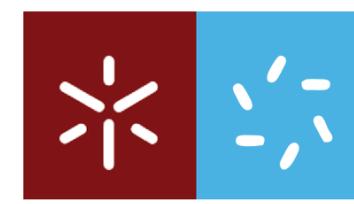


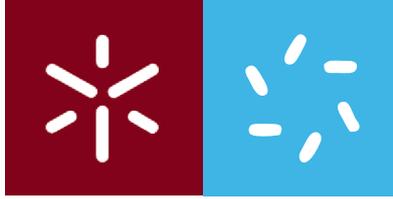


Luis Carlos Moreira Costa

Abordagens bioquímicas e moleculares para compreender o efeito do cálcio na qualidade do bago da uva (*Vitis vinifera* L.) e na sua comunidade microbiana

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luís Carlos Moreira Costa

**Abordagens bioquímicas e moleculares para
compreender o efeito do cálcio na qualidade
do bago da uva (*Vitis vinifera* L.) e na sua
comunidade microbiana**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutora Viviana Maria Varajão Martins
Doutor António da Costa Teixeira

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos. Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição-NãoComercial-Compartilhalgual

CC BY-NC-SA

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

Parte deste trabalho originou a seguinte publicação:

Martins V, Costa L*, Soares R*, Ayogu P, Teixeira A, Gerós H (2021) A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. PLOS One (em revisão).

*estes autores contribuíram de forma equivalente para este trabalho



Este trabalho foi apoiado pelo “Contrato-Programa” UIDB/04050/2020 financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, FCT I.P. O trabalho contou ainda com o apoio da FCT, CCDR-N (Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional do Norte de Portugal) e Fundos Europeus (FEDER/POCI/COMPETE2020) através dos projetos GrapeMicrobiota (PTDC /BAA-AGR/2691/2020), AgriFood XXI (NORTE -01-0145-FEDER-000041), BerryPlastid (PTDC/BIA-FBT/28165/2017 e POCI-01-0145-FEDER-028165) e MitiVineDrought (PTDC /BIA-FBT/30341/2017 e POCI-01-0145-FEDER-030341). Este trabalho beneficiou das atividades em rede do laboratório colaborativo CoLAB VINES & WINES e do projeto Fleurs locales (SOE4/P5/F1011).

AGRADECIMENTOS

Se quero ir longe, tenho de estar acompanhado. A muitos devo um caloroso agradecimento, pela ajuda na conclusão de mais um ciclo desta caminhada terrena.

À Doutora Viviana Martins e ao Doutor António Teixeira, orientadores desta dissertação, além da atenção, disponibilidade e carinho, um grande obrigado por me acolher e guiar os meus primeiros passos, quiçá, de um futuro investigador.

Ao Professor Doutor Hernâni Gerós, um agradecimento especial pela dedicação e ajuda ao longo da realização deste trabalho, bem como a todos os membros do Laboratório de Biologia Vegetal.

A todos os Professores que cruzaram comigo no decorrer do meu percurso académico.

Ao Diogo Silva, aos antigos e aos novos amigos, pelo incentivo e apoio ao longo destes anos.

Por fim, e não menos importante, um agradecimento a toda a minha família, em especial aos meus pais, por todo o amor.

A todos, um afetuoso obrigado.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

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

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

Abordagens bioquímicas e moleculares para compreender o efeito do cálcio na qualidade do bago da uva (*Vitis vinifera* L.) e na sua comunidade microbiana

RESUMO

Os suplementos à base de cálcio têm sido amplamente utilizados para o aumento da firmeza dos frutos e da sua resistência ao stresse abiótico. No entanto, estudos de metabolômica revelaram que o cálcio modifica a composição da película do bago de uva e o perfil volátil do vinho, sugerindo um efeito na microbiota nativa. O objetivo da presente dissertação consistiu em caracterizar o efeito do cálcio na comunidade microbiana cultivável de bagos de uva maduros das castas Loureiro e Vinhão da região DOC Vinhos Verdes, relacionando os resultados com as propriedades bioquímicas e moleculares dos frutos. Foi ainda avaliado o efeito de diversos fatores de stresse abiótico nos diferentes isolados da população microbiana, bem como o perfil de crescimento de espécies de levedura isoladas. Os resultados mostraram que a aplicação de cálcio inibiu a acumulação de antocianinas nos bagos maduros da casta Vinhão, consistente com a repressão da expressão de genes codificantes da chalcona sintase (*CHS3*) e da dihidroflavonol redutase (*DFR*), sem afetar o conteúdo em fenólicos totais e açúcares redutores. Verificou-se que *Aureobasidium pullulans* e *Hanseniaspora uvarum* predominam na superfície de bagos de uva de ambas as castas e que o tratamento com cálcio reduziu a abundância total da microbiota cultivável, afetando a sua diversidade de forma dependente da casta. Ensaio de crescimento das leveduras isoladas mostraram que *A. pullulans* é muito susceptível ao stresse osmótico, ao cálcio e ao cobre, enquanto *Wickerhamomyces anomalus* é a mais tolerante ao etanol, apresentado um metabolismo fermentativo com produção de etanol e de ácido acético. Estes estudos, complementados com abordagens de sequenciação *high throughput*, revestem-se de uma elevada importância científica e aplicada uma vez que abrem caminho, por exemplo, à produção de vinhos com um *terroir* específico, produzidos por fermentação com estirpes nativas, ou à identificação de leveduras com atividade antagonista sobre o crescimento de fungos filamentosos patogénicos, permitindo a sua otimização em estratégias de biocontrolo.

Palavras-chave: Bago de uva, Cálcio, Microbiota cultivável, Stresse osmótico, *Vitis vinifera* L.

Biochemical and molecular approaches to understand the effect of calcium on the quality of the grape berry (*Vitis vinifera* L.) and of its microbial community

ABSTRACT

Calcium-based supplements have been widely used to increase fruit firmness and resistance to abiotic stress. However, metabolomics studies revealed that calcium modifies the composition of the grape berry skin and the volatile profile of wine, suggesting an effect on the native microbiota. The aim of this dissertation was to characterize the effect of calcium on the cultivable microbial community of mature grape berries of the Loureiro and Vinhão varieties from the DOC region Vinhos Verdes, relating the results to the biochemical and molecular properties of the fruits. The effect of different abiotic stress factors on different isolates from the microbial population was also evaluated, as well as the growth profile of isolated yeast species. The results showed that the application of calcium inhibited the accumulation of anthocyanins in the mature berries of the Vinhão variety, consistent with the repression of the expression of genes encoding chalcone synthase (*CHS3*) and dihydroflavonol 4-reductase (*DFR*), without affecting the content of total phenolics and reducing sugars. It was observed that *Aureobasidium pullulans* and *Hanseniaspora uvarum* predominate on the surface of grape berries of both varieties and that the calcium treatment reduced the total abundance of the cultivable microbiota, affecting its diversity in a variety-dependent manner. Growth assays of isolated yeasts showed that *A. pullulans* is very susceptible to osmotic stress, calcium and copper, while *Wickerhamomyces anomalus* is the most tolerant to ethanol, presenting a fermentative metabolism with ethanol and acetic acid production. These studies, complemented with high-throughput sequencing approaches, are of high scientific and applied relevance as they pave the way, for example, to the production of wines with a specific terroir, produced by fermentation with native strains, or the identification of yeasts with antagonistic activity on the growth of pathogenic filamentous fungi, allowing their optimization in biocontrol strategies.

Keywords: Calcium, Cultivable microbiota, Grape berry, Osmotic stress, *Vitis vinifera* L.

ÍNDICE

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO POR TERCEIROS.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iv
DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O cultivo da videira e a produção de vinho num contexto de alterações climáticas.....	1
1.2. Desenvolvimento e maturação do bago de uva.....	2
1.3. Aplicação exógena do cálcio na vinha.....	7
1.3.1. Efeito da aplicação de cálcio na firmeza dos frutos.....	7
1.3.2. Efeito do cálcio na composição fenólica do bago de uva.....	9
1.3.3. Efeito do cálcio no perfil volátil dos vinhos.....	11
1.4. A microbiota do bago de uva e do vinho e os fatores que modelam a sua diversidade.....	12
1.5. Efeito do cálcio na microbiota do bago de uva.....	15
1.6. Hipóteses e objetivos.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Tratamentos da vinha e recolha dos bagos de uva.....	17
2.2. Quantificação de parâmetros bioquímicos-chave do bago de uva: açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas.....	17
2.3. Estudo da expressão de genes do metabolismo secundário por PCR em tempo real (qPCR).....	18
2.4. Isolamento da microbiota do bago de uva.....	19
2.5. Identificação de leveduras.....	19
2.6. Efeito de fatores de stresse no crescimento das leveduras.....	20
2.7. Curvas de crescimento em glicose e avaliação da produção de etanol e ácido acético.....	21

3. RESULTADOS.....	22
3.1. Efeito do cálcio no teor de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais no bago de uva.....	22
3.2. Efeito do cálcio na expressão de genes-chave da via de biossíntese das antocianinas.....	23
3.3. Efeito do cálcio na comunidade microbiana cultivável do bago de uva.....	24
3.4. Avaliação do efeito de fatores de stresse no crescimento de diferentes espécies de levedura.....	31
3.5. Perfil de crescimento de espécies de levedura selecionadas.....	34
4. DISCUSSÃO.....	36
4.1. O cálcio diminui a acumulação de antocianinas no bago de uva, sem afetar níveis de açúcares e fenólicos totais.....	36
4.2. As espécies <i>H. uvarum</i> e <i>A. pullulans</i> prevalecem na comunidade microbiana cultivável dos bagos de uva Loureiro e Vinhão, enquanto que <i>S. cerevisiae</i> não é detetável.....	37
4.3. O cálcio diminui a abundância de leveduras na superfície do bago de uva, afetando diferentes espécies de forma dependente da casta.....	39
4.4. <i>A. pullulans</i> destaca-se na sua elevada sensibilidade ao cobre e ao stresse osmótico.....	41
4.5. Potencial biotecnológico das espécies <i>R. glutinis</i> e <i>W. anomalus</i>	42
4.6. Conclusão.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

μ - Taxa específica de crescimento

4CL - 4-coumaroil: CoA-ligase

AFM - Microscopia de força atômica, do inglês “atomic force microscopy”

ANR - Antocianidina redutase

C4H - Cinamato-4-hidroxilase

Ca - Cálcio

CHI - Chalcona isomerase

CHS - Chalcona sintase

D.O. - Densidade Ótica

DFR - Dihidroflavonol 4-redutase

DP - Desvio padrão

F3'5'H - Flavonóide 3', 5'-hidroxilase

F3'H - Flavonóide 3'-hidroxilase

F3H - Flavanona-3-hidroxilase

FLS - Flavonol sintase

GC-FID - Cromatografia gasosa-deteção por ionização de chama, do inglês “gas chromatography-flame ionization detection”

GC-MS - Cromatografia gasosa-espectrometria de massa, do inglês “gas chromatography-mass spectrometry”

ITS - Internal transcribed spacer

LAR - Leucoantocianidina redutase

LDOX - Leucoantocianidina dioxigenase

NS - Leveduras não-Saccharomyces

OMT - O-metiltransferase

PAL - Fenilalanina amônia liase

PF – Peso Fresco

PGs - Poligalacturonases

PLs - Pectato liases

PMEs - Pectina metilesterases

rpm - Rotações por minuto

STS - Estilbeno sintase

Td - Tempo de duplicação celular

UFGT - Flavonóide glucosiltransferase

WL - Meio diferencial Wallerstein

WSP - Pectina solúvel em água

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa das principais regiões vitivinícolas de Portugal. Adaptado de Infovini (2020).....1
- Figura 2.** Estrutura de um bago de uva maduro. Adaptado de Coxhead (2015).....3
- Figura 3.** Curva dupla-sigmóide de crescimento do bago de uva. Adaptado de Coombe e McCarthy (2000).....4
- Figura 4.** Vias de biossíntese de compostos secundários do bago de uva. Fenilalanina amónia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), 4-coumaroil: CoA-ligase (4CL), estilbeno sintase (STS), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H), flavonóide 3', 5'-hidroxilase (F3'5'H), flavanona-3-hidroxilase (F3H), flavonol sintase (FLS), dihidroflavonol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), dihidroflavonol 4-redutase (DFR), flavonóide glucosiltransferase (UFGT), O-metiltransferase (OMT). Adaptado de Teixeira *et al.* (2013).....6
- Figura 5.** Imagens de microscopia de força atómica (AFM) de pectina solúvel em água (WSP). **(A)** corte transversal de frutos frescos de jujuba (Controlo); **(B)** frutos submetidos a impregnação a vácuo (VI) com uma solução isotónica de sacarose (56 dias); **(C)** jujubas submetidas a VI, tratadas com CaCl₂ (56 dias); **(D)** frutos sujeitos a VI, tratadas com PMEs (56 dias); **(E)** jujubas subordinadas a VI, com CaCl₂ e PMEs (56 dias); Área de varrimento: 5.000µm×5.000µm. Lc: longas cadeias retas; Sc: cadeias curtas; Br: cadeias ramificadas; P: estrutura do polímero. Adaptado de Zhang *et al.* (2019).....8
- Figura 6.** Efeito da aplicação exógena de cálcio nas propriedades físicas, bioquímicas e moleculares do bago de uva. A direção das setas indica o aumento ou diminuição de cada um dos parâmetros. Adaptado de Martins *et al.* (2020b).....9
- Figura 7.** Efeito da aplicação de cálcio no conteúdo de polifenóis e aminoácidos do bago de uva. O sentido das setas verticais indica o aumento ou diminuição de cada um dos metabolitos ou classe de metabolitos e da expressão dos genes alvo de estudo. Adaptado de Martins *et al.* (2020a).....10
- Figura 8.** Desenho experimental do estudo do efeito do cálcio nos perfis voláteis do vinho, bem como o seu efeito nos níveis de metabolitos. Adaptado de Martins *et al.* (2020c).....11
- Figura 9.** Microscopia eletrónica da superfície de bagos de uva maduros de plantas controlo (- Ca) ou tratadas com cálcio (+ Ca). Adaptado de Martins *et al.* (2020b).....15
- Figura 10.** Parâmetros bioquímicos em bagos de uva maduros de videiras das castas Loureiro e Vinhão pulverizadas com cálcio ou sem tratamento (controlo) durante toda a fase de

frutificação. Os resultados indicam a média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras controlo e tratadas com cálcio estão indicadas com asteriscos: ***, $P \leq 0.001$ ($n = 3$). Valores abaixo do limite de deteção estão assinalados com n.d.....23

Figura 11. Expressão de genes do metabolismo secundário em bagos de uva maduros de videiras cv. Vinhão pulverizadas com cálcio ou sem tratamento (controlo), durante toda a fase de frutificação. Os níveis de transcritos foram avaliados para os genes codificantes das enzimas fenilalanina amónia-liase (*PAL1*), chalcona sintase (*CHS3*), dihidroflavonol redutase (*DFR*), leucoantocianidina dioxigenase (*ANS*) e UDP-glicose: flavonóide-3-O-glucosiltransferase (*UFGT*). A expressão foi normalizada pelos níveis de transcrição do gene de referência GAPDH codificante da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Os resultados indicam a média \pm DP e os asteriscos denotam as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras controlo e tratadas com cálcio: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$ ($n = 4$).....24

Figura 12. Colónias de levedura obtidas a partir da solução de lavagem de bagos de uva controlo e tratados com cálcio, das castas Loureiro e Vinhão, após 5 dias de crescimento em meio de cultura diferencial WL. Imagens representativas de 3 réplicas biológicas.....25

Figura 13. Número de colónias de levedura obtidas em 40 μ l da solução de lavagem de bagos controlo e tratados com cálcio, das castas Vinhão e Loureiro. Os valores apresentados representam a média \pm DP dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.....26

Figura 14. Produtos de PCR da região ITS de diferentes isolados de levedura (1-16) **(A)** e dos isolados nº 1, 12 e 13 **(B)** visualizados em géis de agarose 1% (m/v). Poço M: marcador de pesos moleculares.....27

Figura 15. Catálogo de diferentes espécies de levedura obtidas da superfície de bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada taxa são mostradas fotografias do aspeto macroscópico **(A)** e microscópico **(B - DIC)**; a escala corresponde a 10 μ m.....29

Figura 16. Efeito do cálcio na abundância e diversidade de espécies de levedura da superfície de bagos de uva das castas Vinhão e Loureiro. Os resultados representam a média dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.....30

Figura 17. Efeito do cálcio no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a $D.O_{600nm}$ na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos

para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).....31

Figura 18. Efeito do etanol no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a $D.O_{600nm}$ na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).....32

Figura 19. Efeito do cobre no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a $D.O_{600nm}$ na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).....33

Figura 20. Efeito do PEG₆₀₀₀ no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a $D.O_{600nm}$ na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).....34

Figura 21. Avaliação do crescimento celular, consumo de glicose, produção de etanol e de ácido acético de *R. glutinis*, *W. anomalous* e *S. cerevisiae*, a 24 °C em meio mineral suplementado com 2% de glicose como fonte única de carbono, e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Evolução da microbiota da superfície do bago de uva ao longo do seu desenvolvimento. Adaptado de Renouf <i>et al.</i> (2005).....	13
Tabela 2. Genes e respectivos conjuntos de primers usados em qPCR.....	18
Tabela 3. Ciclos de PCR usados para amplificação da região ITS, segundo o método de Stringini <i>et al.</i> (2008).....	19
Tabela 4. Espécies identificadas por <i>Blast</i> das sequências ITS amplificadas, no programa BLASTN do NCBI.....	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. O cultivo da videira e a produção de vinho num contexto de alterações climáticas

Pela sua relevância na indústria do vinho, a videira (*Vitis vinifera* L.) é das espécies frutícolas mais importantes ao nível mundial. Atualmente, ocupa mais de 7,5 milhões de ha de área de cultivo global, produzindo 77,8 milhões de t de uvas, 57% das quais usadas para vinificação, 36% para consumo fresco (uvas de mesa) e 7% para a produção de uvas passas (OIV, 2016). A domesticação da videira terá ocorrido há cerca de 6000 anos na região do Cáucaso e do mar Cáspio (Kunkee e Goswell, 1996; revisto por Conde *et al.*, 2007), a partir do seu ancestral selvagem *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris* (Terral *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2014). Na Península Ibérica terá sido introduzida pelos romanos há cerca de 2800 anos, o que conduziu à expansão da vitivinicultura para a Europa ocidental (Arroyo-Garcia *et al.*, 2006; Veloso *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013). Apesar de existirem diferentes espécies com o género *Vitis*, *Vitis vinifera* é a espécie usada globalmente para produzir vinho. Em Portugal estão descritas diversas castas autóctones, contemplando um total de 240 (Mamaot, 2012; Cunha *et al.*, 2016). Segundo dados de 2016 da Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), a área total de plantação de vinha em Portugal é de 195 284 ha, correspondente a uma produção de uva fresca de 800 738 t e a uma produção de vinho de 6 010 milhões de hl. As principais regiões vitivinícolas portuguesas estão apresentadas na **Fig. 1**.

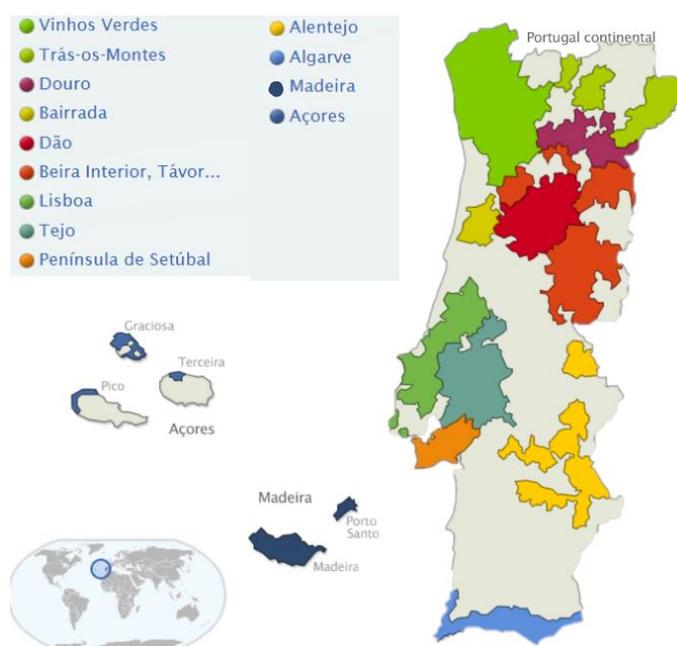


Fig. 1. Mapa das principais regiões vitivinícolas de Portugal. Adaptado de Infovini (2020).

No contexto das alterações climáticas em curso, o cultivo sustentável da videira e a produção de vinho enfrentam importantes desafios. Com efeito, fatores de stresse abiótico, como ondas de calor ou seca, e biótico, como doenças ou pragas, limitam seriamente a produtividade e a qualidade do fruto e do vinho, revestindo-se também de dimensões preocupantes ao nível ambiental porque requerem a aplicação de quantidades crescentes de agroquímicos. (Easterling *et al.*, 2000; Chuine *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2012). Por exemplo, estes fatores ambientais influenciam o desenvolvimento e composição química do bago de uva, nomeadamente ao nível do metabolismo dos compostos fenólicos (Jones *et al.*, 2005; White *et al.*, 2006; revisto por Teixeira *et al.*, 2013). Nesse sentido, têm sido testadas com sucesso práticas agrícolas inovadoras baseadas em estudos científicos, como a irrigação sustentável (irrigação deficitária) (Keller, 2004; Costa *et al.*, 2016), métodos de poda ou de desfolha que possam, por exemplo, reduzir a área foliar sem comprometer a produtividade (Gatti *et al.*, 2015), aplicação de cobertos vegetais nas entrelinhas (Steinmaus *et al.*, 2008), bem como a aplicação exógena de compostos bioativos, incluindo suplementos à base de cálcio (Conde *et al.*, 2018; Martins *et al.*, 2020ab). Com efeito, a aplicação exógena de suplementos à base de cálcio constitui uma abordagem promissora e ecologicamente sustentável, em alternativa aos fungicidas de síntese, proporcionando maior segurança aos consumidores e ao meio ambiente (Martins *et al.*, 2020a).

1.2. Desenvolvimento e maturação do bago de uva

O bago de uva é formado por três tecidos principais, a saber, a película, a polpa e a semente (**Fig. 2**). Durante o seu desenvolvimento este sofre modificações no tamanho, composição, cor, textura, sabor e suscetibilidade a agentes patogénicos (revisto por Conde *et al.*, 2007). O crescimento do bago de uva, como o de muitos frutos drupáceos, é descrito por uma curva dupla-sigmóide (**Fig. 3**) (Coombe e Hale, 1973).

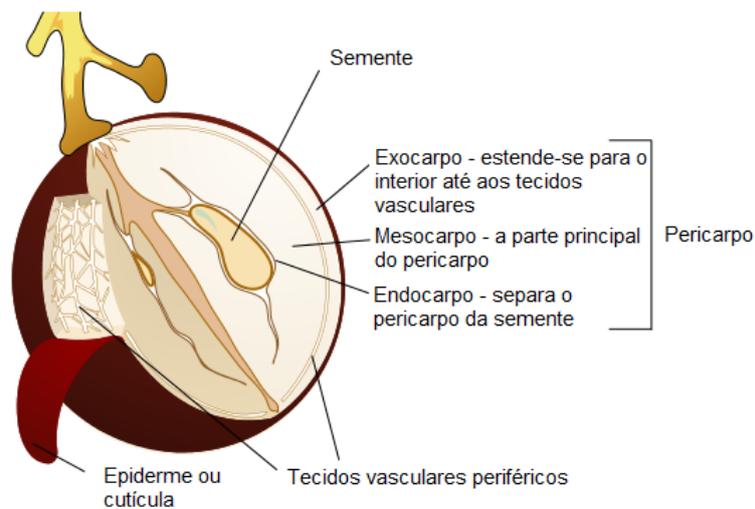


Fig. 2. Estrutura de um bago de uva maduro. Adaptado de Coxhead (2015).

A primeira fase de crescimento ocorre desde a frutificação à custa de um crescimento celular rápido durante ca. 1,5 meses e precede uma fase de latência (revisto por Conde *et al.*, 2007). No final da fase de latência ocorre o pintor (ou *veraison* em francês), marcado pela mudança de cor, acidez, textura e concentração de açúcares do bago, antecipando a maior mudança do seu desenvolvimento com o início da fase de maturação, durante a qual o bago cresce essencialmente por expansão celular (Coombe e Hale, 1973). Durante o amadurecimento, os bagos tornam-se pulposos, menos ácidos e mais doces, e fortemente aromáticos.

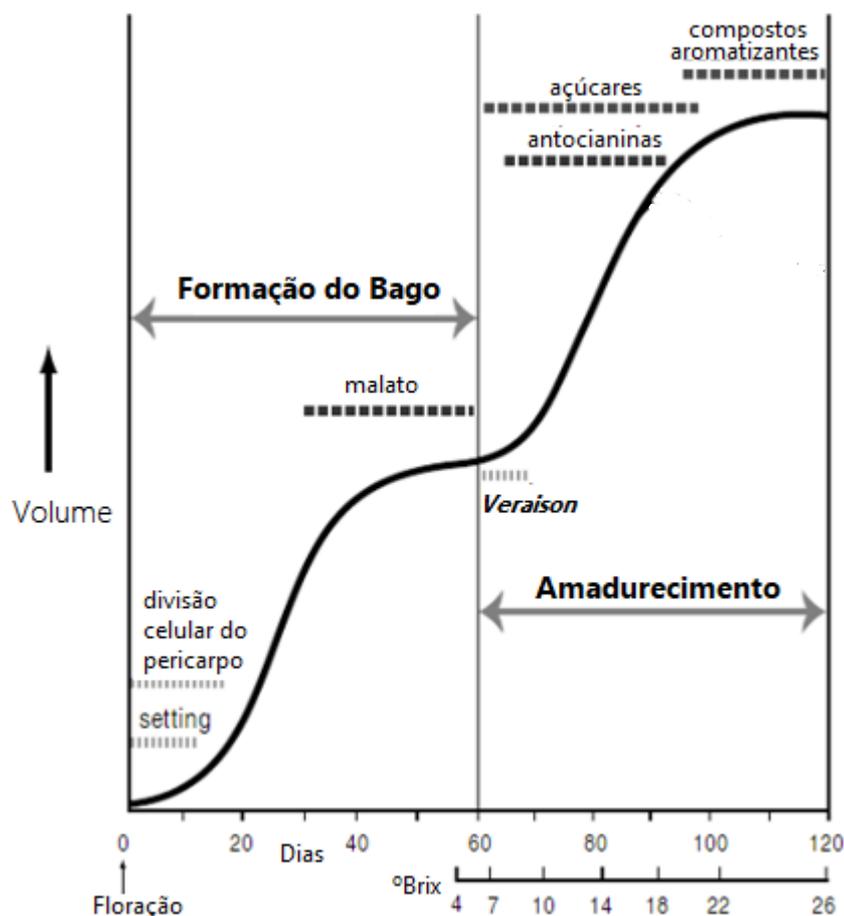


Fig. 3. Curva dupla-sigmoide de crescimento do bago de uva. Do *setting* até à fase de pintor (*veraison*), o volume dos bagos aumenta derivado da divisão celular no pericarpo durante as primeiras três semanas, sendo o malato o principal soluto acumulado. Da fase pintor (*veraison*) até ao final do amadurecimento, os frutos perdem rigidez e aumentam de volume, devido à acumulação de água, de açúcares, de antocianinas e de compostos aromáticos. Adaptado de Coombe e McCarthy (2000).

Do ponto de vista bioquímico, vários solutos são formados em fases específicas de crescimento da uva. Na primeira fase de crescimento, os ácidos tartárico e málico são os compostos dominantes: o ácido tartárico é acumulado nas zonas mais periféricas dos bagos; em contrapartida, a acumulação do ácido málico ocorre no endocarpo e mesocarpo. Estes ácidos são responsáveis pela acidez do fruto, que é essencial para a qualidade do vinho. Os ácidos hidroxicinâmicos, também são acumulados neste período inicial, distribuindo-se pela polpa e cutícula, sendo os precursores de fenólicos voláteis (Romeyer *et al.*, 1983). Os taninos presentes na cutícula e nos tecidos das sementes, também são produzidos nesta fase, onde ocorre também a acumulação de muitos outros solutos, incluindo minerais e aminoácidos, e outros compostos aromáticos detalhados posteriormente. (revisto por Conde *et al.*, 2007). Foi demonstrado que os

taninos são afetados pelo ensombramento dos frutos, portanto pela redução da exposição à luz ou pela exposição a temperaturas mais baixas que os frutos expostos (Downey *et al.*, 2004; Cortell e Kennedy, 2006; Kennedy *et al.*, 2007; Nicholas *et al.*, 2011).

O decréscimo da concentração de ácido tartárico observado na segunda fase de crescimento é atribuído ao efeito de diluição, uma vez que o volume dos bagos aumenta devido à elevada acumulação de água. Por outro lado, a redução da concentração de ácido málico após o pintor resulta do seu metabolismo e degradação enzimática, muito dependente da temperatura ambiente. Em geral, frutos amadurecidos a temperaturas mais baixas (como na região dos vinhos verdes) apresentam uma acidez total superior a frutos amadurecidos a temperaturas superiores (como na região do Douro ou Alentejo), essencialmente resultante de variações na quantidade de ácido málico (Dokoozlian, 2000).

Para suportar o seu desenvolvimento, os bagos de uva dependem de recursos energéticos disponíveis em hidratos de carbono, principalmente sacarose que é importada dos tecidos fotossintéticos e convertida em glicose e frutose no fruto (revisto por Conde *et al.*, 2007). Em comparação com outros frutos, o bago de uva acumula elevadas concentrações de açúcares durante o amadurecimento (ca. 25% do peso fresco (PF) do bago de uva) (Dokoozlian, 2000). O teor em açúcar é um indicador usado frequentemente para avaliar a época ideal da colheita, porque permite prever o teor alcoólico do vinho. Além dos açúcares, outros constituintes influenciam fortemente a qualidade do vinho, como os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos do bago, são constituídos por um anel fenólico como estrutura principal com um grupo hidroxilo, ou com variados grupos de substituição (revisto por Conde *et al.*, 2007). Estes compostos constituem um dos parâmetros de qualidade mais importantes dos vinhos, uma vez que contribuem para as características organolépticas do vinho, como a cor, adstringência, amargor e aroma (revisto por Monagas *et al.*, 2005). São eles os responsáveis pelos benefícios do consumo de uvas e de vinho para a saúde, em quantidades moderadas, atuando, por exemplo, como agentes antioxidantes (Teissedre *et al.*, 1996; Dokoozlian, 2000). Num estudo recente publicado na *Nature Metabolism* foi reportado que o flavonóide procianidina C1 presente em extratos de semente do bago aumenta o tempo de vida de ratos através da sua ação sobre células senescentes (Xu *et al.*, 2021).

Os compostos fenólicos do bago de uva são classificados como não flavonóides (com um esqueleto C6 simples; incluem ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, fenóis voláteis e estilbenos) e flavonóides (incluem flavonas, flavonóis, flavanonas, flavano-3-óis e antocianinas). A

biossíntese de fenólicos solúveis (**Fig. 4**) é iniciada com o aminoácido aromático fenilalanina, um produto da via do chiquimato que ocorre no cloroplasto (revisto por Teixeira *et al.*, 2013).

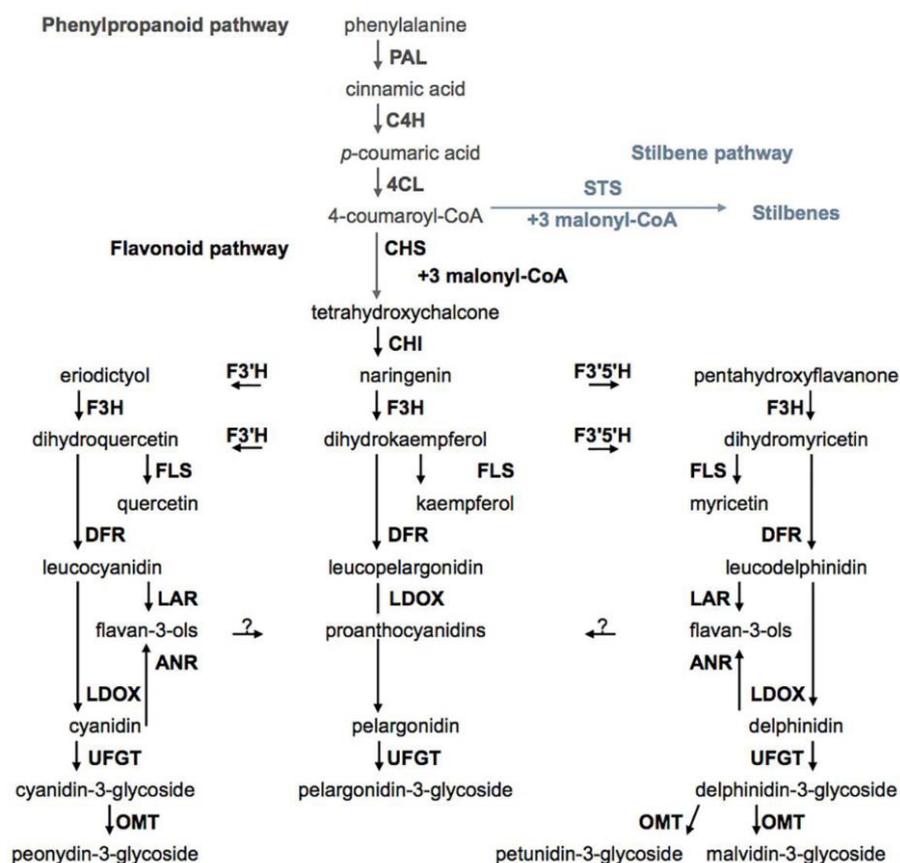


Fig. 4. Vias de biossíntese de compostos secundários do bago de uva. Fenilalanina amônia liase (PAL), cinamato-4-hidroxilase (C4H), 4-coumaroil: CoA-ligase (4CL), estilbeno sintase (STS), chalcona sintase (CHS), chalcona isomerase (CHI), flavonóide 3'-hidroxilase (F3'H), flavonóide 3', 5'-hidroxilase (F3'5'H), flavanona-3-hidroxilase (F3H), flavonol sintase (FLS), dihidroflavonol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), antocianidina redutase (ANR), leucoantocianidina dioxigenase (LDOX), dihidroflavonol 4-redutase (DFR), flavonóide glucosiltransferase (UFGT), O-metiltransferase (OMT). Adaptado de Teixeira *et al.* (2013).

O teor de estilbenos do bago, como o resveratrol, varia entre castas (Gatto *et al.*, 2008) e normalmente a sua síntese aumenta com a infecção por patógenos e em resposta ao stresse abiótico (Bavaresco *et al.*, 2015). Os flavano-3-óis são a classe mais abundante de fenólicos no bago de uva (Singleton, 1992), possuindo uma estrutura monomérica (catequina) ou polimérica, conhecida como proantocianidinas ou taninos condensados. Os flavonóis, como a quercetina, caracterizam-se pela hidroxilação do anel B nas posições C-3' e C-4' e são abundantes nas células dérmicas do bago. A quercetina comporta-se como protetor UV e desempenha um papel na co-

pigmentação do fruto, juntamente com as antocianinas (Aherne *et al.*, 2002; Braidot *et al.*, 2008). As antocianinas são flavonóides que se caracterizam como glicosídeos e acilglicosídeos de antocianidinas. A malvidina-3-*O*-glucosídeo é geralmente a mais abundante antocianina do bago, juntamente com as suas formas aciladas (revisto por Teixeira *et al.*, 2013).

1.3. Aplicação exógena do cálcio na vinha

O cálcio é um elemento essencial que regula vários processos celulares básicos nos tecidos do bago de uva, como principal mensageiro secundário da célula, incluindo a divisão celular e o crescimento dos meristemas, atuando também em sistema de antiporte de aniões orgânicos e inorgânicos ao nível da membrana do vacúolo (Tuteja e Mahajan, 2007). Além disso, o cálcio desempenha um papel central na integridade das paredes celulares, uma vez que medeia ligações cruzadas entre as moléculas de pectina. Este elemento desempenha então um papel central na resposta das plantas ao stresse biótico e abiótico (incluindo ataque de patógenos e intensidade luminosa), crescimento e remodelação da parede celular e desenvolvimento de tecidos vegetais (Hocking *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2020b). Durante o seu amadurecimento o bago de uva torna-se pulposo. Este fenómeno deve-se à degradação da parede celular por enzimas hidrolíticas, incluindo pectato liases (PLs), poligalacturonases (PGs) e pectina metilesterases (PMEs) (Draye e Van Cutsem, 2008). Alguns microrganismos envolvidos na degradação da parede celular das plantas, como fungos e bactérias patogénicas, expressam PMEs que removem grupos metilo das pectinas para facilitar a invasão (Videcoq *et al.*, 2011).

1.3.1. Efeito da aplicação de cálcio na firmeza dos frutos

Fatores de stresse abiótico, como chuvas intensas na altura da vindima, são particularmente críticos em castas cujo bago de uva possui uma película fina. O aumento do teor em água causa o rachamento da película e conduz à diluição de compostos, como os aromas. Em paralelo, a rutura da película torna o bago mais propenso à infeção por fungos, antes e após a colheita, traduzindo-se em perdas económicas significativas (Martins *et al.*, 2018). Com efeito, dada a crescente necessidade de preservação da qualidade de produtos frescos, o cálcio tem sido utilizado como suplemento pós-colheita, a fim de prolongar o seu tempo de vida em prateleira e aumentar o seu valor nutricional. O efeito de aplicações exógenas de cálcio no período de pré-colheita foi testado em mamão, cereja, maçã, morango, kiwi e uvas de mesa, tendo sido obtidos resultados distintos em termos de aumento de firmeza dos frutos (Siddiqui e Bangerth, 1995;

Wójcik e Lewandowski, 2003; Antunes *et al.*, 2004; Bonomelli e Ruiz, 2010; Wójcik e Borowik, 2013; Madani *et al.*, 2016). Estudos recentes debruçaram-se sobre o efeito da aplicação exógena de cálcio e de enzimas PME na qualidade do fruto e na organização das pectinas das paredes celulares em jujuba (Zhang *et al.*, 2019). As PMEs catalisam a desesterificação de ésteres metílicos de pectina ao promoverem a combinação de Ca^{2+} com o carbono 6 não esterificado em resíduos de ácido galacturónico, aumentando a estabilidade da pectina (Anesi *et al.*, 2017). Recorrendo a microscopia de força atômica (AFM), foi possível observar que as moléculas de pectina solúvel em água (WSP) se encontram agregadas, formando grandes polímeros ou blocos, sendo que foram observadas apenas algumas cadeias lineares (**Fig. 5A**). Em frutos tratados com cálcio, PMEs ou Ca+PMEs, foram observadas cadeias lineares longas com estruturas ramificadas (**Fig. 5C-E**). Estes resultados sugerem que as moléculas de pectina despolimerizaram durante o amadurecimento. No entanto, as amostras tratadas com cálcio + PMEs, previnem a despolimerização da pectina.

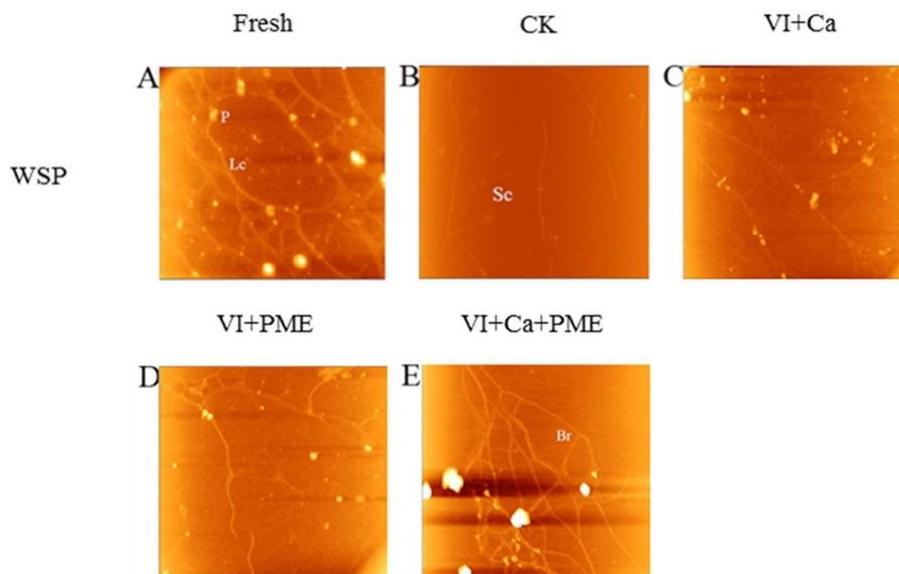


Fig. 5. Imagens de microscopia de força atômica (AFM) de pectina solúvel em água (WSP). **(A)** corte transversal de frutos frescos de jujuba (Controlo); **(B)** frutos submetidos a impregnação a vácuo (VI) com uma solução isotónica de sacarose (56 dias); **(C)** jujubas submetidas a VI, tratadas com CaCl_2 (56 dias); **(D)** frutos sujeitos a VI, tratadas com PMEs (56 dias); **(E)** jujubas subordinadas a VI, com CaCl_2 e PMEs (56 dias); Área de varrimento: $5.000\mu\text{m}\times 5.000\mu\text{m}$. Lc: longas cadeias retas; Sc: cadeias curtas; Br: cadeias ramificadas; P: estrutura do polímero. Adaptado de Zhang *et al.* (2019).

Os autores concluíram que o tratamento de cálcio juntamente com PME constitui uma técnica promissora para preservar a qualidade do fruto, tendo sido obtidos efeitos positivos na manutenção da firmeza, e conseqüentemente, na prevenção da degradação dos frutos.

Estudos recentes em videiras da casta Vinhão demonstraram que a aspersão de CaCl_2 a 2% (m/v) durante a frutificação aumentou a concentração de cálcio na cutícula do fruto maduro e a firmeza dos frutos, confirmando a eficácia deste composto em bagos de uva (Martins *et al.*, 2020b) (**Fig. 6**). Em paralelo, os resultados mostraram que aplicação do cálcio conduziu à inibição da expressão de genes que controlam a degradação da pectina (*PG1*, *PG2*), expansão da parede celular (*EXP6*) e estrutura da cutícula (*CER9*, *CYP15*) (Martins *et al.*, 2020b).

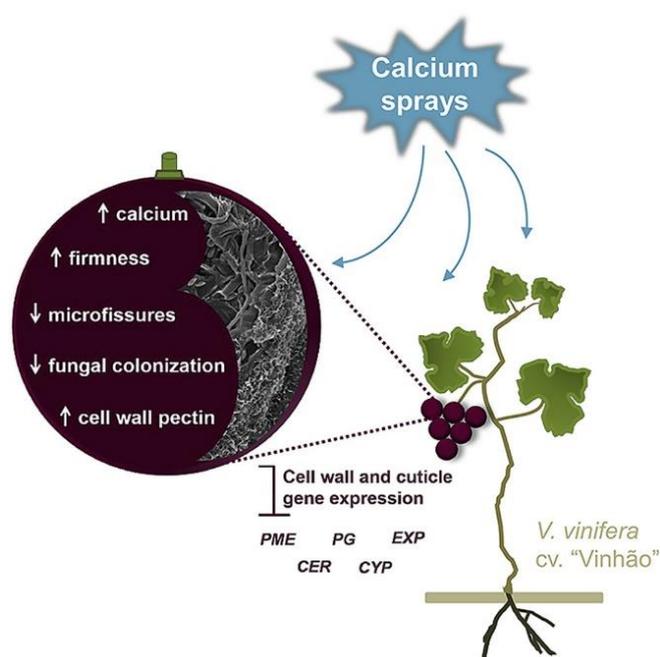


Fig. 6. Efeito da aplicação exógena de cálcio nas propriedades físicas, bioquímicas e moleculares do bago de uva. A direção das setas indica o aumento ou diminuição de cada um dos parâmetros. Adaptado de Martins *et al.* (2020b).

1.3.2. Efeito do cálcio na composição fenólica do bago de uva

Além de modelar a firmeza dos frutos, estudos recentes demonstraram que a aplicação exógena de cálcio modifica o conteúdo de polifenóis do bago de uva, como os ácidos fenólicos, estilbenóides (como o resveratrol), os flavano-3-óis (como as catequinas), os flavonóis (incluindo a quercetina) e antocianinas (incluindo a malvidina-3-*O*-glicosídeo), e modifica também os níveis de aminoácidos aromáticos (como a fenilalanina). Os resultados sugeriram que o cálcio atua na regulação de vias metabólicas, em vez de desviar o metabolismo para novas vias alternativas

(Martins *et al.*, 2020a). Foram ainda estabelecidas correlações positivas ou negativas entre os níveis de metabolitos e os níveis de expressão de genes-chave que codificam enzimas dos principais ramos metabólicos (**Fig. 7**). Por exemplo, o aumento da expressão de *PAL1*, gene que codifica a fenilalanina amônia liase, foi associado com a diminuição dos níveis do substrato da enzima, a L-fenilalanina. Foi observado que o cálcio aumenta a expressão do gene *STS* (que codifica a enzima estilbeno sintetase) e reduz o número de transcritos do gene *CHS3* (que codifica a enzima chalcona sintetase), o que permitiu explicar o aumento da concentração de estilbenóides em detrimento da biossíntese de flavonóides, uma vez que *STS* e *CHS* competem pelo mesmo substrato (revisto por Teixeira *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2020a). A redução em resposta ao cálcio dos níveis de transcritos do gene *UFGT*, que codifica a enzima UDP-glicose:flavonóide-3-*O*-glucosiltransferase, envolvida no passo limitante da síntese de antocianinas, também se correlacionou com a diminuição observada dos níveis de malvidina-3-*O*-glicosídeo. Em paralelo, a aplicação exógena de cálcio provocou uma diminuição consistente da concentração de aminoácidos do bago e promoveu o aumento de ácidos fenólicos e flavonóis. Os níveis de flavano-3-óis foram afetados pelo cálcio de forma dependente da fase de desenvolvimento do fruto (Martins *et al.*, 2020a).

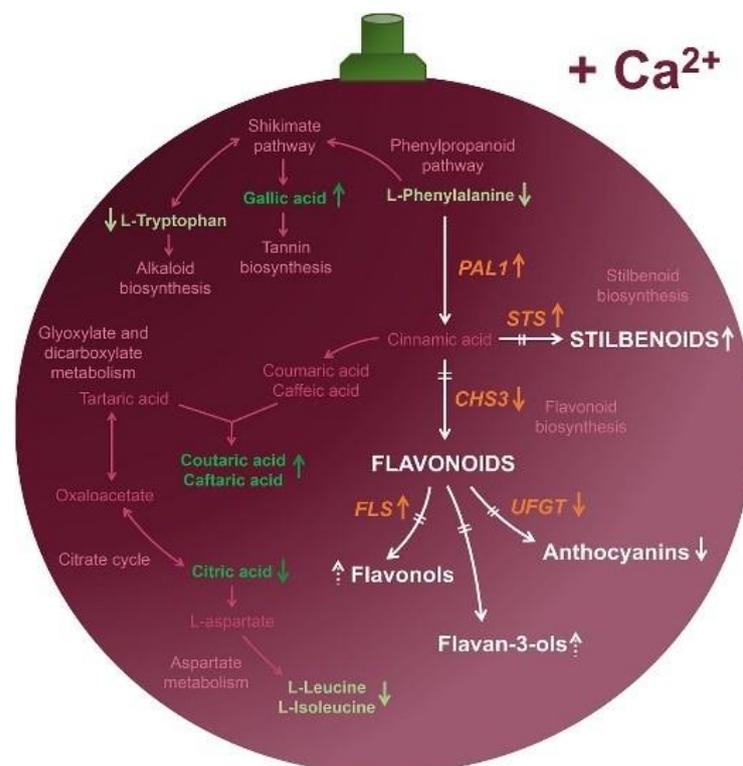


Fig. 7. Efeito da aplicação de cálcio no conteúdo de polifenóis e aminoácidos do bago de uva. O sentido das setas verticais indica o aumento ou diminuição de cada um dos metabolitos ou classe de metabolitos e da expressão dos genes alvo de estudo. Adaptado de Martins *et al.* (2020a).

1.3.3. Efeito do cálcio no perfil volátil dos vinhos

Estudos recentes do nosso grupo de investigação (Martins *et al.*, 2020c) dedicaram-se também à avaliação do efeito da aplicação exógena do cálcio na vinha na qualidade do vinho, por ter sido observado em estudos anteriores que o cálcio afeta acentuadamente o perfil polifenólico do fruto, como referido nas secções anteriores. Nestes estudos, foi aplicado cálcio a 2% (m/v) em videiras da casta Vinhão em dois anos vitícolas consecutivos, e os mostos foram preparados à escala laboratorial e analisados por GC-MS e GC-FID (**Fig. 8**). Os mostos de uvas de videiras tratadas com cálcio continham níveis mais elevados de cálcio e menor quantidade antocianinas. Os resultados mostraram que os tratamentos com cálcio alteraram o perfil volátil dos vinhos jovens, afetando os aromas varietais e os aromas secundários, sugerindo fortemente que, para além de influenciar o metabolismo do bago, o cálcio afeta o seu microbioma bem como a atividade das leveduras durante a fermentação.

Os níveis de vários fenóis voláteis diminuíram, juntamente com a β -damascenona, etil vanilato, benzaldeído e γ -nonalactona. Por outro lado, vários acetatos, álcoois e monoterpenos aumentaram em vinhos produzidos a partir de bagos tratados com cálcio (**Fig. 8**). Os resultados mostraram ainda que o aumento da concentração de cálcio não afetou o curso da fermentação quando a mesma foi induzida por inoculação do mosto com *Saccharomyces cerevisiae*, mas alterou positivamente o processo das fermentações espontâneas realizadas pela microflora endógena do bago, aumentando a reprodutibilidade dos perfis voláteis do vinho entre diferentes replicados, comparativamente aos vinhos produzidos a partir de bagos sem tratamento (Martins *et al.*, 2020c).

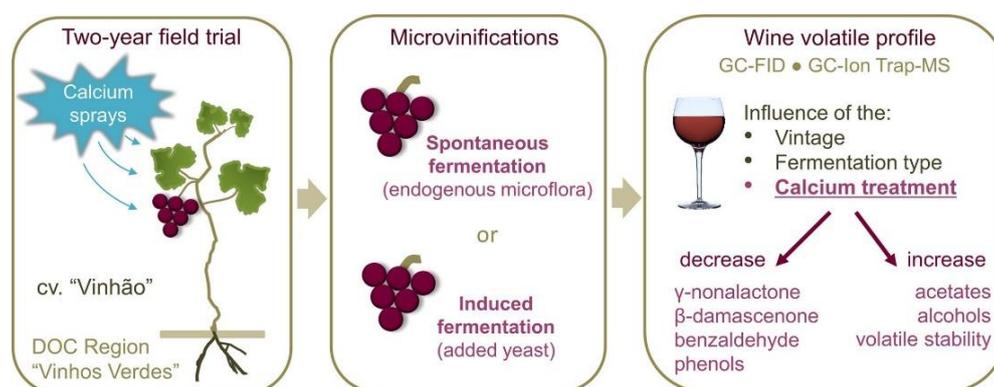


Fig. 8. Desenho experimental do estudo do efeito do cálcio nos perfis voláteis do vinho, bem como o seu efeito nos níveis de metabolitos. Adaptado de Martins *et al.* (2020c).

1.4. A microbiota do bago de uva e do vinho e os fatores que modelam a sua diversidade

Os bagos de uva são colonizados por um ecossistema microbiano complexo e dinâmico, que engloba uma grande variedade de microrganismos epífitos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Esta microbiota desempenha um papel importante na saúde das culturas e também interfere no processo de vinificação, potenciando grandes repercussões na qualidade do vinho (Martins *et al.*, 2014a).

A superfície do bago de uva evolui ao longo das fases de maturação e desenvolvimento, resultando num habitat volúvel para a microflora presente (Coombe, 1992), pelo que as populações e espécies variam claramente no decorrer das diversas fases de desenvolvimento do bago de uva (**Tabela 1**). Os açúcares do bago de uva constituem um dos principais substratos que promovem o crescimento da microbiota superficial. A concentração moderada destes solutos favorece o crescimento de microrganismos incluindo fungos patogénicos. No entanto, níveis de açúcar demasiado elevados tornam o bago menos suscetível à infeção, possivelmente por causarem stresse osmótico (Salzman *et al.*, 1998). Durante a maturação dos bagos de uva, alguns açúcares combinados com proteínas de resistência a agentes patogénicos constituem um mecanismo de defesa contra fungos (Salzman *et al.*, 1998; revisto por Conde *et al.*, 2007). Por outro lado, o stresse hídrico pode também comprometer a colonização da microbiota por causar uma diminuição da concentração de arginina no bago, um aminoácido assimilável pela levedura (Goodwin, 2002; Keller, 2004). Por exemplo, uma das espécies de levedura mais frequentes no fruto, *Aureobasidium pullulans*, não é frequentemente detetada na fase de colheita (Renouf *et al.*, 2005). Ao contrário, as leveduras fermentativas detetadas na fase colheita, são pouco abundantes na fase do crescimento do bago de uva.

A bactéria *Oenococcus oeni* foi encontrada em frutos verdes e em frutos maduros. A fase de pintor parece ser a mais apropriada para a colonização de leveduras como *A. pullulans*, substituindo assim algumas espécies de fungos. A maior abundância de populações microbianas ocorre na fase de colheita em que é facilitada a adesão dos microrganismos à superfície do bago. No entanto, nesta fase, o crescimento dos microrganismos é facilitado pela ausência de tratamentos fitossanitários. Os bagos de uva que apresentam lesões, embora em cachos aparentemente saudáveis, contribuem também para uma maior diversidade de espécies identificadas (revisto por Barata *et al.*, 2012).

Tabela 1. Evolução da microbiota da superfície do bago de uva ao longo do seu desenvolvimento. Adaptado de Renouf *et al.* (2005).

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

O conceito de *terroir* pode definir-se como o ambiente natural completo em que um determinado vinho é produzido, incluindo fatores como o solo, a casta, a topografia, as práticas vitivinícolas e o clima (Anesi *et al.*, 2015; Belda *et al.*, 2020). Por outro lado, o “*terroir* microbiano” consiste na diversidade do microbioma (do bago e do mosto durante a fermentação) que contribui para a identidade de um vinho (Comitini *et al.*, 2017). Espécies dos géneros *Metschnikowia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Lachancea* (*Kluyveromyces*) e *Saccharomyces* formam normalmente o consórcio dominante no início do processo de fermentação (Cocolin *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2002; Fleet, 2008). No entanto, à medida que o teor em álcool aumenta durante o processo fermentativo as estirpes de *S. cerevisiae* tornam-se dominantes por serem mais

tolerantes ao etanol (Fleet, 2008). Por outro lado, espécies dos géneros *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* estão envolvidas na fermentação malolática que promove a desacidificação dos mostos ou do vinho pela conversão do málico em ácido láctico (ácido mais fraco) (Lonvaud-Funel, 1999; Pinto *et al.*, 2015; Lerm *et al.*, 2011).

Diversos estudos realizados com o intuito de descrever a biodiversidade microbiana encontrada em amostras da vinha (solos, madeira, folhas e uvas das vinhas) e em mostos de uvas mostraram padrões de diversidade e co-ocorrências de espécies nesses diferentes habitats. Através da técnica de sequenciação NGS (Next-Generation Sequencing), observou-se uma correlação entre a microbiota do mosto de uvas e as comunidades microbianas do solo, bem como entre a microbiota e a geografia e o clima de diferentes áreas vitícolas (Bokulich *et al.*, 2014; Burns *et al.*, 2015). Num estudo relativamente recente foi observada uma correlação entre o microbioma fermentativo do vinho e a localização geográfica da vinha, tendo sido estabelecida uma “impressão microbiana” de 6 regiões vitivinícolas demarcadas de Portugal (Pinto *et al.*, 2015). Outros estudos têm corroborado que cada região apresenta o seu próprio padrão de biodiversidade, o que reforça o seu papel nos atributos regionais dos vinhos (Romano *et al.*, 2003; Jolly *et al.*, 2014).

Está ainda descrito que os tratamentos fitossanitários exercem uma forte influência na microbiota do mosto (Carboni e Cabras, 2010). Para além do seu impacto na diversidade da microbiota do bago, os fungicidas de síntese ou à base de cobre podem ser transferidos para o mosto e influenciar a seleção e o desenvolvimento das linhagens de leveduras, impactando negativamente a fermentação. Em concreto, já foi demonstrado que os fungicidas à base de cobre (autorizados em modo de agricultura biológica), atrasam a fermentação alcoólica (Martins *et al.*, 2015). Este efeito aumenta a probabilidade de contaminação do mosto por microrganismos oportunistas responsáveis pela produção de aromas indesejáveis no vinho. Estudos da microbiota do bago em práticas agrícolas em modo biológico e convencionais (fungicidas de síntese) revelaram alterações na comunidade microbiana de acordo com a presença de resíduos de fungicidas na superfície do bago (Martins *et al.*, 2014a). Foi observado que a população de fungos, em particular do género *Sporidiobolus*, é mais abundante quando as vinhas são tratadas com compostos orgânicos de síntese. Os fungos do género *Aureobasidium* predominam em bagos de uva de vinhas tratadas apenas com calda bordalesa. A predominância de *Aureobasidium* em bagos de vinhas tratadas com calda bordalesa está aparentemente relacionada com a sua maior tolerância ao cobre e ao enxofre (Grube *et al.*, 2011). Os mesmos autores concluíram em estudos

anteriores que também existe uma correlação negativa entre concentração de cobre da superfície do bago e a densidade das comunidades bacterianas (Martins *et al.*, 2012).

Embora no passado as leveduras não-*Saccharomyces* (NS) tenham sido consideradas de importância secundária ou indesejáveis, atualmente é amplamente aceite que o perfil geral de um vinho pode ser melhorado recorrendo a culturas selecionadas de leveduras NS em associação com *S. cerevisiae* (Comitini *et al.*, 2017). Com efeito, além da sua contribuição para a complexidade do aroma do vinho, as leveduras NS podem contribuir positivamente para se obviarem alguns desafios da vinificação moderna, incluindo a redução do volume de etanol do vinho e controlo da sua deterioração (Padilla *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2018).

1.5. Efeito do cálcio na microbiota do bago de uva

Além das alterações acima descritas ao nível da fermentação espontânea observadas em mostos produzidos a partir de uvas de videiras tratadas com cálcio, estudos de microscopia eletrónica demonstraram que o tratamento com cálcio produziu alterações na superfície do fruto (Martins *et al.*, 2020b). Os resultados mostraram que enquanto os bagos controlo apresentam uma superfície rugosa que, possivelmente, favorece a colonização por fungos filamentosos, os bagos de videiras tratadas com cálcio apresentam uma superfície lisa e um menor grau de colonização por fungos filamentosos (**Fig. 9**). Estes resultados sugerem que a aplicação exógena de cálcio induz alterações na microbiota do fruto.

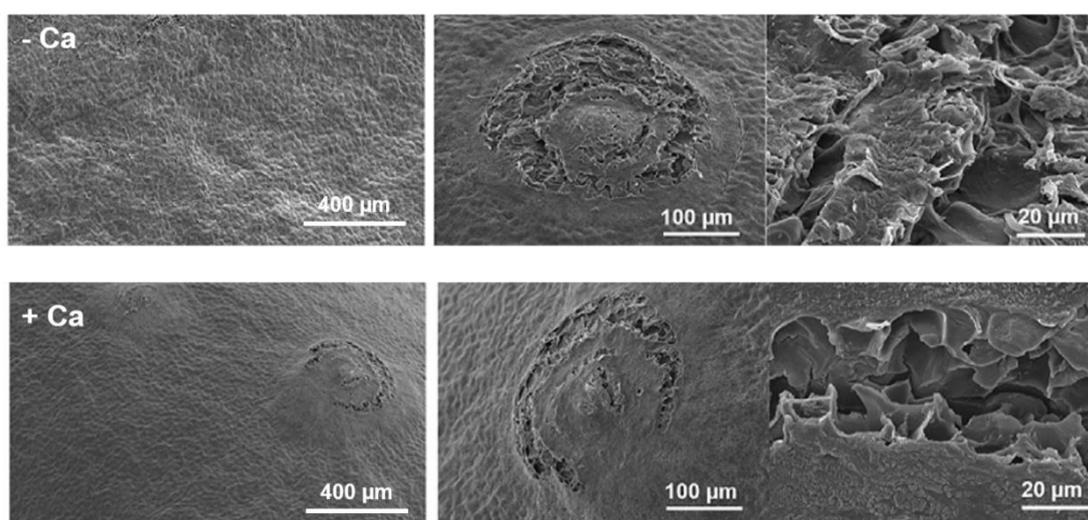


Fig. 9. Microscopia eletrónica da superfície de bagos de uva maduros de plantas controlo (- Ca) ou tratadas com cálcio (+ Ca). Adaptado de Martins *et al.* (2020b).

Estudos muito recentes demonstraram ainda que o tratamento com cálcio nas vinhas modifica o perfil de ceras cuticulares do bago, favorecendo o crescimento de Basidiomicetos (Martins *et al.*, 2021b).

1.6. Hipóteses e objetivos

Os resultados acima descritos sobre o efeito do cálcio na firmeza do bago de uva e na redução das microfissuras da película, bem como no perfil fenólico do bago e no perfil volátil de vinhos, abriram caminho a novos projetos de investigação relacionados com o estudo do microbioma do fruto em resposta à aplicação exógena de agroquímicos, bem como ao estudo da diversidade do microbioma em diferentes castas da mesma região vitivinícola (projeto GrapeMicrobiota, FCT PTDC/BAA-AGR/2691/2020).

Em particular, no presente trabalho pretendemos validar duas hipóteses: i) além de afetar a composição química do fruto, a aplicação exógena de cálcio modifica a microbiota cultivável do bago de uva e ii) diferentes fatores de stresse abiótico como o cobre, o etanol e o stresse osmótico afetam de forma distinta as espécies cultiváveis isoladas da microflora do fruto.

O objetivo do presente trabalho foi, portanto, caracterizar o efeito do Ca na comunidade microbiana cultivável do bago de uva das castas Loureiro e Vinhão da região DOC Vinhos Verdes, relacionando os resultados com as propriedades bioquímicas e moleculares dos frutos, bem como avaliar o efeito de diversos fatores de stresse abiótico nos diferentes isolados da população microbiana.

Como referido acima, a identificação de espécies de levedura que colonizam o bago pode conduzir à otimização de inóculos específicos que exponenciem o *terroir* do vinho, bem como ao desenho de estratégias de biocontrolo de doenças, pelo que o presente trabalho, reveste-se de uma dimensão biotecnológica, para além da sua dimensão científica inovadora.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Tratamentos da vinha e recolha dos bagos de uva

Tendo por base o método otimizado por Martins *et al.* (2020^a,b,c), os ensaios de campo foram realizados em videiras das castas Vinhão e Loureiro localizadas numa vinha comercial da região DOC portuguesa dos “Vinhos Verdes” (coordenadas: latitude N41°28'28”, longitude W8°34'59”, 165 m de altitude), no período de frutificação de 2020. Desta forma, a aplicação de cálcio nas videiras foi realizada previamente ao início oficial deste trabalho, em que, uma parcela das vinhas foi pulverizada com uma solução de CaCl₂ a 2% (m/v) e Silwet L-77 a 0,1% (v/v), usado como surfactante, e outra parcela foi pulverizada apenas com Silwet L-77 (controlo). No total, foram realizadas 3 aplicações ao longo da fase de frutificação (julho a setembro de 2020), a primeira na fase de bago verde (bago de ervilha, E-L 33; Coombe, 1995), a segunda na fase de pintor (E-L 35) e a última na fase madura (E-L 38), uma semana antes da colheita. Os bagos na fase madura foram colhidos aleatoriamente de 6 videiras de cada casta e tratamento.

2.2. Quantificação de parâmetros bioquímicos-chave do bago de uva: açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas

Os parâmetros bioquímicos foram quantificados em triplicado após maceração dos bagos em azoto líquido e posterior armazenamento a -80 °C até à realização da experiência. A concentração de açúcares redutores foi determinada através do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico, pelo método de Miller (1959), com as modificações descritas em Martins *et al.* (2021^a), após a extração do conteúdo solúvel de 200 mg de PF em 1,5 mL de água ultrapura. Da mesma forma, os compostos fenólicos totais, foram extraídos de 200 mg de PF com 1 mL de metanol a 100% e quantificados posteriormente pelo protocolo de colorimetria *Folin-Ciocalteu* (Waterhouse, 2002; Martins *et al.*, 2018, 2020^a, 2021^a). As antocianinas totais foram quantificadas pelo método do pH diferencial, utilizando o mesmo método de extração descrito para os fenólicos totais (Nicoue *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2020^a, 2021^a). Os resultados foram expressos em g kg⁻¹ de PF e analisados estatisticamente com o *t-test* de *Student* no Prism®8 (GraphPad Software, Inc.). Nos gráficos de barras, as diferenças significativas foram assinaladas com asteriscos para denotar o nível de significância em comparação com o controlo (sem tratamento): ***, $P \leq 0,001$.

2.3. Estudo da expressão de genes do metabolismo secundário por PCR em tempo real (qPCR)

As reações quantitativas por qPCR foram realizadas em quadriplicado conforme descrito por Martins *et al.* (2018; 2020a e 2021a), utilizando cDNA previamente preparado através do RNA isolado e purificado dos bagos de uva de plantas controlo ou tratadas com cálcio. A mistura de reação consistiu em 5 μ L de Xpert Fast SYBR Master Mix (Grisp Research Solutions), 0,3 μ M de cada primer, 1 μ L de cDNA e água livre de nucleases, para um volume final de 10 μ L. As condições de PCR foram as seguintes: 15 min a 95 °C e 45 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 55 °C e 30 s a 72 °C. Foi quantificada a expressão de genes-alvo selecionados de acordo com as diferenças significativas obtidas da análise estatística dos parâmetros bioquímicos-chave do bago de uva, nomeadamente ao nível do metabolismo secundário, utilizando primers específicos:

Tabela 2: Genes e respetivos conjuntos de primers usados em qPCR.

Abreviação do gene	Codificante da:	Primers (<i>forward</i> / <i>reverse</i>)	Autor
PAL1	Fenilalanina amônia-liase	CCGAACCGAATCAAGGACTG/ GTTCCAGCCACTGAGACAAT	Boubakri <i>et al.</i> , 2013
CHS3	Chalcona sintase	TCGCATCACAAATAGCGAAC/ CAGGGAAGCTGCCATGTATT	Ageorges <i>et al.</i> , 2006
DFR	Dihidroflavonol redutase	GGCTTTCTAGCGAGAGCGTA/ ACTCTCATTTCCGGCATT	Bogs <i>et al.</i> , 2006
UFGT	UDP-Glicose:flavonóide-3- <i>O</i> -glucosiltransferase	TGCAGGGCCTAACTACTCT/ GCAGTCGCCTTAGGTAGCAC	Conde <i>et al.</i> , 2016
ANS	Leucoantocianidina dioxigenase	CAACAATGCTAGTGGACAGCTTGAG/ TGGAACGTAGTCGCTTGGTGTCTTA	Tavares <i>et al.</i> , 2013

A especificidade das reações de PCR foi confirmada através de curvas de dissociação no final de cada reação qPCR, pelo aquecimento dos produtos de PCR de 65 a 95 °C, em intervalos de 0,5 °C durante 5 s. A expressão dos genes-alvo foi normalizada pela expressão do gene de referência *GAPDH* codificante da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*forward* – TTCCGTGTTCCCTACTGTTG e *reverse* – CCTCTGACTCCTCCTTGAT; Gainza-Cortés *et al.*, 2012), usando o método $\Delta\Delta Cq$ no CFX Manager Software 3.1 (Bio-Rad laboratories, Inc.). Os dados foram analisados estatisticamente pelo *t-test* de *Student* no Prism®8 (GraphPad Software, Inc.). Nos

gráficos de barras, as diferenças significativas foram marcadas com asteriscos para denotar o nível de significância em comparação com o controle: *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$.

2.4. Isolamento da microbiota do bago de uva

A recolha da biomassa microbiana foi realizada em três réplicas biológicas constituídas por 20 bagos frescos de plantas controlo ou tratadas com cálcio. Os bagos de uva foram lavados com 100 mL de uma solução isotónica (NaCl 0,9% (m/v)) durante 3 h, com uma agitação de 150 rpm (Mezzasalma *et al.*, 2017). Foram depois plaqueados 40 μ L da solução de lavagem em meio de cultura diferencial *Wallerstein* (WL) agarizado, suplementado com cloranfenicol a 0,005% (m/v) para inibição do crescimento de bactérias e bifenil 0,02% (v/v) para inibição do crescimento de fungos filamentosos. As placas foram incubadas durante 5 dias à temperatura ambiente. Posteriormente, tipos únicos de colónias de cada condição foram repicados para meio WL fresco, segundo o método de Pallmann *et al.* (2001).

2.5. Identificação de leveduras

Os isolados foram identificados após amplificação por PCR de regiões não conservadas dos *internal transcribed spacer* (ITS), usando os primers *forward ITS1*: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'; e *reverse ITS4*: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' (Stringini *et al.*, 2008). Para um volume total de 30 μ L, as reações de PCR foram realizadas com 15 μ L de Master Mix 2x (NZYTech, Lda), 0,45 μ L de cada primer (stock a 10 μ M) e 14,1 μ L de água ultrapura, utilizando cada colónia como molde de DNA. Os ciclos de tempo/temperatura usados no termociclador estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3: Ciclos de PCR usados para amplificação da região ITS, segundo o método de Stringini *et al.* (2008).

Ativação	Desnaturação	Annealing	Extensão	Extensão final
				
95 °C	94 °C	55,5 °C	72 °C	72 °C
15 min	30 s	30 s	1 min	10 min



X 35

As amostras foram posteriormente submetidas a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) para confirmar a amplificação da região pretendida. Os produtos de PCR foram purificados, juntando-se 80 µL de isopropanol a 75% (v/v) a 20 µL de produto de PCR, seguido de uma incubação à temperatura ambiente de 15 min. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm durante 30 min. Após descartar o sobrenadante, o pellet foi lavado duas vezes com 150 µL de isopropanol a 75% (v/v). Por fim, deixou-se secar o pellet ao ar durante 30 min, à temperatura ambiente. O pellet de DNA foi então ressuscitado em 10 µL de água ultrapura. A concentração de DNA foi estimada através da medição da absorbância a 260 nm, utilizando um *NanoDrop*. As amostras foram enviadas para sequenciação de Sanger numa empresa especializada, com o primer *reverse ITS4*. As espécies de leveduras foram identificadas após fazer *Blast* das sequências ITS obtidas no programa BLASTN do NCBI e seleção do organismo com melhor *ranking* (melhor grau de homologia baseado nos valores de *query coverage*, *percentage identity* e *E value*).

2.6. Efeito de fatores de stresse no crescimento das leveduras

O estudo da influência de fatores de stresse no crescimento das leveduras focou-se nas 5 espécies mais abundantes em ambas as castas. Em ensaios independentes, as leveduras foram inoculadas em meio líquido YPD suplementado com cloranfenicol a 0,005% (m/v) e com diferentes concentrações dos seguintes compostos (marca Sigma-Aldrich): 1) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,2; 2; 10; 20 e 40 g L⁻¹, estando o primeiro valor na ordem de grandeza das concentrações de cálcio encontradas nos mostos e vinhos (Martins *et al.*, 2020c) e o penúltimo correspondendo à concentração da solução de cálcio pulverizada nas vinhas (Martins *et al.*, 2020a,b,c); 2) etanol (C₂H₅OH): 3, 6 e 10%, sendo a última percentagem o valor máximo obtido em vinhos da casta Vinhão (Martins *et al.*, 2020c); 3) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 250, 500, e 1000 mg L⁻¹, sendo o primeiro valor oito vezes superior ao encontrado em mostos de bagos de uva tratados com calda bordalesa e o último valor vinte vezes inferior ao encontrado na formulação da calda bordalesa (Martins *et al.*, 2015); 4) PEG₆₀₀₀: 5, 10 e 20%, correspondente à gama de valores utilizada por Silambarasan *et al.* (2019) para avaliar stresse osmótico em levedura. Como controlo, as leveduras foram inoculadas também em meio YPD sem suplementação. As culturas foram preparadas em duplicado e a sua D.O._{600nm} inicial foi ajustada para 0,1. O crescimento foi avaliado através da densidade ótica após incubação durante 14 h a 24 °C, e agitação constante de 200 rpm.

Os resultados foram apresentados sob a forma de *heat maps*, em que, para cada espécie foi calculado o rácio entre a densidade celular (D.O.) na presença do fator de stresse e no controlo.

2.7. Curvas de crescimento em glicose e avaliação da produção de etanol e ácido acético

Conforme o método descrito por Silva *et al.* (2004), as espécies *Rhodotorula glutinis*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio mineral sintético contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5% (m/v), KH_2PO_4 0,5% (m/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05% (m/v), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,013% (w/v) (meio basal), vitaminas, micronutrientes e glicose 2%. A solução de vitaminas consistiu em biotina 0,001% (m/v), pantotenato de cálcio 0,08% (m/v), inositol 4% (m/v), niacina 0,16% (m/v), piridoxina HCl 0,16% (m/v) e tiamina HCl 0,16% (m/v). A solução de micronutrientes consistiu em H_3BO_3 0,1% (m/v), KI 0,02% (m/v) e $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,04%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,008% (m/v), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,04%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,08% (m/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08% (m/v) e HCl 0,001. As vitaminas e os micronutrientes foram adicionados na proporção de 0,5 mL L⁻¹ de meio. Todas as curvas de crescimento foram realizadas em duplicado, com pH inicial de 4,5, a 24 °C e agitação mecânica a 200 rpm. O crescimento foi monitorizado através de medidas de absorbância a 600 nm (num espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 20) para a determinação das taxas específicas de crescimento e dos tempos de duplicação. As concentrações de glicose, etanol e ácido acético no meio de cultura foram quantificadas por HPLC após realizar a desproteinização das amostras com ácido perclórico a 60%, numa proporção de 3:1. O aparelho utilizado foi um cromatógrafo LaChrom Elite -DEMO (Hitachi) com coluna Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) da Phenomex, mantida a 40 °C, com 2,5 mM de H_2SO_4 como fase móvel, a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min⁻¹. A concentração de glicose, etanol e ácido acético nas amostras foi determinada através da análise do tempo de retenção e área do respetivo pico dos cromatogramas, por comparação com os cromatogramas de soluções-padrão de glicose (5, 10, 15 e 20 g L⁻¹), etanol (1, 3, 6 e 10% (v/v)) e ácido acético (1, 3, 6 e 10% (v/v)).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do cálcio no teor de açúcares redutores, compostos fenólicos e antocianinas totais no bago de uva

A análise dos parâmetros bioquímicos mostrou que os bagos de uva da casta Loureiro possuem um maior teor em açúcares redutores do que os bagos da casta Vinhão (239,11 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PF e 187,55 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de PF, respectivamente). Em contrapartida, os bagos da casta Loureiro apresentaram um menor teor em compostos fenólicos (4,21 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PF) do que os bagos da casta Vinhão (8,76 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PF), não tendo sido detetadas antocianinas na casta branca pelo método de quantificação utilizado (**Fig. 10**).

O tratamento com cálcio nas vinhas durante o desenvolvimento do fruto não afetou significativamente os níveis de açúcares redutores nos bagos de ambas as castas, apesar de ter sido verificado um decréscimo aparente de 15,6% em Loureiro. De igual forma, os fenólicos totais presentes nos bagos de uva não foram significativamente afetados pelo tratamento com cálcio em ambas as castas. O tratamento com cálcio reduziu em 26,7% a concentração de antocianinas totais nos bagos cv. Vinhão.

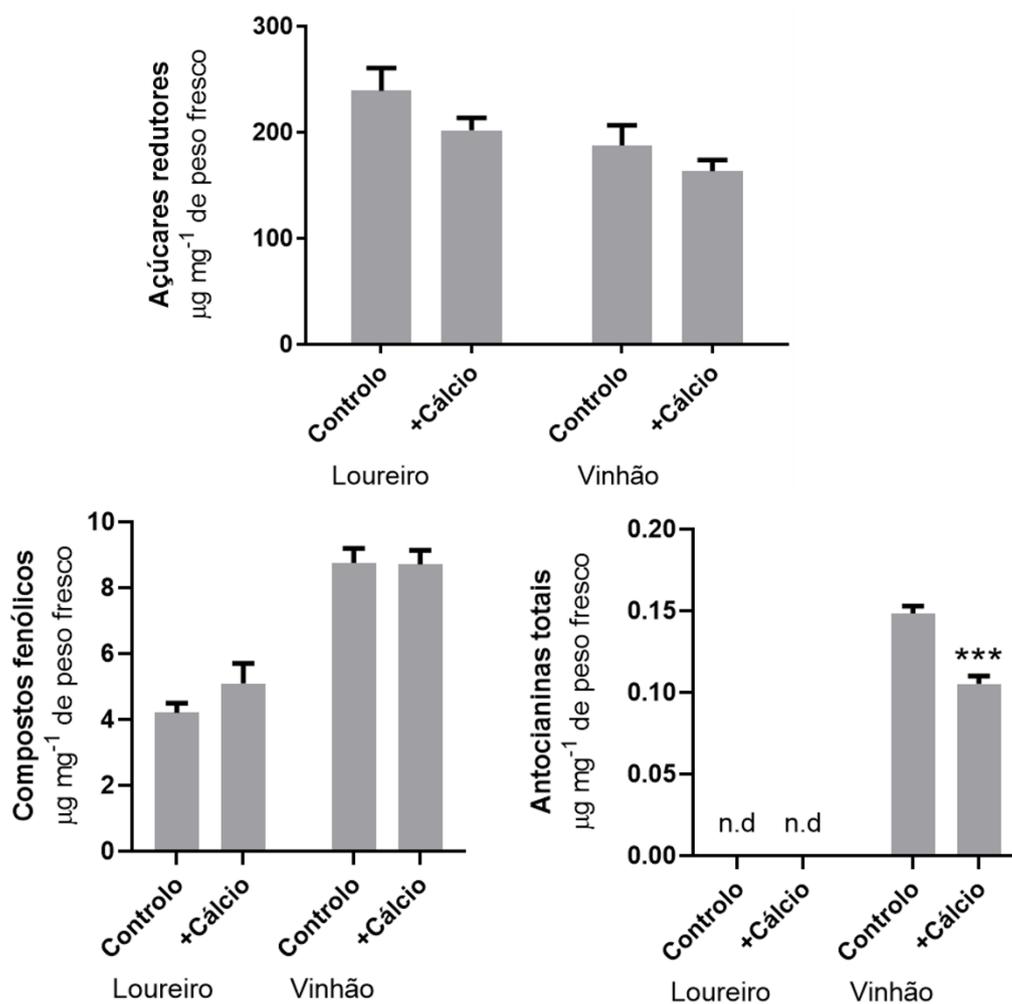


Fig. 10. Parâmetros bioquímicos em bagos de uva maduros de videiras das castas Loureiro e Vinhão pulverizadas com cálcio ou sem tratamento (controlo) durante toda a fase de frutificação. Os resultados indicam a média \pm desvio padrão (DP) e as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras controlo e tratadas com cálcio estão indicadas com asteriscos: ***, $P \leq 0.001$ ($n = 3$). Valores abaixo do limite de deteção estão assinalados com n.d.

3.2. Efeito do cálcio na expressão de genes-chave da via de biossíntese das antocianinas

Tendo em consideração as diferenças estatisticamente significativas encontradas no teor de antocianinas totais dos bagos de uva cv. Vinhão foi avaliada a expressão de genes chave da via do metabolismo secundário. Os resultados mostraram que, genericamente, o tratamento com cálcio conduziu a uma repressão dos genes estudados, desde o *PAL1*, envolvido no primeiro passo do metabolismo secundário até ao *UFGT*, envolvido no passo limitante da síntese de antocianinas, embora em alguns casos as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (**Fig. 11**).

O gene *CHS3* que codifica a enzima chalcona sintase e o *DFR* codificante da dihidroflavonol redutase foram os mais afetados, sendo a sua expressão reduzida em 15,6 e 23%, respectivamente.

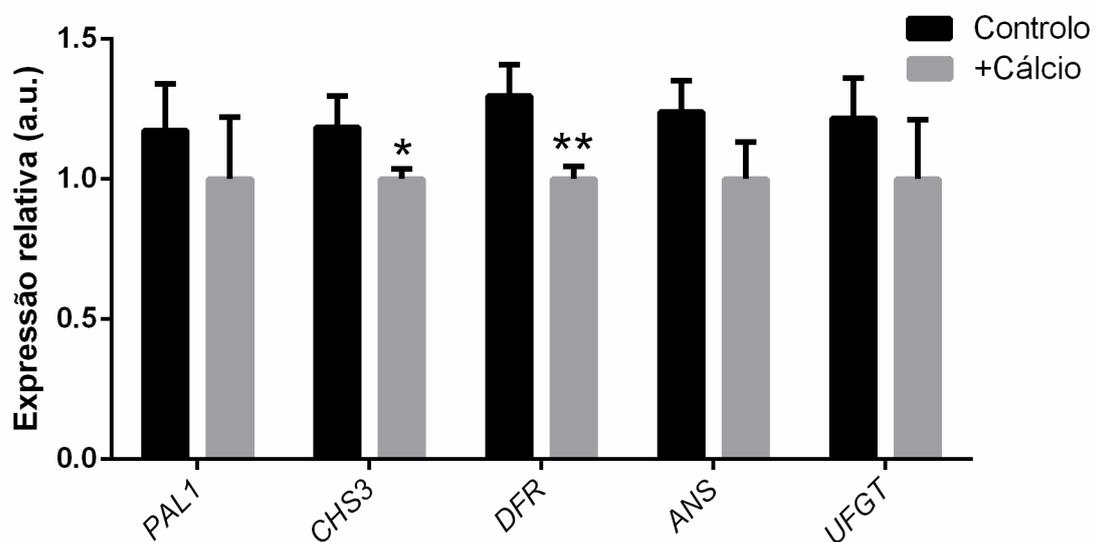


Fig. 11. Expressão de genes do metabolismo secundário em bagos de uva maduros de videiras cv. Vinhão pulverizadas com cálcio ou sem tratamento (controle), durante toda a fase de frutificação. Os níveis de transcritos foram avaliados para os genes codificantes das enzimas fenilalanina amônia-liase (*PAL1*), chalcona sintase (*CHS3*), dihidroflavonol redutase (*DFR*), leucoantocianidina dioxigenase (*ANS*) e UDP-glicose: flavonóide-3-O-glucosiltransferase (*UFGT*). A expressão foi normalizada pelos níveis de transcrição do gene de referência GAPDH codificante da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Os resultados indicam a média \pm DP e os asteriscos denotam as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras controle e tratadas com cálcio: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$ ($n = 4$).

3.3. Efeito do cálcio na comunidade microbiana cultivável do bago de uva

O crescimento da microbiota que coloniza a superfície dos bagos de uva foi analisado após 5 dias de incubação em meio de cultura diferencial WL (**Fig. 12**). A análise visual das placas mostrou maior abundância de leveduras nos bagos controle da casta Loureiro do que nos bagos da casta Vinhão. Com efeito, a contagem das colônias confirmou que os bagos controle da casta Loureiro apresentaram um número de colônias 2,6 vezes superior ao medido em bagos da casta Vinhão (**Fig. 13**). Observou-se ainda que, em ambas as castas, o tratamento com cálcio diminuiu visivelmente a quantidade de leveduras.

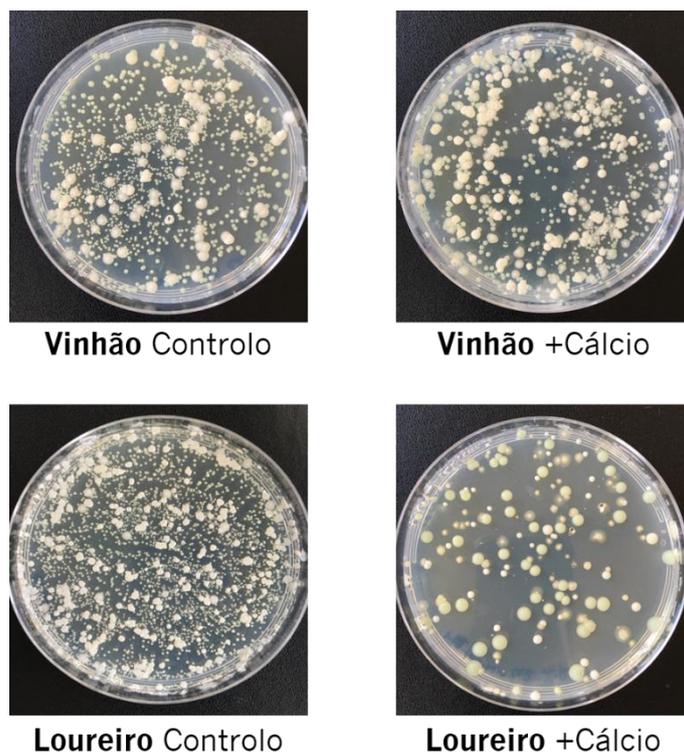


Fig. 12. Colónias de levedura obtidas a partir da solução de lavagem de bagos de uva controlo e tratados com cálcio, das castas Loureiro e Vinhão, após 5 dias de crescimento em meio de cultura diferencial WL. Imagens representativas de 3 réplicas biológicas.

Com efeito, após contagem das colónias em 3 réplicas biológicas de cada condição, foi possível confirmar que o cálcio provocou uma diminuição em 35% da quantidade total de colónias de levedura em bagos Vinhão e de 81% em bagos Loureiro (**Fig. 13**).

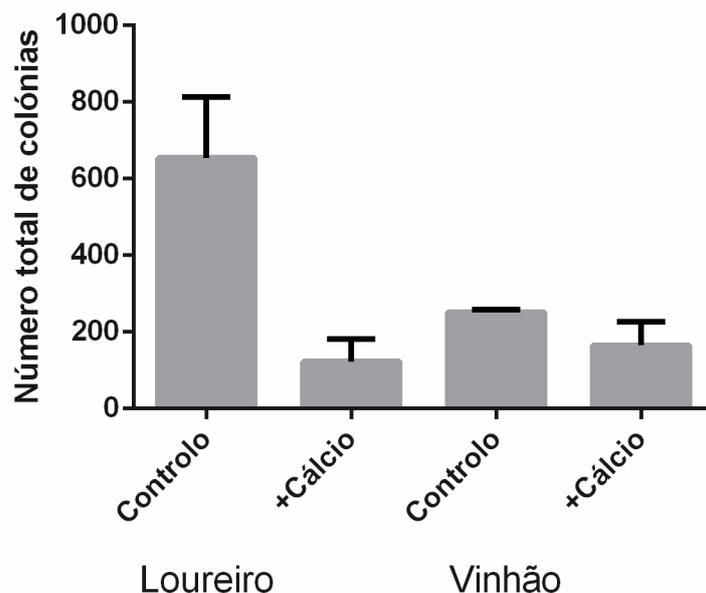


Fig. 13. Número de colónias de levedura obtidas em 40 µl da solução de lavagem de bagos controlo e tratados com cálcio, das castas Vinhão e Loureiro. Os valores apresentados representam a média ± DP dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

Após vários exemplares de cada tipo de colónia serem isolados em meio WL fresco, foi amplificada a sua região ITS por PCR, utilizando os *primers* universais *ITS1* e *ITS4*, para posterior identificação. De modo a confirmar a amplificação da região pretendida, os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) (**Fig. 14A**). Os resultados mostraram que foi amplificada a região pretendida de todos os isolados, com a exceção dos isolados n° 1, 12 e 13, pelo que se procedeu à repetição da reação de PCR, seguida de uma eletroforese (**Fig. 14B**). Deste modo, foi possível confirmar a amplificação da região ITS de todos os isolados pretendidos. Como controlo negativo, foi observado que não ocorreu amplificação na ausência de molde de DNA (levedura) (resultado não apresentado).

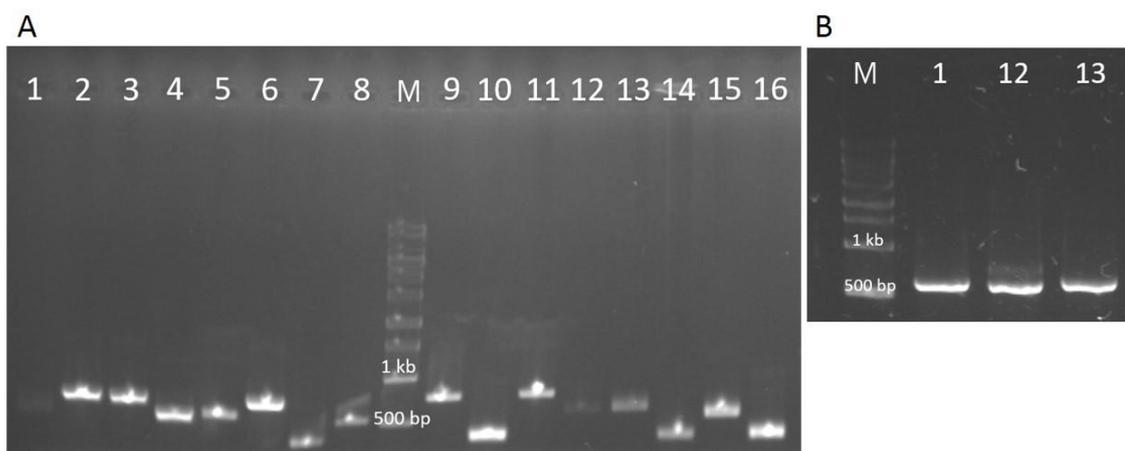


Fig. 14. Produtos de PCR da região ITS de diferentes isolados de levedura (1-16) **(A)** e dos isolados n° 1, 12 e 13 **(B)** visualizados em géis de agarose 1% (m/v). Poço M: marcador de pesos moleculares.

Após sequenciação de Sanger dos produtos de PCR purificados, foi possível identificar a espécie correspondente a cada isolado, por comparação BLASTN das sequências obtidas com a informação disponível no banco de dados do NCBI. A identificação foi realizada de acordo com o critério de melhor *ranking* (melhor grau de homologia), baseado nos valores de *query coverage*, *percentage identity* e *E value* **(Tabela 4)**.

Tabela 4: Espécies identificadas por *Blast* das sequências ITS amplificadas, no programa BLASTN do NCBI.

N° do isolado	Espécie	Query cover	E value	Percent Identity
1	<i>Rhodotorula glutinis</i>	97%	0,0	99,82%
2	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	60%	0,0	95,21%
3	<i>Hanseniaspora</i> sp.	98%	0,0	90,61%
4	<i>Zygoascus meyeræ</i>	87%	0,0	95,31%
5	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	89%	0,0	95,22%
6	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	95%	0,0	99,86%
7	<i>Metschnikowia</i> sp.	59%	3e-166	98,25%
8	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	77%	0,0	87,59%
9	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	46%	0,0	94,11%
10	<i>Metschnikowia</i> sp.	47%	3e-161	96,86%
11	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	73%	0,0	95,87%
12	<i>Aureobasidium pullulans</i>	96%	0,0	99,27%

13	<i>Rhodotorula</i> sp.	82%	0,0	92,62%
14	<i>Metschnikowia</i> sp.	47%	6e-158	96,53%
15	<i>Bulleromyces albus</i>	66%	0,0	99,61%
16	<i>Metschnikowia</i> sp.	40%	2e-123	96,40%

A partir da identificação dos microrganismos que compõem a microbiota do bago, foi construído um catálogo com a sua caracterização fenotípica, ao nível macroscópico e microscópico (**Fig. 15**), num total de 8 taxas diferentes. Macroscopicamente, *Metschnikowia* sp. apresenta uma cor rosada com um halo circundante mais intenso. As culturas de *Hanseniaspora uvarum* exibem uma tonalidade esverdeada; a espécie *Rhodotorula glutinis* apresenta uma textura gelatinosa rosa, que lhe confere uma ampla facilidade na sua identificação. A pigmentação branca ou bege é comum nas espécies *Aureobasidium pullulans*, *Bulleromyces albus*, *Trichosporon coremiiforme*, *Wickerhamomyces anomalus* e *Zygoascus meyeræ*, que apresentam diferentes tipos de relevo. Microscopicamente, as células de *R. glutinis* e *H. uvarum* exibem uma morfologia oval, semelhante à das espécies *A. pullulans*, *T. coremiiforme* e *Z. meyeræ* apesar destas se disporem frequentemente sob a forma de filamento. Com um aspeto circular, destacam-se as células de *B. albus*, *Metschnikowia* sp. e *W. anomalus* contendo, as duas últimas, um núcleo bem evidente.

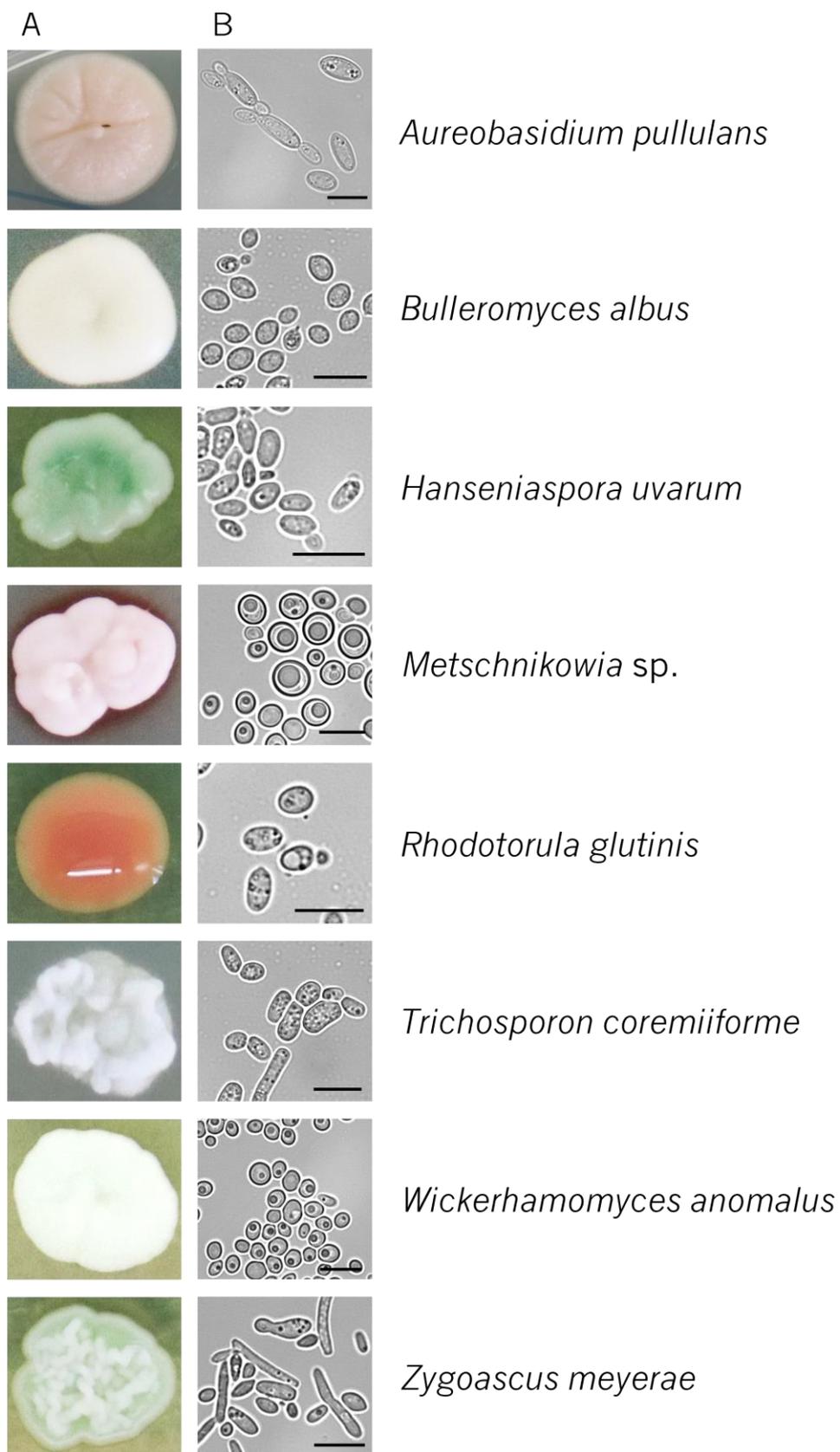


Fig. 15. Catálogo de diferentes espécies de levedura obtidas da superfície de bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada taxa são mostradas fotografias do aspeto macroscópico (**A**) e microscópico (**B** - DIC); a escala corresponde a 10 μ m.

Como mostrado na **Fig. 16**, verificou-se uma maior diversidade de taxas em Loureiro do que em Vinhão. As espécies *A. pullulans* (55,6%), *R. glutinis* (36,9%), *H. uvarum* (7,1%) e *Z. meyeræ* (0,4%) constituem a coleção dominante na casta Vinhão. Em Loureiro, destacam-se as taxa *H. uvarum* (90%), como espécie dominante, bem como *W. anomalus* (4,6%), *A. pullulans* (3,5%), *Metschnikowia* sp. (1,2%) e *T. coremiiforme* (0,8%). Como esperado, os tratamentos com cálcio, influenciaram positivamente ou negativamente a microbiota de ambas as castas. Em bagos da casta Vinhão, o tratamento com cálcio promoveu o aumento da abundância relativa de *H. uvarum* (6,5x) e uma diminuição da abundância relativa de *A. pullulans* (30,1%) e *R. glutinis* (9%).

Apesar do tratamento com cálcio ter reduzido o número total de colônias de levedura encontradas nos bagos (**Fig. 12**), verificou-se um aumento da diversidade de taxa na casta Loureiro, tornando-se detetáveis as espécies *B. albus* e *R. glutinis*. Em paralelo, nesta casta, o tratamento com cálcio levou ao aumento da abundância relativa de *A. pullulans* (15x) e de *Metschnikowia* sp. (4,8x), e uma diminuição da abundância relativa de *H. uvarum* (68%), bem como o desaparecimento de *T. coremiiforme*. Em suma, em bagos da casta Loureiro podem-se destacar as espécies *A. pullulans*, *H. uvarum*, *R. glutinis*, *W. anomalus* e *Z. meyeræ*, como dominantes do consórcio das leveduras presentes em bagos tratados com cálcio.

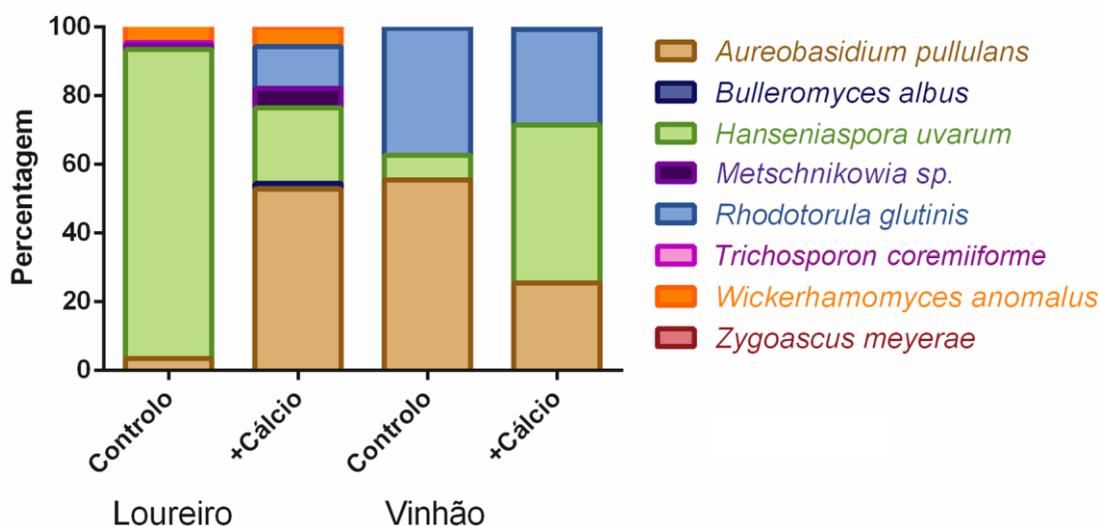


Fig. 16. Efeito do cálcio na abundância e diversidade de espécies de levedura da superfície de bagos de uva das castas Vinhão e Loureiro. Os resultados representam a média dos valores obtidos para 3 réplicas biológicas.

3.4. Avaliação do efeito de fatores de stresse no crescimento de diferentes espécies de levedura

Foi realizada uma análise *in vitro* para averiguar o efeito isolado de quatro fatores de stresse no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Como mostrado na **Fig. 17**, foram observadas diferenças no grau de tolerância das diferentes espécies a concentrações crescentes de CaCl_2 , após 14 h de exposição. As espécies *W. anomalus* e *Z. meyeræ* revelaram ser as mais tolerantes, não sendo o seu crescimento afetado por concentrações de cálcio até 20 g L⁻¹. Para as restantes espécies, verificou-se uma inibição do crescimento de forma dependente da concentração de cálcio, sendo *A. pullulans* a mais sensível, seguida de *H. uvarum* e *R. glutinis*. Na presença de 40 g L⁻¹ de cálcio o crescimento de todas as espécies de levedura foi seriamente comprometido.

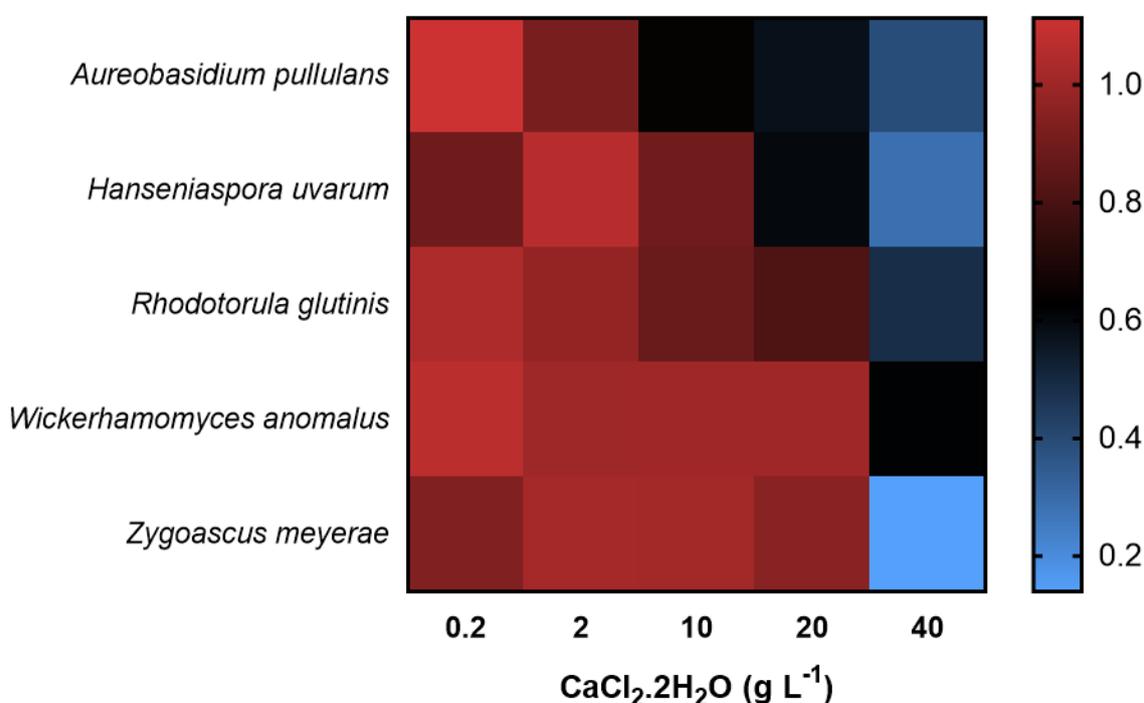


Fig. 17. Efeito do cálcio no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a D.O._{600nm} na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

Relativamente à tolerância das leveduras isoladas ao etanol, os resultados mostraram uma inibição de 66,1 a 92,4% do crescimento das espécies *A. pullulans*, *R. glutinis*, *Z. meyeræ* e *H. uvarum* na presença de 3% de etanol, ocorrendo uma inibição total do crescimento das primeiras

três na presença de 6% de etanol (**Fig. 18**). *W. anomalus* revelou ser a espécie mais tolerante ao etanol. A concentração de etanol de 10% (valor máximo obtido em vinhos da casta Vinhão; Martins *et al.*, 2020c) revelou-se como condição extrema para todas espécies selecionadas.

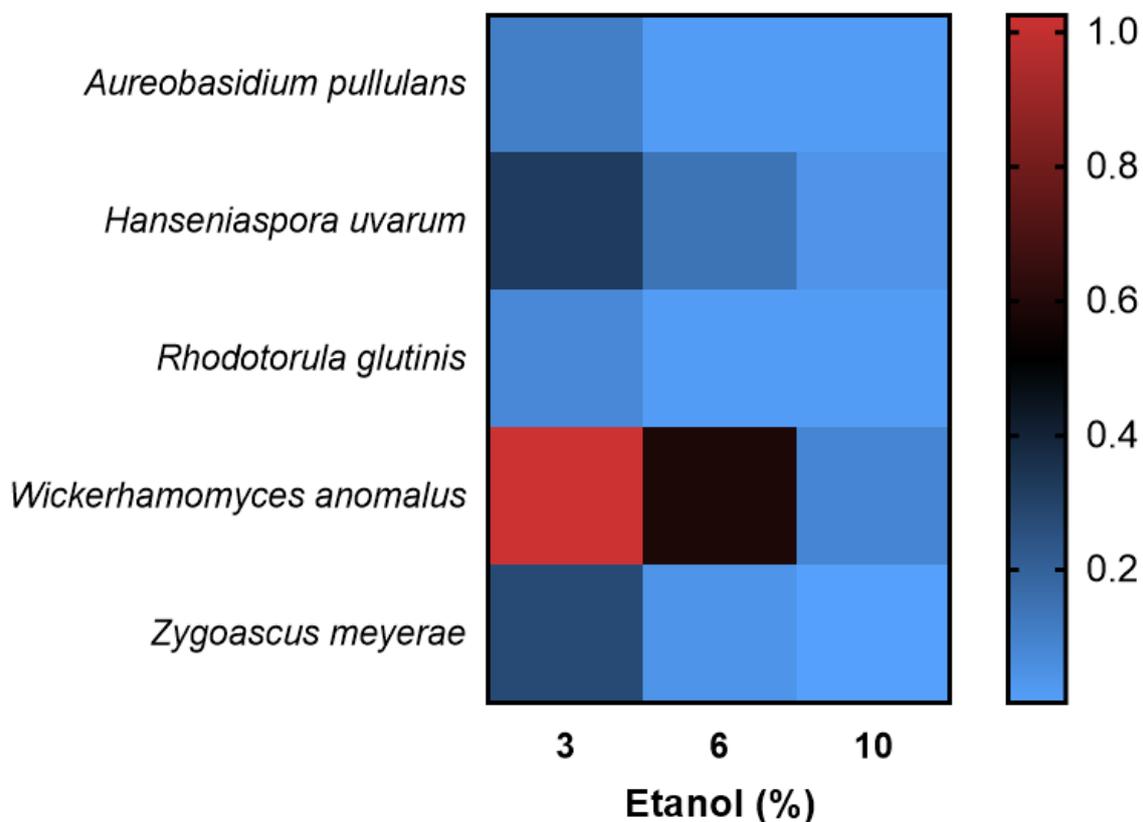


Fig. 18. Efeito do etanol no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a D.O._{600nm} na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

O efeito do CuSO_4 no crescimento de 5 espécies de levedura isoladas do bago é apresentado na **Fig. 19**. Os resultados mostraram que o crescimento da maioria das espécies não é afetado de forma negativa por concentrações de cobre até 500 mg L^{-1} (**Fig. 19**). Ao contrário do crescimento de *R. glutinis* e *Z. meyeriae*, o crescimento de *W. anomalus* não foi afetado por concentrações de cobre até 1 g L^{-1} (valor 20x inferior ao encontrado na formulação da calda bordalesa). A espécie mais sensível ao cobre foi *A. pullulans*, cujo crescimento foi inibido em 49% nesta concentração, relativamente ao controlo. Ao contrário, o crescimento de *H. uvarum* foi estimulado na presença de cobre, em qualquer das concentrações testadas.

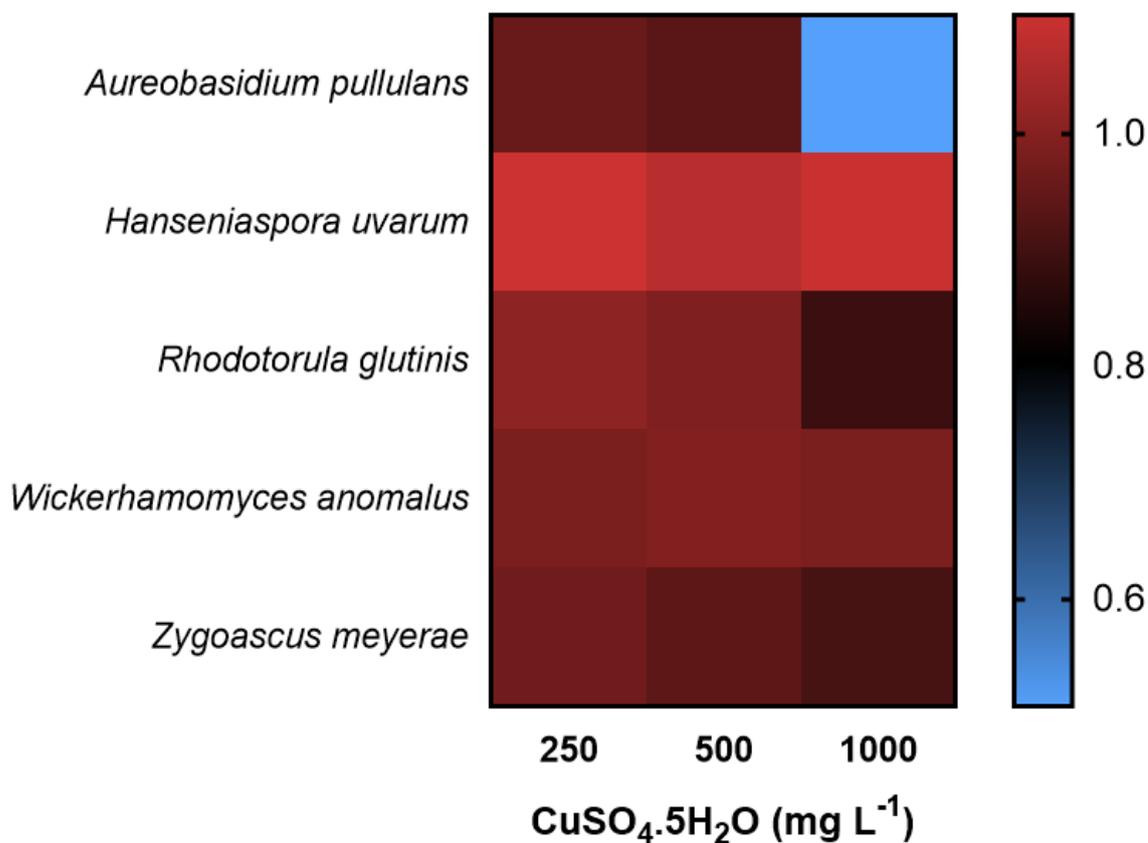


Fig. 19. Efeito do cobre no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a D.O._{600nm} na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

A **Fig. 20** mostra o efeito do PEG₆₀₀₀ no crescimento das leveduras isoladas do bago, onde se pretendeu estudar o efeito do stresse osmótico. Os resultados mostraram uma forte inibição do crescimento de *A. pullulans* em concentrações de PEG a partir de 5% (redução em 75,8%). Em contrapartida, o crescimento da espécie *R. glutinis* não foi afetado pelo PEG. As restantes taxa estudadas exibiram uma diminuição gradual no crescimento com o aumento da pressão osmótica do meio de cultura.

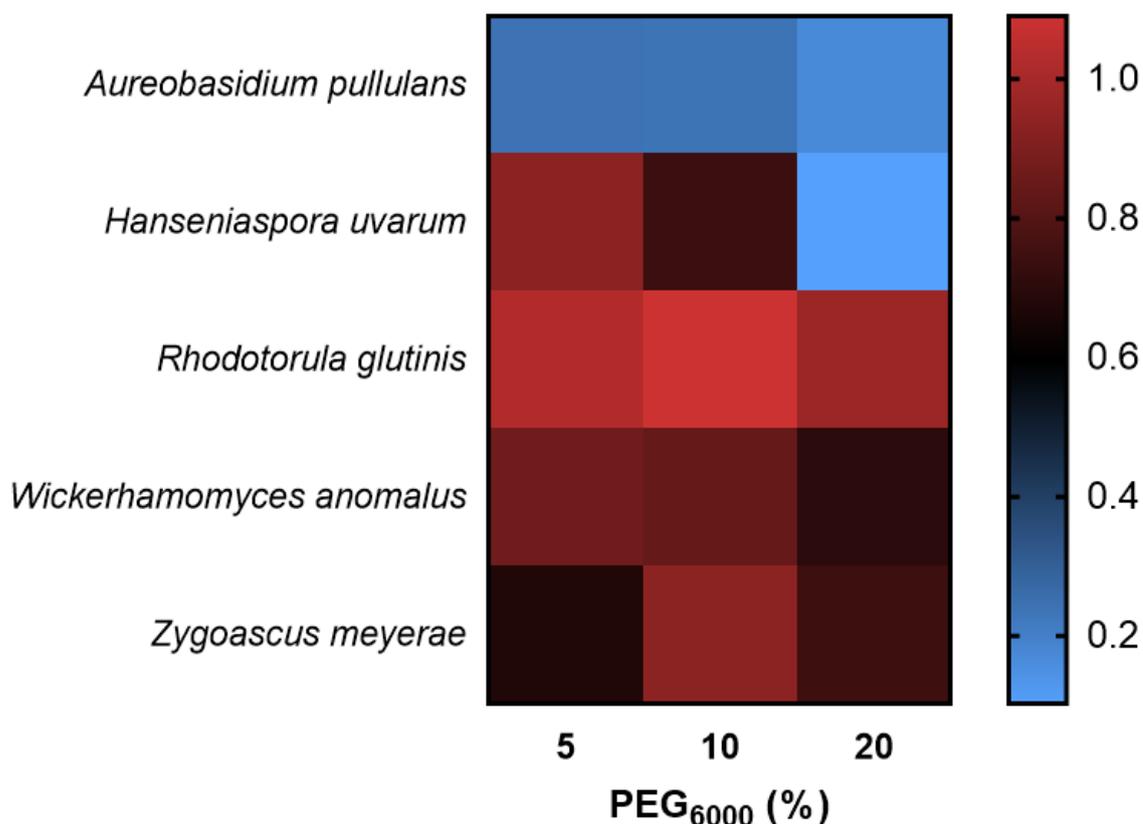


Fig. 20. Efeito do PEG₆₀₀₀ no crescimento das 5 espécies de levedura mais abundantes nos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão. Para cada espécie, foi calculado o rácio entre a D.O._{600nm} na presença do fator de stresse e na sua ausência (controlo), após 14 h de incubação. Os resultados foram representados sob a forma de *heat map* utilizando a média dos valores obtidos para 2 réplicas biológicas; na escala de cores, o rácio 1,0 refere-se a crescimento idêntico ao verificado na condição controlo (sem tratamento).

3.5. Perfil de crescimento de espécies de levedura selecionadas

O perfil de crescimento das espécies *R. glutinis* e *W. anomalus* foi avaliado em detalhe com vista a aferir o seu potencial biotecnológico. Para efeitos comparativos, foi também estudado o perfil de crescimento de *S. cerevisiae* (isolada de bagos de uva em estudos anteriores), por ser um modelo biológico de eleição em estudos de fermentação alcoólica (**Fig. 21**). O padrão de crescimento celular de *R. glutinis* e *W. anomalus* em meio mineral com glicose foi semelhante. As espécies apresentaram taxas específicas de crescimento (μ) de 0,561 e 0,629 h⁻¹, respetivamente, e tempos de duplicação (Td) de 1,236 e 1,102 h, respetivamente. A levedura *S. cerevisiae* apresentou um valor de μ substancialmente mais baixo (0,332 h⁻¹) e um Td de 2,088 h.

A capacidade fermentativa de *W. anomalus* foi comparada com a de *S. cerevisiae*, pela quantificação de etanol e de ácido acético no meio de cultura. *S. cerevisiae* exibiu maior capacidade fermentativa, tendo-se observado um pico máximo de etanol às 23 h após inoculação. A concentração de etanol produzida por *W. anomalus* foi inferior à concentração produzida por *S. cerevisiae*. Em paralelo, foi observada a produção de ácido acético durante o crescimento de *W. anomalus*, com um valor máximo de 0,041% observado às 39 h.

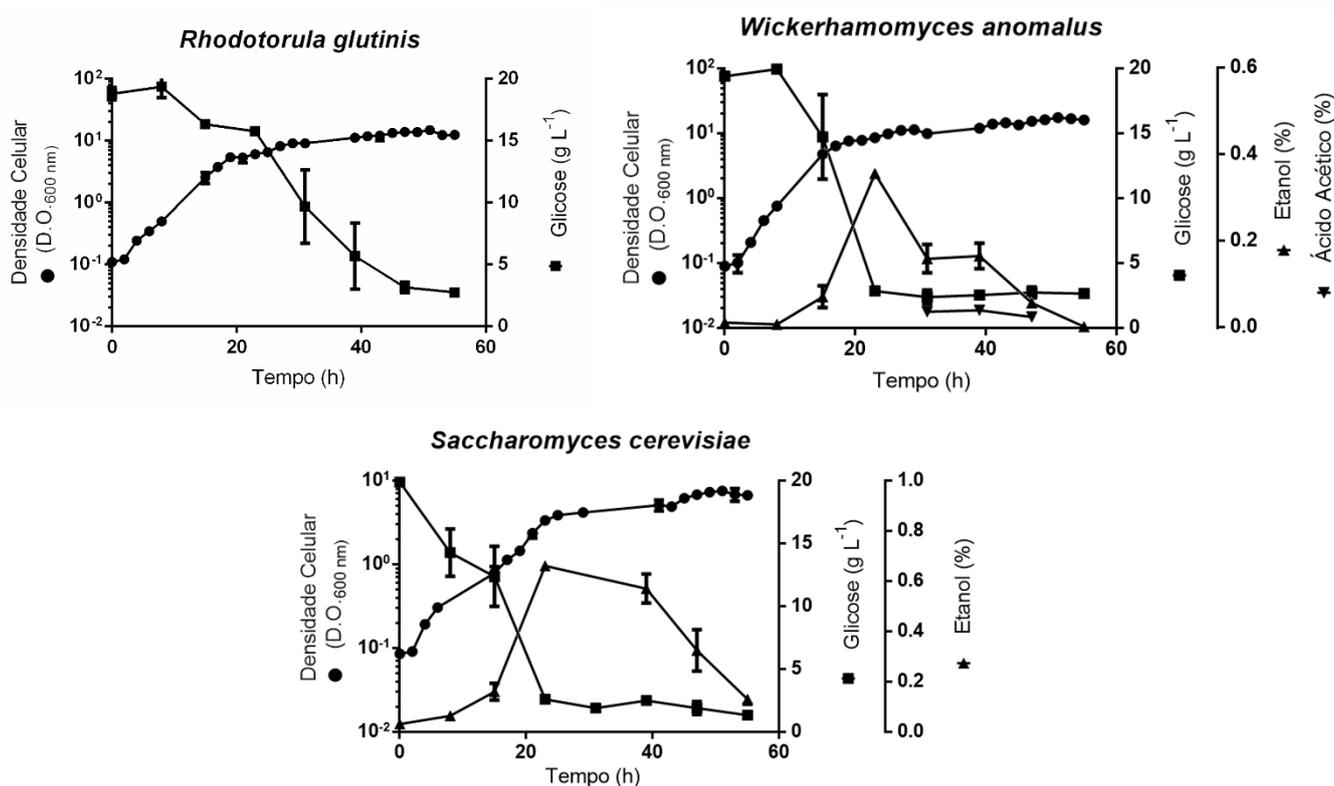


Fig. 21. Avaliação do crescimento celular, consumo de glicose, produção de etanol e de ácido acético de *R. glutinis*, *W. anomalus* e *S. cerevisiae*, a 24 °C em meio mineral suplementado com 2% de glicose como fonte única de carbono, e pH 4,5. Os resultados representam a média ± DP de valores obtidos para 2 réplicas biológicas.

4. DISCUSSÃO

4.1. O cálcio diminui a acumulação de antocianinas no bago de uva, sem afetar níveis de açúcares e fenólicos totais

Como já mencionado ao longo desta dissertação, o cálcio é um mensageiro secundário intracelular, desempenhando papéis importantes na regulação de vários processos celulares essenciais (Tuteja e Mahajan, 2007). Desta forma, foram esperadas modificações metabólicas que afetam a qualidade do fruto com a suplementação de cálcio. Neste estudo foram detetadas antocianinas nos bagos cv. Vinhão, mas não nos bagos cv. Loureiro, estando em conformidade com estudos anteriores que relataram a ausência destes pigmentos em variedades brancas (Boss *et al.*, 1996). No entanto, estudos recentes de Martins *et al.* (2021b) reportaram a detecção de antocianinas em bagos cv. Loureiro, através do método de quantificação de elevada sensibilidade UPLC-MS. O estudo revelou ainda que a diversidade destes pigmentos é semelhante tanto nas variedades de uvas brancas como nas tintas. Em outros estudos também recorrendo a métodos cromatográficos de elevada sensibilidade, foram detetados níveis residuais de antocianinas em uvas de castas brancas, incluindo “Chardonnay”, “Sauvignon Blanc”, “Riesling”, “Pinot Blanc” e “Muscat Blanc” (Arapitsas *et al.*, 2015; Niu *et al.*, 2017).

O efeito inibitório do cálcio sobre os níveis de antocianinas observado no presente trabalho em bagos da casta Vinhão corrobora estudos anteriores e é consistente com a regulação negativa dos genes *ANS* e *UFGT* (Martins *et al.*, 2020a, 2021b). Com efeito, em suspensões celulares de bago de uva, níveis elevados de cálcio no meio de cultura induziram repressão das vias de biossíntese das antocianinas, tanto a nível da transcrição como ao nível da atividade de enzimas chave (Martins *et al.*, 2018).

Um estudo recente conduzido no nosso grupo de investigação (Martins *et al.* 2020a), mostrou ainda que o efeito do cálcio nos níveis totais de compostos fenólicos pode variar de acordo com o ano de colheita, estando os resultados do presente trabalho de acordo com o observado no ano de 2018 em vinhas da casta Vinhão.

Os resultados referentes ao teor de açúcares mostraram que a aplicação de suplementos de cálcio não afetou significativamente a acumulação destes solutos, corroborando resultados anteriores em bagos cv. Vinhão (Martins *et al.* 2020a). No entanto, a tendência de decréscimo observada em bagos cv. Loureiro está de acordo com uma pesquisa recente nesta variedade, em que foi demonstrado que o cálcio atrasa o processo de maturação dos frutos, diminuindo o conteúdo em açúcares e o tamanho dos frutos na fase madura (Martins *et al.*, 2021b). No presente

trabalho, a maior concentração de açúcares redutores medida nos bagos da casta Loureiro do que nos bagos da casta Vinhão pode explicar a maior abundância de microbiota na primeira casta, discutida nas secções seguintes.

4.2. As espécies *H. uvarum* e *A. pullulans* prevalecem na comunidade microbiana cultivável dos bagos de uva Loureiro e Vinhão, enquanto que *S. cerevisiae* não é detetável

Para o presente estudo foi adotada uma metodologia de identificação de leveduras cultiváveis baseada na sequenciação de Sanger, que se revelou útil dada a possibilidade de preservar em laboratório várias espécies relevantes do ponto de vista enológico e de melhor estudar o seu fenótipo. Em contrapartida, este método apresenta limitações, visto que apenas permite o estudo de espécies cultiváveis *in vitro*, que representam uma pequena percentagem da microbiota total do bago. Com efeito, as técnicas de NGS – *next generation sequencing* – permitem a caracterização extensiva das comunidades microbianas a partir da extração do DNA da microbiota total dos bagos de uva (Mezzasalma *et al.*, 2017). Estes estudos incluem a construção de duas bibliotecas de DNA, uma para fungos e outra para bactérias, e a sequenciação das regiões ITS e 16S, respetivamente. Este método permite obter uma lista de todas as espécies presentes, incluindo as menos abundantes e as que não são cultiváveis. No entanto, no contexto do presente trabalho, o estudo das espécies cultiváveis foi prioritário, uma vez que permitiu contribuir para a construção de um catálogo das estirpes de cada casta com potencial utilização na produção de vinhos regionais, em linha com os objetivos do projeto GrapeMicrobiota (FCT - PTDC/BAA-AGR/2691/2020).

No presente trabalho, verificou-se que a espécie *Hanseniaspora uvarum* é a taxa dominante nos bagos de uva da casta Loureiro (90%) e a terceira mais abundante em bagos da casta Vinhão, em linha com estudos anteriores (Fleet 2003; Kántor *et al.*, 2017). No entanto, estes estudos mostraram que o género *Metschnikowia* sp. é dos isolados mais comuns, representando até 38% da microbiota cultivável, o que não se verificou no presente estudo, visto que este género apenas está presente nos bagos de uva cv. Loureiro em percentagens muito menores (1,2%). Os resultados mostraram ainda que *Aureobasidium pullulans* constituiu a taxa dominante nos bagos da casta Vinhão, expostos ao mesmo microclima, juntamente com *Rhodotorula glutinis*. *A. pullulans* detém uma posição dominante na maioria dos *terroirs* de videira estudados, sendo classificada como uma espécie facilmente controlável, sem capacidade de deteriorar o vinho,

quando boas práticas de produção são aplicadas (Barata *et al.*, 2012; Bozoudi e Tsaltas, 2018), ostentado assim uma notável significância tecnológica. Apesar da possibilidade do seu isolamento em bagos de uva maduras, esta taxa é predominante, nas primeiras fases de maturação, juntamente com as espécies: *Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Candida* (Fleet, 2003). No seu conjunto, os resultados do presente estudo confirmam que a casta tem uma influência considerável na microbiota cultivável do bago de uva.

As interações entre os microrganismos que colonizam os bagos de uva ainda estão muito pouco estudadas, no entanto, vários fatores podem afetar a composição da microbiota do bago e, conseqüente, a abundância relativa de cada espécie, incluindo a região geográfica, as condições edafoclimáticas, o grau de maturação dos frutos e os tratamentos fitossanitários (Fleet, 2003; Barata *et al.* 2012). Entre as leveduras menos abundantes no fruto, identificadas no presente estudo, encontram-se *W. anomalus*, *T. coremiiforme* e *Z. meyeræ*, sendo esta última também a menos abundante em estudos anteriores (Cabañas *et al.* 2020).

Ainda a respeito de *Metschnikowia* sp., no presente trabalho não foi possível fazer uma identificação ao nível da espécie, uma vez que foram obtidos valores invulgares de *E value* na sua identificação por *Blast*, sugerindo que a sequência ITS da espécie isolada não está ainda anotada no NCBI. Neste contexto a sequenciação de outra região do genoma desta estirpe poderá ser útil.

Desde os trabalhos de Pasteur (1872), em finais do século XIX, uma grande quantidade de informação foi recolhida sobre a disseminação das leveduras em ambientes associados ao vinho, mas a evolução da microbiota do bago para o vinho ainda não foi totalmente compreendida (Vaughan-Martini e Martini, 1995). O foco principal tem sido *S. cerevisiae* dada a sua relevância na fermentação alcoólica. No presente trabalho, foi observado que *Saccharomyces* spp. não incorpora o conjunto de taxas detetáveis na superfície dos bagos de uva, o que está de acordo com estudos anteriores focados na microbiota cultivável (Barata *et al.*, 2012) e na microbiota total pelo método de NGS (Martins *et al.* 2021c). Foi ainda estimado que *S. cerevisiae* apenas é detetável em cerca de um em mil bagos de uva. A possibilidade de correntes de ar transportarem gotículas de espuma rica em *S. cerevisiae* do topo dos fermentadores das adegas vinícolas é diminuta (Mortimer e Polsinelli, 1999). No entanto, práticas vitivinícolas como a aplicação de borras de vinho nas vinhas como método fertilizante podem ser uma das formas de disseminação desta levedura (Clavijo *et al.*, 2010). Tendo sido concluído que esta taxa não é um contaminante do ar, estudos apontam que esta espécie necessita de um vetor para colonizar os bagos de uva, incluindo insetos disseminadores no ambiente vitivinícola, como abelhas (*Apis* sp.), vespas

(*Vespa* sp.) e moscas (*Drosophila* sp.) (Stević, 1963; Lachance *et al.*, 1995). Por outro lado, a possibilidade de *S. cerevisiae* estar presente em equipamentos vinícolas como trituradores, bombas, tubos ou tanques de fermentação pode explicar a sua incorporação na flora de fermentação (Mortimer e Polsinelli, 1999). Dependendo dos procedimentos de limpeza aplicados nos locais onde ocorrem os processos de vinificação, leveduras fermentativas como a *S. cerevisiae* poderão ser encontradas ainda nas paredes das adegas (Martini, 1993; Martini *et al.*, 1996). Outros estudos sugerem que algumas espécies de levedura como *Metschnikowia pulcherrima* competem com *S. cerevisiae*, inibindo o seu crescimento (Nguyen e Panon, 1998), o que pode explicar a dificuldade de detecção deste taxa nos bagos de uva.

4.3. O cálcio diminui a abundância de leveduras na superfície do bago de uva, afetando diferentes espécies de forma dependente da casta

No presente estudo, a aplicação de CaCl_2 nas vinhas ao longo da época de frutificação resultou na diminuição da quantidade total de leveduras na superfície dos bagos de uva de ambas as castas. Estudos de microscopia eletrônica de varrimento (Martins *et al.*, 2020b), mostraram que o tratamento com cálcio inibe a colonização da superfície do bago por fungos filamentosos. Estes resultados indicam que o cálcio poderá ter potencial aplicabilidade como fungicida, de acordo com estudos preliminares (Romanazzi *et al.* 2012; Martins *et al.*, 2021b). No presente trabalho, verificou-se que o tratamento com cálcio afeta fortemente as espécies mais abundantes nos bagos: a abundância relativa de *H. uvarum* diminuiu substancialmente nos bagos cv. Loureiro, sendo substituída por *A. pullulans*. O efeito inverso foi observado em bagos cv. Vinhão. Estes resultados evidenciam um claro efeito antagonista entre as espécies *A. pullulans* e *H. uvarum*. O efeito diferencial do tratamento com cálcio dependente da casta foi também observado ao nível de outras espécies como *R. glutinis*, consistente com a existência de relações estreitas entre as diferentes espécies da microbiota do bago que deverão ser alvo de investigação em estudos futuros.

Como já referido em secções anteriores, a composição da comunidade de leveduras do bago de uva depende de fatores como temperatura, tipo de solo, precipitação, presença de insetos, tratamentos fitossanitários, entre outros (Kántor *et al.*, 2017). Por exemplo, foi observado que *Aureobasidium* spp. e *H. uvarum* evidenciavam uma abundância relativa equivalente, embora as suas proporções variassem dependendo do sistema de cultivo e da localização/zonas climáticas de origem (Cachón *et al.*, 2019). Uma vez que todo o material biológico recolhido no presente trabalho foi exposto ao mesmo microclima, este fenómeno apenas poderá ser explicado pela

diferença na composição dos bagos cv. Vinhão e Loureiro. Com efeito, estudos recentes do nosso grupo de investigação reportaram que o tratamento com cálcio afeta de forma diferencial o perfil metabólico das ceras presentes na cutícula dos bagos de cada casta (Martins *et al.* 2021b), podendo este efeito estar relacionado com a diferente composição da microbiota superficial, uma vez que muitos dos compostos das ceras são substratos das leveduras. Ao nível molecular, foi observado que o cálcio inibe a expressão dos genes *CER9* e *CYP15* que regulam a formação de ceras e a biossíntese da cutícula do bago de uva (Martins *et al.*, 2020b), o que pode afetar diretamente a síntese de cutina, a composição das ceras e a supressão da transpiração, conforme descrito em mutantes de *Arabidopsis* (Lü *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2021c).

Adicionalmente, modificações dos níveis de compostos polifenólicos e das propriedades antioxidantes dos frutos podem também explicar as diferenças observadas pelo tratamento com cálcio (Martins *et al.* 2021a). Por exemplo, foi reportado que o cálcio induz a expressão do gene *STS* em ambas as castas, resultando, no entanto, na acumulação preferencial de diferentes estilbenóides em cada casta, sendo o *E*-resveratrol mais acumulado em bagos cv. Vinhão e *E*-piceid em bagos cv. Loureiro (Martins *et al.*, 2020a, 2021b). Outras diferenças ao nível da composição química do bago podem também explicar os resultados observados e deverão ser exploradas em estudos futuros.

Nos ensaios realizados no presente estudo com as espécies isoladas sujeitas a fatores de stresse específicos, foi possível concluir que *H. uvarum* e *A. pullulans* são as mais sensíveis ao tratamento com cálcio, reforçando que a conjugação de outros fatores *in vivo* determina a abundância relativa de cada espécie. Estes resultados são relevantes do ponto de vista enológico, visto que *A. pullulans* contribui para o perfil aromático do vinho com aromas típicos associados ao ácido 2-metilbutírico, ao 3-metil-1-butanol e ao octanoato (Bozoudi e Tsaltas, 2018; Verginer *et al.*, 2010). Por outro lado, as espécies ascomicetas oxidativas, fracamente fermentativas ou fermentativas (*Candida* spp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* spp.), incluindo a *H. uvarum*, estão presentes nas etapas de pré-fermentação ou início de fermentação, mas são consideradas contaminantes ou deterioradoras (Barata *et al.*, 2012). Os resultados do presente estudo podem também ter relevância ao nível biotecnológico, uma vez que já foi confirmada a eficácia de *A. pullulans* como agente de biocontrolo contra podridões pós-colheita (Schena *et al.*, 2003). A atividade antagonista de *H. uvarum* face ao fungo *Botrytis cinerea* torna-a um ótimo agente de biocontrolo para a doença da podridão cinzenta (Qin *et al.*, 2015). Estas e outras doenças pós-colheita são tipicamente controladas por aplicações rotineiras de fungicidas químicos sintéticos

(Fleet, 2003), no entanto, a crescente preocupação dos consumidores e autoridades de saúde relativa ao uso intensivo de agroquímicos tem incentivado os cientistas a procurar opções de controlo de doenças sustentáveis amigas do ambiente (Chalutz e Droby, 1998). Estudos demonstraram que *H. uvarum* afeta a atividade dos principais sistemas enzimáticos de proteção celular contra danos oxidativos (*POD*, *SOD* e *CAT*), potenciando a atividade de outras enzimas-chave envolvidas na resposta de defesa contra infeções fúngicas, incluindo a PAL e β -1,3-glucanase (Liu *et al.*, 2010ab). As leveduras *M. pulcherrima*, *Pichia* sp., *Cryptococcus* sp., algumas espécies de *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* são potenciais agentes de controlo biológico, bem como várias espécies de *Candida*, incluindo *C. oleophila* que está registada para uso comercial (Walker *et al.*, 1995; Fleet, 2003).

Uma vez que os resultados do presente estudo demonstraram que o cálcio pode atuar também como agente antifúngico, a otimização de combinações de cálcio e de leveduras nativas com atividade antifúngica pode conduzir ao desenho de estratégias de combate a doenças, minimizando a utilização dos fungicidas químicos para uma viticultura mais sustentável.

4.4. A. pullulans destaca-se na sua elevada sensibilidade ao cobre e ao stresse osmótico

No presente estudo verificou-se que de entre as espécies isoladas da superfície dos bagos de uva, *A. pullulans* exibe a maior sensibilidade ao stresse causado pelo cobre e pelo PEG, ao contrário de *H. uvarum* que revelou ser a mais tolerante ao primeiro e *R. glutinis* ao segundo. Estes resultados sugerem que *A. pullulans* pode ser um bom indicador de stresse abiótico em videira, ajudando, por exemplo, a monitorizar os efeitos de fungicidas à base de cobre, como a calda bordalesa, na qualidade dos frutos e do vinho. Com efeito, estudos anteriores mostraram que a aplicação de calda bordalesa nas vinhas modela a composição química do bago de uva e o perfil volátil do vinho, podendo inibir o processo fermentativo (Martins *et al.*, 2014b, 2015). Outros estudos mostraram que vários fungicidas utilizados no tratamento da vinha influenciam a comunidade microbiana do bago, bem como a ecologia e o desempenho das leveduras durante a fermentação, embora muitos resultados sejam contraditórios, pelo que são necessários mais estudos (Cabras *et al.*, 1999; Cabras e Angioni, 2000). A aplicação de fungicidas orgânicos (ciprodinil + fludioxonil) resultou numa redução pronunciada do número de leveduras na superfície do bago (Comitini e Ciani, 2008). Foi observado que a aplicação deste tipo de fungicidas favorece a colonização de leveduras não fermentativas e ubíquas, tais como *A. pullulans* e *Cryptococcus*

spp. Ao contrário, a aplicação de fungicidas inorgânicos (sulfato de cobre e enxofre), os únicos permitidos na agricultura biológica, favorece a colonização do bago por leveduras de fermentação de vinho como *M. pulcherrima*, juntamente com *H. uvarum*, *A. pullulans* e *Cryptococcus* spp., sugerindo um efeito menos nefasto sobre comunidades microbianas. Foi também observado que os surfactantes, dispersantes, solubilizantes, entre outros compostos presentes nas formulações dos fungicidas, podem modificar a microbiota do fruto (Preece e Dickinson, 1971, Ng *et al.* 2005).

4.5. Potencial biotecnológico das espécies *R. glutinis* e *W. anomalus*

S. cerevisiae exibe um metabolismo fermentativo quando a concentração de açúcar excede 10 g L⁻¹ (efeito Crabtree), no entanto, muitas leveduras não-*Saccharomyces* são capazes de utilizar o oxigênio para o crescimento, independentemente da concentração de açúcar e, desta forma, desviar o carbono para a síntese de outros metabolitos, reduzindo a produção de etanol (Alexander e Jeffries, 1990; De Deken, 1966; Gonzalez *et al.*, 2013; Contreras *et al.*, 2015). Este é o caso de *R. glutinis*, uma levedura com um metabolismo essencialmente respiratório, sendo capaz de metabolizar variados substratos como fonte de carbono e energia, nomeadamente, glicose (presente estudo), galactose, sacarose, maltose, trealose, etanol, glicerol e hexadecano. Com efeito, apesar de ser considerada irrelevante para a produção vitícola (Kántor *et al.*, 2017), *R. glutinis* tem um elevado potencial para a produção de vinhos com menor teor alcoólico por ser capaz de reduzir os níveis de açúcar do mosto por respiração. Neste contexto, foi observado que a adição de pequenas quantidades de oxigênio durante o processo fermentativo, conduz à redução da concentração de etanol no vinho (Contreras *et al.*, 2015).

No presente estudo foi mostrado que *W. anomalus* é mais tolerante ao etanol do que as restantes leveduras isoladas dos bagos, tratando-se de uma levedura fermentativa. Com efeito, algumas estirpes de *W. anomalus* podem tolerar até 12,5 % (v/v) de etanol (Padilla *et al.*, 2018). Para além de ser capaz de produzir ácido acético, esta espécie tolera condições ambientais extremas, como stresse oxidativo, salino e osmótico, bem como choques térmicos e de pH, pelo que é considerada uma levedura de contaminação (Tokuoka *et al.*, 1985; Lanciotti *et al.*, 1998). Contudo, *W. anomalus* pode ter um efeito benéfico durante o processo de vinificação devido à capacidade de produção e secreção de enzimas específicas (Cordero-Bueso *et al.*, 2013).

O comportamento de cada espécie não-*Saccharomyces* é influenciado de uma forma específica pela presença de *S. cerevisiae* (Bagheri *et al.*, 2017). Por exemplo, *W. anomalus* é capaz de produzir toxinas e suprimir as espécies não-*Saccharomyces* na ausência de *S. cerevisiae*, sendo

capaz de sobreviver nas fases iniciais da fermentação recorrendo ao azoto libertado pelas células mortas. No entanto, na presença de *S. cerevisiae*, a população de *W. anomalus* é muito reduzida, sugerindo que existe uma interação antagonística entre ambas as leveduras. Esta interação negativa entre ambas *W. anomalus* e *S. cerevisiae* foi também proposta em fermentações de cidra de maçã (Ye *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2018).

4.6. Conclusão

O presente estudo contribuiu para a elaboração de um catálogo de espécies de levedura cultiváveis dos bagos de uva das castas Loureiro e Vinhão, apresentando valiosa informação sobre a resposta de diferentes isolados a fatores de stresse abiótico. Estes estudos abriram ainda caminho para a produção de vinhos com um *terroir* específico, produzidos por fermentação com estirpes nativas, bem como para a otimização da utilização das leveduras nativas como agentes de biocontrolo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ageorges, A., Fernandez, L., Vialet, S., Merdinoglu, D., Terrier, N., & Romieu, C.** (2006). Four specific isogenes of the anthocyanin metabolic pathway are systematically co-expressed with the red colour of grape berries. *Plant Science*, *170*(2), 372-383.
- Aherne, S. A., & O'Brien, N. M.** (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, *18*(1), 75-81.
- Alexander, M. A., & Jeffries, T. W.** (1990). Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*, *12*(1), 2-19.
- Ando, Y., Hagiwara, S., & Nabetani, H.** (2017). Thermal inactivation kinetics of pectin methylesterase and the impact of thermal treatment on the texture, electrical impedance characteristics and cell wall structure of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Food Engineering*, *199*, 9-18.
- Anesi, A., Stocchero, M., Dal Santo, S., Commisso, M., Zenoni, S., Ceoldo, S., Tornielli, G., Siebert, T., Herderich, M., Pezzotti, M., & Guzzo, F.** (2015). Towards a scientific interpretation of the terroir concept: plasticity of the grape berry metabolome. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 191.
- Antunes, M. D. C., Panagopoulos, T., Rodrigues, S., Neves, N., & Curado, F.** (2004). The effect of pre- and postharvest calcium applications on Hayward kiwifruit storage ability. *V International Postharvest Symposium*, *682* (pp. 909-916).
- Arapitsas, P., Oliveira, J., & Mattivi, F.** (2015). Do white grapes really exist?. *Food Research International*, *69*, 21-25.
- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M. A., Arnold, C., ... & Martínez-Zapater, J. M.** (2006). Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*, *15*(12), 3707-3714.
- Bagheri, B., Bauer, F. F., & Setati, M. E.** (2017). The impact of *Saccharomyces cerevisiae* on a wine yeast consortium in natural and inoculated fermentations. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1988.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V.** (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, *153*(3), 243-259.
- Bavaresco, L., Cantu, E., Fregoni, M., & Trevisan, M.** (2015). Constitutive stilbene contents of grapevine cluster stems as potential source of resveratrol in wine. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, *36*(3), 115.
- Belda, I., Gobbi, A., Ruiz, J., de Celis, M., Ortiz-Álvarez, R., Acedo, A., & Santos, A.** (2020). Microbiomics to define wine terroir.
- Bogs, J., Ebadi, A., McDavid, D., & Robinson, S. P.** (2006). Identification of the flavonoid hydroxylases from grapevine and their regulation during fruit development. *Plant Physiology*, *140*(1), 279-291.
- Bokulich, NA, Thorngate, JH, Richardson, PM, & Mills, DA** (2014). A biogeografia microbiana de uvas para vinho é condicionada pelo cultivo, safra e clima. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111* (1), E139-E148.
- Bonomelli, C., & Ruiz, R.** (2010). Effects of foliar and soil calcium application on yield and quality of table grape cv. 'Thompson Seedless'. *Journal of Plant Nutrition*, *33*(3), 299-314.

- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M. A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., ... & Soustre-Gacougnolle, I.** (2013). Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, *13*(1), 1-15.
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D.** (2018). The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*, *4*(4), 85.
- Braidot, E., Zancani, M., Petrusa, E., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., ... & Vianello, A.** (2008). Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Signaling & Behavior*, *3*(9), 626-632.
- Burns, K. N., Kluepfel, D. A., Strauss, S. L., Bokulich, N. A., Cantu, D., & Steenwerth, K. L.** (2015). Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features. *Soil Biology and Biochemistry*, *91*, 232-247.
- Cabañas, C. M., Hernández, A., Martínez, A., Tejero, P., Vázquez-Hernández, M., Martín, A., & Ruiz-Moyano, S.** (2020). Control of *Penicillium glabrum* by indigenous antagonistic yeast from vineyards. *Foods*, *9*(12), 1864.
- Caboni, P., & Cabras, P.** (2010). Pesticides' influence on wine fermentation. *Advances in Food and Nutrition Research*, *59*, 43-62..
- Cabras, P., & Angioni, A.** (2000). Pesticide residues in grapes, wine, and their processing products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(4), 967-973.
- Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Pirisi, F. M., Farris, G. A., Madau, G., & Emonti, G.** (1999). Pesticides in fermentative processes of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(9), 3854-3857.
- Castro, I., Pinto-Carnide, O., Ortiz, J. M., & Martín, J. P.** (2013). Chloroplast genome diversity in portuguese grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Molecular Biotechnology*, *54*(2), 528-540.
- Chalutz, E., & Droby, S.** (1998). Biological control of *plant-microb. Interactions and Biological Control*, *63*, 157.
- Chuine, I., Yiou, P., Viovy, N., Seguin, B., Daux, V., & Ladurie, E. L. R.** (2004). Grape ripening as a past climate indicator. *Nature*, *432*(7015), 289-290.
- Clavijo, A., Calderón, I. L., & Paneque, P.** (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serrania de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, *143*(3), 241-245.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A.** (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, *189*(1), 81-87.
- Cohen, S. D., Tarara, J. M., Gambetta, G. A., Matthews, M. A., & Kennedy, J. A.** (2012). Impact of diurnal temperature variation on grape berry development, proanthocyanidin accumulation, and the expression of flavonoid pathway genes. *Journal of Experimental Botany*, *63*(7), 2655-2665.
- Comitini, F., & Ciani, M.** (2008). Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes. *Annals of Microbiology*, *58*(3), 489-493.
- Comitini, F., Capece, A., Ciani, M., & Romano, P.** (2017). New insights on the use of wine yeasts. *Current Opinion in Food Science*, *13*, 44-49.

- Conde, A., Neves, A., Breia, R., Pimentel, D., Dinis, L. T., Bernardo, S., ... & Moutinho-Pereira, J.** (2018). Kaolin particle film application stimulates photoassimilate synthesis and modifies the primary metabolome of grape leaves. *Journal of Plant Physiology*, *223*, 47-56.
- Conde, A., Pimentel, D., Neves, A., Dinis, L. T., Bernardo, S., Correia, C. M., ... & Moutinho-Pereira, J.** (2016). Kaolin foliar application has a stimulatory effect on phenylpropanoid and flavonoid pathways in grape berries. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1150.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., ... & Gerós, H.** (2007). Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, *1*, 1-22.
- Contreras, A., Hidalgo, C., Schmidt, S., Henschke, P. A., Curtin, C., & Varela, C.** (2015). The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content. *International Journal of Food microbiology*, *205*, 7-15.
- Coombe, B. G.** (1992). Research on development and ripening of the grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, *43*(1), 101-110.
- Coombe, B. G.** (1995). Growth stages of the grapevine: adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine research*, *1*(2), 104-110.
- Coombe, B. G., & Hale, C. R.** (1973). The hormone content of ripening grape berries and the effects of growth substance treatments. *Plant Physiology*, *51*(4), 629-634.
- Coombe, B. G., & McCarthy, M. G.** (2000). Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *6*(2), 131-135.
- Cordero-Bueso, G., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., Gil-Díaz, M., & Arroyo, T.** (2013). Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.). *European Food Research and Technology*, *236*(1), 193-207.
- Cortell, J. M., & Kennedy, J. A.** (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(22), 8510-8520.
- Costa, J. M., Vaz, M., Escalona, J., Egípto, R., Lopes, C., Medrano, H., & Chaves, M. M.** (2016). Modern viticulture in southern Europe: Vulnerabilities and strategies for adaptation to water scarcity. *Agricultural Water Management*, *164*, 5-18.
- Coxhead, P.** (2015). www.commons.wikimedia.org/wiki/File:Grape_berry_diagram_en.svg (acesso em junho de 2020).
- Cunha, J., Ibáñez, J., Teixeira-Santos, M., Brazão, J., Feveiro, P., Martínez-Zapater, J. M., & Eiras-Dias, J. E.** (2016). Characterisation of the Portuguese grapevine germplasm with 48 single-nucleotide polymorphisms. *Australian Journal of Grape and Wine research*, *22*(3), 504-516.
- De Deken, R. H.** (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Microbiology*, *44*(2), 149-156.
- Dokoozlian, N. K.** (2000). Grape berry growth and development. *Raisin Production Manual*, *3393*, 30.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P.** (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *10*(1), 55-73.

- Easterling, D. R., Evans, J. L., Groisman, P. Y., Karl, T. R., Kunkel, K. E., & Ambenje, P.** (2000). Observed variability and trends in extreme climate events: a brief review. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 81(3), 417-426.
- Fleet, G. H.** (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Fleet, G. H.** (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979-995.
- Gainza-Cortés, F., Pérez-Díaz, R., Pérez-Castro, R., Tapia, J., Casaretto, J. A., González, S., ... & González, E.** (2012). Characterization of a putative grapevine Zn transporter, VvZIP3, suggests its involvement in early reproductive development in *Vitis vinifera* L. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-13.
- Gatti, M., Garavani, A., Cantatore, A., Parisi, M. G., Bobeica, N., Merli, M. C., ... & Poni, S.** (2015). Interactions of summer pruning techniques and vine performance in the white *Vitis vinifera* cv. O rtrugo. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(1), 80-89.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., ... & Velasco, R.** (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(24), 11773-11785.
- Gonzalez, R., Quirós, M., & Morales, P.** (2013). Yeast respiration of sugars by non-*Saccharomyces* yeast species: a promising and barely explored approach to lowering alcohol content of wines. *Trends in Food Science & Technology*, 29(1), 55-61.
- Goodwin, I.** (2002). *Managing water stress in grape vines in Greater Victoria*. Department of Primary Industries.
- Grube, M., Schmid, F., & Berg, G.** (2011). Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology*, 115(10), 978-986.
- Hocking, B., Tyerman, S. D., Burton, R. A., & Gilliham, M.** (2016). Fruit calcium: transport and physiology. *Frontiers in Plant Science*, 7, 569.
- Infovini** – www.infovini.com (acesso em novembro de 2020).
- Jolly, N. P., Varela, C., & Pretorius, I. S.** (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215-237.
- Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., & Storchmann, K.** (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73(3), 319-343.
- Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., & Kačániová, M.** (2017). Microorganisms of grape berries. In *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, (Vol. 71, No. 6, pp. 502-508).
- Keller, M.** (2004). Irrigation strategies for white and red grapes. March 31, 2004. In *33rd Annual NY Wine Industry Workshop, Geneva, New York* (pp. 102-106).
- Kennedy, James & Robinson, Simon & Walker, Mandy.** (2007). Grape and wine tannins: production, perfection, perception. *Practical Winery and Vineyard*.
- Kunkee RE, Goswell RW** (1996). Table wines. In: Jay JM (Ed) *Modern Food Microbiology* (5th Edn), Chapman and Hall, USA, pp 315-379.

- Lachance, M. A., Gilbert, D. G., & Starmer, W. T.** (1995). Yeast communities associated with *Drosophila* species and related flies in an eastern oak-pine forest: a comparison with western communities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 14(6), 484-494.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., & Guerzoni, M. E.** (1998). *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. *Microbiological Research*, 153(2), 145-148.
- Lerm, E., Engelbrecht, L., & Du Toit, M.** (2011). Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 32(2), 280-295.
- Liu, H. M., Guo, J. H., Cheng, Y. J., Luo, L., Liu, P., Wang, B. Q., ... & Chao'an, A.** (2010a). Control of gray mold of grape by *Hanseniaspora uvarum* and its effects on postharvest quality parameters. *Annals of Microbiology*, 60(1), 31-35.
- Liu, H. M., Guo, J. H., Luo, L., Liu, P., Wang, B. Q., Cheng, Y. J., ... & Long, C. A.** (2010b). Improvement of *Hanseniaspora uvarum* biocontrol activity against gray mold by the addition of ammonium molybdate and the possible mechanisms involved. *Crop Protection*, 29(3), 277-282.
- Lonvaud-Funel, A.** (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. In *Lactic acid bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* (pp. 317-331). Springer, Dordrecht.
- Lü, S., Zhao, H., Des Marais, D. L., Parsons, E. P., Wen, X., Xu, X., ... & Jenks, M. A.** (2012). Arabidopsis ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiology*, 159(3), 930-944.
- Madani, B., Mirshekari, A., & Yahia, E.** (2016). Effect of calcium chloride treatments on calcium content, anthracnose severity and antioxidant activity in papaya fruit during ambient storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2963-2968.
- Mamaot** (2012). Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, Portaria n.º 380/2012 de 22 de novembro.
- Martini, A.** (1993). Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine research*, 4(3), 165-176.
- Martini, A., Ciani, M., & Scorzetti, G.** (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(4), 435-440.
- Martins, G., Miot-Sertier, C., Lauga, B., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Soulas, G., & Masneuf-Pomarède, I.** (2012). Grape berry bacterial microbiota: impact of the ripening process and the farming system. *International Journal of Food Microbiology*, 158(2), 93-100.
- Martins, G., Vallance, J., Mercier, A., Albertin, W., Stamatopoulos, P., Rey, P., Lonvaud, A., & Masneuf-Pomarède, I.** (2014a). Influence of the farming system on the epiphytic yeasts and yeast-like fungi colonizing grape berries during the ripening process. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 21-28.
- Martins, V., Billet, K., Garcia, A., Lanoue, A., & Gerós, H.** (2020a). Exogenous calcium deflects grape berry metabolism towards the production of more stilbenoids and less anthocyanins. *Food Chemistry*, 313, 126123.
- Martins, V., Garcia, A., Alinho, A. T., Costa, P., Lanceros-Méndez, S., Costa, M. M. R., & Gerós, H.** (2020b). Vineyard calcium sprays induce changes in grape berry skin, firmness, cell wall composition and expression of cell wall-related genes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 49-55.

- Martins, V., Garcia, A., Costa, C., Sottomayor, M., & Gerós, H.** (2018). Calcium-and hormone-driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *Journal of Plant Physiology*, *231*, 57-67.
- Martins, V., López, R., Garcia, A., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2020c). Vineyard calcium sprays shift the volatile profile of young red wine produced by induced and spontaneous fermentation. *Food Research International*, *131*, 108983.
- Martins, V., Soares, C., Spormann, S., Fidalgo, F., & Gerós, H.** (2021a). Vineyard calcium sprays reduce the damage of postharvest grape berries by stimulating enzymatic antioxidant activity and pathogen defense genes, despite inhibiting phenolic synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, *162*, 48-55.
- Martins, V., Szakiel, A., Pączkowski, C., Teixeira, A., Gerós, H.** (2021c) The restructuring of grape berry waxes by calcium changes the surface microbiota. *Food Research International*, under review.
- Martins, V., Teixeira, A., & Gerós, H.** (2015). Changes in the volatile composition of wine from grapes treated with Bordeaux mixture: a laboratory-scale study. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *21*(3), 425-429.
- Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Blumwald, E., & Gerós, H.** (2014b). Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiology and Biochemistry*, *82*, 270-278.
- Martins, V., Unlubayir, M., Teixeira, A., Lanoue, A., & Gerós, H.** (2021b). Exogenous calcium delays grape berry maturation in the white cv. Loureiro while increasing fruit firmness and flavonol content. *Frontiers in Plant Science*, 1880.
- Mezzasalma, V., Sandionigi, A., Bruni, I., Bruno, A., Lovicu, G., Casiraghi, M., & Labra, M.** (2017). Grape microbiome as a reliable and persistent signature of field origin and environmental conditions in Cannonau wine production. *PLoS One*, *12*(9).
- Miller, G. L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428.
- Mills, D. A., Johannsen, E. A., & Cocolin, L.** (2002). Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, *68*(10), 4884-4893.
- Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C.** (2005). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(2), 85-118.
- Mortimer, R., & Polsinelli, M.** (1999). On the origins of wine yeast. *Research In Microbiology*, *150*(3), 199-204.
- Ng, P. J., Fleet, G. H., & Heard, G. M.** (2005). Pesticides as a source of microbial contamination of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, *101*(2), 237-250.
- Nguyen, H. V., & Panon, G.** (1998). The yeast *Metschnikowia pulcherrima* has an inhibitory effect against various yeast species. *Sciences des Aliments*, *101*(5), 515-526.
- Nicholas, K. A., Matthews, M. A., Lobell, D. B., Willits, N. H., & Field, C. B.** (2011). Effect of vineyard-scale climate variability on Pinot noir phenolic composition. *Agricultural and Forest Meteorology*, *151*(12), 1556-1567.
- Nicoue, E. E., Savard, S., & Belkacemi, K.** (2007). Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(14), 5626-5635.

Niu, S., Hao, F., Mo, H., Jiang, J., Wang, H., Liu, C., ... & Zhang, Y. (2017). Phenol profiles and antioxidant properties of white skinned grapes and their coloured genotypes during growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(1), 58-67.

Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV) - www.oiv.int/en/statistiques/ (acesso em junho de 2020).

Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2018). Challenges of the non-conventional yeast *Wickerhamomyces anomalus* in winemaking. *Fermentation*, 4(3), 68.

Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7, 411.

Pallmann, C. L., Brown, J. A., Olineka, T. L., Cocolin, L., Mills, D. A., & Bisson, L. F. (2001). Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 198-203.

Pasteur, L. (1872). Nouvelles expériences pour démontrer que le germe de la levure qui fait le vin provient de l'extérieur des grains de raisin. *CR Searces Acad. Sci. Paris*, 75, 781-793.

Pinto, C., Pinho, D., Cardoso, R., Custódio, V., Fernandes, J., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C., & Gomes, A. C. (2015). Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Frontiers in Microbiology*, 6, 905.

Preece, T. F., & Dickinson, C. H. (1971). Ecology of leaf surface microorganisms. *Academic Press, London*, pp. 640.

Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., & Si, L. (2015). Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 160-167.

Ramos, M. J. N., Coito, J. L., Silva, H. G., Cunha, J., Costa, M. M. R., & Rocheta, M. (2014). Flower development and sex specification in wild grapevine. *BMC Genomics*, 15(1), 1-21.

Renouf, V., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. L. I. N. E. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 316-327.

Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M., Smilanick, J.L., 2012. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biol. Technol.* 63 (1), 141-147.

Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M., & Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 169-180.

Romeyer F., Macheix J., Goiffon J., Reminiac C., & Sapis J. (1983). The browning capacity of grapes. 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31, 346-349.

Salzman RA, Tikhonova I, Bordelon BP, Hasegawa PM, Bressan RA (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiology*, 117, 465-472.

- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., & Ippolito, A.** (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30(3), 209-220.
- Siddiqui, S., & Bangerth, F.** (1995). Effect of pre-harvest application of calcium on flesh firmness and cell-wall composition of apples—influence of fruit size. *Journal of Horticultural Science*, 70(2), 263-269.
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Cornejo, P., & Kannan, V. R.** (2019). Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 55-62.
- Silva, P., Cardoso, H., & Gerós, H.** (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 65-72.
- Singleton, V. L.** (1992). Tannins and the qualities of wines. *Plant Polyphenols* (pp. 859-880). Springer, Boston, MA.
- Steinmaus, S., Elmore, C. L., Smith, R. J., Donaldson, D., Weber, E. A., Roncoroni, J. A., & Miller, P. R. M.** (2008). Mulched cover crops as an alternative to conventional weed management systems in vineyards. *Weed Research*, 48(3), 273-281.
- Stević, B.** (1963). The significance of bees (*Apis* sp.) and wasps (*Vespa* sp.) as carriers of yeasts, for the microflora. *Journal for Scientific Agricultural Research*, 15(47), 81.
- Stringini, M., Comitini, F., Taccari, M., & Ciani, M.** (2008). Yeast diversity in crop-growing environments in Cameroon. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 184-189.
- Tavares, S., Vesentini, D., Fernandes, J. C., Ferreira, R. B., Laureano, O., Ricardo-Da-Silva, J. M., & Amâncio, S.** (2013). *Vitis vinifera* secondary metabolism as affected by sulfate depletion: diagnosis through phenylpropanoid pathway genes and metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 118-126.
- Teissedre, P. L., Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., Peleg, H., & German, J. B.** (1996). Inhibition of human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70(1), 55-61.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Gerós, H.** (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Terral, J. F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance JB., Jung, C., Fabre, L., Christophe T., Compan M., Bacilieri, R., Lacombe, T., & This, P.** (2010). Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of Botany*, 105(3), 443-455.
- Tokuoka, K., Ishitani, T., Goto, S., & Komagata, K.** (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 31(5), 411-427.
- Tuteja, N., & Mahajan, S.** (2007). Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant Signaling & Behavior*, 2(2), 79-85.
- Vaughan-Martini, A., & Martini, A.** (1995). Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(6), 514-522.

- Veloso, M. M., Almandanim, M. C., Baleiras-Couto, M., Pereira, H. S., Carneiro, L. C., Fevereiro, P., & Eiras-Dias, J.** (2010). Base de dados de microsátélites das castas (*Vitis vinifera* L.) utilizadas na produção de vinho em Portugal. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 25(2), 53-61.
- Verginer, M., Leitner, E., & Berg, G.** (2010). Production of volatile metabolites by grape-associated microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8344-8350.
- Videcoq, P., Garnier, C., Robert, P., & Bonnin, E.** (2011). Influence of calcium on pectin methylesterase behaviour in the presence of medium methylated pectins. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1657-1664.
- Walker, G. M., Mcleod, A. H., & Hodgson, V. J.** (1995). Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 127(3), 213-222.
- Waterhouse, A. L.** (2002). Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 6(1), 11-1.
- White, M. A., Diffenbaugh, N. S., Jones, G. V., Pal, J. S., & Giorgi, F.** (2006). Extreme heat reduces and shifts United States premium wine production in the 21st century. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11217-11222.
- Wójcik, P., & Borowik, M.** (2013). Influence of preharvest sprays of a mixture of calcium formate, calcium acetate, calcium chloride and calcium nitrate on quality and 'Jonagold' apple storability. *Journal of Plant Nutrition*, 36(13), 2023-2034.
- Wójcik, P., & Lewandowski, M.** (2003). Effect of calcium and boron sprays on yield and quality of "Elsanta" strawberry. *Journal of Plant Nutrition*, 26(3), 671-682.
- Xu, Q., Fu, Q., Li, Z., Liu, H., Wang, Y., Lin, X., ... & Sun, Y.** (2021). The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. *Nature Metabolism*, 1-21.
- Ye, M., Yue, T., & Yuan, Y.** (2014). Effects of sequential mixed cultures of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* on apple cider fermentation. *FEMS Yeast Research*, 14(6), 873-882.
- Zhang, L., Wang, P., Chen, F., Lai, S., Yu, H., & Yang, H.** (2019). Effects of calcium and pectin methylesterase on quality attributes and pectin morphology of jujube fruit under vacuum impregnation during storage. *Food Chemistry*, 289, 40-48.