 4 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade fúngica presente nas amostras de uvas.....	59
Figura 5 - Caracterização molecular da fungos filamentosos e leveduras das amostras de uvas viníferas.....	61
Figura 6 - Mapa de calor dos gêneros presentes nas amostras de uvas viníferas.....	63
Figura 7 – Cladograma das UTOs caracterizadas a nível de espécies presentes na amostra Syrah 1 ...	64
Figura 8 - Cladograma das UTOs caracterizadas a nível de espécies presentes na amostra Syrah 2 ...	65
Figura 9 - Cladograma das UTOs caracterizadas a nível de espécies presentes na amostra Tempranillo	66
Figura 10 - Cladograma das UTOs caracterizadas a nível de espécies presentes na amostra Touriga Nacional.....	67
Figura 11 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química dos solos de cultivo de dois vinhedos de uvas Syrah (V1 e V2).....	76
Figura 12 - Caracterização molecular da comunidade fúngica das amostras de uvas viníferas.....	78
Figura 13 - UTOs classificadas a nível de espécie em amostras de solo de cultivo dos vinhedos Syrah (V1 e V2).....	80

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1 - Percentual relativo de gêneros por amostra de uva.....	54
Gráfico 2 - Percentual relativo de espécies por amostra de uva.....	56
Gráfico 3 - Percentual relativo de gêneros por amostra de solo.....	70
Gráfico 4 - Percentual relativo de espécies por amostra de solo de cultivo de uvas.....	72

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil no último biênio em toneladas.....	16
--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de amostras na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco.....	44
Tabela 2 - Características gerais dos <i>reads</i> obtidos pelo sequenciamento.....	51
Tabela 3 - Composição físico-química dos solos de cultivo dos vinhedos V1 e V2.....	75
Tabela 4 - Espécies fúngicas isoladas de uva vinífera e solo de cultivo potencialmente toxigênicas.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

DO – Denominação de Origem

FA – Fermentação Alcólica

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGs – Indicações Geográficas

INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial

IP – Indicação de Procedência

NGS - *Next Generation Sequencing*

OMPI – Organização Mundial da Propriedade Intelectual

OTA – Ocratoxina A

UTO – Unidade Taxonômica Operacional

OIV - Organização Internacional da Vinha e do Vinho

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RNAr – Ácido Ribonucleico ribossomal

VSMSF – Vale do Submédio São Francisco

TN – Touriga Nacional

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Cenário da Vitivinicultura no Brasil	15
2.2 O Vale do Submédio São Francisco - VSMSF	17
2.3 Produção de vinhos no Vale do Submédio São Francisco	18
2.4 Conceito de <i>Terroir</i>	20
2.5 Microbiota <i>terroir</i>	21
2.5.1 Microbiota <i>terroir</i> associada às uvas	22
2.5.2 Microbiota <i>terroir</i> e qualidade do vinho	23
2.5.3 Microbiota <i>terroir</i> e segurança do vinho	24
2.5.4 Microbiota <i>terroir</i> associado ao solo	25
2.6 Indicações Geográficas	27
3 Caracterização da biodiversidade micológica	28
3.1 Isolamento e identificação morfológica de fungos filamentosos	29
3.2 Ferramentas moleculares – Metagenômica	30
CAPÍTULO 2.....	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Área de estudo	42
3.2 Amostragem	43
3.2.1 Coleta das uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.)	44
3.2.2 Coleta de solos de cultivo das uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.)	45
3.3 Isolamento de fungos filamentosos	46
3.4 Identificação de fungos filamentosos	46
3.5 Análise físico-química dos solos de cultivo de uvas (<i>Vitis vinifera</i> L.)	47
3.6 Avaliação do potencial toxigênico	48
3.6.1 Avaliação do potencial toxigênico dos fungos filamentosos	48
3.7 Análises estatísticas	49
3.8 Metagenômica	49
3.9 Extração do DNA para metagenômica	49
3.10 Produção do <i>amplicon</i> e sequenciamento	50
3.11 Bioinformática	51
3.11.1 Tratamento dos <i>reads</i>	51
3.11.2 <i>Clusterização</i> e anotação das UTOs	51
3.11.3 Análises, diagramas e curvas de rarefação	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Análises da biodiversidade de fungos filamentosos nos frutos	53
4.1.1 Caracterização morfológica	53
4.1.2 Análise do componente principal das amostras de uvas viníferas	58
4.1.3 Perfil metagenômico	60
5.1 Análises da biodiversidade de fungos filamentosos nos solos dos vinhedos	69
5.1.1 Caracterização morfológica de fungos filamentosos isolados dos solos de vinhedos Syrah....	69
5.1.2 Análise de componentes principais do solo	74
5.1.3 Metagenômica de solos de vinhedos	78
6.1 Capacidade toxigênica de espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
8 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A videira é uma planta de alto valor econômico cultivada em todo o mundo, sendo a espécie *Vitis vinifera* L. a mais disseminada e utilizada para produção de vinhos de alta qualidade. Essa apresenta maior relevância tanto em hectares cultivados quanto em valor de mercado (RIENTH et al., 2014). No Brasil, o mercado vitivinícola está em crescimento, sendo a região Sul do país a principal responsável pela produção de vinhos.

Entretanto, de maneira oposta aos principais países produtores de vinhos no mundo, fração majoritária da produção de vinhos nacionais (90 %) ainda é com uso da espécie *Vitis labrusca* L. Essa realidade é distinta na região vitivinícola do Vale do São Francisco, localizada no Nordeste do país, onde os vinhos são produzidos principalmente a partir de *Vitis vinifera* L. (PADILHA et al., 2017).

Apenas algumas poucas cultivares de videira *Vitis vinifera* L. são plantadas. Essa baixa variabilidade genética está diretamente relacionada com a alta susceptibilidade dessas plantas a estresses bióticos e abióticos, os quais estão fortemente associados com perdas econômicas (ARMIJO et al., 2016). Tais fatos ressaltam ainda mais a importância das práticas e do manejo dos vinhedos para obtenção de uvas de qualidade para a vinificação.

O microbioma vegetal é a comunidade microbiana presente em toda a planta nos seus diferentes tecidos, e a presença e composição dessa comunidade tem sido associada com a saúde da planta e de seus produtos (BERG et al., 2014). Em videiras a caracterização do microbioma é ainda mais relevante, pelo fato do vinho se tratar de um produto fermentado e esse processo ser mediado justamente pelos micro-organismos constituintes do microbioma vegetal (MEZZASALMA et al., 2017).

Assim, ao conceito clássico de *terroir*, que engloba as características geográficas e culturais peculiares de uma região e suas relações com o vinho ali produzido, se adiciona a microbiota típica da videira, uma vez que essa é modulada por características edafoclimáticas (HERDERICH et al., 2015).

Nesse sentido, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar tanto de forma quantitativa, quanto qualitativa a comunidade de fungos filamentosos presentes nas uvas e no

solo de vinhedos, almejando caracterizar a microbiota *terroir* da região do Vale do Submédio São Francisco (VSMSF).

Os resultados são apresentados no capítulo 2 e mostram a diversidade de fungos filamentosos encontrados em amostras de uva e solo de 2 vinhedos da região do Submédio do Vale do São Francisco, no Nordeste do Brasil. Foram utilizadas abordagens clássicas como a caracterização morfológica e modernas como sequenciamento de segunda geração. Em conjunto os dados descrevem os fungos mais prevalentes na região para as amostras analisadas e podem servir como base para a caracterização do *terroir* microbiano dessa região vitivinícola.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cenário da Vitivinicultura no Brasil

A vitivinicultura brasileira iniciou-se por volta de 1532 com a chegada dos colonizadores portugueses que plantaram as primeiras mudas de videira no país. Porém, sem os devidos cuidados, essas desapareceram e apenas em 1870, na Serra Gaúcha, com a chegada dos primeiros imigrantes italianos que a produção de vinhos foi retomada no país (VALDUGA, 2011). Desde então, o cultivo da uva no Brasil esteve restrito às regiões Sul e Sudeste, mantendo as características de cultura de clima temperado, onde, após o ciclo de colheita, a videira passava por um período de repouso nas baixas temperaturas do inverno (PROTAS; CAMARGO; MELLO, 2006). Entretanto, esse panorama começou a ser alterado a partir da década de 60, com a introdução exitosa de uvas da variedade “Itália” na região semiárida do Vale do Submédio São Francisco - VSMSF, marcando o início da viticultura tropical no Brasil (CAMARGO; PROTAS; MELLO, 2008). A prática da viticultura se difundiu e consolidou-se no norte do Paraná na década de 1970 e em regiões do estado de São Paulo e do norte de Minas Gerais na década seguinte. A partir de 1990 surgiram diversos novos polos vitícolas, alguns voltados à produção de uvas de mesa e outros direcionados à produção de uvas para a elaboração de suco e vinho (WENDLER, 2009).

Em 2017 o Brasil produziu cerca de 1,6 milhões de toneladas de uvas, o que reflete em um aumento de 41,4 % da produção em relação ao ano anterior. Dentre as principais regiões viticultoras, o estado do Rio Grande do Sul, o qual representa mais de 75 % da área vitícola do país, contribuiu com um aporte de 57,0 % da produção total de uvas. Em Santa Catarina,

observou-se aumento de 49,5 % na produção e, no Paraná, o acréscimo foi de 7,27 %. Na região sudeste, o estado de São Paulo apresentou decréscimo na produção de uvas de 5,32 %, enquanto que nos estados da Bahia (BA) e Pernambuco (PE), os quais representam o VSMSF, e que, também compreendem uma área importante na produção de uvas, obtiveram respectivamente uma retração de 34,0 % (BA) e um acréscimo de 37,8 % (PE) na produção total de uvas do país nos anos de 2016 e 2017 (IBGE, 2017) (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil no último biênio em toneladas.

Região	2016 (t)	2017 (t)	% da produção nacional (2017)
Rio Grande do Sul	413.640	956.913	57,0
Santa Catarina	33.245	65.800	3,9
Vale do Submédio do São Francisco (PE - BA)	320.289	441.390	26,3
São Paulo	140.593	133.118	7,9
Paraná	52.198	56.295	3,4
Minas Gerais	11.224	13.070	0,8

Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2017).

No Brasil, seis regiões são conhecidas como as principais produtoras de vinhos finos (produzidas a partir de uvas *Vitis vinifera*), sendo elas a Serra Gaúcha, Campanha, Serra do Sudeste, Campos de Cima da Serra, Planalto Catarinense e VSMSF, as quais compõem a maior parte dos 83,7 mil hectares de área de produção vitivinícola brasileira (HOECKEL; FREITAS, 2016). O estado do Rio Grande do Sul apresenta-se como o principal produtor dos vinhos nacionais, liderando o abastecimento interno (WENDLER, 2009). De acordo com dados do Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN), no ano de 2017 o Estado produziu 49,3 milhões de litros de vinho provenientes de uvas viníferas.

Representando a principal região tropical vitivinícola brasileira, o VSMSF sedia o único lugar do mundo que possui produção vinícola em condições semiáridas, devido ao seu sistema de irrigação que conta com a disponibilidade de recursos hídricos provenientes do rio São Francisco entre os estados da Bahia e Pernambuco (Figura 1) (PEREIRA, 2013). Atualmente, o Vale possui aproximadamente 500 hectares de vinhedos de uvas viníferas, emprega 30 mil pessoas diretamente e produz cerca de 7 milhões de litros de vinhos finos, o que representa

cerca de 15% da produção nacional, sendo a segunda área em produção do país e perdendo apenas para o Rio Grande do Sul (COELHO-COSTA; CORIOLANO, 2017).

2.2 O Vale do Submédio São Francisco - VSMSF

A região do VSMSF está localizada entre os paralelos 8 - 9° do hemisfério Sul, abrangendo em sua área vitivinícola cidades como Casa Nova na Bahia, Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista em Pernambuco (FIGURA 1) (FLORES; FLORES, 2012). Além de ser a região vitivinícola mais próxima da linha do Equador em todo o mundo (SOARES; LEÃO, 2009), o Submédio São Francisco vem apresentando vinhedos com ótimo desempenho produtivo e qualitativo sob condições semiáridas irrigadas, o que o diferencia perante a vitivinicultura mundial localizada tradicionalmente em regiões climáticas temperadas entre as latitudes de 40 ° e 50 ° no hemisfério norte e 40 ° no hemisfério sul (ILAND, 2009).

Figura 1 - Localização da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco.



Legenda - Localização da região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco nos Estados de Pernambuco e Bahia. Região em vermelho destaca o VSMSF, compreendendo os municípios vitivinícolas dos estados da Bahia (Casa Nova), em alaranjado, e Pernambuco (Petrolina, Lagoa Grande e Santa Maria da Boa Vista) em roxo, divididos em azul pelo rio São Francisco.

Fonte: Adaptado de Guerra et al., 2005.

Os vinhos produzidos em vinhedos de regiões onde as temperaturas anuais permitem ter mais de um ciclo vegetativo por ano e mais de uma colheita anual, são considerados vinhos

tropicais. Países da América do Sul como o Brasil, Equador, Peru e Venezuela; da Ásia como a China, Índia e Vietnã; da África como a Namíbia, Madagascar e Tanzânia; são os países que, atualmente, compõem essa nova geografia vitivinícola (JOGAIAH et al., 2013).

O clima do VSMSF se caracteriza por baixa pluviosidade, concentrada nos meses de dezembro a abril, perfazendo um total de 750 a 500 mm de chuva/ano. Ocorrem em média 300 dias de sol por ano, aproximadamente 2.800 h de luminosidade aliada a uma baixa umidade relativa, de 50 %, e temperatura média anual de 26 °C (DIAS; PEZZELLA; MARCHEZINI, 2016).

O solo pertencente ao VSMSF é oriundo de rochas cristalinas, predominantemente raso, pouco permeável, sujeito a erosão, de razoável fertilidade natural em decorrência dos baixos valores da soma de bases trocáveis (íons relacionados à liberação a longo prazo de nutrientes pelo solo) (RONQUIM, 2010). É composto por granitos, anfibólitos, micaxistos, quartzitos e filitos. Em linhas gerais a maior parte do solo do VSMSF é grosseiramente granítico, ácido, calcário e argiloso, o que para alguns enólogos podem conferir certa “mineralidade” aos vinhos produzidos a partir das uvas cultivadas com esse tipo de solo (TINTOS&TANTOS, 2017). Nessa região predomina a vegetação da caatinga, com sucessão indicativa de processo de degradação ambiental (DIAS; PEZZELLA; MARCHEZINI, 2016).

Em conjunto, os fatores edafoclimáticos do VSMSF associados à grande quantidade de água do rio São Francisco disponível para irrigação, conferem ao produtor a possibilidade de programar a colheita para qualquer época do ano, através do manejo da videira utilizando a poda e uso de fitorreguladores para quebra de dormência das gemas. Tais fatores permitem a obtenção de duas safras anuais (PROTAS; CAMARGO; DE MELO, 2002).

2.3 Produção de vinhos no Vale do Submédio São Francisco

As variedades de maior importância para elaboração de vinhos tintos finos do VSMSF são a Syrah, a Tempranillo, a Touriga Nacional e Cabernet Sauvignon, representando cerca de 85 % do vinho produzido, juntamente com as variedades Alicante Bouschet, Aragonês, Tannat e Rubi Cabernet. Na elaboração dos vinhos brancos, as uvas utilizadas são Chenin Blanc, Moscato Canelli, representando cerca de 80 % dos vinhos, além de Sauvignon Blanc, Verdejo e Viognier (WURZ et al., 2017).

Os vinhos brancos do Vale são descritos em linhas gerais por Pereira (2013) como leves, com aromas florais e fáceis de serem consumidos. Os tintos são variados, desde vinhos leves, jovens, até os mais encorpados, os quais, passam por algum período em barricas. Enquanto que os espumantes são elaborados de todos os tipos, desde secos até moscatéis, a partir das uvas moscatos Itália e Canelli, além de vinhos rosados com Syrah, licorosos e brandy.

Nas condições ambientais do VSMSF, a variedade Syrah (em francês) ou Shiraz (em inglês), utilizada também na elaboração de vinhos rosé e espumantes, apresentou ótimos resultados de cultivo, sendo a principal variedade para elaboração de vinhos tintos, representando 65 % do total de produção (PEREIRA et al., 2010). A origem dessa variedade é controversa, alguns autores sugerem que seria em Shiraz, na Pérsia, entretanto, outros acreditam que essa uva seria nativa da Vila de Siracusa, na Sicília (GUERRA et al., 2005). É uma variedade de *Vitis vinifera* típica de climas quentes, apresenta-se com cachos medianos, cilíndricos-cônicos, compactos, com bagas pequenas a medianas, ovaladas, negro-azuladas, acumulando até 25° Brix de sólidos solúveis (TORRES et al., 2013).

As uvas Syrah possuem alta sensibilidade a podridões do cacho com tendência a desidratação em estágios avançados de maturação, o que as tornam de difícil cultivo nas condições ambientais da Serra Gaúcha. Porém, nas condições do VSMSF, essa variedade se mostra bem-sucedida (SILVA, 2016). O seu plantio obteve êxito na Austrália, onde é considerada símbolo da vitivinicultura, conquistando também espaço na Califórnia, África do Sul, Chile e Argentina. Seu vinho é característico pelo seu aroma e buquê, recordando ameixa, figo e pimenta do reino preta, além de apresentar bom potencial alcoólico, cor intensa, fino, complexo, tânico e estruturado com acidez moderada (GUERRA et al., 2005; MIELE, 2003).

Originária da Espanha, a variedade Tempranillo, também conhecida por Tinta *del País*, Tinta Fina, Cencibel e Tinta Roriz (AZEVEDO, 2017), apresenta médio a alto vigor, cachos cheios e de tamanho médio, com maturação precoce em relação a outras cultivares *Vitis vinifera*. Foi introduzida no VSMSF em 2007 (PEREIRA et al., 2009) e se destacou pela boa produtividade, acidez, açúcar (22 °Brix) e antocianinas (CAMARGO; PROTAS; MELLO, 2008). Sua videira é considerada produtiva e vigorosa, porém sensível a doenças fúngicas como oídio, e possui baixa tolerância ao calor e à seca. Esta variedade é provavelmente a casta tinta com maior importância econômica no contexto vitivinícola ibérico e em Portugal, também denominada Aragonez (AZEVEDO, 2017), além disso é bem adaptada na Argentina e Austrália. No Brasil, a Tempranillo foi inserida no ano 2000, sendo cultivada, inicialmente, no Rio Grande do Sul (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011). A cultivar dá origem a

vinhos com notas de frutas vermelhas e pretas, herbáceos e especiarias, além de originar vinhos bem equilibrados e aromáticos com acidez mediana e cor estável, sendo consumidos jovens ou envelhecidos (LOMBARDI, 2012).

A variedade tinta Touriga Nacional é originária de Portugal, da região do Dão ou do Douro (MARTINS et al., 2009), sendo utilizada na fabricação de vinho do Porto, vinho de mesa e vinhos varietais. Possui elevada fertilidade com maturação média a precoce, apresentando resistência ao oídio, míldio, podridão cinzenta, cigarrinha e traça, no entanto, é susceptível ao estresse hídrico e outras doenças fúngicas (TEIXEIRA, 2011). Essa uva possui cacho de tamanho pequeno a médio, produzindo pequenas bagas com película rígida, sendo de difícil separação (JAYASANKAR; LI; GRAY, 2000). Os vinhos produzidos apresentam cor intensa com tonalidades violáceas quando novos, o aroma é intenso de frutas vermelhas escuras como amoras maduras (BRITES; PEDROSO, 2000). Em um trabalho de avaliação sensorial realizado por De Pinho e colaboradores (2007), foram detectados aromas de bergamota, laranja e violeta. A bebida é encorpada, persistente, robusta, taninosa e muito frutada quando jovem. Possui elevado potencial para envelhecimento prolongado, adquirindo uma elegância, um aroma e sabor aveludados (VIEIRA, 2017).

2.4 Conceito de *Terroir*

Terroir é uma palavra-noção que se conecta ao ambiente físico e às condições geoagroambientais de uma determinada localidade. O termo traz consigo especificidades relacionadas aos aspectos climáticos, morfológicos e sociais, portanto um conceito geográfico diferenciado de território, contudo relacionado à identidade natural de um lugar. Sendo assim, o *terroir* descreve a identidade local de uma comunidade construída ao longo do tempo correlacionando seus conhecimentos e práticas com o meio físico e biológico (COELHO-COSTA; CORIOLANO, 2017).

O setor agroalimentar compreende elementos como território, cultura, tradição, culinária, entre outros e faz surgir produtos e serviços que agregam valor e promovem o *terroir* de várias regiões, ampliando o significado de experiência gastronômica além da simples ingestão de bebidas e alimentos (NIEDERLE; VITROLLES, 2010). Nesse sentido, iniciativas como o turismo enogastronômico se difundiram como forma de majorar a valorização de vinhos regionais e incrementar a economia local (FLORES; FLORES, 2012).

A Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) definiu em 2010 o *terroir* vitivinícola como um conceito que se refere ao espaço reconhecido como capaz de conferir características distintivas a produtos dali originários, graças às características físicas e biológicas localmente identificadas, bem como às práticas vitivinícolas ali realizadas (OIV/Viti/333/2010) (OIV, 2010). Um exemplo bem estruturado de região vitivinícola ocorre em Borgonha na França, onde o conceito de *terroir* foi explorado principalmente para a comercialização dos vinhos da região, promovendo o turismo e conferindo vantagem competitiva frente as outras regiões (CROCE; PERRI, 2017).

A combinação dos fatores naturais como paisagem, solo e clima, responsáveis por interferirem na videira, além dos fatores humanos, são fundamentais na caracterização do *terroir*. Essa interligação complexa resulta nas características únicas do vinho. Mateus e colaboradores (2001) estudaram a coloração característica do vinho do Porto em relação ao *terroir* das regiões produtoras de castas de Touriga Nacional e Touriga Franca. Os autores concluíram que vinhedos situados em altitudes mais elevadas (acima de 200 m) apresentaram temperaturas mais baixas e menor umidade relativa, o que favoreceu maior deposição de antocianinas tanto na casca da uva quanto no vinho. Esses compostos já foram descritos como diferenciais no estabelecimento da coloração do vinho (TANG et al., 2017).

2.5 Microbiota *terroir*

Micro-organismos associados às plantas desempenham um papel central na modulação das características fisiológicas do vegetal tais como: crescimento, fitossanidade e conteúdo nutricional (VACHER et al., 2016). Especialmente para o setor vitivinícola é importante documentar a diversidade microbiana associada às videiras, com intuito de assegurar a produção de uvas saudáveis e, por conseguinte, vinhos de alta qualidade (KNIGHT et al., 2015). Já foi descrito que leveduras autóctones e bactérias lácticas e acéticas, capazes de colonizar as bagas de uva, afetam diretamente o aroma do vinho (VIGENTINI et al., 2016), além disso a diversidade de fungos e bactérias epifíticos nas folhas está intimamente relacionada à fitossanidade (PINTO et al., 2014). Em conjunto, vários estudos recentes apontam que diferenças regionais na composição microbiana associada às uvas, denominado *terroir* microbiano, está significativamente correlacionado com as características regionais e sensoriais

típicas de um vinho (BOKULICH et al., 2016; GILBERT; VAN DER LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014).

A interação entre fatores regionais, climáticos e a comunidade microbiana promovem uma seleção não aleatória da microbiota *terroir* associada a um produto ou local (BOKULICH et al., 2014). Em conjunto o estudo dessas interações pode melhorar o controle biológico dentro do sistema pesquisado, valorizando, por exemplo, um produto regional ou uma *commoditie* agrícola. Assim, a composição da diversidade microbiana e suas funções ecológicas e metabólicas apresentam relevância científica, econômica e social (SUZZI, 2011).

2.5.1 Microbiota *terroir* associada às uvas

Dentre os diferentes constituintes da parte aérea da videira, a superfície das uvas caracteriza-se por ser um microambiente nutricionalmente rico, favorável à colonização por micro-organismos epifíticos (MARTINS et al., 2012). Entretanto, propriedades da uva, como pH e composição de açúcares, apresentam caráter variável ao longo do amadurecimento, podendo ainda estar influenciado com fatores como umidade, temperatura, regime de chuvas, radiação ultravioleta e aplicação de fitoreguladores (RENOUF; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2005).

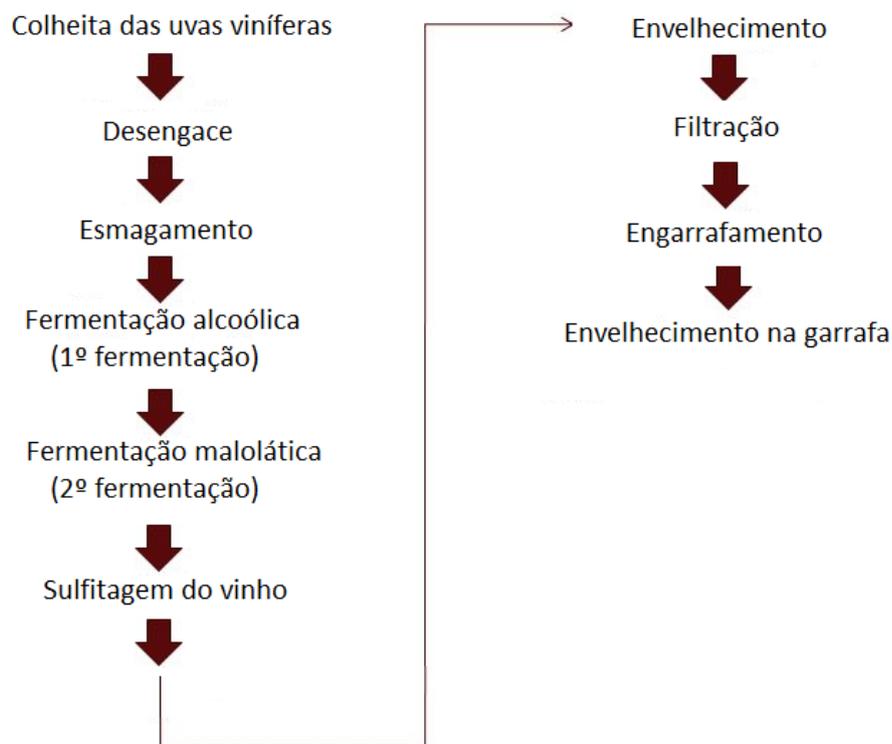
Bactérias endofíticas já foram descritas como capazes de efetuar interações positivas como promoção do crescimento vegetal (HAAS; DÉFAGO, 2005) e controle biológico de patógenos (BERG, 2009). Além disso, foi relatado que micro-organismos associados a uva, em conjunto ou isoladamente, podem produzir compostos orgânicos voláteis presentes no vinho (VERGINER; LEITNER; BERG, 2010). Em um outro trabalho, foi demonstrado que o manejo orgânico de videiras evidenciou o aumento da população de *Aureobasidium pullulans* quando comparado com o manejo tradicional. Nesse mesmo trabalho, também foi relatado o biocontrole contra *Botrytis cinerea* por *Aureobasidium pullulans* (SCHMID et al., 2011).

Adicionalmente, a microbiota *terroir* da uva pode contribuir de maneira benéfica para a fabricação do vinho. Belda e colaboradores (2016) observaram a presença de perfis de produção de enzimas hidrolíticas por cepas de leveduras de acordo com a origem geográfica. Os autores caracterizaram essas diferenças como fatores determinantes nas propriedades sensoriais dos vinhos.

2.5.2 Microbiota *terroir* e qualidade do vinho

O vinho é resultado de um encadeamento de etapas, que se iniciam na colheita da matéria-prima (uva), através da execução de diferentes processos até a elaboração do produto final (FIGURA 2). Dentre essas etapas destacam-se vias fermentações alcóolica (FA) e malolática, processos nos quais a microbiota desempenha atividade determinante influenciando o *flavor*, aroma e a qualidade do vinho em si (MORRISON-WHITTLE; GODDARD, 2018). Apesar de toda microbiota do vinho contribuir para as características químicas, as leveduras exercem um papel preponderante durante a fermentação, uma vez que promovem a FA, etapa na qual os açúcares da uva são transformados em etanol e dióxido de carbono (CAPOZZI et al., 2015).

Figura 2 – Fluxograma dos processos básicos da produção dos vinhos



Legenda – Fluxograma mostrando as etapas básicas envolvidas na elaboração de vinhos.
Fonte: Do autor (2018).

As espécies microbianas isoladas a partir de uvas podem ser divididas em três grupos de acordo com a importância tecnológica da uva. Assim, as espécies podem ser agrupadas em:

1. espécies facilmente controláveis, sem a capacidade de comprometer a qualidade da produção de vinhos, pois são espécies incapazes de fermentar açúcares e sobreviver em vinhos; 2. as espécies que são utilizadas na fermentação, como exemplo de espécie fermentativa de maior importância tem-se a *Saccharomyces cerevisiae*; 3. as espécies responsáveis pelas alterações no vinho, como exemplo as leveduras do gênero *Pichia spp*, que promovem a formação de películas sobre a superfície de vinhos, com a produção de *off-flavor* (MALFEITO-FERREIRA, 2011; ROMANO, 2002).

Nos estágios iniciais da fermentação leveduras não-*Saccharomyces* tais como os gêneros: *Hanseniaspora*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Issatchenkia* e *Kluyveromyces* são encontradas em maior abundância (DE FILIPPIS; LA STORIA; BLAIOTTA, 2017). Posteriormente, a maior tolerância ao etanol favorece o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, conferindo vantagem competitiva frente à outras leveduras (ALONSO-DEL-REAL et al., 2017). Uma vez que *Candida* e *Hanseniaspora* influenciam o perfil aromático do vinho, verificou-se que, em temperaturas de 10 a 15 °C, essas leveduras são capazes de sobreviver até os estágios fermentativos finais (ERTEN, 2002). Em um estudo recente, Morrison-Whittle e Goddard (2018) analisaram comunidades fúngicas e observaram prevalência de *Botryotinia* logo após a maceração das uvas. Porém, após o início da fermentação observou-se significativo incremento da abundância de *Saccharomyces*.

A inoculação de cepas de *S. cerevisiae* para atuar como cultura *starter* é prática comum na elaboração de vinhos, pois permite a padronização da produção (SPANO et al., 2010). Entretanto, vários trabalhos apontam que a manutenção da biodiversidade autóctone é determinante para a obtenção do *flavor* e aroma típicos de uma variedade de uva (PRETORIUS, 2000). Dessa forma, a exploração da biodiversidade indígena fermentativa pode contribuir de forma relevante no entendimento e seleção de cepas *starter* com um fenótipo específico (CAPECE et al., 2010).

2.5.3 Microbiota *terroir* e segurança do vinho

Durante as etapas de pré-colheita, colheita e processamento as uvas são susceptíveis à contaminação por várias espécies de fungos (FREIRE et al., 2017). Sabe-se que o manejo e as condições climáticas podem afetar a ocorrência desses fungos e explicar as diferenças na composição da microbiota de diferentes regiões (SOMMA; PERRONE; LOGRIECO, 2012).

No que tange à segurança alimentar, o estudo dos fungos micotoxigênicos, aqueles produtores de micotoxinas, apresenta relevância para assegurar a qualidade do produto final (SANZANI et al., 2016).

Um dos grandes problemas na qualidade do vinho é a sua contaminação por micotoxinas, por isso se destaca a colonização de fungos micotoxigênicos nas uvas, principalmente os produtores de ocratoxina A (OTA). A OTA (7-(L-fenilalanil- β -carbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarin) é uma nefrotoxina com propriedades carcinogênicas, teratogênicas e imunossupressoras, classificada como grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993). O Comitê Misto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu 100 ng/kg de peso corpóreo como a dose semanal tolerável recomendada para a OTA (JECFA, 2007), a qual também é regulada pela Comissão Europeia. Os níveis de regulação nos alimentos para consumo humano e animal são estabelecidos em 10 μ g/kg em uvas secas (EC-472/2002), 2 μ g/kg em suco de uva, mosto e vinho (EC-123/2005). Esses mesmos limites foram fixados pela ANVISA em 2011 (BRASIL, 2011).

Nos alimentos, de modo geral, os principais fungos ocratoxigênicos são: *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *Penicillium verrucosum*, *P. nordicum*. Porém, as principais espécies de fungos produtoras de ocratoxina A nas uvas de diversas regiões (temperadas, subtropicais e tropicais) pertencem ao gênero *Aspergillus* da Seção *Nigri*, sendo o *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* os maiores representantes (ZHANG et al., 2016).

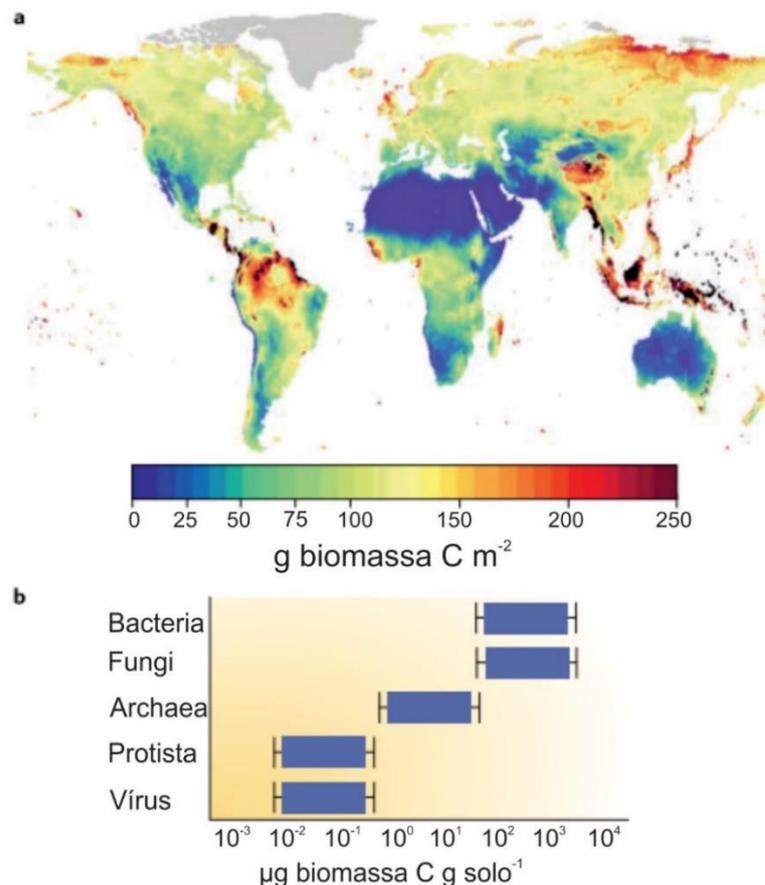
Além disso, o vinho também pode ser contaminado por outras micotoxinas como a fumonisina (*Fusarium* spp.) (CARRASCO-SÁNCHEZ et al., 2017), aflatoxina (*A. parasiticus*) (DI STEFANO et al., 2015), patulina (*Byssoschlamys* sp) (OTEIZA et al., 2017) e alternariol (*Alternaria* sp.) (PRENDES et al., 2015).

2.5.4 Microbiota *terroir* associado ao solo

O microbioma do solo contém mais de 1.000 Kg de biomassa microbiana de carbono por hectare (FIGURA 3) (SERNA-CHAVEZ; FIERER; BODEGOM, 2013). Esses microorganismos desempenham papéis cruciais na ciclagem de nutrientes e manutenção da fertilidade. De maneira geral, o microbioma do solo afeta direta e indiretamente a saúde de

plantas e animais presentes nos ecossistemas terrestres (FIERER et al., 2009). O solo não é um ambiente único, pelo contrário, é composto por diferentes microambientes, os quais podem distar apenas alguns milímetros entre si, tais como: rizosfera (associado às raízes), zona fótica (superfície sujeita a luz solar), drilosfera (área da ação das minhocas), além de horizontes mais profundos (FIERER, 2017).

Figura 3 - Biomassa microbiana global encontrada no solo.



Legenda - **a.** Estimativa da variação da biomassa microbiana na Terra. **b.** Estimativas da contribuição dos principais grupos microbianos para a biomassa microbiana total do solo.

Fonte: FIERER (2017).

A análise da diversidade das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) encontradas a partir de um estudo de metagenômica em videiras da variedade Merlot, utilizando a região V4 do RNA ribossomal (RNAr) 16s em diferentes tecidos da parte aérea das videiras e o solo rizosférico ou bruto, permitiu a Zarraonaindia e colaboradores (2015) inferir que o solo atua como reservatório da biodiversidade bacteriana encontrada nos tecidos aéreos, ou seja, em

última análise, a estrutura da microbiota *terroir* dos solos nos quais a videira é cultivada influencia na composição microbiana das bagas das uvas e, por conseguinte, nas etapas fermentativas da produção do vinho.

No solo, as raízes das videiras geralmente são colonizadas por fungos micorrízicos arbusculares, pertencentes ao filo *Glomeromycota*. Esses organismos são considerados os pioneiros na interação com os vegetais (BALESTRINI et al., 2010). Contudo, outros dados sugerem que diferentes frações do solo são majoritariamente colonizadas pelos gêneros *Penicillium* e *Cryptococcus* (ORGIAZZI et al., 2012).

2.6 Indicações Geográficas

O termo “Indicações Geográficas” (IGs) é uma designação utilizada para bens que possuem uma origem geográfica específica e qualidades, reputação ou características que são essencialmente atribuíveis àquele local de origem (OMPI, 2017). Esta designação promove agregação de valor aos produtos através da identidade e valorização de seus respectivos fatores naturais e culturais. O interesse pela implementação das IGs por parte de novos países, não somente para produtos vinícolas, mas também para outros produtos da agropecuária e da agroindústria, é crescente. Embora seu emprego venha aumentado nos últimos tempos, este conceito possui origem remota na era romana com a utilização de selos de identificação da região de proveniência e de produção controlada nas ânforas de vinhos (MAFRA, 2008).

No Brasil, as IGs são conceituadas pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) por duas modalidades: a Indicação de Procedência (IP) e a Denominação de Origem (DO). A IP seria “o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que se tenha tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação de determinado produto ou de prestação de determinado serviço”. Enquanto que a DO é “o nome geográfico de país, cidade, região ou localidade de seu território, que designe produto ou serviço cujas qualidades ou características se devam exclusiva ou essencialmente ao meio geográfico, incluídos fatores naturais e humanos”. De modo geral, é uma garantia quanto à origem de um produto e ou suas qualidades e características regionais (INPI, 2015).

Sendo assim, para a IP é necessário que seja realizado apenas um dos processos de extração, produção ou fabricação na região delimitada, enquanto que para a DO há

obrigatoriedade que o produto possua características exclusivas do meio geográfico, fatores físicos e humanos (FERNÁNDEZ, 2012).

No que tange o mercado vitivinícola as IGs estão consolidadas em vários países, em particular na Europa, muitas das quais são conhecidas mundialmente como Bordeaux, Champagne, Porto e Rioja (VALDUGA; VALDUGA, 2016). No Brasil, o Vale dos Vinhedos foi a primeira região vitivinícola a obter a IG. Outras regiões se juntaram a essa como: Pinto Bandeira, Altos Montes, Monte Belo, Farroupilha e Vale da Uva Goethe. Outras duas regiões estão em processo de estruturação como Campanha Gaúcha e Altos de Pinto Bandeira (TONIETTO; PEREIRA, 2016). Também em processo de estruturação está a IG da região do VSMSF. Essa é de certa forma recente em comparação com as regiões tradicionais (PEREIRA, 2013). Solicitada pela associação Instituto do Vinho do Vale do São Francisco – VinhoVasf, em parceria com a Embrapa, essa IG contempla diversos tópicos, entre eles a caracterização do *terroir* microbiano.

3 Caracterização da biodiversidade micológica

A identificação de fungos a nível de espécie é um componente fundamental de muitos estudos, tanto nos campos aplicados quanto na pesquisa básica (BEGEROW et al., 2010). Além disso, a identificação confiável de espécies desempenha um papel central em todos os estudos relacionados à caracterização da biodiversidade, pois todos os aspectos biológicos de qualquer indivíduo em um ecossistema só podem ser atribuídos de forma significativa através de um identificador inequívoco como o nome de uma espécie (RYBERG, 2015).

Atualmente, as técnicas moleculares de identificação têm sido cada vez mais utilizadas como forma de sobrepor as limitações conhecidas pela caracterização morfológica (RAJA et al., 2017). O uso de marcadores específicos (i.e. genes com alta resolução filogenética para um táxon) é uma das estratégias empregadas, porém as espécies são mais fidedignamente delimitadas utilizando-se diferentes linhas de evidência do que somente uma característica (SCHOCH et al., 2012). Consequentemente, o uso de múltiplos genes como marcadores surgiu como alternativa (DOWTON et al., 2014).

Seguindo essa nova tendência taxonômica os micologistas têm se empenhado em compilar os dados de chaves de identificação, composição dos meios de cultivo, árvores

filogenéticas e uso de genes *barcodes* em grandes revisões para cada gênero, como foi feito para *Penicillium* por Visagie e colaboradores (2014).

3.1 Isolamento e identificação morfológica de fungos filamentosos

A morfologia é a arquitetura física através da qual um organismo exerce sua fisiologia e se adapta ao ambiente (GHAJARBEYGI et al., 2015). Embora os dados moleculares sejam agora amplamente utilizados na sistemática fúngica e na filogenia, a descrição válida de uma espécie ainda requer a caracterização morfológica de acordo com o Código Botânico de Nomenclatura (HAWKSWORTH et al., 2010).

Um exemplo específico da necessidade de se realizar a caracterização morfológica ocorre no gênero *Penicillium*, conforme revisto por Visagie e colaboradores (2014). Os autores relataram que o gene β -tubulina A (*benA*) e outros genes marcadores são idênticos em *P. camemberti*, *P. caseifulvum* e *P. commune* (GIRAUD et al., 2010). A identificação morfológica, porém, revela que *P. camemberti* possui conídios brancos, *P. caseifulvum* possui o reverso laranja em meio de cultura YES e *P. commune* produz conídios verdes (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Os métodos dependentes de cultivo apresentam grande importância, eles permitem a caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de um micro-organismo, bem como seu isolamento. Dessa forma, as espécies isoladas podem ser estudadas e avaliadas quanto seu possível potencial biotecnológico. Ainda que a diversidade de micro-organismos se apresente maior por meio de técnicas moleculares, estas não disponibilizam uma espécie isolada e, por conseguinte, um possível estudo detalhado sobre as características metabólicas que a espécie pode apresentar e vir a contribuir em um processo fermentativo ou a um substrato, por exemplo.

Apesar de consolidada, a caracterização morfológica possui limitações como a plasticidade de caracteres morfológicos discriminatórios, mas de fácil acesso em muitos fungos (SLEPECKY; STARMER, 2009). Além disso, peculiaridades dos ciclos de vida dos fungos, como nas transições miceliais das leveduras, frequentemente dificultam a identificação correta da morfologia ao nível das espécies (KLEIN; TEBBETS, 2007). Dessa forma, ferramentas moleculares foram prontamente adotadas pela comunidade de micologistas no momento em que se tornaram disponíveis. Isso é exemplificado pelo fato de que aproximadamente 6.000

sequências de fungos estavam prontas para serem publicadas quando o Instituto Nacional de Saúde dos EUA iniciou o GenBank em 1993. Desde então, as submissões anuais de sequências aumentaram significativamente (BEGEROW et al., 2010).

3.2 Ferramentas moleculares – Metagenômica

A noção de que a ampla maioria dos micro-organismos não são cultiváveis em meios de cultura forçou os microbiologistas a mudarem a premissa de que um micro-organismo não existe, a não ser que possa ser cultivado (HANDELSMAN, 2004). Dentro dessa nova perspectiva, a prática da microbiologia mudou para acomodar a vastidão de vida não cultivável em laboratório. Lane e colaboradores (1985) inauguraram o estudo da diversidade microbiana diretamente a partir do ambiente amplificando RNAr 16s sem realizar o isolamento prévio das bactérias, para tanto os pesquisadores realizaram o sequenciamento de DNA através do método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

O estudo de DNA isolado diretamente a partir de micro-organismos em seus respectivos ambientes se consolidou e foi denominado de metagenômica (MANDAL; SAHA; DAS, 2015). Existem duas abordagens principais na metagenômica: o sequenciamento *shotgun* e o sequenciamento de *amplicon* (RANJAN et al., 2016). No sequenciamento *shotgun* todo o DNA presente em uma amostra é sequenciado aleatoriamente, há a possibilidade de se reconstruir um ou mais genomas a partir dos dados, porém em função da elevada quantidade de material genético presente em amostras ambientais, é necessário gerar uma quantidade de dados muito maior, acarretando aumento no custo do experimento (SIMS et al., 2014).

No sequenciamento de *amplicon* é realizada uma *polymerase chain reaction* (PCR) entre a extração do DNA e o sequenciamento, utilizando-se *primers* específicos para regiões altamente conservadas, como o 16s e o ITS (SIMS et al., 2014). A amplificação de apenas uma região conservada do genoma garante que seja necessária menor quantidade de DNA sequenciado para caracterização da biodiversidade (ESCOBAR-ZEPEDA; VERA-PONCE DE LEÓN; SANCHEZ-FLORES, 2015). A classificação é realizada através da comparação com bancos de dados como SILVA *database* (QUAST et al., 2012) para 16s bacteriano e UNITE (ABARENKOV et al., 2010) para ITS fúngico.

Com a popularização do *Next Generation Sequencing* (NGS), a metagenômica tem sido cada vez mais presente nos estudos dos alimentos. O ramo de laticínios é o mais explorado e uma variedade de produtos, especialmente queijos, já foram estudadas através de técnicas de *amplicon*-NGS (DE FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2017). Como exemplo, a fermentação inicial da coalhada após a coagulação foi monitorada (DE FILIPPIS et al., 2014), assim como a maturação (ALESSANDRIA et al., 2016) e a diferença espacial na composição da microbiota no mesmo queijo (DE PASQUALE et al., 2016).

Uma vez que o vinho tem suas características atreladas à sua microbiota *terroir*, a metagenômica é uma ferramenta que está cada vez mais inserida na enologia. A maioria dos projetos se divide em caracterizar a microbiota em diferentes porções do vegetal (DEL CARMEN PORTILLO et al., 2016), no solo dos vinhedos (ZARRAONAINDIA et al., 2015) ou no mosto durante etapas da fermentação (SPANO; TORRIANI, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABARENKOV, K., et al. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives. **New Phytologist**. 186(2): 281-285, 2010
- ALESSANDRIA, V., et al. Microbiota of an Italian Grana-Like cheese during manufacture and ripening, unraveled by 16S rRNA-Based approaches. **Applied and environmental microbiology**. 82(13): 3988-3995, 2016
- ALONSO-DEL-REAL, J., et al. Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: competition, physiological fitness, and influence in final wine composition. **Frontiers in microbiology**. 8: 150, 2017
- ARMIJO, G., et al. **Grapevine biotechnology: molecular approaches underlying abiotic and biotic stress responses**. Grape and Wine Biotechnology, InTech, 2016
- AZEVEDO, A. P. N. **Estudo de parâmetros químicos e bioquímicos de clones da casta Tinta Roriz**, Universidade de Trás-os-Montes e Alto-Douro, 2017
- BALESTRINI, R., et al. Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. **Environmental microbiology reports**. 2(4): 594-604, 2010
- BEGEROW, D., et al. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. **Applied microbiology and biotechnology**. 87(1): 99-108, 2010
- BELDA, I., et al. Unraveling the enzymatic basis of wine “flavorome”: a phylo-functional study of wine related yeast species. **Frontiers in microbiology**. 7: 12, 2016
- BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**. 84(1): 11-18, 2009
- BERG, G., et al. The plant microbiome and its importance for plant and human health. **Frontiers in microbiology**. 5: 1, 2014
- BERGEY, D., et al. **Bergey’s manual of determinative bacteriology**, Williams and Wilkins Baltimore, Md, 1923
- BOKULICH, N. A., et al. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. **MBio**. 7(3): e00631-00616, 2016
- BOKULICH, N. A., et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111(1): E139-E148, 2014
- BRASIL **Regulamento técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Resolução RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**, Anvisa Brasília, 2011

BRITES, J.; V. M. A. PEDROSO **Castas recomendadas da região do Dão**. D. R. d. A. d. B. Litoral, Centro de Estudos Vitivinícolas do Dão, 2000

CAMARGO, U.; J. D. S. PROTAS; L. D. MELLO **Grape growing and processing in Brazil**. International Symposium on Grape Production and Processing 785, Year

CAMARGO, U. A.; J. TONIETTO; A. HOFFMANN Advances in grape culture in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 33(SPE1): 144-149, 2011

CAPECE, A., et al. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. **International journal of food microbiology**. 144(1): 187-192, 2010

CAPOZZI, V., et al. Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. **Microbiological research**. 181: 75-83, 2015

CARRASCO-SÁNCHEZ, V., et al. Removal of fumonisin B1 and B2 from model solutions and red wine using polymeric substances. **Food chemistry**. 224: 207-211, 2017

COELHO-COSTA, E. R.; L. N. CORIOLANO Indicações geográficas e turismo enogastronômico no Vale dos Vinhedos (RS) e no Vale do Ro São Francisco (PE/BA). **Revista Turismo: estudos e práticas**. 6, 2017

CROCE, E.; G. PERRI **Food and wine tourism**, Cabi, 2017

DE FILIPPIS, F.; A. LA STORIA; G. BLAIOTTA Monitoring the mycobiota during Greco di Tufo and Aglianico wine fermentation by 18S rRNA gene sequencing. **Food microbiology**. 63: 117-122, 2017

DE FILIPPIS, F., et al. A selected core microbiome drives the early stages of three popular Italian cheese manufactures. **PLoS One**. 9(2): e89680, 2014

DE FILIPPIS, F.; E. PARENTE; D. ERCOLINI Metagenomics insights into food fermentations. **Microbial biotechnology**. 10(1): 91-102, 2017

DE PASQUALE, I., et al. Spatial distribution of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewes' milk cheeses. **PLoS One**. 11(4): e0153213, 2016

DE PINHO, P. G., et al. Further insights into the floral character of Touriga Nacional wines. **Journal of food science**. 72(6), 2007

DEL CARMEN PORTILLO, M., et al. Bacterial diversity of Grenache and Carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). **International journal of food microbiology**. 219: 56-63, 2016

DI STEFANO, V., et al. Natural co-occurrence of ochratoxin A, ochratoxin B and aflatoxins in Sicilian red wines. **Food Additives & Contaminants: Part A**. 32(8): 1343-1351, 2015

DIAS, M.; M. PEZZELLA; F. MARCHEZINI São Francisco Valley: Vitivini Culture Activities in the Brazilian Unthinkable Semiarid Climate and its Challenges. **International Journal of Business and Management Review**. 4(10): 1-13, 2016

DOWTON, M., et al. A preliminary framework for DNA barcoding, incorporating the multispecies coalescent. **Systematic biology**. 63(4): 639-644, 2014

EC-123/2005 Commission regulation No 123/2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Communities**. 2005

EC-472/2002 Commission Regulation (EC) No 472/2002 of 12 March 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). **Official Journal of the European Communities**. 2002

ERTEN, H. Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18(4): 377-382, 2002

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; A. VERA-PONCE DE LEÓN; A. SANCHEZ-FLORES The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics. **Frontiers in genetics**. 6: 348, 2015

FERNÁNDEZ, M. G. V. **Indicações geográficas e seus impactos no desenvolvimento dos pequenos produtores do Vale dos Vinhedos-RS**, UnB, 2012

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**. 15(10): 579, 2017

FIERER, N., et al. Global patterns in belowground communities. **Ecology letters**. 12(11): 1238-1249, 2009

FLORES, M. A. D.; A. FLORES Diagnóstico do enoturismo brasileiro: um mercado de oportunidades. **Brasília, DF: SEBRAE**. 2012

FREIRE, L., et al. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International journal of food microbiology**. 241: 181-190, 2017

FRISVAD, J. C.; R. A. SAMSON Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**. 49(1): 1-174, 2004

GHAJARBEYGI, P., et al. Inhibitory Activity of *Artemisia tridentata* Essential Oil Against Fungal Species Isolated From Minced Meat. **Biotechnology and Health Sciences**. 2(4), 2015

GILBERT, J. A.; D. VAN DER LELIE; I. ZARRAONAINDIA Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111(1): 5-6, 2014

GIRAUD, F., et al. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. **International journal of food microbiology**. 137(2-3): 204-213, 2010

GUERRA, C. C., et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Embrapa Uva e Vinho. Documentos. Embrapa, 2005

- HAAS, D.; G. DÉFAGO Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**. 3(4): 307, 2005
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and molecular biology reviews**. 68(4): 669-685, 2004
- HAWKSWORTH, D. L., et al. information in a recognized repository a requirement for valid publication of organisms treated as fungi under the Code. **TAXON**. 59(2): 1-11, 2010
- HERDERICH, M., et al. **Terroir effects on grape and wine aroma compounds**. Advances in wine research, ACS Publications: 131-146, 2015
- HOECKEL, P. D. O.; C. D. FREITAS Análise da Eficiência Econômica na Produção de Vinhos do Rio Grande do Sul. **Espacios**. 37(02), 2016
- IARC **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins/this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 9-16 June 1992**. I. A. f. R. o. Cancer, 1993
- IBGE **Levantamento Sistemático da produção Agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil 1975-2017**, IBGE Rio de Janeiro, 2017
- ILAND, P. **A taste of the world of wine**, Patrick Iland Wine Promotions, 2009
- INPI. **Indicação Geográfica no Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/indicacao-geografica-no-brasil>>. Acesso em: 29 abril 2018
- JAYASANKAR, S.; Z. LI; D. GRAY In-vitro selection of *Vitis vinifera* Chardonnay with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. **Planta**. 211(2): 200-208, 2000
- JECFA, J. F. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eight report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. **WHO Technical Report Series**. (947), 2007
- JOGAIAH, S., et al. Influence of canopy management practices on fruit composition of wine grape cultivars grown in semi-arid tropical region of India. **African Journal of Agricultural Research**. 8(26): 3462-3472, 2013
- KLEIN, B. S.; B. TEBBETS Dimorphism and virulence in fungi. **Current opinion in microbiology**. 10(4): 314-319, 2007
- KNIGHT, S., et al. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. **Scientific reports**. 5: 14233, 2015
- LANE, D. J., et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 82(20): 6955-6959, 1985

LOMBARDI, L. M. M. **Manejo e maturação da uva Tempranillo sobre a concentração de polifenóis do vinho da região Jerez, Espanha.**, INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE, 2012

MAFRA, L. A. S. **Indicação geográfica e construção do mercado: a valorização da origem no Cerrado Mineiro**, Tese (Doutorado de Ciências Sociais em Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade). Rio de Janeiro: UFRRJ, 2008

MALFEITO-FERREIRA, M. Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. **Annals of microbiology**. 61(1): 95-102, 2011

MANDAL, R. S.; S. SAHA; S. DAS Metagenomic surveys of gut microbiota. **Genomics, proteomics & bioinformatics**. 13(3): 148-158, 2015

MARTINS, A., et al. **PERSPECTIVAS SOBRE A ORIGEM DE CASTAS DO DÃO BASEADAS NA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRAVARIETAL**. 1º Congresso Internacional dos vinhos do Dão – Inovação e desenvolvimento - “Unbottled”, Viseu - Portugal, Year

MARTINS, G., et al. Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system. **International journal of food microbiology**. 158(2): 93-100, 2012

MATEUS, N., et al. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. **CYTA-Journal of Food**. 3(2): 102-110, 2001

MEZZASALMA, V., et al. Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. **PLoS One**. 12(9): e0184615, 2017

MIELE, A. **O sabor do vinho**, Vinícola Miolo: Embrapa Uva e Vinho, 2003

MORRISON-WHITTLE, P.; M. R. GODDARD From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. **Environmental microbiology**. 20(1): 75-84, 2018

NIEDERLE, P.; D. VITROLLES Indicações Geográficas e qualificação no setor vitivinícola brasileiro. **Estudos Sociedade e Agricultura**. 18(1): 5-55, 2010

OIV **RESOLUTION OIV/VITI 333/2010**. Eighth General Assembly of the Organisation Internationale de la Vigne et du Vin.,Tbilisi, Georgia, 2010

OMPI, Organização Mundial da Propriedade Intelectual. **Geographical Indications: An Introduction**. Genebra, 2017

ORGIAZZI, A., et al. Unravelling soil fungal communities from different Mediterranean land-use backgrounds. **PLoS One**. 7(4): e34847, 2012

OTEIZA, J. M., et al. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. **LWT-Food Science and Technology**. 80: 200-207, 2017

- PADILHA, C. V. D. S., et al. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of commercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. **Journal of Food Biochemistry**. 41(3), 2017
- PEREIRA, G., et al. **Chemical and aromatic characteristics of Brazilian tropical wines**. II International Symposium on Tropical Wines 910: 135-140, 2010
- PEREIRA, G., et al. **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**, Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2009
- PEREIRA, G. E. Os vinhos tropicais em desenvolvimento no Nordeste do Brasil. **ComCiência**. (149): 0-0, 2013
- PINTO, C., et al. Unravelling the diversity of grapevine microbiome. **PLoS One**. 9(1): e85622, 2014
- PRENDES, L. P., et al. Mycobiota and toxicogenic *Alternaria* spp. strains in Malbec wine grapes from DOC San Rafael, Mendoza, Argentina. **Food control**. 57: 122-128, 2015
- PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**. 16(8): 675-729, 2000
- PROTAS, J. D. S.; U. CAMARGO; L. D. MELLO Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**. 27(234): 7-15, 2006
- PROTAS, J. F. D. S.; U. A. CAMARGO; L. M. DE MELO **A Viticultura brasileira: realidade e perspectivas**. Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso (ALICE), In: SIMPÓSIO MINEIRO DE VITICULTURA E ENOLOGIA, 1., 2002, Andradás, MG. Anais... Viticultura e Enologia: atualizando conceitos. Caldas: EPAMIG, 2002., Year
- QUAST, C., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**. 41(D1): D590-D596, 2012
- RAJA, H. A., et al. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. **Journal of natural products**. 80(3): 756-770, 2017
- RANJAN, R., et al. Analysis of the microbiome: advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. **Biochemical and biophysical research communications**. 469(4): 967-977, 2016
- RENOUF, V.; O. CLAISSE; A. LONVAUD-FUNEL 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, 2005
- RIENTH, M., et al. Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. **BMC plant biology**. 14(1): 108, 2014
- RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Embrapa Monitoramento por Satélite. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. 2010

RYBERG, M. Molecular operational taxonomic units as approximations of species in the light of evolutionary models and empirical data from Fungi. **Molecular ecology**. 24(23): 5770-5777, 2015

SANGER, F.; S. NICKLEN; A. R. COULSON DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 74(12): 5463-5467, 1977

SANZANI, S. M., et al. A rapid assay to detect toxigenic *Penicillium* spp. contamination in wine and musts. **Toxins**. 8(8): 235, 2016

SCHMID, F., et al. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents. **Applied and environmental microbiology**. 77(6): 2188-2191, 2011

SCHOCH, C. L., et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 109(16): 6241-6246, 2012

SERNA-CHAVEZ, H. M.; N. FIERER; P. M. BODEGOM Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. **Global Ecology and Biogeography**. 22(10): 1162-1172, 2013

SILVA, T. M. G. D. **Tinta anti-incrustante e análises de resíduos da indústria vinícola (Vitis SP) do Vale do São Francisco.**, UFPE, 2016

SIMS, D., et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. **Nature Reviews Genetics**. 15(2): 121, 2014

SLEPECKY, R. A.; W. T. STARMER Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**. 101(6): 823-832, 2009

SOARES, J. M.; P. D. S. LEÃO **A vitivinicultura no Semiárido brasileiro**, Embrapa Informação Tecnológica; Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009

SOMMA, S.; G. PERRONE; A. F. LOGRIECO Diversity of black Aspergini and mycotoxin risks in grape, wine and dried vine fruits. **Phytopathologia Mediterranea**. 131-147, 2012

SPANO, G., et al. Biogenic amines in fermented foods. **European journal of clinical nutrition**. 64(S3): S95, 2010

SPANO, G.; S. TORRIANI Microbiota of Grapes: Positive and Negative Role on Wine Quality. **Frontiers in microbiology**. 7: 2036, 2016

SUZZI, G. From wild strain to domesticated strain: the philosophy of microbial diversity in foods. **Frontiers in microbiology**. 2: 169, 2011

TANG, K., et al. The importance of monomeric anthocyanins in the definition of wine colour properties. **South African Journal of Enology and Viticulture**. 38(1): 1-10, 2017

TEIXEIRA, A. S. F. **Estudos moleculares e enológicos da biota de leveduras de uvas da casta Touriga Nacional**, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011

TINTOS&TANTOS. **Como um vinho pode ser mineral?!**. Nov. 2017. Disponível em: <<http://www.tintosetantos.com/index.php/degustando/792-como-um-vinho-pode-ser-mineral>>. Acesso em: 24 abr. 2018

TONIETTO, J.; G. E. PEREIRA **Structuring a geographical indication for tropical wines in the São Francisco Valley, Brazil**. Embrapa Uva e Vinho-Resumo em anais de congresso (ALICE), IN: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL WINES, 5., 2016, Petrolina, PE. Book of abstracts... Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, p. 29, 19 a 21 outubro., Year

TORRES, A. P., et al. **Características agronômicas de videiras viníferas cultivadas em Morro do Chapéu, BA**. Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE), In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 8., 2013, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido., Year

VACHER, C., et al. The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 47: 1-24, 2016

VALDUGA, V. **Raízes do turismo no território do vinho: Bento Gonçalves e Garibaldi-1870 a 1960 (RS/Brasil)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011

VALDUGA, V.; M. VALDUGA **The Experience of Wine Tourism in Vale dos Vinhedos—Rio Grande do Sul—Brazil**. Wine and Tourism, Springer: 71-85, 2016

VERGINER, M.; E. LEITNER; G. BERG Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. **Journal of agricultural and food chemistry**. 58(14): 8344-8350, 2010

VIEIRA, R. J. A. **Acompanhamento da produção de vinho tinto e branco da região Dão**, Politécnico de Coimbra - Escola Superior Agrária, 2017

VIGENTINI, I., et al. Indigenous Georgian wine-associated yeasts and grape cultivars to edit the wine quality in a precision oenology perspective. **Frontiers in microbiology**. 7: 352, 2016

VISAGIE, C., et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. 78: 343-371, 2014

WENDLER, D. F. **Sistema de Gestão ambiental aplicado a uma vinícola: um estudo de caso**, Universidade Federal de Santa Maria, 2009

WURZ, D. A., et al. **New wine-growing regions of Brazil and their importance in the evolution of Brazilian wine**. BIO Web of Conferences, EDP Sciences, Year

ZARRAONAINDIA, I., et al. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **MBio**. 6(2): e02527-02514, 2015

ZHANG, H., et al. Control of ochratoxin A-producing fungi in grape berry by microbial antagonists: A review. **Trends in Food Science & Technology**. 51: 88-97, 2016

CAPÍTULO 2

Diversidade de fungos filamentosos e leveduras associados às uvas viníferas e solo de vinhedos tropicais do Vale do Submédio São Francisco

RESUMO

O estudo do *terroir* relaciona-se com território e com as capacidades agrícolas que este representa, na vinificação este termo vai além do solo onde a videira se estabelece e envolve também o clima, as práticas enológicas e a microbiota, conferindo tipicidade ao produto final. Vários trabalhos já foram realizados com intuito de identificar a biodiversidade e as espécies presentes em diferentes partes da videira e no solo, porém até o advento de técnicas capazes de aferir a biodiversidade de micro-organismos não cultiváveis esses trabalhos dependiam do prévio isolamento microbiano. Nesse intuito o presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a microbiota *terroir* de uvas Syrah, Tempranillo e Touriga Nacional de dois vinhedos localizados nos municípios de Casa Nova-BA e Lagoa Grande-PE, presentes na região do Vale do Submédio São Francisco por meio de isolamento baseado em sua ultraestrutura em associação com sequenciamento de nova geração de *amplicons* de ITS1 do RNA ribossomal fúngico. A identificação morfológica evidenciou predominância dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, representando 63,47 %, 26,67 % e 8,12 % respectivamente. A análise da comunidade fúngica através do sequenciamento da região ITS1 mostrou principalmente os filos *Ascomycota*, seguido de *Basidiomycota*, e os gêneros encontrados nas uvas foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Acremonium*, *Paramycospharella*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Saccharomycopsis*, *Campylocarpon*, *Talaromyces*, *Erysiphe*, *Aureobasidium* e *Hanseniaspora*. A amostra Syrah 2 apresentou maior diversidade em relação às demais, seguidas das amostras Syrah 1, Touriga Nacional e com menor diversidade a Tempranillo. Algumas espécies foram caracterizadas como predominantes dentre essas diversas espécies de *Aspergillus*. Nas amostras de solo dos vinhedos os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* foram os mais prevalentes, com 63,83 %, 27,66 % e 5,85 % respectivamente. A metagenômica dos solos revelou maior abundância de Unidade Taxonômica Operacional (UTOs) do que nos frutos, indicando maior biodiversidade. Há prevalência da classe *Dothideomycetes* e da ordem *Pleosporales* em ambas amostras de solo. Também foram estudadas características físico-químicas do solo dos 2 vinhedos e a correlação da composição química encontrada foi correlacionada com a identificação morfológica. Em conjunto, os dados encontrados neste trabalho revelam um panorama da diversidade fúngica em vinhedos do Vale do Submédio São Francisco, expandindo o conhecimento da microbiota associada a vinhedos, especialmente no Brasil.

Palavras chave: Uva. Diversidade de fungos. ITS. Metagenômica. Morfologia.

1 INTRODUÇÃO

Comunidades fúngicas são de extrema importância para a vasta maioria dos ecossistemas (SELIN et al., 2016), e uma descrição acurada de seus membros e sua composição diferencial é etapa determinante para responder questões relacionadas à ecologia microbiana (LANGE, 2014). Uma vez que fungos filamentosos comumente desempenham papéis relevantes em processos saprofíticos e fermentativos, reportá-los também pode ajudar a elucidar questões inerentes ao substrato a partir do qual foram isolados (SETÄLÄ; MCLEAN, 2004).

O número de espécies distintas em uma comunidade (riqueza de espécies) possui influência tanto direta quanto indireta na produtividade, consumo, decomposição e outras funções associadas à comunidade microbiana (NIELSEN et al., 2011). A diversidade correlaciona-se com a capacidade funcional, uma vez que grupos taxonômicos distintos ao efetuar a mesma função acarretam aumento da diversidade funcional da comunidade microbiana, isso pode se dar através da presença de espécies dominantes ou espécies-chave (HILLEBRAND; BENNETT; CADOTTE, 2008). As dominantes se constituem de espécies que apresentam maior número de indivíduos. Em contrapartida, espécies-chave constituem-se de espécies com alto impacto funcional, independentemente de sua representatividade (BOYNTON; GREIG, 2016).

A relação entre os alimentos e seu microbioma é fundamental para sua qualidade e segurança. Em vinhos, um produto de origem vegetal e processamento fermentativo microbiano, essa relevância é ainda mais pronunciada. Micro-organismos benéficos podem ser responsáveis por características reológicas e sensoriais no vinho (DE FILIPPIS; PARENTE; ERCOLINI, 2018). Tradicionalmente, a microbiologia de alimentos utilizou-se de técnicas de isolamento baseadas em cultura. Entretanto, técnicas independentes de cultura prévia baseadas na análise do DNA extraído diretamente da amostra tem ajudado os pesquisadores a expandir o conhecimento sobre ecologia microbiana associada à produção de vinhos (COCOLIN et al., 2013).

Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar microbiota *terroir* associada às uvas (*Vitis vinifera* L.) e solos de cultivo destas uvas, pertencentes a dois vinhedos localizados na região do VSMSF, por meio de caracterização morfológica taxonômica e análise molecular de metagenômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a comunidade de fungos presentes nas uvas e no solo de cultivo dos vinhedos por meio de abordagens clássicas de caracterização morfológica e modernas como sequenciamento de segunda geração, almejando caracterizar a microbiota *terroir* da região do VSMSF.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar morfológicamente os fungos filamentosos presentes nas uvas e nos solos de duas vinícolas do VSMSF.
- b) Avaliar a influência dos componentes físico-químicos do solo na incidência de fungos filamentosos em duas vinícolas do VSMSF.
- c) Avaliar a diversidade de fungos filamentosos e leveduras presentes nas uvas e nos solos de duas vinícolas do VSMSF, por meio de técnica molecular de metagenômica.
- d) Comparar a diversidade de fungos filamentosos entre dois vinhedos do VSMSF.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

As amostras de uvas e solo foram coletadas em vinícolas localizadas na região do VSMSF, nos municípios de Lagoa Grande, em Pernambuco, e Casa Nova na Bahia, os quais estão processo de obtenção de designação de indicação geográfica (Denominação de Origem), para os vinhos elaborados a partir das variedades coletadas. Foram coletadas quatro amostras de uvas tintas de três variedades diferentes, sendo uma amostra de Touriga Nacional e outra de Tempranillo, além de duas amostras da variedade Syrah provenientes de dois vinhedos distintos (Syrah 1 do Vinhedo 1 e Syrah 2 do Vinhedo 2). Para cada amostra efetuou-se a coleta em 3 pontos distintos (FIGURA 1).

Figura 1 – Região vitivinícola do VSMSF em que foram coletadas as amostras de uvas (*Vitis vinifera* L.) e solos de videira.



Legenda - Mapa mostrando a Vinícola 1 localizada em Casa Nova-BA e a Vinícola 2 em Lagoa Grande – PE na região do VSMSF
Fonte – Google Maps (2018).

3.2 Amostragem

As coordenadas geográficas dos pontos de coleta foram determinadas com utilização de equipamento de GPS (Garmin Map 64S) (TABELA 1).

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de amostras na região vitivinícola do Vale do Submédio São Francisco

Variedade	Vinícola	Local	Ponto	Coordenadas geográficas		
				Latitude	Longitude	Altitude
Syrah	Vinícola 1	Casa Nova - BA	1	9° 16' 13.656" S	40° 51' 57.132" W	419
			2	9° 16' 9.2316" S	40° 51' 53.8092" W	419
			3	9° 16' 4.8108" S	40° 51' 51.1056" W	419
Syrah	Vinícola 2	Lagoa Grande - PE	1	9° 2' 15.5436" S	40° 11' 31.7868" W	370
			2	9° 2' 14.7048" S	40° 11' 28.8888" W	370
			3	9° 2' 13.6716" S	40° 11' 25.6452" W	370
Touriga Nacional	Vinícola 2	Lagoa Grande - PE	1	9° 2' 18.6288" S	40° 11' 10.2732" W	369
			2	9° 2' 17.2932" S	40° 11' 7.5696" W	372
			3	9° 2' 15.5004" S	40° 11' 4.4052" W	372
Tempranillo	Vinícola 2	Lagoa Grande - PE	1	9° 2' 25.16723" S	40° 3' 40.79069" W	364
			2	9° 2' 25.8453" S	40° 3' 41.5002" W	364
			3	9° 2' 25.80988" S	40° 3' 42.72031" W	362

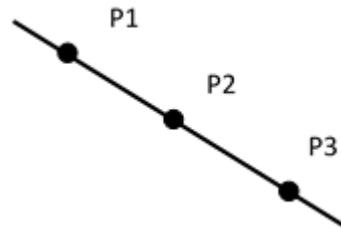
Fonte: Do autor (2018).

3.2.1 Coleta das uvas (*Vitis vinifera* L.)

Todas as amostras de uvas foram coletadas no estágio final de maturação (época da colheita), no ano de 2017. As variedades estudadas foram selecionadas devido a sua aplicação na elaboração de vinhos tintos e boa capacidade de adaptação à região do VSMSF.

Para isso, foi considerado um transecto diagonal ao longo do vinhedo, no qual foram coletados três cachos de uvas sadios em três videiras equidistantes (P1, P2 e P3), desprezando-se as extremidades (FIGURA 2). As uvas foram armazenadas em sacos estéreis e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

Figura 2 - Esquema de coleta das bagas de uvas

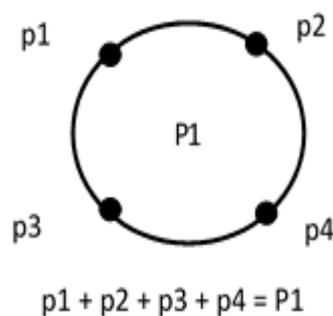


Legenda - Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta de amostras de uvas.
Fonte – Do autor (2018).

3.2.2 Coleta de solos de cultivo das uvas (*Vitis vinifera* L.)

Duas amostras de solo foram coletadas nos mesmos pontos em que foram colhidas as diferentes amostras de uvas Syrah (P1, P2 e P3). Quatro amostras simples (p1, p2, p3 e p4) foram retiradas com o auxílio de um trado, a 10 cm de profundidade e a 20 cm de raio entorno da planta (FIGURA 3). Posteriormente, as amostras simples foram homogeneizadas em um saco plástico estéril, formando uma amostra composta de cada ponto. Em seguida elas foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

Figura 3 – Esquema dos pontos de coleta de amostras do solo



Legenda – Ao redor de cada videira selecionada para coleta dos frutos (ex: P1), traçaram-se 4 pontos nos quais foi coletado solo, a combinação desses dados constitui um ponto da amostra final de solo.

Fonte – Do autor (2018).

3.3 Isolamento de fungos filamentosos

As amostras de uvas foram avaliadas por meio da técnica de diluição seriada com espalhamento em superfície em meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (HIMEDIA) (glicose: 10,0 g; peptona bacteriológica: 5,0 g; KH_2PO_4 : 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g; solução 5% de Rosa de Bengala: 0,5 mL; Dicloran: 1,0 mL; água destilada: 1 L; ágar: 15,0 g e cloranfenicol: 1 mg) e Ágar Dicloran Glicerol Médium Base (DG18) (HIMEDIA) (dicloran: 1,0 mL; peptona bacteriológica: 5,0 g; KH_2PO_4 : 1,0 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,5 g; glicerol: 220 g; ágar: 15,0 g; Cloranfenicol: 1 mg; água destilada: 1 L), para análise de fungos filamentosos.

De cada ponto de coleta das amostras de uvas (P1, P2 e P3) foram selecionadas, aleatoriamente, 25 g de bagas do fruto, que foram homogeneizadas com 225 mL de Água peptonada a 0,1% para a obtenção do mosto das uvas. As bagas foram então maceradas e mantidas sob agitação em Stomacher® a 490 golpes por 2 minutos. Em seguida utilizou-se alíquotas de 0,1 mL das diluições 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000 para plaqueamento em superfície nos meios de cultura DRBC e DG-18 com espalhamento das alíquotas até total esgotamento (*spread plate*). As placas foram incubadas em BOD a 25 °C por 7 dias para análise de fungos filamentosos. O procedimento foi igualmente repetido nas amostras de solo de cultivo das uvas, com a utilização do somatório total de 25 g da amostra composta de cada ponto de solo (p1 + p2 + p3 + p4 = P1) coletado. Os resultados foram expressos em porcentagem de número de isolados fúngicos, conforme Pitt e Hocking (1997).

Dos resultados de crescimento das colônias de fungos filamentosos, foi realizada a caracterização por morfotipo e empregada a técnica de raiz quadrada para determinar o número de fungos filamentosos de cada morfotipo que foram isolados para o meio de purificação. As colônias de fungos filamentosos selecionadas foram transferidas para o meio de cultura Ágar Extrato de Malte (MA) (ACUMEDIA) (extrato de malte: 20 g; ágar: 20 g e água destilada: 1 L) e incubadas a 25 °C por mais 7 dias, para o seu devido isolamento.

3.4 Identificação de fungos filamentosos

As colônias puras isoladas foram transferidas para os meios de identificação, de acordo com cada gênero. Os isolados pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram

incubados em meios de cultura Ágar Czapeck Levedura (CYA) (SYNTH) (K_2HPO_4 : 1,0 g; concentrado Czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g; ágar: 15,0 g; água destilada: 1 L; (concentrado Czapec: $NaNO_3$: 30,0 g; KCl : 5,0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 5,0 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,05 g; água destilada: 100 mL), a 25 °C e a 37 °C e Ágar Extrato de Malte (MEA) (ACUMEDIA) (extrato de malte: 20,0 g; peptona: 1,0 g; glucose: 30,0 g; ágar: 20 g; água destilada: 1 L), a 25 °C. Os demais gêneros foram inoculados apenas no meio de cultura MEA a 25 °C. Após sete dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas das culturas puras dos fungos filamentosos.

Para a identificação dos fungos filamentosos foram utilizadas chaves de identificação específicas para cada gênero de fungo encontrado. Por meio do Manual de Klich (2002) foram identificados os fungos do gênero *Aspergillus*, enquanto que para o gênero *Penicillium* e para os demais gêneros foram utilizados o Manual de Pitt (2000) e o Manual de Samson et al. (2000), respectivamente. Os fungos filamentosos não identificados a nível de gênero foram agrupados de acordo com suas características macro e microscópicas semelhantes e denominados “Morfotipo sp.”. Ao passo, os fungos filamentosos identificados a nível de gênero foram também agrupados de acordo com suas características morfológicas semelhantes e denominados de acordo com seu gênero específico (por exemplo, *Penicillium* sp3). Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.5 Análise físico-química dos solos de cultivo de uvas (*Vitis vinifera* L.)

As amostras de solo foram analisadas no Laboratório de Análises de Solo, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, propriedades como granulometria, pH, fertilidade, quantidade de matéria orgânica, teor de boro, cobre, enxofre, ferro, manganês, potássio, sódio e zinco foram avaliadas segundo metodologia proposta pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 1999).

3.6 Avaliação do potencial toxigênico

3.6.1 Avaliação do potencial toxigênico dos fungos filamentosos

Os fungos potencialmente toxigênicos foram testados pelo método *Plug Agar* para avaliação de: ocratoxina A (Seção *Nigri* e Seção *Circumdati*), aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (Seção *Flavi*) e citrinina (*Penicillium* da Seção *Citrina*), de acordo com o descrito por Filtenborg e Frisvad (1980).

Tendo em vista a quantidade abundante de isolados pertencentes à Seção *Nigri*, foi realizado um teste preditivo de potencial ocratoxigênico em ágar coco (AC) (creme de leite de coco: 400 g; ágar: 12 g; água destilada: 400 mL). Todos os isolados foram inoculados em meio AC por 10 dias a 25 °C, no escuro (Mohamed et al. 2013). A observação da produção de ocratoxina A (OTA) pelos fungos, foi realizada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 366 nm, em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER), em que os isolados considerados produtores devem apresentar fluorescência azul-esverdeada em torno da colônia (HEENAN; SHAW; PITT, 1998).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencentes à Seção *Flavi* e à Seção *Circumdati* foram inoculados em meio de cultura Ágar Extrato de Levedura Sacarose (YES) (Extrato de levedura: 20,0 g; Sacarose: 150 g; Ágar: 20,0 g; ZnSO₄.7H₂O: 0,1 g; CuSO₄.5H₂O: 0,05 g; Água destilada: 1L), por 7 dias a 25 °C. Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* da Seção *Citrina* e os isolados da Seção *Nigri* positivos no teste em meio AC, foram inoculados em meio de cultura CYA, por 7 dias a 25 °C. Foram utilizadas Placas de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (MERK-SÍLICA GEL 60, 20 x 20), com fase móvel composta por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90% (60:30:10) e soluções padrão de citrinina, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, e ocratoxina A (Sigma-Aldrich).

A aferição quanto à produção de citrinina, OTA e AFLA foi efetuada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 366 nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de toxina apresentaram fator de retenção (RF) e spot de fluorescência semelhantes aos padrões das micotoxinas, ou seja, roxo para OTA, azul violeta para aflatoxina B1 e B2, verde para G1 e G2 e verde fluorescente para citrinina.

3.7 Análises estatísticas

A análise estatística da diversidade de fungos filamentosos em uva e solo e sua incidência de acordo com a análise físico-química do solo foi realizada por meio da análise de componente principal (PCA), usando o software livre SensoMaker versão 1.91 (<http://ufla.br/sensomaker/>) (PINHEIRO; NUNES; VIETORIS, 2013).

3.8 Metagenômica

O sequenciamento foi realizado pela empresa GenOne (Rio de Janeiro - RJ), a partir de uma amostra de 30,0 g (composta por 10,0 g de cada ponto). Essas amostras compostas foram devidamente acondicionadas e enviadas sob refrigeração para o sequenciamento.

3.9 Extração do DNA para metagenômica

O genoma total foi extraído utilizando o método brometo de cetil-trimetilamonio – $C_{19}H_{42}BrN$ (CTAB). O uso desse detergente catiônico na extração foi empregado devido aos bons resultados reportados em amostras fúngicas (WATANABE et al., 2010). Para as amostras de uvas foram pesadas 5,0 g do fruto, essas foram maceradas em gral e pistilo em 25,0 mL de tampão CTAB a 1 % (brometo de cetil-trimetilamonio - $C_{19}H_{42}BrN$) pH 8,0 sob refrigeração com nitrogênio líquido. As amostras foram transferidas para eppendorfs contendo RNase A (20 μ g/mL), homogeneizadas e incubadas a 37°C por 15 min. Posteriormente, adicionou-se 10 μ L de proteinase K 1 mg/mL e a mistura foi incubada em banho a 70 °C por 1h, sendo homogeneizada após 30 min. Após esse período foi adicionado clorofórmio:álcool isoamílico aos eppendorfs e centrifugado a 12.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos eppendorfs, os quais foram adicionados 350 μ L de NaCl 5 M e deixados em banho de gelo por 15 min. Em seguida, foram adicionados aos frascos acetato de sódio e álcool isopropílico resfriado, os mesmos foram invertidos e deixados a -20°C por 30 min. Finalmente, os eppendorfs foram centrifugados a 11.000 rpm por 5 minutos e os pellets coletados. O DNA coletado foi lavado com etanol 70 % e centrifugado novamente a 11.000 rpm por 5 minutos, o álcool foi descartado e os pellets dissolvidos em 100 μ L de água ultrapura livre de nuclease e estocado a -20°C para sequenciamento.

Para uma amostra (Tempranillo), o protocolo foi modificado com a adição de PVP (polivinilpirrolidona) ao tampão de extração, tal fato se relaciona com o alto teor de compostos fenólicos, os quais interagem com o DNA, inativando-o (PICCOLO et al., 2012).

3.10 Produção do *amplicon* e sequenciamento

A identificação molecular através do sequenciamento da região do espaçador interno transcrito – *internal transcriber spacer* – ITS de fungos é uma técnica que vem sendo aperfeiçoada nos últimos 20 anos e se tornou parte essencial dos estudos de caracterização de comunidades micológicas para diferentes grupos de fungos, principalmente por ser capaz de caracterizar, muitas vezes, gêneros e espécies (ZHANG; LUO; BHATTACHARYA, 2017). Alguns trabalhos evidenciam que ITS1 é mais efetivo do que ITS2 na caracterização de comunidades de Ascomycetos (BLAALID et al., 2013) e por isso foi escolhido como alvo para o sequenciamento do *amplicon* nesse trabalho.

Os *primers* (ITS5-1737F – 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' e ITS2-204R 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (DEGNAN; OCHMAN, 2012) foram utilizados para amplificar a região ITS1. Para cada amostra foi anexado um *barcode* específico, para viabilizar a separação das amostras após o sequenciamento. As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas com Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs). Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 2 % e as bandas das amostras com 400-450 pb (o peso molecular esperado para a região ITS1) foram removidas e purificadas com Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany).

Após a purificação dos produtos da PCR, foram produzidas as bibliotecas para o sequenciamento. Bibliotecas *paired-end* de 250 pb para o sequenciamento foram geradas com o auxílio do kit NEBNext Ultra DNA Library Pre[®] (Illumina, San Diego - CA), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi aferida no fluorômetro Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) e Agilent Bioanalyzer 2100 system (Santa Clara, CA). Finalmente, o sequenciamento das bibliotecas foi realizado em um Illumina platform HiSeq 20500.

3.11 Bioinformática

3.11.1 Tratamento dos *reads*

Os pares de *reads* foram designados às suas respectivas amostras com base em seu código de barra único, que foi, em seguida, removido juntamente com a sequência do primer. Os pares foram conectados utilizando o software FLASH 1.2.7 (MAGOČ; SALZBERG, 2011), capaz de encontrar sobreposições entre os pares e assim reconstruir toda a região ITS1. Na Tabela 2 estão apresentadas as características do sequenciamento gerado.

Tabela 2 - Características gerais dos *reads* obtidos pelo sequenciamento das amostras de fruto e solo. Apresentam-se a quantidade de *reads* obtidos, o tamanho médio destes, a porcentagem de pares de *reads* combinados com êxito e o tamanho total da *library* sequenciada para cada amostra.

Amostra	<i>Reads</i> totais	Tamanho médio (pb)	% <i>reads</i> combinados	Total bases (pb)
Syrah 1	69.587	215	87,87	13.136.691
Syrah 2	79.457	234	57,18	10.633.001
Tempranillo	78.811	238	77,01	14.419.734
Touriga Nacional	78.026	244	72,08	13.723.043
Solo-V1	66.656	231	84,04	12.915.831
Solo2-V2	71.694	236	79,21	13.406.762

Fonte: Dados fornecidos pela “GenOne”, Rio de Janeiro (2018).

Posteriormente, os *reads* pareados foram filtrados de acordo com a qualidade obtida por meio do sequenciamento pelo *software* QIIME 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010). Somente *reads* com $Q \geq 30$ foram utilizados. Adicionalmente, as quimeras foram removidas com o *software* UCHIME 4.2 (EDGAR et al., 2011). Para as análises de abundância os dados foram normalizados para a amostra com menos sequências.

3.11.2 Clusterização e anotação das UTOs

As sequências foram *clusterizadas* utilizando-se o parâmetro mais reportado para análise de *amplicons*, ou seja, sequências com $\geq 97\%$ de similaridade foram agrupadas na mesma unidade taxonômica operacional (UTO). Para esse fim utilizou-se o *software* Uparse 7.0.1. A sequência representativa para UTO foi selecionada para anotação, a qual foi realizada

por meio de comparação com o algoritmo Blast (ALTSCHUL et al., 1990). Como referência foi utilizada a base de dados UNITE (KÖLJALG et al., 2005).

3.11.3 Análises, diagramas e curvas de rarefação

A diversidade alpha foi aplicada para calcular as espécies observadas utilizando o software QIIME 1.9.1 (CAPORASO et al., 2010). Os diagramas de Venn foram criados com auxílio do pacote VennDiagram (CHEN; BOUTROS, 2011) e visualizados com software R 3.4.2. Para construção do cladograma, foi realizado alinhamento múltiplo de sequências, utilizando-se as sequências representativas das UTOs encontradas, com o uso do software Muscle 3.8.31 (EDGAR, 2004).

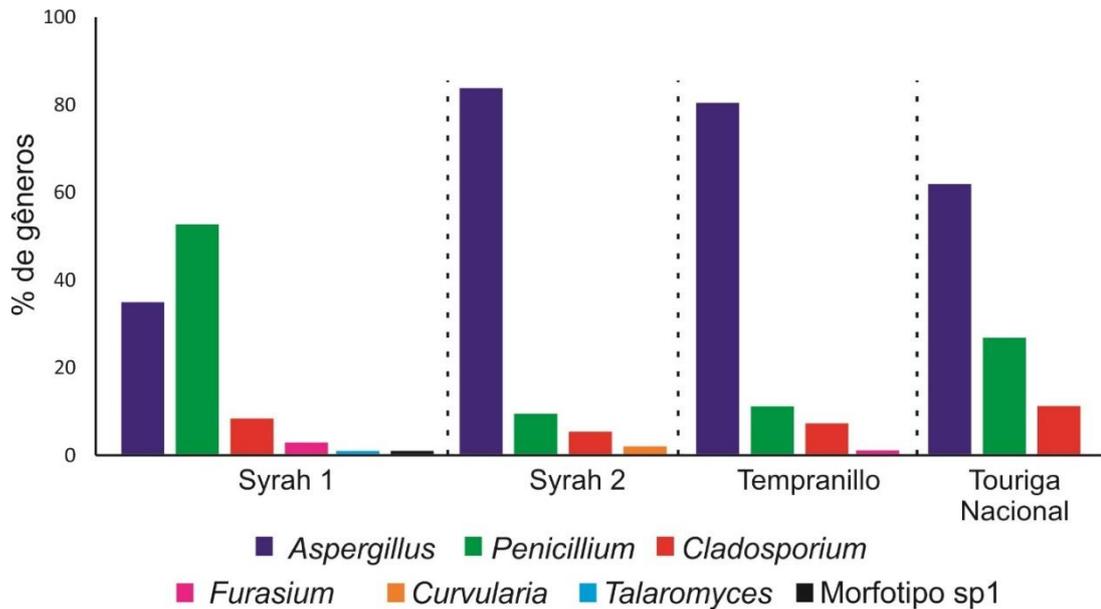
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises da biodiversidade de fungos filamentosos nos frutos

4.1.1 Caracterização morfológica

Para aferir a biodiversidade cultivável presente nas amostras foi realizada caracterização morfológica dos fungos presentes nas uvas coletadas. Um total de 690 fungos filamentosos de diferentes gêneros foram isolados das amostras de frutos, sendo a maioria das espécies pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, representando 63,47 %, 26,67 % e 8,12 %, respectivamente, do total de isolados. Na amostra Syrah 1 foi verificado, por meio do método de caracterização morfológica adotado, um maior número de gêneros, apresentando indivíduos pertencentes a: *Aspergillus* (35 %), *Penicillium* (52,7 %), *Cladosporium* (8,37 %), *Fusarium* (2,95 %), e *Talaromyces* (0,5 %). O gênero *Aspergillus* foi recorrente em todas as amostras, sendo mais prevalente em Syrah 2 (83,4 %), seguido de Tempranillo (80,4 %) e Touriga Nacional (61,9 %). Da mesma forma, o gênero *Penicillium* foi obtido no fruto das amostras: Syrah 2 (9,46 %), Tempranillo (11,2 %) e Touriga Nacional (26,9 %). Similarmente, fungos do gênero *Cladosporium* apresentaram-se nas amostras Syrah 2 (5,41 %), Tempranillo (7,26 %) e Touriga Nacional (11,25 %). O gênero *Curvularia* (1,35 %) foi isolado apenas da amostra Syrah 2, enquanto que o gênero *Fusarium*, além de ter sido isolado da amostra de Syrah 1, foi encontrado, também, na amostra de fruto Tempranillo (1,12 %) (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Percentual relativo de gêneros por amostra de uva.



Legenda – Porcentagem relativa dos gêneros obtidos a partir de caracterização morfológica das quatro amostras de uvas analisadas.

Fonte – Do autor (2018).

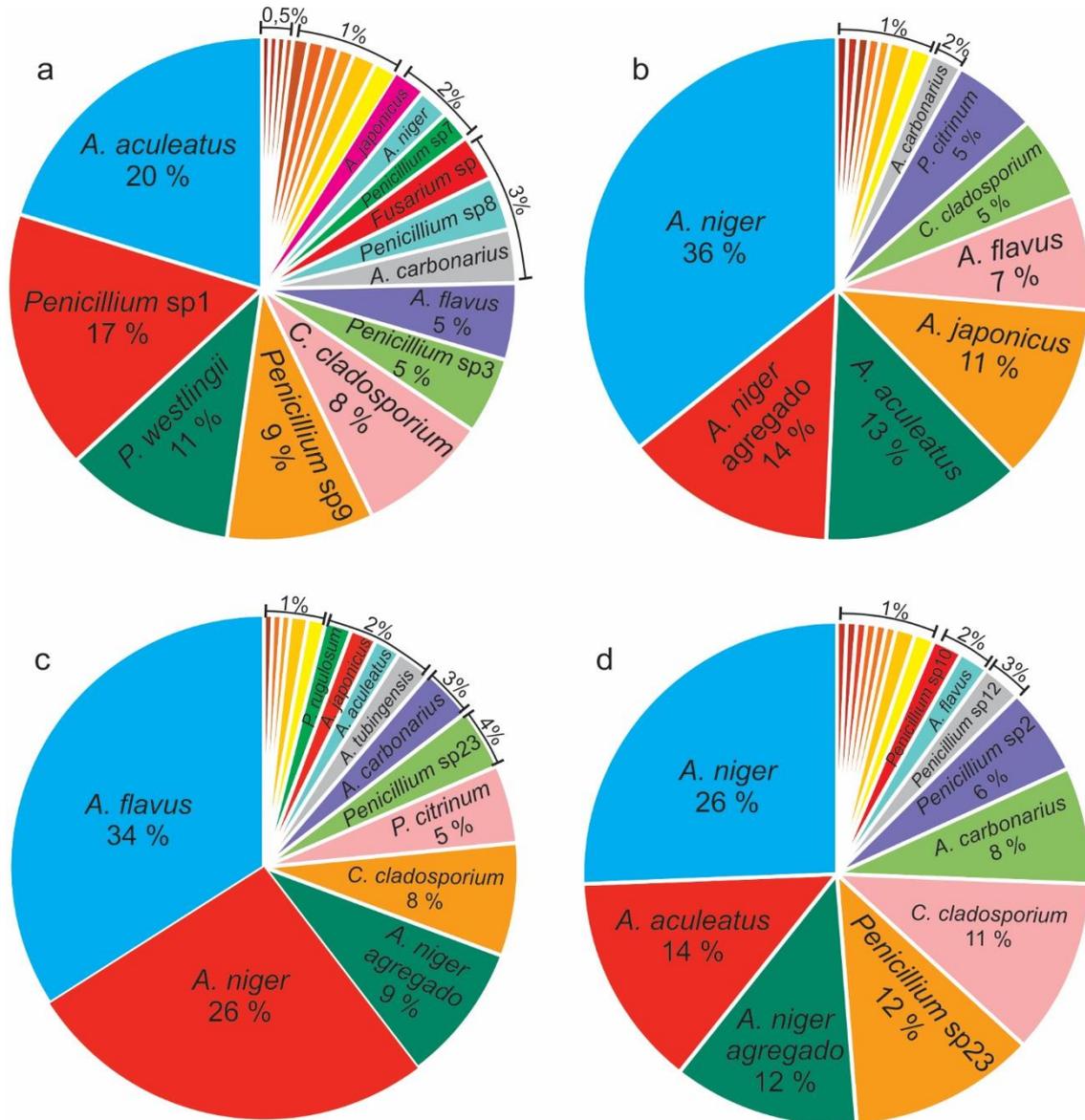
Nas diferentes amostras de uva foram identificados 6 gêneros no total (GRÁFICO 1). Verificou-se uma diversidade maior de gêneros dos isolados obtidos a partir da amostra Syrah 1, com predominância do gênero *Penicillium*, o que diverge dos resultados apresentados para as demais amostras, nas quais a porcentagem de *Aspergillus* foi maior. O domínio do gênero *Aspergillus* na maioria das amostras corrobora com os mesmos resultados encontrados em outros estudos sobre diversidade de gêneros presentes em vinhedos, principalmente de regiões com temperaturas mais elevadas (BATTILANI et al., 2006; FREIRE et al., 2017). A explicação para essa ocorrência relaciona-se à maior adaptação das espécies de *Aspergillus* a regiões com temperaturas elevadas, enquanto as espécies do gênero *Penicillium* frequentemente são encontradas em regiões com climas temperados e amenos (PITT; HOCKING, 1997; SERRA et al., 2006). A maior incidência de fungos isolados do gênero *Penicillium* em uma única amostra (Syrah 1) não se mostrou um resultado comum, visto que a região de cultivo da variedade possui clima tropical semiárido com temperaturas médias mais elevadas. Porém, tal gênero é comum em vários habitats como ar, vegetação, além de serem encontrados em frutas e outros alimentos (VISAGIE et al., 2014). Em um estudo com uvas da região vinícola de Soave, na Itália, caracterizada por ser uma região temperada, Lorenzini e colaboradores (2018) relataram uma maior incidência de fungos do gênero *Penicillium* na superfície das bagas de uvas.

A presença de fungos do gênero *Cladosporium* foi observada em todas as amostras de uvas viníferas, sendo a terceira maior frequência, embora com menores percentuais em comparação com *Aspergillus* e *Penicillium*. *Cladosporium* são fungos cosmopolitas, frequentemente encontrados no ar, em solo, plantas, alimentos e outras matérias orgânicas (BENSCH et al., 2012), além de serem também comumente isolados de uvas viníferas. Considerados fungos de campo, responsáveis pela podridão do cacho, este gênero é comum em regiões temperadas e a podridão ocasionada por *Cladosporium* é tipicamente uma doença pós-colheita, em que as uvas colhidas tardiamente podem ser infestadas pela podridão, permitindo as bagas caírem e acumularem compostos orgânicos voláteis que conferem um sabor mofado às uvas e seus derivados (SWETT; BOURRET; GUBLER, 2016). Assim como Swett et al (2016), Garcia-Cela e colaboradores (2015) também relataram a presença de *Cladosporium* em vinhedos espanhóis, porém, com uma incidência mais baixa, reforçando os resultados obtidos nessa pesquisa.

A incidência dos gêneros *Fusarium*, *Curvularia* e *Talaromyces* foi bem menor em relação aos outros fungos isolados. A baixa frequência desses fungos em uvas viníferas já foi observada por Einloft et al. (2016) e Magnoli et al. (2003).

Diferentes espécies fúngicas foram isoladas e identificadas em todas as amostras de uvas, distribuídas em: *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. niger* agregado, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *P. Funiculosum*, *P. westlingii*, *P. variabile*, *P. citrinum*, *P. bilaiae*, *P. rugulosum*, complexo *Cladosporium cladosporioides*, *Talaromyces* sp, *Fusarium* sp e *Curvularia* sp. (GRÁFICO 2). Adicionalmente, os isolados cuja classificação morfológica não foi capaz de discriminar a respectiva espécie foram agrupados em morfotipos distintos, como por exemplo: *Penicillium* sp1 e *Aspergillus* sp3.

Gráfico 2 - Percentual relativo de espécies por amostra de uva.



Legenda – Porcentagem relativa das espécies obtidas a partir de caracterização morfológica das quatro amostras de uvas analisadas. As espécies observadas em percentual $\leq 1\%$ são descritas a seguir: **a.** Syrah 1: *P. Funiculosum*, *Penicillium sp10*, *Talaromyces sp*, Morfotipo sp1 (0,5%), *Aspergillus sp1*, *Penicillium sp2*, *Penicillium sp4*, *Penicillium sp6* (1%) **b.** Syrah 2: *Penicillium sp*, *Penicillium sp3*, *Penicillium sp23*, *P. variabile*, *A. oryzae*, *Penicillium sp11*, *Curvularia sp* (1%) **c.** Tempranillo: *Aspergillus sp3*, *Aspergillus sp4*, *P. bilaiae*, *Aspergillus sp2*, *Fusarium sp* (1%) **d.** Touriga Nacional: *A. japonicus*, *Aspergillus sp5*, *P. westlingii*, *Penicillium sp5*, *Penicillium sp13*, *Penicillium sp14*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp11* (1%).

Fonte – Do autor (2018).

De acordo com os resultados de caracterização morfológica a nível de espécie, todas as amostras de frutos estudadas apresentaram em comum, em diferentes porcentagens, 8 espécies de fungos filamentosos, sendo estas: *Aspergillus aculeatus*, *A. carbonarius*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. niger Agregado*, estes pertencentes à Seção *Nigri*. Também foram encontrados *A.*

flavus, complexo *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium* sp.3. Dentre as espécies isoladas em comum nas amostras de uvas percebe-se a predominância de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri*. Esse fato era esperado, uma vez que alguns estudos relatam a grande incidência na colonização de uvas por tais espécies fúngicas (KIZIS et al., 2014). Freire e colaboradores (2017), assim como Terra et al. (2012) e Passamani et al. (2012) também relataram resultados contendo a maioria das espécies pertencentes à Seção *Nigri* em uvas de vinhedos localizados no VSMSF, o que corrobora com os achados aqui documentados.

A colonização das bagas de uvas por espécies de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* é favorecida principalmente por níveis mais altos de temperatura no vinhedo e pela resistência desses fungos à luz solar (PITT; HOCKING, 1997). Esse atributo relaciona-se com a coloração preta de seus esporos, que os tornam capazes de sobreviver à exposição prolongada ao sol, sem afetar sua viabilidade, o que acarreta vantagem competitiva perante outros micro-organismos (LEONG et al., 2006). Sendo assim, esse fenótipo pode ajudar a explicar a prevalência desses fungos em uma região com características climáticas do Semiárido Nordeste.

As espécies de *Aspergillus* isoladas das uvas do presente trabalho totalizam cerca de 63,47 %, sendo a maioria da Seção *Nigri* representados principalmente por *A. niger* (33,11 %) e *A. aculeatus* (19,41 %), seguidos por *A. niger* Agregado (13,24 %) e *A. carbonarius* (8,68 %).

Em relação à Seção *Flavi*, praticamente todos os isolados foram identificados como *A. flavus*, (19,41 % do total de *Aspergillus*) apresentando-se em todas as amostras de uva, com apenas um isolado de *A. oryzae* identificado na amostra Syrah 2. *A. flavus* foram isolados na Argentina, Espanha, Portugal e Líbano (BAU et al., 2005b; KHOURY et al., 2008; MAGNOLI et al., 2003; SERRA et al., 2006), porém esta espécie não é habitualmente associada à micobiota das uvas (MARTINEZ-CULEBRAS; RAMON, 2007; MEDINA VAYA et al., 2005), e sabe-se que *A. flavus* e *A. niger* competem no campo (PITT; HOCKING, 1997).

Do total de isolados fúngicos pertencentes às amostras de uva, 26,67 % são classificados como *Penicillium*, sendo *P. westlingii* (12,5 %) e *P. citrinum* (9,24 %) a maioria dos isolados identificados. A predominância do gênero *Aspergillus* sobre *Penicillium* nos vinhedos do VSMSF pode ser explicada por estudos nos quais os autores afirmam que as espécies do gênero *Penicillium* estão mais associadas às regiões com climas temperados, amenos ou frios, enquanto as espécies de *Aspergillus* são geralmente isoladas de regiões com clima tropical e quente (PITT; HOCKING, 1997; SERRA et al., 2006), como ocorre no VSMSF. Curiosamente, 99 % dos *P. westlingii* foram identificados na amostra Syrah 1, enquanto os *P. citrinum* estiveram presentes apenas nas amostras de Syrah 2 e Tempranillo. Em uma pesquisa com vinhedos de duas regiões da Espanha, tanto *P. westlingii* quanto *P. citrinum* foram identificados, porém este

gênero não foi tão expressivo, assim como encontrado no presente estudo, sendo o gênero *Alternaria* mais predominante nas amostras de uvas (GARCÍA-CELA et al., 2015).

Determinadas espécies fúngicas tiveram sua presença relacionada com apenas uma das amostras. Tal fato ocorreu na Syrah 1, única a apresentar *P. funiculosum*, embora com baixo percentual (0,5 %) (GRÁFICO 2a). Esta espécie foi relatada como capaz de sintetizar o composto volátil 2-isopropil-3-metoxi-pirazina (IPMP), conhecido por seu *off-flavor* em vinhos, reproduzindo aromas terrosos ou herbáceos com um limiar de percepção de 1 ng/L em vinhos tintos (PICKERING et al., 2007). *A. oryzae* e *P. variable* foram identificados, com cerca de 1 % do total das espécies isoladas, apenas na amostra Syrah 2. Na indústria de bebidas e alimentos fermentados, principalmente da culinária japonesa, o fungo *A. oryzae* é um micro-organismo seguro e muito utilizado (MACHIDA et al., 2005), porém o *P. variable* apresenta capacidade de produção de geosmina (trans-1, 10-dimetil-trans-9-decalol), uma molécula indesejável responsável pelo aroma de terra, mofo e beterraba cozida em mosto de uva e vinho (DARRIET et al., 2000). A geosmina resulta em efeitos prejudiciais na qualidade do aroma do alimento e seu limiar de percepção em vinho tinto é de 60 a 65 ng/L (POLAK; PROVASI, 1992).

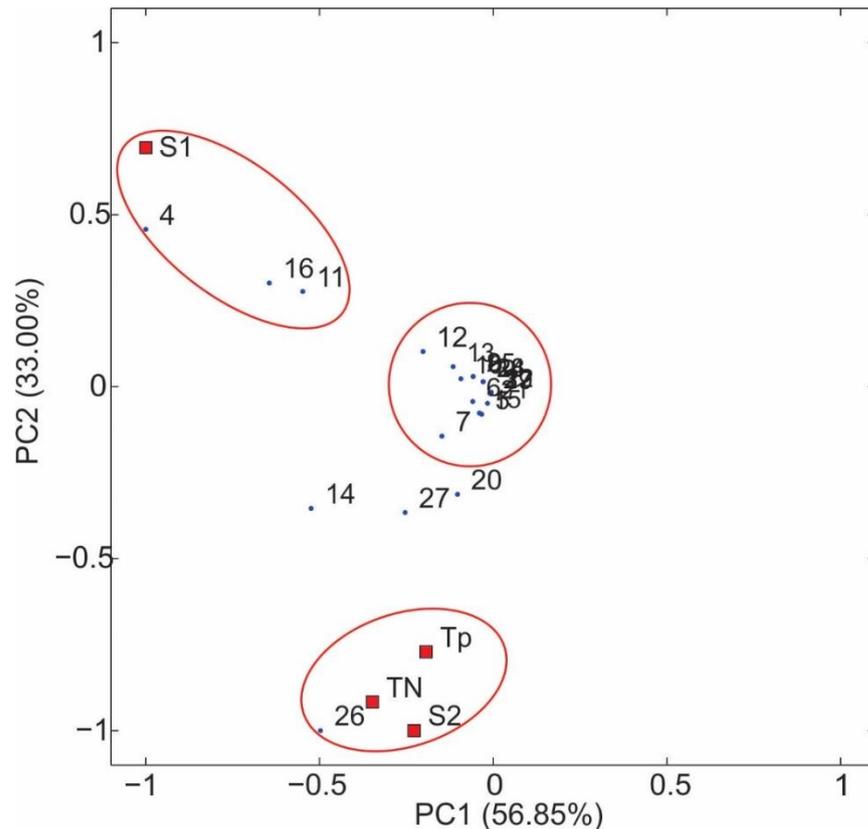
Na amostra de uva da variedade Tempranillo, observou-se exclusivamente as espécies *P. bilaiae* (0,5 %), *P. rugulosum* (2 %) e *A. tubingensis* (2 %), porém todas, também, em pequenas quantidades de isolados. O *P. bilaiae* é uma espécie que possui potencial para produzir a molécula 2-metilisoborneol (MIB) (SIDDIQUE, 2012), a qual contribui para o surgimento de *off-flavor* em alimentos, fornecendo odores de terra, cânfora ou de mofo característicos de uvas com podridão negra, seu limiar de percepção olfativa no vinho é de 30 a 40 ng/L (LA GUERCHE et al., 2006). A baixa frequência de isolamento do *P. rugulosum* nesta amostra corrobora com os resultados obtidos por Sage et al. (2002) e Serra et al. (2005), em vinhedos da França e Portugal. Isolados de *A. tubingensis* também têm sido encontrados em baixa frequência em vinhedos. Entretanto, na amostra de Touriga Nacional apenas morfotipos caracterizados a níveis de gênero constituem-se de isolados únicos dessa amostra, representados por: *Aspergillus* sp5, *Penicillium* sp5, *Penicillium* sp12, *Penicillium* sp13 e *Penicillium* sp14.

4.1.2 Análise do componente principal das amostras de uvas viníferas

A análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada para se obter uma visualização acerca da possível relação existente entre as variedades de uvas viníferas e a incidência de

isolados fúngicos nessas amostras. A Figura 4 demonstra que dois componentes principais foram responsáveis pela distinção entre as amostras. O primeiro componente principal (PC1) e o segundo componente principal (PC2) descrevem 56,85 % e 33 %, respectivamente, da variância total dos dados.

Figura 4 – Análise de componente principal (PCA) da diversidade fúngica presente nas amostras de uvas.



Legenda – Syrah 1 (S1), Syrah 2 (S2), Tempranillo (Tp), Touriga Nacional (TN), *Penicillium* sp1 (4), *Penicillium* sp9 (11), *P. westlingii* (16) e *Aspergillus niger* Agregado (26).

Fonte – Do autor (2018).

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram agrupamentos formados entre as variedades de uvas e as espécies fúngicas relacionadas. As associações observadas foram entre as amostras de uvas Syrah 1 (S1) e as espécies *Penicillium* sp1 (4), *Penicillium* sp9 (11) e *P. westlingii* (16), que se apresentaram mais correlacionadas. Syrah 2 (S2), Tempranillo (Tp) e Touriga Nacional (TN) associaram-se à espécie *Aspergillus niger* Agregado (26), exibindo maior correlação. Todas as amostras de uvas apresentaram resultado semelhante às demais espécies fúngicas, as quais se aproximaram ao eixo zero, mostrando dessa forma expressividade

pouco significativa na diferenciação do perfil das comunidades fúngicas associadas às amostras de uva.

Interessantemente, a análise de PCA mostra agrupamentos com associações entre as amostras pertencentes à mesma vinícola, evidenciada pela associação entre S2, TN e Tp e a espécie 26, como também na associação entre a amostra S1, e as espécies 4, 11 e 16. A amostra S1 pertence à vinícola 1, enquanto as amostras S2, TN e Tp pertencem à vinícola 2, localizada em municípios diferentes. Embora ambas vinícolas pertençam à mesma região (VSMSF), e por isso também apresentam características climáticas semelhantes, os resultados de colonização fúngica divergem entre si. Amostras da mesma vinícola possuem correlações análogas entre as espécies fúngicas nelas encontradas, porém ao comparar vinícolas diferentes não se evidencia nenhuma correlação.

4.1.3 Perfil metagenômico

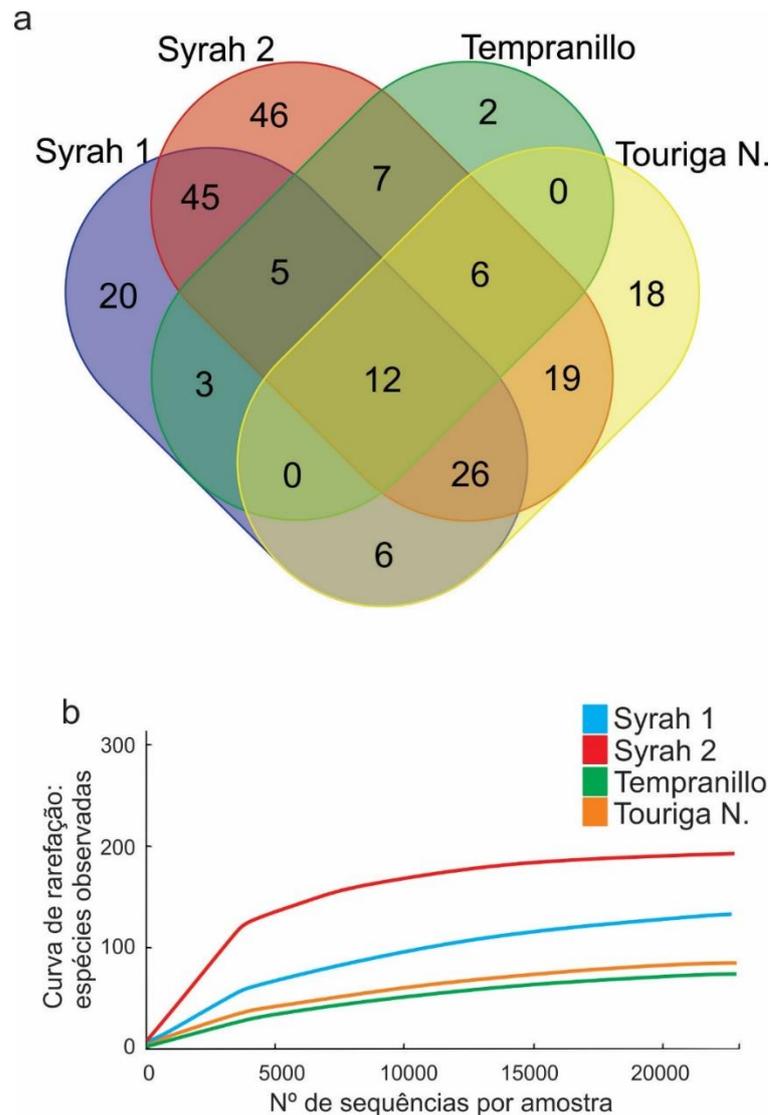
Para a análise metagenômica, definiu-se as UTOs como grupos de sequências com 97 % de similaridade, parâmetro recorrente em análises desse tipo (TAYLOR et al., 2016). Foram obtidas um total de 215 UTOs para todas as 4 amostras, sendo 117, 166, 35 e 87 para Syrah 1, Syrah 2, Tempranillo e Touriga Nacional, respectivamente. O diagrama evidencia o compartilhamento dessas UTOs nas amostras de uvas (FIGURA 5a).

Várias UTOs foram detectadas exclusivamente para cada amostra, sendo 20 para Syrah 1, 46 para Syrah 2, 2 para Tempranillo e 8 foram exclusivos da Touriga Nacional. Interessantemente, as amostras Syrah 1 e Syrah 2, embora tenham sido colhidas em vinhedos diferentes, apresentaram mais UTOs em comum do que as outras comparações (Syrah 1 com Tempranillo, 3 UTOs e Syrah 1 com Touriga N., 6 UTOs). Analogamente, Syrah 2 apresenta 7 UTOs em comum com Tempranillo e 19 com Touriga Nacional, evidenciando que uvas de vinhedos distintos podem possuir um perfil microbiano mais próximo do que as pertencentes ao mesmo vinhedo. Essa observação corrobora com o descrito por Setati e colaboradores (2012), que aferiram existir maior heterogeneidade de espécies ao comparar amostras da mesma unidade produtiva, do que a de vinhedos distintos.

Esses resultados são distintos dos resultados encontrados pela caracterização morfológica (item 4.1.1), a qual aponta como mais similares as uvas oriundas do mesmo vinhedo. Essa discrepância pode estar relacionada com a técnica e com a quantidade de espécies analisadas nas duas abordagens.

Doze UTOs estão presentes em todas as amostras, representadas pelas espécies: *Alternaria alternata*, *Aspergillus carbonarius*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*, *Penicillium citrinum*, *Bipolaris spicifera*, *Erysiphe necator*, *Aspergillus melleus*, *Gymnostellatospora*, *Magnaporthe grisea*.

Figura 5 – Caracterização metagenômica de fungos filamentosos e leveduras nas amostras de uvas viníferas.



Legenda - **a** Diagrama de Venn das amostras de uvas viníferas. **b** Curvas de rarefação das amostras de uvas viníferas.

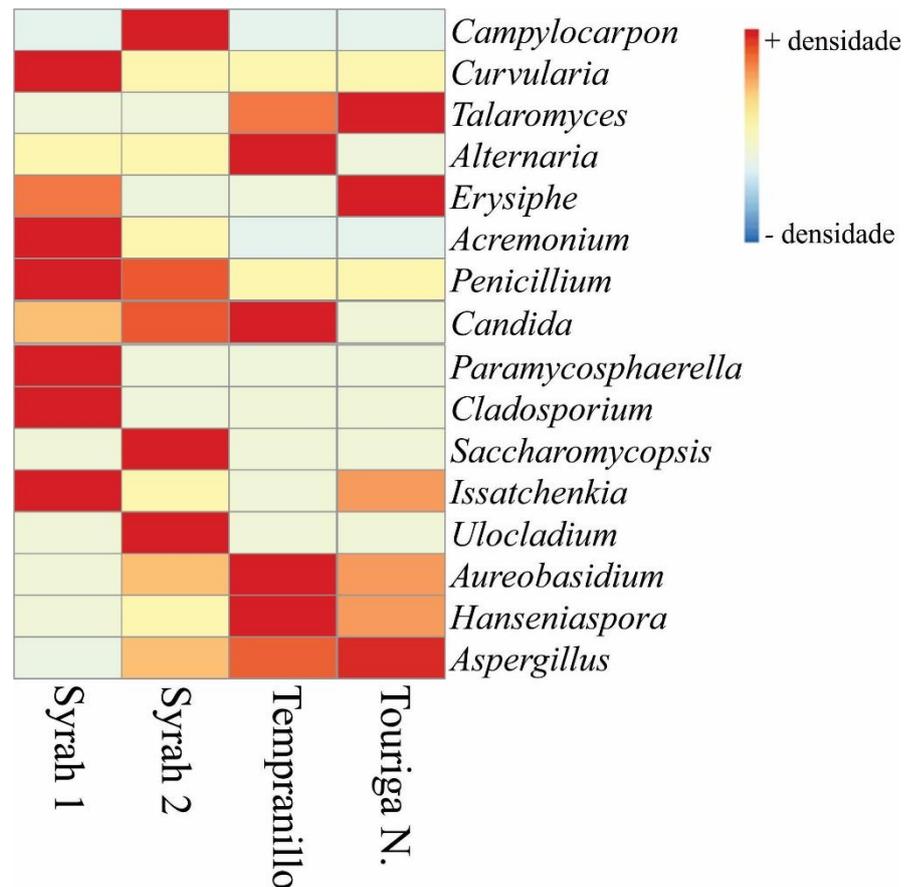
Fonte – Do autor (2018).

A partir do perfil metagenômico das amostras de fruto, foi gerada uma curva de rarefação retratando o número de UTOs encontradas em relação ao número de sequências obtidos pelo sequenciamento. Curvas de rarefação constituem-se de uma técnica útil para

comparar comunidades de tamanho distinto, as amostras cujas curvas estejam mais elevadas no eixo Y retratam, graficamente, maior diversidade. As curvas de rarefação tendem a aumentar muito rapidamente logo no início, mostrando uma inclinação que expressa que as espécies mais comuns estão sendo encontradas. No entanto, grande parte da diversidade ainda precisa ser caracterizada. As curvas tendem, então, a diminuir sua inclinação, indicando sua redução da caracterização de novas UTOs (YOUSSEF; ELSHAHED, 2009). Tal fato evidencia que o sequenciamento foi capaz de alcançar a majoritária micodiversidade da amostra. Portanto, é possível observar neste resultado que a amostra Syrah 2 apresentou maior riqueza de UTOs em relação às demais, seguidas das amostras Syrah 1, Touriga Nacional e, com menor, Tempranillo (FIGURA 5b.).

A análise do mapa de calor (FIGURA 6) evidencia a prevalência inter-amostras dos gêneros. Apresentam-se gêneros comumente associados aos frutos de uvas viníferas como *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium* (GARCÍA-CELA et al., 2015). Syrah 1 é a amostra que possui maior prevalência dos gêneros *Curvularia*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Paramycosphaerella*, *Cladosporium* e *Issatchenkia*. Enquanto os gêneros *Ulocladium*, *Saccharomycopsis* e *Campylocarpon* predominam em Syrah 2. Interessantemente, *Penicillium* também apresenta abundância significativa em Syrah 2, ou seja, aparentemente esse gênero fúngico está mais associado à variedade Syrah.

Figura 6 – Mapa de calor dos gêneros de presentes nas amostras de uvas viníferas.



Legenda – Mapa de calor para visualização da abundância relativa dos gêneros encontrados nas diferentes amostras de uvas analisadas.

Fonte – Do autor (2018).

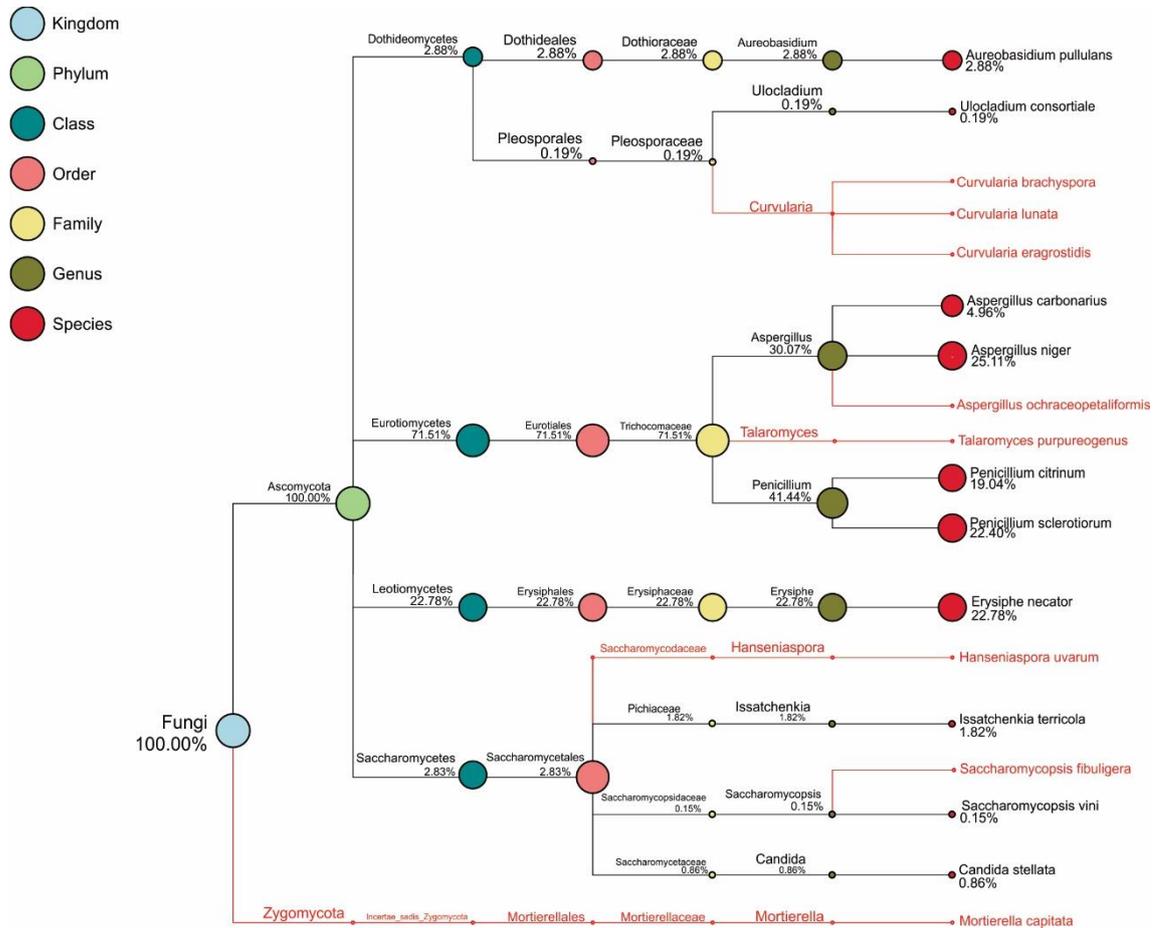
A amostra Tempranillo apresenta maior incidência do que as demais dos gêneros *Alternaria*, *Candida* e *Aureobasidium*. Esse último também denominado como levedura negra é descrito como constituinte importante para as uvas saudáveis e capaz de inibir o crescimento de fungos produtores de micotoxinas (FLEET, 2003). Esse gênero também foi reportado como mais abundante nos frutos de vinhedos chineses (WEI et al., 2018).

Touriga Nacional apresenta maior abundância de *Aspergillus* e *Hanseniaspora*. Esse gênero de levedura foi reportado como capaz de sobreviver por tempo considerável durante a fermentação alcóolica em uvas Tinta Roriz (concentração 12,5 % v/v), e pode influenciar positivamente o perfil aromático de vinhos tintos (MOREIRA et al., 2011).

Foram construídas árvores filogenéticas com as UTOs classificadas a nível de espécie para as amostras de uvas viníferas do VSMSF e os resultados obtidos apresentam os seguintes gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Curvularia*, *Erysiphe* e *Mortierella*,

além de gêneros de leveduras como: *Issatchenkia*, *Candida*, *Saccharomycopsis*, *Hanseniaspora* e o fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* (FIGURA 7, 8, 9 e 10).

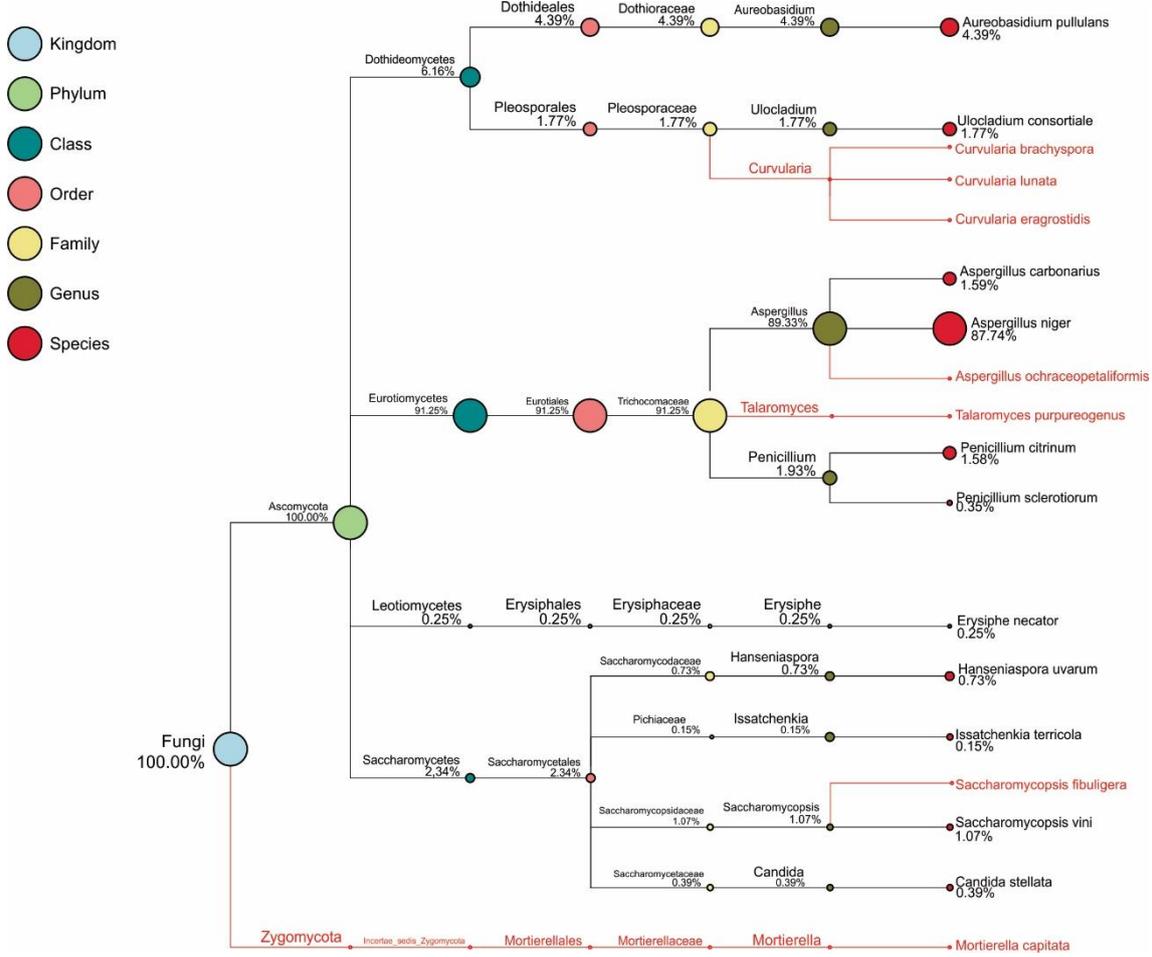
Figura 7 – Cladograma das UTOs classificadas a nível de espécies presentes na amostra Syrah 1.



Legenda – Árvore filogenética de UTOs encontradas a nível de espécie para a amostras de fruto Syrah 1. Clados em coloração vermelha demonstram ausência dos táxons na amostra analisada.

Fonte – Do autor (2018).

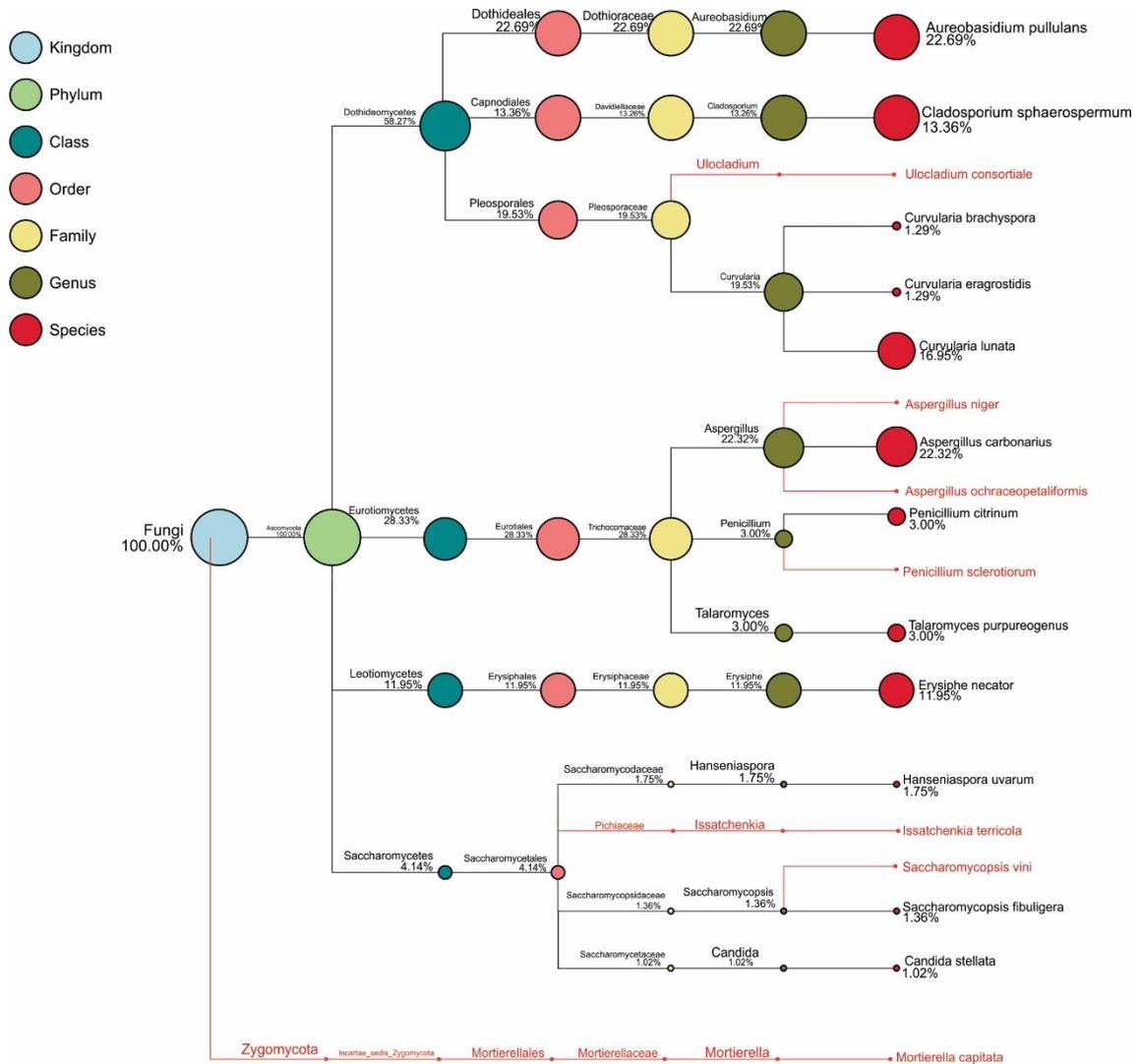
Figura 8 – Cladograma das UTOs classificadas a nível de espécies presentes na amostra Syrah 2.



Legenda – Árvore filogenética de UTOs encontradas a nível de espécie para a amostras de fruto Syrah 2. Clados em coloração vermelha demonstram ausência dos táxons na amostra analisada.

Fonte – Do autor (2018).

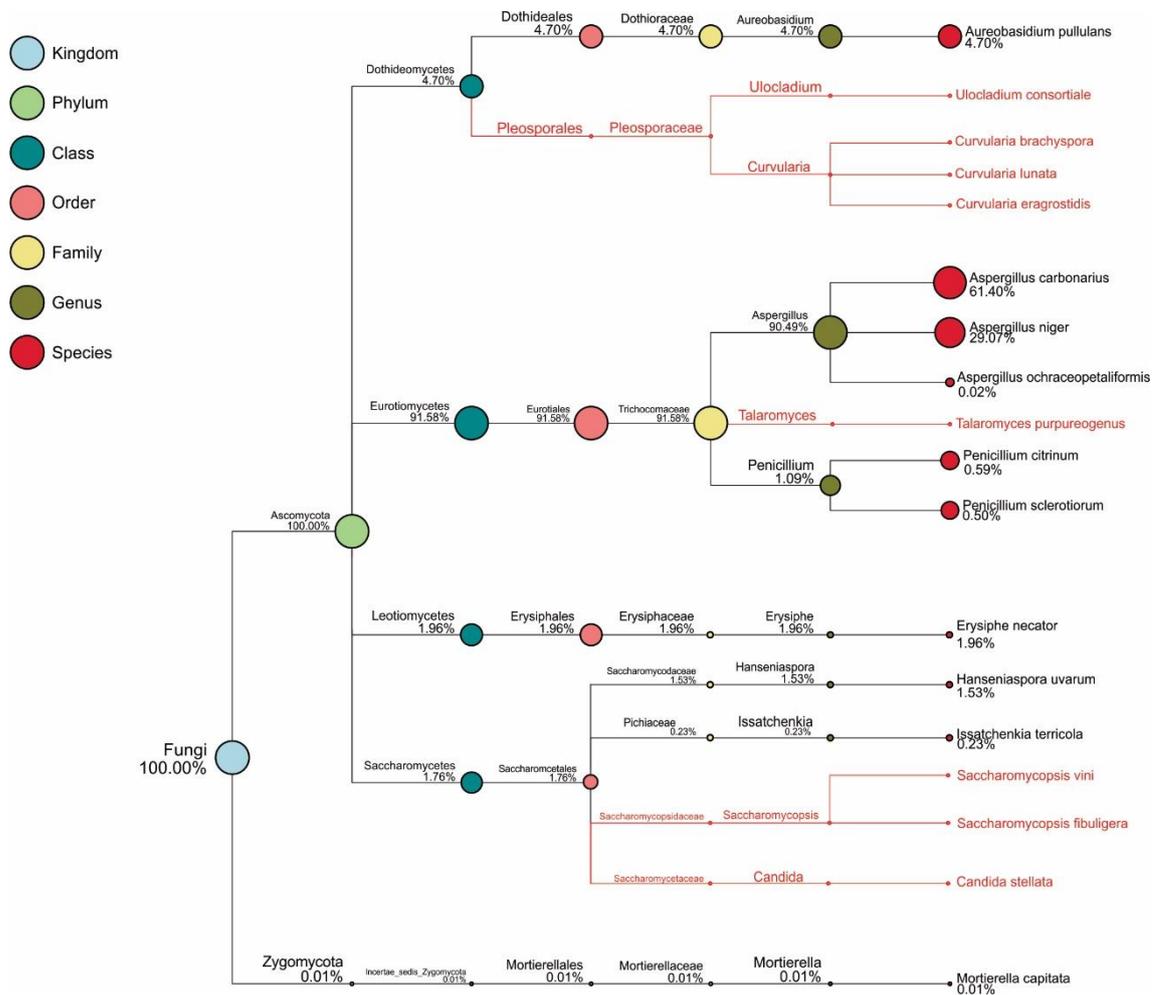
Figura 9 – Cladograma das UTOs classificadas a nível de espécies presentes na amostra Tempranillo.



Legenda – Árvore filogenética de UTOs encontradas a nível de espécie para a amostras de fruto Tempranillo. Clados em coloração vermelha demonstram ausência dos táxons na amostra analisada.

Fonte – Do autor (2018).

Figura 10 – Cladograma das UTOs classificadas a nível de espécies presentes na amostra Touriga Nacional.



Legenda – Árvore filogenética de UTOs encontradas a nível de espécie para a amostras de fruto Touriga Nacional. Clados em coloração vermelha demonstram ausência dos táxons na amostra analisada.

Fonte – Do autor (2018).

Somente duas espécies de *Penicillium* e três espécies de *Aspergillus* foram identificadas pela análise molecular, porém, pela caracterização morfológica, foi encontrado maior número de espécies pertencentes a estes gêneros. Tal fato pode estar relacionado à ausência de outras espécies na base de dados utilizada pela análise de metagenômica, impossibilitando a identificação de demais fungos. Outra possibilidade é que a similaridade das sequências obtidas nos resultados com a base de dados utilizada para a comparação pela metagenômica pode muitas vezes ser inconclusiva a níveis de espécie, gênero, família e etc.

Micro-organismos encontrados somente pela abordagem molecular como as espécies: *Aspergillus ochraceopetaliformis*, *Penicillium sclerotiorum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia eragrostidis*, *Curvularia brachyspora*, *Ulocladium consortiale*, *Erysiphe necator*, podem não

ter sido encontrados por meio de análise de identificação com caracterização morfológica devido à dificuldade da correta e precisa identificação da morfologia a nível de espécie desses fungos.

A presença de fungos da Seção *Nigri* com alta prevalência nas uvas já foi reportada para uvas *Vitis labrusca* oriundas do Vale do São Francisco (FERRANTI et al., 2018). Os resultados encontrados no presente estudo expandem esses achados para *Vitis vinifera*. Além disso, a incidência de fungos dessa seção pode estar relacionada às altas médias de temperatura locais (CHIOTTA et al., 2013).

Leveduras não *Saccharomyces* foram inicialmente consideradas indesejáveis na vinificação devido seu isolamento em vinhos deteriorados (RANKINE, 1972). Porém, posteriormente vários trabalhos investigaram os efeitos benéficos dessas leveduras nos vinhos, especialmente nos estágios iniciais da fermentação, revisto por Comitini et al. (2011). O termo não *Saccharomyces* engloba todas as leveduras que não se classificam como *S. cerevisiae* com efeitos benéficos ao vinho. Dessa forma, agentes leveduriformes danosos ao vinho, como *Dekkera/Brettanomyces*, não se enquadram nesse grupo (JOLLY, VARELA, PRETORIUS, 2014).

A levedura *Candida stellata* é uma levedura não *Saccharomyces* que foi descrita como benéfica para a produção de vinhos e potencial co-inoculante, pois produz grandes quantidades de enzimas extracelulares proteolíticas e pectinolíticas (STRAUSS et al., 2001). Normalmente são encontradas em maior quantidade próximo ao início da fermentação e à medida que a fermentação progride. *C. stellata* diminui em número dando lugar às espécies de *Saccharomyces* (WEI et al., 2018). Outra levedura não *Saccharomyces* bem descrita na vinificação é *Hanseniaspora uvarum*, a qual também foi encontrada nos frutos analisados e foram caracterizadas como importantes para a produção de compostos voláteis (VIANA et al., 2009).

O fungo leveduriforme *Aureobasidium pullulans* apresenta pigmentação negra, geralmente coloniza superfície de folhas e frutos, mas também já foi descrito como endófito. Na vinificação é utilizado para produção de pectinases (MERÍN et al., 2015) e β -glicosidases, as quais incrementam as características dos vinhos (BAFFI et al., 2013).

Nas uvas, fração relevante dos compostos aromáticos estão presentes como precursores glicosídicos não voláteis (HERNANDEZ-ORTE et al., 2009), e sua liberação durante o processo de vinificação pode ser incrementada pela introdução de outras cepas, ou de enzimas purificadas (MAICAS, S., & MATEO, J. J., 2005). As enzimas β -glicosidases produzidas por cepas não *Saccharomyces* foram relatadas como capazes de impactar o desenvolvimento do

aroma *varietal*, contribuindo para a tipicidade do vinho (ROMO-SANCHEZ et al., 2013). Assim, a caracterização de cepas produtoras dessas enzimas no ecossistema nativo do vinho configura-se como uma alternativa às formulações industriais. Nesse sentido, encontramos nas uvas analisadas as leveduras *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis vini* e *Issatchenkia terricola*. Em *Saccharomycopsis fibuligera* as β -glicosidases apresentaram maior eficácia do que as produzidas por *S. cerevisiae* na liberação de terpenos aromáticos ligados a sacarídeos (RENSBURG. et al., 2005). *Saccharomycopsis vini* já teve sua presença reportada em uvas e mosto (KURTZMAN 2011). Em outro estudo, Gamero e colaboradores (2016) aferiram o perfil de produção de compostos aromáticos de leveduras e caracterizaram *S. vini* como mais eficaz do que *S. cerevisiae* na produção de dois ésteres etílicos (etil butirato e etil isovalerato), moléculas associadas às notas frutadas (abacaxi ou maçã) (GAMERO et al., 2016). Recentemente, o efeito das β -glicosidases de *Issatchenkia terricola* foi aferido para produção de vinho Cabernet Sauvignon, com aumento da liberação de norisoprenóides e fenóis, resultando em um vinho com notas de frutas secas e sem comprometimento de sua coloração (DE OVALLE et al., 2018).

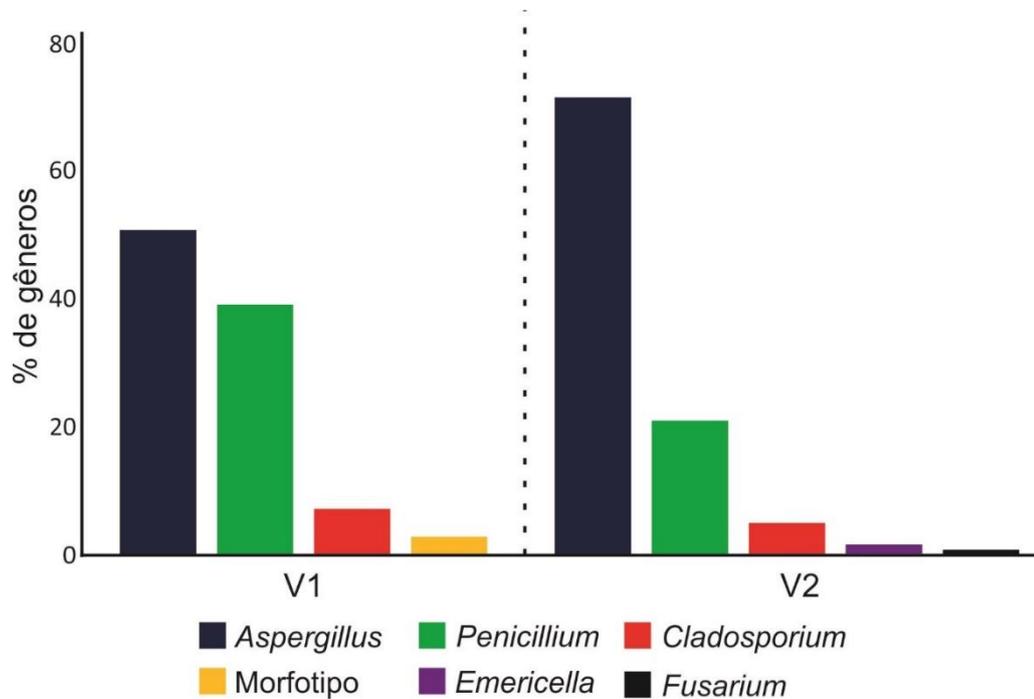
5.1 Análises da biodiversidade de fungos filamentosos nos solos dos vinhedos

5.1.1 Caracterização morfológica de fungos filamentosos isolados dos solos de vinhedos Syrah

A caracterização morfológica de fungos filamentosos isolados dos solos foi realizada apenas nos vinhedos de variedade Syrah, com a finalidade de investigar a diversidade micológica associada às duas diferentes vinícolas (amostra V1: solo da videira Syrah 1 e amostra V2: solo da videira Syrah 2) abordadas neste trabalho. Um total de 188 fungos filamentosos isolados das amostras de solo dos vinhedos, os quais pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Emericella* e *Fusarium*, foram encontrados neste trabalho. A micobiota mais comumente isolada, em ambas as amostras, foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, representando 63,83 %, 27,66 % e 5,85 %, respectivamente. A maior diversidade de gêneros encontrados por meio da análise morfológica foi pertencente à amostra de solo do vinhedo 2 (V2), na qual obteve-se representantes de todos os gêneros citados (71,43 % de *Aspergillus*, 21 % de *Penicillium*, 5,04 % de *Cladosporium*, 1,68 % de *Emericella* e 0,84 % de *Fusarium*). Porém, no vinhedo 1 (V1) não houve isolados de *Fusarium* e

Emericella, apresentando apenas *Aspergillus* (50,72 %), *Penicillium* (39,13 %), *Cladosporium* (7,25 %) e isolados do morfotipo sp3 (2,89 %, que não representam nenhum dos gêneros identificados) (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 - Percentual relativo de gêneros por amostra de solo.



Legenda – Porcentagem relativa dos gêneros obtidos a partir de caracterização morfológica das amostras de solos de cultivo de uvas analisadas.

Fonte – Do autor (2018).

Aspergillus, *Penicillium* e *Fusarium* foram os gêneros dominantes isolados também a partir de amostras de solo de vinhedos italianos situados no Monte Etna (Sicília oriental) (OLIVERI et al., 2016). Em solos de vinhedos de diferentes regiões da Argentina, tais gêneros estiveram presentes, porém os prevalentes, em ordem decrescente, foram: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Ulocladium*, *Fusarium* e *Trichoderma* (BARBERIS et al., 2014). Componentes comuns da micobiota em ambientes de vinhedos, *Aspergillus* e *Penicillium* são considerados fungos saprofíticos, onipresentes, cujos conídios são facilmente distribuídos na atmosfera, principalmente pela movimentação do ar ao seu redor (SERRA et al., 2006). Segundo Hocking et al. (2007) o manejo adequado da irrigação sobre a videira minimiza o desenvolvimento de *Aspergillus*, através da manutenção da umidade do solo em níveis razoavelmente constantes.

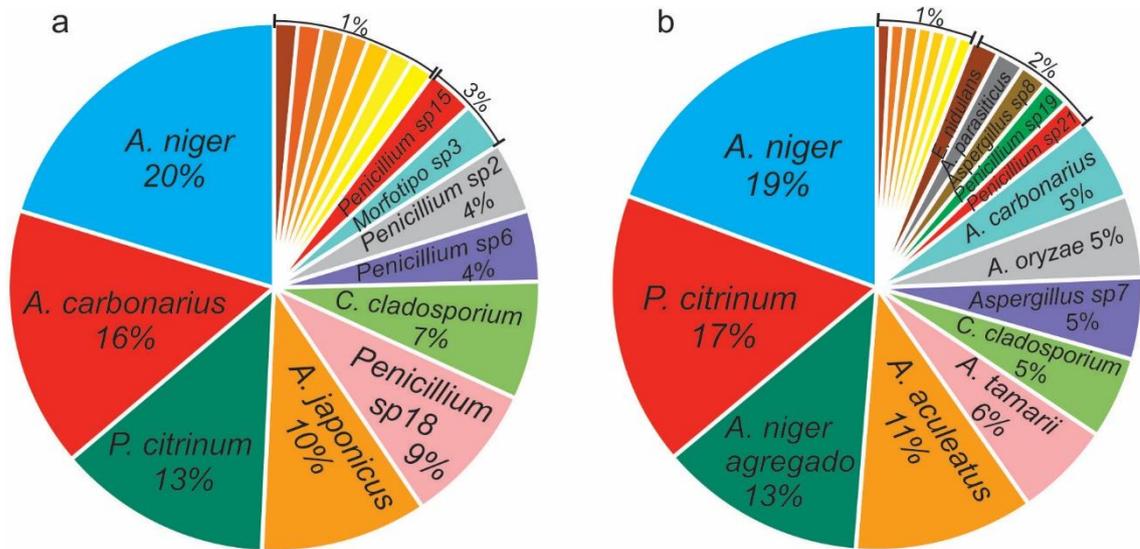
Os fungos do gênero *Penicillium* possuem uma gama diversificada de habitats, incluindo o solo, sendo frequentes em regiões temperadas (SERRA et al., 2006). Porém, esses fungos foram também encontrados no VSMSF, o qual possui clima tropical semiárido e abriga os vinhedos V1 e V2, analisados neste trabalho. O gênero *Penicillium* consistiu no segundo maior percentual de isolados encontrados nas amostras de solos V1 e V2.

Cladosporium e *Fusarium* possuem ampla distribuição ambiental, podendo ocorrer normalmente no ar, em superfícies de plantas, detritos e solo (SERRA et al., 2006). Ambos gêneros podem prejudicar a saúde da videira, com surgimento de podridão do cacho ocasionada por *Cladosporium* (BENSCH et al., 2015), ou causando murcha de videira originada por *Fusarium* (GONZÁLEZ; TELLO, 2011). A distribuição destes gêneros nas duas amostras de solos analisadas mostra a importância do monitoramento dos vinhedos, afim de prevenir, por adoção de práticas agrícolas adequadas, a presença desses fungos também nas uvas.

O solo geralmente abriga diferentes fontes de carbono, ácidos orgânicos e carboidratos. Este ambiente pode manter a temperatura e a umidade mais estáveis que as partes aéreas das videiras, além de poder bloquear a radiação UV (LEVEAU; TECH, 2011). Por esses motivos, o solo pode se configurar como um habitat rico para diversas espécies de micro-organismos, contribuindo para difundir muitas espécies de fungos para outros ambientes, como plantas e frutos, através da dispersão de seus esporos com a movimentação de ar.

Na análise dos resultados de caracterização morfológica dos isolados presentes na microbiota dos solos de cultivo dos dois vinhedos de Syrah estudados, as espécies *Aspergillus niger*, *A. niger* Agregado, *A. carbonarius*, *Penicillium citrinum* e complexo *Cladosporium cladosporioides* foram identificadas em comum nas amostras (GRÁFICO 4). Destas espécies *A. niger*, *A. carbonarius* e *P. citrinum* apresentaram-se com percentuais relativamente elevados em ambos vinhedos. Tais espécies representam potencial risco a esses ambientes, devido a capacidade de produção de micotoxinas em situações específicas de temperatura, umidade e atividade de água.

Gráfico 4 - Percentual relativo de espécies por amostra de solo de cultivo de uvas.



Legenda – Porcentagem relativa das espécies obtidas a partir de caracterização morfológica de solos de cultivo de uvas analisados. As espécies observadas em percentual $\leq 1\%$ são descritas a seguir: **a** Solo V1: *A. tubingensis*, *Aspergillus* sp1, *P. brevecompactum*, *Penicillium* sp16, *Penicillium* sp17, *Penicillium* sp22 e *A. niger* Agregado (1%). **b** Solo V2: *A. calidoustus*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *Aspergillus* sp6, *Aspergillus* sp9, *Penicillium* sp20 e *Fusarium* sp (1%).

Fonte – Do autor (2018).

Das espécies relatadas nos solos de cultivo dos vinhedos do presente estudo, muitas pertencem ao gênero *Aspergillus* da Seção *Nigri*, evidenciando que o aumento da frequência dessas espécies em regiões de climas mais quentes pode estar associado à capacidade de sobrevivência prolongada destas espécies no solo, bem como a capacidade de adaptação a altas temperaturas e baixa atividade de água (BATTILANI et al., 2006; LEONG; HOCKING; PITT, 2004). Estes mesmos resultados de grande incidência de espécies da Seção *Nigri* nos solos de cultivo correlacionam-se aos mesmos resultados apresentados nas amostras de uvas relatados neste trabalho.

Segundo Kazi et al. (2003), *A. carbonarius* possui um nível de temperatura de sobrevivência máxima em solo de 25 °C e o aumento do teor de umidade nesse nicho diminui sua sobrevivência. Os autores ainda relatam que após a irrigação dos vinhedos a incidência de *A. carbonarius* diminuiu, ao passo que a incidência retornou aos níveis anteriores quando o solo foi seco. De acordo com essa informação, a região do VSMSF possui condições que permitem o crescimento dessa espécie, registrando temperaturas médias de 26 °C e promovendo irrigação apropriada em seus vinhedos, justificando os resultados registrados no trabalho.

Em seu trabalho, Oliveri et al. (2016) exhibe resultados semelhantes aos encontrados nesta análise para *A. niger*. Sua investigação acerca do papel da micobiota do solo e do ar na contaminação das uvas de vinhedos italianos revelou que a presença de uvas na fase inicial da maturação influenciava positivamente a população de *A. niger*, tanto no solo quanto no ar. Isso ocorre, provavelmente, devido a movimentação de ar que deposita esporos contidos no solo sobre as uvas (KAZI et al., 2003). Outros estudos realizados em vinhedos da Austrália também evidenciaram que a principal fonte de inóculo de *A. niger* é o solo, vivendo em sua camada superior como saprófitas (LEONG et al., 2006; LEONG; HOCKING; SCOTT, 2007).

A maior concentração de *A. niger* e *P. citrinum* foi narrada também em solos de vinhedos do VSMSF por Freire (2016), estando presentes em todas as amostras pesquisadas, assim como consta nos resultados deste trabalho que reforça a informação que tais espécies participam da micobiota *terroir* dos vinhedos do VSMSF. *A. aculeatus* também foram encontrados em todas as amostras de solos de cultivo do VSMSF pelo mesmo autor, porém, nesta pesquisa, apenas na amostra de solo V2 a espécie foi identificada em quantidade expressiva.

Uma grande diferença foi encontrada no número de espécies pertencentes à Seção *Flavi* entre as regiões de vinhedos de Syrah. Todos os isolados foram exclusivamente encontrados no solo de cultivo V2 (13,44 %), e as espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. tamarii* foram identificadas dentro dessa seção. Interessantemente, a amostra de solo V2 apresentou maior diversidade e maior quantidade de isolados do gênero *Aspergillus* do que V1, a qual o gênero *Penicillium* foi mais incidente, porém com espécies identificadas apenas a nível de gênero.

Todos os isolados fúngicos encontrados na Seção *Circumdati* estavam nas amostras de solo de cultivo dos vinhedos, principalmente em V2 (8,40 % do total de isolados da amostra), entretanto, estes não foram identificados a níveis de espécie, sendo agrupados dentro da Seção *Circumdati* em quatro morfotipos diferentes, de acordo com suas características macro e microscópicas. O baixo percentual encontrado para espécies desta seção assemelha-se aos resultados de Oliveri et al. (2016) para *Aspergillus* da Seção *Circumdati* que identificou alguns isolados apenas. Nos resultados de isolamento fúngico para os frutos, essa seção não foi significativa.

A maioria das espécies relatadas nos solos de cultivo dos vinhedos também foram observadas nas respectivas amostras de uvas dos mesmos, estando de acordo com a hipótese de que o solo seria um inóculo inicial para as uvas (LEONG et al., 2006).

A diversidade de micro-organismos capazes de se estabelecer no solo e colonizar as uvas, caso encontre condições que favoreçam o seu desenvolvimento, determinará tanto a saúde dos frutos quanto a variabilidade de micro-organismos que serão introduzidos na vinícola, afetando os processos de fermentação e maturação do vinho, por exemplo (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012). Isso demonstra que a adoção de medidas preventivas que evitem o fornecimento das condições mínimas necessárias à colonização das uvas pelos esporos fúngicos presentes no solo são fundamentais para a manutenção da sanidade do vinhedo.

5.1.2 Análise de componentes principais do solo

A Tabela 3 apresenta a composição físico-química do solo de cultivo das vinícolas V1 e V2.

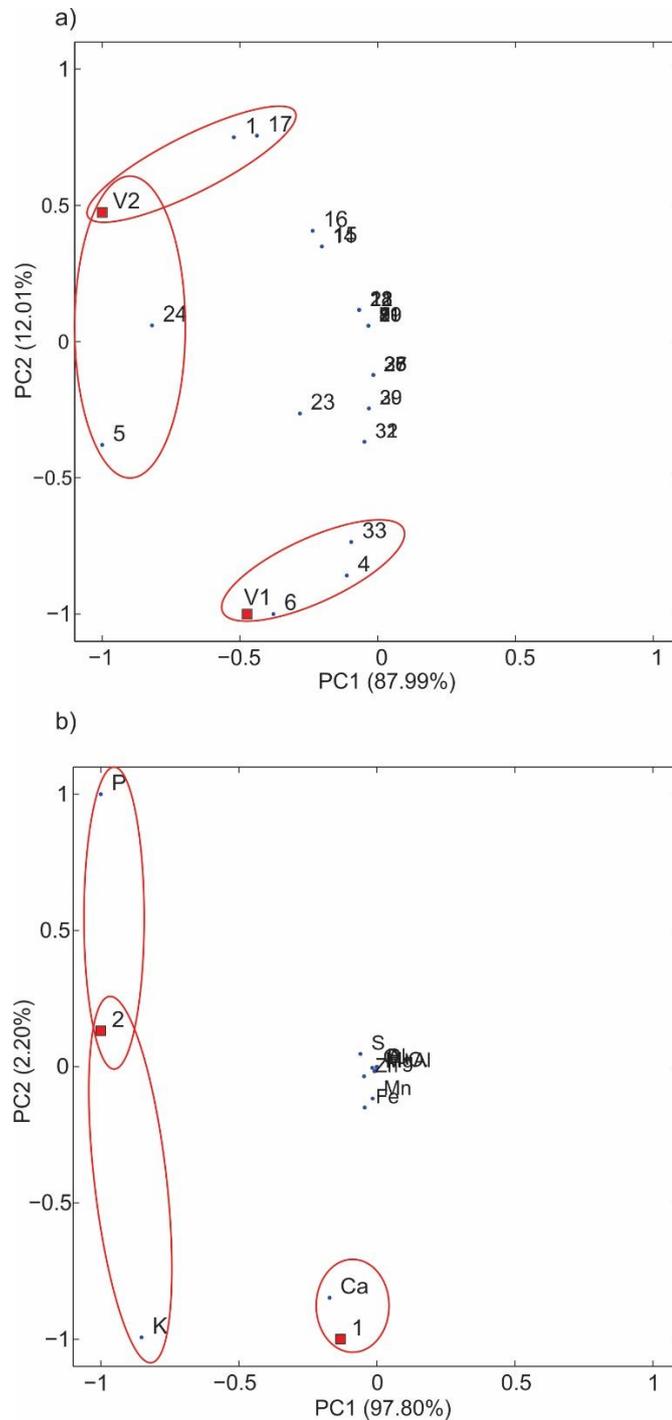
Tabela 3 – Composição físico-química dos solos de cultivo dos vinhedos V1 e V2.

	Solo	pH	Macronutrientes							Micronutrientes					M.O.*	
			mg/dm ³			cmol/dm ³				mg/dm ³			dag/kg			
			Na	P	K	Mg	Ca	Al	H+Al	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	
V1	Textura média	7.2	-	7,01	136,18	1,9	9,42	0	1,2	6,1	14,01	73,16	1,62	0,18	1,34	1,59
V2	Textura média	7.2	-	596,28	491,02	5,1	7,87	0,14	0,94	26,96	24,56	92,86	9,94	0,66	35,66	4,01

* Matéria orgânica

Fonte - Dados fornecidos pelo Laboratório de Análise de Fertilidade do Solo da UFLA (2017).

Figura 11 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química dos solos de cultivo de dois vinhedos de uvas Syrah (V1 e V2).



Legenda - a) Diversidade de fungos filamentosos. *Aspergillus niger* Agregado (1), *A. japonicus* (4), *A. niger* (5), *A. carbonarius* (6), *A. aculeatus* (17), *Penicillium citrinum* (24) e *Penicillium* sp18 (33) b) Composição físico-química. Vinícola 1 (1), vinícola 2 (2), cálcio (Ca), potássio (K) e fósforo (P).

Fonte – Do autor (2018).

A Figura 11a mostra a incidência de espécies fúngicas nas amostras de solos V1 e V2 e a possível presença expressiva de alguma dessas espécies sobre uma das amostras de solos de cultivo dos vinhedos (V1 e V2) analisados. A relação de ocorrência maior ou menor de alguma espécie sobre os solos V1 e V2 é explicada, principalmente, por uma componente principal (PC1), a qual explica 87,99 % da variância total, para as amostras de solo. As associações observadas entre as espécies encontradas e as amostras V1 e V2, mostram a maior incidência das espécies *Aspergillus japonicus* (4), *A. carbonarius* (6) e *Penicillium* sp18 (33) em V1 e *Aspergillus niger* Agregado (1), *A. niger* (5), *A. aculeatus* (17), *Penicillium citrinum* (24) em V2. As demais espécies fúngicas associadas próximas ao eixo 0, apresentaram comportamento semelhante e não foram correlacionadas em maior grau com alguma amostra de solo de cultivo.

A composição físico-química dos solos das vinícolas 1 e 2 é apresentada na Figura 11b, na qual é possível observar que o nutriente cálcio (Ca) é mais associado à vinícola 1 (1) e a presença dos minerais potássio (K) e fósforo (P) estão mais relacionados com a amostra da vinícola 2 (2). Os demais componentes do solo analisados não demonstram fortes associações com V1 ou V2.

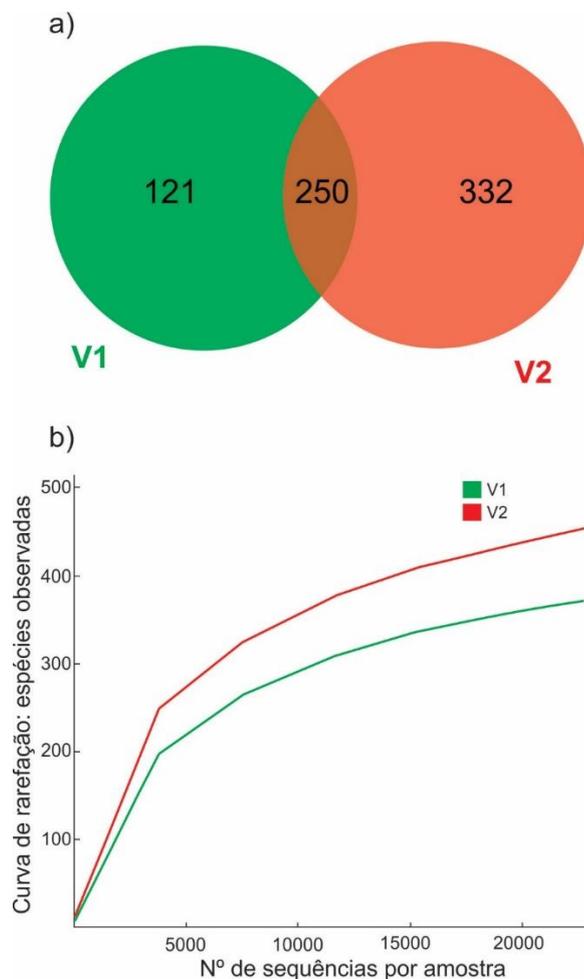
Houve maiores associações entre a amostra V2 e as espécies *Aspergillus niger* Agregado (1), *A. niger* (5), *A. aculeatus* (17) e *Penicillium citrinum* (24). Esse fato pode estar relacionado à elevada presença dos minerais fósforo (P) e potássio (K) encontrados no solo de cultivo da vinícola 2, os quais podem exercer influência sobre as espécies associadas à amostra. Na amostra V1 a presença de *Aspergillus japonicus* (4), *A. carbonarius* (6) e *Penicillium* sp18 (33) foi maior e a incidência dessas espécies pode estar relacionada com o mineral cálcio, presente em maior quantidade no solo de cultivo da vinícola 1.

A microbiota associada ao solo tem sido conhecida como determinante, não apenas para as propriedades químicas e nutricionais dos solos, mas também para influenciar as boas condições fitossanitárias e produtividade da videira. Além disso, trabalhos recentes descrevem o microbioma do solo como reservatório da microbiota associada à videira e contribuem para as propriedades sensoriais dos vinhos (BELDA et al., 2017). Portanto, saber mais sobre as condições microbiológicas e nutritivas do vinhedo permite ao viticultor pensar na redução de tratamentos químicos e executá-los apenas quando são necessários.

5.1.3 Metagenômica de solos de vinhedos

Os solos dos vinhedos (V1 e V2) foram analisados através da amplificação da região ITS1 do RNAr. Foram encontradas 703 UTOs, quantidade expressivamente maior do que nos frutos. Essa maior riqueza de espécies encontradas no solo já foi relatada em outros vinhedos (ZARRAONAINDIA et al., 2015). Desse total, 250 UTOs estão presentes em ambos vinhedos, 121 somente no V1 e 332 somente no V2 (FIGURA 12a). A curva de rarefação evidencia o maior número de espécies observadas na amostra V2 do que na V1. Além disso, pode-se observar que as curvas se encerram ainda com inclinação positiva (FIGURA 12b), indicando que um sequenciamento de maior número de pares de bases poderia revelar ainda mais UTOs.

Figura 12 – Caracterização molecular da comunidade fúngica das amostras de solos.



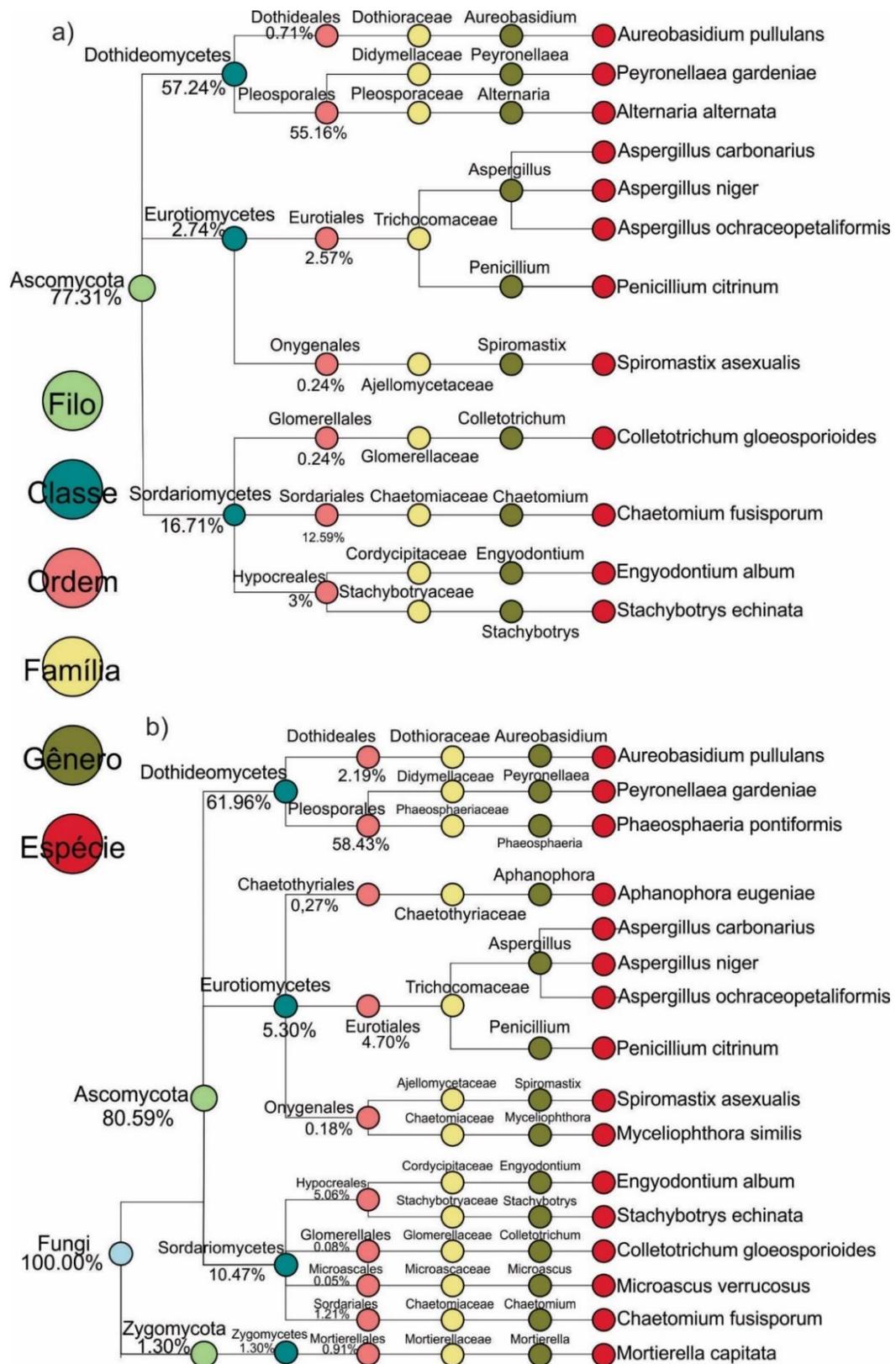
Legenda - a) Diagrama de Venn das amostras de solo de cultivo de dois vinhedos de Syrah. b) Curva de rarefação das amostras de solo de cultivo de dois vinhedos de Syrah.

Fonte – Do autor (2018).

A classificação taxonômica das UTOs encontradas revelou predomínio do filo *Ascomycota* em ambos vinhedos (FIGURA 13a,b). Isso vai de encontro ao reportado em outros trabalhos onde foi analisada a diversidade fúngica em vinhedos (DAVID et al., 2014; TAYLOR et al., 2014). A classe *Dothideomycetes* também se mostrou predominante em ambas amostras, seguida por *Sordariomycetes* e *Eurotiomycetes*, panorama semelhante ao encontrado em outro estudo que avaliou a micodiversidade em vinhedos portugueses (PINTO et al., 2015). Curiosamente, ambos vinhedos também apresentaram majoritariamente as ordens *Pleosporales* e *Dothideales* em proporções similares. Esses resultados estão alinhados com o que foi relatado por Hofstetter e colaboradores (2012), os quais encontraram predominância da ordem *Pleosporales* em videiras jovens e adultas. Também foi observada correlação entre a presença de *Dothideales* e a idade da videira (HOFSTETTER et al., 2012). Na ordem *Eurotiales* os gêneros mais presentes foram *Aspergillus* e *Penicillium*, fungos os quais já foram reportados em outros trabalhos de metagenômica de vinhedos (BOKULICH et al., 2014; PINTO et al., 2015).

Na amostra V1, a principal UTO encontrada foi classificada como *Alternaria alternata* (FIGURA 13a), um fungo tipicamente encontrado em vinhedos (GHNAYA-CHAKROUN et al., 2014). Ao passo que em V2 a principal UTO encontrada foi *Phaeosphaeria pontiformis* (FIGURA 13b).

Figura 13– UTOs classificadas a nível de espécie em amostras de solo de cultivo dos vinhedos Syrah (V1 e V2).



Legenda – Árvore filogenética com as espécies encontradas em amostras de solo dos dois vinhedos. a) Amostra V1. b) Amostra V2.
 Fonte – Do autor (2018).

6.1 Capacidade toxigênica de espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 e citrinina

As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, isoladas das uvas viníferas e do solo de cultivo destas uvas, foram testadas quanto à produção de OTA, citrinina e aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Espécies fúngicas isoladas de uva vinífera e solo de cultivo potencialmente toxigênicas.

Espécie/Micotoxina	Syrah 1		Syrah 2		Tempranillo	Touriga N.
	uva	solo	uva	solo	uva	uva
<i>A. flavus</i> (Afla – B1, B2)	10(10)	0(0)	11(11)	1(1)	61(61)	3(3)
<i>A. parasiticus</i> (Afla – B1, B2, G1, G2)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)
<i>P. citrinum</i> (citrinina)	0(0)	9(9)	8(8)	20(20)	9(9)	0(0)
<i>P. sp</i> seção <i>Citrina</i> (citrinina)	2(0)	3(0)	0(0)	0(0)	0(0)	9(0)
<i>A. carbonarius</i> (OTA)	7(7)	11(11)	3(3)	6(6)	6(6)	12(12)
<i>A. niger</i> (OTA)	4(0)	14(0)	53(0)	23(1)	47(2)	41(0)
<i>A. niger</i> Agregado (OTA)	3(0)	1(0)	20(0)	15(0)	16(0)	19(0)
<i>A. sp</i> 7 seção <i>Circumdati</i> (OTA)	0(0)	0(0)	0(0)	6(6)	0(0)	0(0)
<i>A. sp</i> 8 seção <i>Circumdati</i> (OTA)	0(0)	0(0)	0(0)	2(2)	0(0)	0(0)

Número total de isolados (número de isolados toxigênicos)

Fonte – Dados obtidos pela autora (2018).

Dos 231 fungos avaliados pertencentes às espécies da Seção *Nigri* isolados das uvas, apenas 12,99 % apresentaram produção de OTA, enquanto que dos 70 fungos isolados dos solos de cultivo das amostras de Syrah 1 e Syrah 2, 25,71 % foram produtores de OTA. A presença de espécies da Seção *Nigri* tem grande importância, uma vez que são os principais produtores de ocratoxina A e sua presença nas uvas, junto com as condições ambientais ideais, possibilita que esses fungos produzam a toxina, colocando em risco a saúde do consumidor final (VARGA; KOZAKIEWICZ, 2006).

Todos os *Aspergillus carbonarius* presentes tanto nas amostras de uvas quanto nas amostras de solos de cultivo foram produtores de OTA. Apesar dos isolados de *Aspergillus niger* serem os mais frequentes entre as espécies da mesma seção, tais fungos exibiram 1,38 % e 2,70 % de produtores de ocratoxina A respectivamente, na variedade de uva Tempranillo e no solo de cultivo V2 avaliados. Nenhum dos 74 isolados de *A. niger* Agregado foi produtor de OTA, resultado que se assemelha ao descrito em solos de vinhedos Argentinos, onde nenhum membro da mesma espécie foi produtor (BARBERIS et al., 2014). Quanto às demais espécies pertencentes à Seção *Nigri* isoladas neste trabalho, *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. tubingensis*, não exibiram capacidade para a produção desta micotoxina.

Embora a colonização das uvas e do solo seja predominantemente por *A. niger* em relação aos *A. carbonarius*, estes últimos demandam maior atenção por apresentarem maior capacidade de produção de OTA na maioria dos casos de colonização, principalmente quando as condições para a produção da micotoxina estejam favoráveis, ou seja, temperaturas mais amenas (15 °C) e atividade de água de 0,99 (PASSAMANI et al., 2014).

Fungos produtores de OTA foram identificados em diversos vinhedos de países tradicionalmente produtores de vinho como Espanha (BELLÍ et al., 2006), Argentina (PONSONE et al., 2007), França (DACHOUPAKAN et al., 2009) e Itália (LUCCHETTA et al., 2010). Neste último, Lucchetta e colaboradores (2010) avaliaram uvas cultivadas nas regiões norte, central e sul da Itália, identificando *A. carbonarius* principalmente nas uvas produzidas na região sul, enquanto que nas regiões central e norte do país o *A. niger* foi predominante. As uvas provenientes da região sul apresentaram maiores contaminações e concentrações por OTA, diferentemente das demais regiões, em que os níveis de OTA encontrados foram baixos. Os autores correlacionam a incidência dessas espécies a fatores climáticos, os quais influenciam, conseqüentemente, a produção da micotoxina nas uvas.

Perrone et al. (2006) reforçam os resultados encontrados por Lucchetta et al. (2010), afirmando que a OTA é produzida em maiores quantidades por *A. carbonarius* do que por *A. niger*, assim como consta nos resultados obtidos no presente trabalho.

Em nenhuma amostra de uva houve isolamento de fungos pertencentes à Seção *Circumdati*. Apenas na amostra de solo V2, foi observada a incidência de duas espécies não identificadas, porém pertencentes à esta seção, foram relatadas e produziram OTA em 100 % dos seus isolados. De acordo com Bau e colaboradores (2005a), as espécies da Seção *Circumdati*, produtoras de OTA, não são relevantes devido a sua baixa ocorrência em uvas, fato este que reforça os resultados encontrados.

A citrinina foi produzida somente por *Penicillium citrinum* isolados das amostras de solo V1 e V2 e das uvas Syrah 2 e Tempranillo. Os demais fungos da Seção citrina não produziram a toxina e estiveram presentes em baixo percentual nas amostras.

A colonização das amostras por espécies aflatoxigênicas foi muito observada, principalmente na amostra Tempranillo que apresentou vários isolados de *A. flavus*, todos produtores de aflatoxina B1 e B2. A produção dessas toxinas também foi notada nos demais *A. flavus* presentes em todas as outras amostras. Apenas 2 *Aspergillus parasiticus* produtores de aflatoxina B1, B2, G1 e G2 foram isolados de uma amostra de solo (V2), o que representa a baixa representatividade desta espécie micotoxigênica nas amostras.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, a diversidade de fungos presentes em uvas viníferas e solos de cultivo de dois vinhedos do VSMSF foram estudados por técnicas clássicas de caracterização morfológica taxonômica e por sequenciamento de segunda geração, o que permitiu a identificação de gêneros e muitas espécies dominantes nas amostras de uvas e solos analisados. Este trabalho é o primeiro estudo a aplicar essa tecnologia molecular na pesquisa de vinícolas da região do VSMSF, no Nordeste brasileiro, com o objetivo de avaliar a micobiota dos vinhedos analisados. Tal investigação acerca da diversidade de fungos de vinícolas dessa região é útil para caracterização do *terroir* desses vinhedos, contribuindo assim para elucidar os fatores biológicos, naturais do Vale, podendo, conseqüentemente, diferencia-lo das demais regiões

vitivinicultoras do país. Dessa forma, poder-se-á colaborar com a estruturação da designação de Denominação de Origem para os vinhedos do VSMSF.

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que a maioria das espécies relatadas nas amostras de uvas também foram observadas nas respectivas amostras de solos de cultivos dos vinhedos das mesmas, além disso houve elevada incidência de *Aspergillus* pertencentes à Seção *Nigri* em todas as amostras, corroborando com resultados de estudos realizados em regiões com clima semelhante. A espécie *A. carbonarius* representou a principal fonte de OTA nas uvas e solos de cultivo do VSMSF, confirmando estudos anteriores que afirmam ser este o principal fungo responsável pela contaminação de uvas por OTA no VSMSF. Porém, estes resultados não são conclusivos para confirmarem a presença de OTA nas uvas e nos vinhos produzidos a partir destas, embora sirvam de auxílio no monitoramento de potenciais riscos para o vinhedo e contribuir na prevenção e controle desses fungos toxigênicos.

Tanto o método tradicional quanto o independente de cultivo podem auxiliar na identificação da micobiota das amostras. Através dos dois métodos foi possível observar alguns resultados semelhantes, principalmente no que diz respeito às amostras de uvas viníferas, em que maiores porcentagens de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente da Seção *Nigri*, foram relatados nas amostras em ambas abordagens. Adicionalmente, as amostras de solo de cultivo do vinhedo V2 apresentou maior diversidade em relação a amostra V1, fato confirmado pela análise molecular. Entretanto, houve também resultados distintos entre as análises, uma vez que a técnica de metagenômica apontou maior semelhança entre as variedades das uvas analisadas, enquanto a caracterização morfológica mostrou mais similaridade entre as uvas oriundas do mesmo vinhedo.

As técnicas de identificação de micro-organismos abordadas neste estudo possibilitaram uma melhor compreensão acerca dos micro-organismos que compõem a comunidade fúngica de vinhedos pertencentes a duas vinícolas localizadas no VSMSF, segunda maior região produtora de vinhos finos no país. Tais informações elucidaram ainda mais a questão de como essa diversidade de micro-organismos pode interferir nas uvas e também no produto final. Portanto, a continuidade de estudos com o monitoramento da comunidade microbiana dessas áreas é importante para que se possa descobrir novas espécies, ou mesmo certificar que os mesmos micro-organismos estão se desenvolvendo nesses vinhedos, contribuindo, dessa forma, no esclarecimento sobre a identidade dos vinhedos, bem como o papel que a comunidade

microbiana expressa nos vinhos da região e, assim, possibilitar traçar técnicas e planejamentos agrícolas almejando sempre o bom resultado das colheitas e produtos elaborados com alta qualidade.

Vale ressaltar, dentre todas considerações, que este estudo se configura como pioneiro em avaliar a microbiota *terroir* de vinhedos tropicais da região do VSMSF por meio de técnicas dependentes e independentes de cultivo de micro-organismos, aumento o conhecimento da diversidade fúngica e servindo de base para estudos posteriores nessa área.

8 CONCLUSÕES

Algumas espécies foram identificadas somente por caracterização morfológica nas uvas viníferas, tais como *Aspergillus japonicus*, *A. aculeatus*, *A. flavus*, *Penicillium rugulosum*, *P. westlingii*, e nos solos de cultivo *A. japonicus*, *A. aculeatus*, *A. tamaritii* e *Emericella nidulans*. Pelo método molecular de metagenômica foi possível identificar os fungos *Aspergillus ochraceopetaliformis*, *Penicillium sclerotiorum*, *Curvularia luneta*, *Curvularia eragrostidis*, *Curvularia brachyspora*, *Ulocladium consortiale*, *Erysiphe necator*.

Através dos resultados de análise estatística de PCA observamos uma grande diferença na quantidade de fósforo e potássio nos solos avaliados, sendo relacionados em maiores quantidades ao solo do vinhedo 2. Possivelmente estes nutrientes são fatores relevantes na maior ocorrência das espécies *Aspergillus niger* Agregado, *A. niger*, *A. aculeatus*, *Penicillium citrinum* no solo de cultivo do vinhedo 2. A maior presença de cálcio no solo de cultivo da vinícola 1 também pode ter influenciado na incidência das espécies *Aspergillus japonicus*, *A. carbonarius* e *Penicillium* sp18, que apresentaram maior associação com a amostra de solo do vinhedo 1.

Entre os dois vinhedos de uvas Syrah estudados percebemos maior diversidade de espécies encontradas no vinhedo 2 em comparação com o vinhedo 1 e o predomínio do filo Ascomycota e a classe *Dothideomycetes* em ambos os vinhedos. Além disso os vinhedos apresentaram majoritariamente as ordens *Pleosporales* e *Dothideales* em proporções similares. As analogias presentes nos vinhedos mostram a grande semelhança entre ambos, tal fato pode estar relacionado às características climáticas bem próximas dos vinhedos pertencentes a municípios que compõem a região do VSMSF.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**. 215(3): 403-410, 1990
- GAMERO, Amparo et al. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. **Food microbiology**. v. 60, p. 147-159, 2016
- BAFFI, M. A., et al. Wine aroma improvement using a β -glucosidase preparation from *Aureobasidium pullulans*. **Applied biochemistry and biotechnology**. 169(2): 493-501, 2013
- BARATA, A.; M. MALFEITO-FERREIRA; V. LOUREIRO The microbial ecology of wine grape berries. **International journal of food microbiology**. 153(3): 243-259, 2012
- BARBERIS, M. G., et al. Factors affecting distribution and abundance of *Aspergillus section Nigri* in vineyard soils from grapevine growing regions of Argentina. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94(14): 3001-3007, 2014
- BATTILANI, P., et al. Mapping of *Aspergillus section Nigri* in Southern Europe and Israel based on geostatistical analysis. **International journal of food microbiology**. 111: S72-S82, 2006
- BAU, M., et al. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. **International journal of food microbiology**. 98(2): 125-130, 2005a
- BAU, M., et al. **Ochratoxin A producing fungi from Spanish vineyards**. *Advances in Food Mycology*, Springer: 173-179, 2005b
- BELDA, I., et al. From vineyard soil to wine fermentation: microbiome approximations to explain the “terroir” concept. **Frontiers in microbiology**. 8: 821, 2017
- BELLÍ, N., et al. Mycobiota and ochratoxin A producing fungi from Spanish wine grapes. **International journal of food microbiology**. 111: S40-S45, 2006
- BENSCH, K., et al. The genus *cladosporium*. **Studies in Mycology**. 72: 1-401, 2012
- BENSCH, K., et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. **Studies in Mycology**. 82: 23-74, 2015
- BLAALID, R., et al. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. **Molecular Ecology Resources**. 13(2): 218-224, 2013
- BOKULICH, N. A., et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 111(1): E139-E148, 2014
- BOYNTON, P. J.; D. GREIG Species richness influences wine ecosystem function through a dominant species. **Fungal Ecology**. 22: 61-72, 2016

- CAPORASO, J. G., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**. 7(5): 335, 2010
- CHEN, H.; P. C. BOUTROS VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. **BMC bioinformatics**. 12(1): 35, 2011
- CHIOTTA, M. L., et al. Biodiversity of *Aspergillus* section *Nigri* populations in Argentinian vineyards and ochratoxin A contamination. **Food microbiology**. 36(2): 182-190, 2013
- CIANI, M.; F. COMITINI Non-Saccharomyces wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. **Annals of microbiology**. 61(1): 25-32, 2011
- COCOLIN, L., et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International journal of food microbiology**. 167(1): 29-43, 2013
- DACHOUPAKAN, C., et al. Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. **International journal of food microbiology**. 132(1): 14-23, 2009
- DARRIET, P., et al. Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines. **Journal of agricultural and food chemistry**. 48(10): 4835-4838, 2000
- DAVID, V., et al. High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**. 41(5): 811-821, 2014
- DE FILIPPIS, F.; E. PARENTE; D. ERCOLINI Recent Past, Present, and Future of the Food Microbiome. **Annual review of food science and technology**. 9(1), 2018
- DEGNAN, P. H.; H. OCHMAN Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME journal**. 6(1): 183, 2012
- DE OVALLE, Stefani et al. Production and characterization of a β -glucosidase from *Issatchenkia terricola* and its use for hydrolysis of aromatic precursors in Cabernet Sauvignon wine. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 515-522, 2018.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**. 32(5): 1792-1797, 2004
- EDGAR, R. C., et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**. 27(16): 2194-2200, 2011
- EINLOFT, T. C., et al. Survey of mycobiota, black *Aspergillus* and ochratoxin A occurrence on Brazilian wine grapes. **Annals of microbiology**. 67(1): 59-64, 2016
- EMBRAPA, E. B. D. P. A. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**, Embrapa comunicação para transferência de tecnologia Brasília: 370, 1999
- FERRANTI, L. D. S., et al. Diversity of *Aspergillus* section *Nigri* on the surface of *Vitis labrusca* and its hybrid grapes. **International journal of food microbiology**. 2018

FILTENBORG, O.; J. FRISVAD A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie**. 13(3): 128-130, 1980

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International journal of food microbiology**. 86(1-2): 11-22, 2003

FREIRE, L. **Incidência de ocratoxina A em vinhos e a correlação de fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* com as características físico-químicas de uvas viníferas da região tropical semiárida do Brasil**. 153 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016

FREIRE, L., et al. Influence of physical and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. **International journal of food microbiology**. 241: 181-190, 2017

GARCÍA-CELA, E., et al. Fungal diversity, incidence and mycotoxin contamination in grapes from two agro-climatic Spanish regions with emphasis on *Aspergillus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 95(8): 1716-1729, 2015

GHNAYA-CHAKROUN, A. B., et al. Diploidia seriata two pathogens of Esca and black dead arm diseases of grapevine in the Northern region of the Tunisia. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**. 3(8): 977-987, 2014

GONZÁLEZ, V.; M. L. TELLO The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. **Fungal Diversity**. 47(1): 29-42, 2011

HEENAN, C.; K. SHAW; J. PITT Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates and detection using coconut cream agar. 1998

HERNANDEZ-ORTE, P. et al. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 773-781, 2009

HILLEBRAND, H.; D. M. BENNETT; M. W. CADOTTE Consequences of dominance: a review of evenness effects on local and regional ecosystem processes. **Ecology**. 89(6): 1510-1520, 2008

HOCKING, A. D., et al. Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. **International journal of food microbiology**. 119(1-2): 84-88, 2007

HOFSTETTER, V., et al. What if esca disease of grapevine were not a fungal disease? **Fungal Diversity**. 54(1): 51-67, 2012

JOLLY, N. P.; C. VARELA; I. S. PRETORIUS Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**. 14(2): 215-237, 2014

KAZI, B., et al. **Effects of temperature, moisture and/or irrigation on the survival of *Aspergillus carbonarius* in soil**. Proceedings of 8th International Congress of Plant Pathology, Year

KHOURY, A. E., et al. Fungal contamination and Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Lebanese wine–grapes and musts. **Food and Chemical Toxicology**. 46(6): 2244-2250, 2008

KIZIS, D., et al. Biodiversity and ITS-RFLP characterisation of *Aspergillus* section *Nigri* isolates in grapes from four traditional grape-producing areas in Greece. **PLoS One**. 9(4): e93923, 2014

KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* specie. **Centraalbureau voor schimmelcultures**. 2002

KÖLJALG, U., et al. UNITE: a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi. **New Phytologist**. 166(3): 1063-1068, 2005

KURTZMAN, C. P. *Wickerhamia Soneda* (1960) In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (eds) **The yeasts, a taxonomic study**. 2011

LA GUERCHE, S., et al. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. **Journal of agricultural and food chemistry**. 54(24): 9193-9200, 2006

LANGE, L. The importance of fungi and mycology for addressing major global challenges. **IMA fungus**. 5(2): 463-471, 2014

LEONG, S.-L. L., et al. Australian research on ochratoxigenic fungi and ochratoxin A. **International journal of food microbiology**. 111: S10-S17, 2006

LEONG, S.; A. HOCKING; E. SCOTT *Aspergillus* species producing ochratoxin A: isolation from vineyard soils and infection of Semillon bunches in Australia. **Journal of applied microbiology**. 102(1): 124-133, 2007

LEONG, S.; A. D. HOCKING; J. PITT Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**. 10(1): 83-88, 2004

LEVEAU, J.; J. TECH **Grapevine microbiomics: bacterial diversity on grape leaves and berries revealed by high-throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons**. International Symposium on Biological Control of Postharvest Diseases: Challenges and Opportunities 905, Year

LORENZINI, M., et al. Filamentous fungi associated with natural infection of noble rot on withered grapes. **International journal of food microbiology**. 272: 83-86, 2018

LUCCHETTA, G., et al. Occurrence of black *Aspergilli* and ochratoxin A on grapes in Italy. **Toxins**. 2(4): 840-855, 2010

MACHIDA, M., et al. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. **Nature**. 438(7071): 1157, 2005

MAGNOLI, C., et al. Mycoflora and ochratoxin-producing strains of *Aspergillus* section *Nigri* in wine grapes in Argentina. **Letters in Applied Microbiology**. 37(2): 179-184, 2003

MAGOČ, T.; S. L. SALZBERG FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. **Bioinformatics**. 27(21): 2957-2963, 2011

- MAICAS, Sergi; MATEO, José Juan. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 322-335, 2005
- MARTINEZ-CULEBRAS, P.; D. RAMON An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International journal of food microbiology**. 113(2): 147-153, 2007
- MEDINA VAYA, A., et al. Study of Spanish Grape Mycobiota and Ochratoxin A Production by the Isolates of *Aspergillus tubingensis* and other *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and environmental microbiology**. 71(num. 8): 4696-4702, 2005
- MERÍN, M. G., et al. Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. **Brazilian Journal of Microbiology**. 46(3): 815-823, 2015
- MOREIRA, N., et al. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. **Food control**. 22(5): 662-667, 2011
- NIELSEN, U. N., et al. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. **European Journal of Soil Science**. 62(1): 105-116, 2011
- OLIVERI, C., et al. Grape and environmental mycoflora monitoring in old, traditionally cultivated vineyards on Mount Etna, southern Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 97(1): 65-73, 2016
- PASSAMANI, F. R. F., et al. *Aspergillus* section *Nigri* in grapes cultivated in the tropical winery region of Brazil. **Food and Public Health**. 2(6): 276-280, 2012
- PASSAMANI, F. R. F., et al. Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. **Journal of food protection**. 77(11): 1947-1952, 2014
- PERRONE, G., et al. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. **Applied and environmental microbiology**. 72(1): 680-685, 2006
- PICCOLO, S. L., et al. A simple and rapid DNA extraction method from leaves of grapevine suitable for polymerase chain reaction analysis. **African Journal of Biotechnology**. 11(45): 10305, 2012
- PICKERING, G., et al. Determination of ortho- and retronasal detection thresholds for 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in wine. **Journal of food science**. 72(7), 2007
- PINHEIRO, A. C. M.; C. A. NUNES; V. VIETORIS *SensoMaker*: a tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**. 37(3): 199-201, 2013
- PINTO, C., et al. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. **Frontiers in microbiology**. 6: 905, 2015

PITT, J. A Laboratory Guide to Common Penicillium Species. . **Sydney: Food Science Australia**. 187, 2000

PITT, J.; A. HOCKING **Fungi and food spoilage**. Boston, MA, Springer US, 1997

POLAK, E.; J. PROVASI Odor sensitivity to geosmin enantiomers. **Chemical senses**. 17(1): 23-26, 1992

PONSONE, M. L., et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic Aspergillus species in Argentinean wine grapes cultivated under organic and non-organic systems. **International journal of food microbiology**. 114(2): 131-135, 2007

RANKINE, B. Influence of yeast strain and malo-lactic fermentation on composition and quality of table wines. **American journal of Enology and Viticulture**. 23(4): 152-158, 1972

ROMO-SÁNCHEZ, Sheila et al. Immobilization of β -glucosidase and its application for enhancement of aroma precursors in muscat wine. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 5, p. 1381-1392, 2014

SAGE, L., et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of agricultural and food chemistry**. 50(5): 1306-1311, 2002

SAMSON, R. A., et al. Introduction to food-borne fungi. **4a edição, Centraalbureau Voor Schimmelcultures Baarn Delft**. 2000

SELIN, C., et al. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges. **Frontiers in microbiology**. 7: 600, 2016

SERRA, R.; A. BRAGA; A. VENÂNCIO Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. **Research in Microbiology**. 156(4): 515-521, 2005

SERRA, R., et al. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on Aspergillus and Penicillium species. **Mycological research**. 110(8): 971-978, 2006

SETÄLÄ, H.; M. A. MCLEAN Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. **Oecologia**. 139(1): 98-107, 2004

SETATI, M. E., et al. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **PLoS One**. 7(12): e52609, 2012

SIDDIQUE, M. H. **Study of the biosynthesis pathway of the geosmin in Penicillium expansum**, INPT, 2012

STRAUSS, M., et al. Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-Saccharomyces wine yeasts. **Journal of applied microbiology**. 91(1): 182-190, 2001

SWETT, C. L.; T. BOURRET; W. D. GUBLER Characterizing the brown spot pathosystem in late-harvest table grapes (*Vitis vinifera* L.) in the California Central Valley. **Plant Disease**. 100(11): 2204-2210, 2016

- TAYLOR, D. L., et al. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for Illumina amplicon sequencing. **Applied and environmental microbiology**. 82(24): 7217-7226, 2016
- TAYLOR, M. W., et al. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. **Environmental microbiology**. 16(9): 2848-2858, 2014
- TERRA, M. F., et al. Detection of ochratoxin A in tropical wine and grape juice from Brazil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 93(4): 890-894, 2012
- VAN RENSBURG, Pierre et al. Development and assessment of a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast producing two aroma-enhancing β -glucosidases encoded by the *Saccharomycopsis fibuligera* BGL1 and BGL2 genes. **Ann Microbiol**, v. 55, p. 33-42, 2005
- VARGA, J.; Z. KOZAKIEWICZ Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science & Technology**. 17(2): 72-81, 2006
- VIANA, F., et al. Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International journal of food microbiology**. 135(1): 68-74, 2009
- VISAGIE, C., et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. 78: 343-371, 2014
- WATANABE, M., et al. Rapid and effective DNA extraction method with bead grinding for a large amount of fungal DNA. **Journal of food protection**. 73(6): 1077-1084, 2010
- WEI, Y.-J., et al. High-throughput sequencing of microbial community diversity in soil, grapes, leaves, grape juice and wine of grapevine from China. **PLoS One**. 13(3): e0193097, 2018
- YOUSSEF, N. H.; M. S. ELSHAHED Diversity rankings among bacterial lineages in soil. **The ISME journal**. 3(3): 305, 2009
- ZARRAONAINDIA, I., et al. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **MBio**. 6(2): e02527-02514, 2015
- ZHANG, N.; J. LUO; D. BHATTACHARYA **Advances in Fungal Phylogenomics and Their Impact on Fungal Systematics**. Advances in genetics, Elsevier. 100: 309-328, 2017