

UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS
ASOCIADAS A LA UVA Y A LA FERMENTACIÓN
ESPONTÁNEA DE LA VARIEDAD NEGRO SAURÍ**

TESIS DOCTORAL
Isora González Alonso

León, 2021



Programa de Doctorado
“Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

Tesis Doctoral dirigida por Dr. D. Germán Naharro Carrasco,
Dr. D. Vladimir Jiranek y Dra. Dña. María Eva Vallejo Pascual



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

Los Dres. D. Germán Naharro Carrasco, D. Vladimir Jiranek y Dña. María Eva Vallejo Pascual, como Directores de la Tesis Doctoral titulada **“Aislamiento y caracterización de levaduras asociadas a la uva y a la fermentación espontánea de la variedad Negro Saurí”**, realizada por **D^a. Isora González Alonso** en el programa de doctorado Ciencias Veterinarias y de los Alimentos, informan favorablemente del depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 7 de octubre de 2021.

Fdo: Germán Naharro Carrasco

Fdo: Vladimir Jiranek

Fdo: María Eva Vallejo Pascual

A mami,
A Luis Manuel y Jacinto

“Respect the past, lead the present and secure the future of wine”
I.S. Pretorius

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Dr. D. Germán Naharro Carrasco, Dr. D. Vladimir Jiranek y Dra. Dña. María Eva Vallejo Pascual por su orientación, dedicación y apoyo.

A la Dra. Dña. Michelle Walker y Dr. D. Vladimir Jiranek por sus enseñanzas en la Escuela de Agricultura y Alimentos de la Universidad de Adelaida y por el calor humano y familiar que me dieron durante mi estancia de investigación en Australia.

A los Ing. Dres. José Antonio Rubio Cano, Enrique Barajas Tola y Alejandro Vicente Castro por su ayuda y maestría en el campo de la Viticultura y la Enología.

A mis compañeros de laboratorio los Dres. Pedro José Gómez de Novoa y Álvaro Álvarez Estrada, quienes compartieron sus conocimientos sobre Biología Molecular y Microbiología.

Al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Confederación de Centro de Desarrollo Rural-Centro de Desarrollo Rural Valdecea y Melgarajo S.A. con los que he colaborado a lo largo de estos años.

A mi marido Jacinto y a mi hijo Luis Manuel por su apoyo incondicional durante este tiempo a fin de compatibilizar la vida familiar y profesional.

RESUMEN

El cultivo de la vid cuenta con una vasta tradición y amplia base social en las comarcas de Los Oteros y Cea (sureste de León y noroeste de Valladolid). Para asegurar una diferencia del producto y tipo de vino, el enfoque de la investigación actual intenta correlacionar el *terroir* microbiano con las características sensoriales y químicas de los vinos varietales de distintas regiones geográficas vitivinícolas.

El objetivo de este trabajo ha sido el aislamiento en uva, mosto y fermentación espontánea no inoculada a escala piloto de levaduras autóctonas en la variedad minoritaria Negro Saurí. Esta variedad ha experimentado un resurgimiento como variedad debido a sus elegantes cualidades de aroma y sabor como vino varietal en la D. O. León.

Se muestreó un viñedo experimental de Melgarajo, S. A. (42° 15' 48,68 N, 5° 9' 56,66 W) durante cuatro añadas consecutivas. Los aislados fueron identificados mediante secuenciación de la región 5.8-ITS y las especies no-*Saccharomyces* fueron caracterizadas mediante cribado enzimático de relevancia enológica.

Las principales especies de levaduras presentes en la uva, mosto y al inicio de la fermentación espontánea fueron *Metschnikowia pulcherrima*, *Lancelata thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspota delbrueckii*.

La población de levaduras no-*Saccharomyces*, caracterizada por la actividad proteasa y β - glucosidasa, fue la más abundante. La especie *M. pulcherrima* mostró actividad β - glucosidasa y proteasa. *H. uvarum* presentó actividad proteasa y lipasa. La especie *L. thermotolerans* fue la única especie con actividad celulítica y *T. delbrueckii* no mostró actividad enzimática.

Saccharomyces cerevisiae predominó durante la fermentación, con una población diversa y transitoria, con siete biotipos principales entre las 110 cepas en las cuatro añadas estudiadas. La añada 2014 es la de mayor variabilidad. La añada 2015 muestra homogeneidad. La añada 2016 evidencia la menor variabilidad genética. La añada 2017 se caracteriza por su heterogeneidad. Del total de cepas, 61 son de «cosecha única» y nueve son aislados perennes, de las cuales cinco se encontraron en dos o más añadas. Por tanto, las 70 cepas señaladas requieren una mayor validación de sus propiedades enológicas como cultivos iniciadores.

Índice

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
1. La vid y las variedades minoritarias	11
1.1. Origen de la vid	11
1.2. Patrimonio genético.....	12
1.3. Variedades minoritarias y variedades autóctonas	13
1.4. Variedades minoritarias en el mundo.....	14
1.5. Variedades minoritarias en España	15
1.6. Variedades minoritarias en Castilla y León	16
1.7. Variedad minoritaria Negro Saurí.....	16
2. El papel de las levaduras en el sector agroindustrial y en la vinificación	18
2.1. Las levaduras en la industria biotecnológica y de los alimentos	18
2.2. Levaduras vínicas.....	19
2.3. Microbiota asociada al viñedo	20
2.4. <i>Terroir</i> y factores que influyen sobre la microbiota	21
2.4.1. Los factores que influyen sobre la microbiota	22
2.4.1.1. Condiciones climáticas	22
2.4.1.2. Los insectos y las aves.....	23
2.4.1.3. Variedad de uva, viñedo y añada.....	24
2.4.1.4. Microclimas, origen geográfico y factores genéticos	25
2.4.1.5. Manejo del viñedo y prácticas agrícolas	25
2.5. Levaduras asociadas a la fermentación.....	26
2.6. Identificación de levaduras.....	29
2.6.1. Métodos moleculares para la identificación de especie.....	29
2.6.1.1. Secuenciación de ADN ribosómico (ADNr).....	29
2.6.1.2. Análisis de restricción de ADN ribosómico (ADNr)	30
2.6.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE).....	30
2.6.2. Métodos moleculares para la diferenciación entre cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.6.2.1. Hibridación genómica comparativa (CGH).....	31
2.6.2.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)	31
2.6.2.3. RFLP-ADNmt.....	31
2.6.2.4. RAPD-PCR.....	32
2.6.2.5. Análisis de microsatélites	32
2.6.2.6. Amplificaciones de secuencia δ	32
2.6.2.7. Tipos de secuencias multilocus (MLST).....	33
2.6.3. Otras técnicas de identificación de levaduras	33
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Viñedo experimental y selección de la variedad	41
2. Datos climatológicos y manejo del viñedo	42
3. Procesamiento y análisis de las muestras	44
3.1. Toma de muestras.....	44
3.2. Procesamiento de las muestras	45

3.3. Medios de cultivo	45
3.3.1. Medio YEPD o YPD	45
3.3.2. Medio YED sólido	46
3.3.3. Medio YED líquido	46
3.3.4. Actividad proteasa	46
3.3.5. Actividad lipasa	47
3.3.6. Actividad celulasa	47
3.3.7. Actividad esterase	48
3.3.8. Actividad β -glucosidasa	48
4. Soluciones y tampones empleados en los medios de cultivo	48
5. Aislamiento e identificación genética de las levaduras en uva, mosto y fermentación espontánea	49
5.1. Aislamiento y conservación de levaduras	49
6. Identificación genética de las levaduras	51
6.1. Extracción del ADN de levaduras	51
6.2. Amplificación del ADN por PCR	51
6.3. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa	53
6.4. Análisis de la secuenciación de ADN	54
7. Caracterización genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
8. Cribado de la actividad enzimática	55
8.1. Actividad enzimática	55
8.1.1. Proteasa	56
8.1.2. Lipasa	56
8.1.3. Celulasa	56
8.1.4. Esterasa	56
8.1.5. β -glucosidasa	56
9. Análisis químico	57
9.1. Análisis químico de la uva	57
9.2. Análisis químico del mosto	57
10. Análisis estadístico	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
1. Microbiota asociada a la variedad minoritaria Negro Saurí	61
2. Aislamiento e identificación de levaduras en uva, mosto y fermentación espontánea	61
2.1. Uva	63
2.2. Mosto	64
2.3. Fermentación espontánea	64
3. Efecto de las condiciones climáticas y del manejo del viñedo en el <i>terroir</i> microbiano	66
3.1. Influencia de las condiciones climáticas	66
3.2. Impacto del manejo fitosanitario en el viñedo experimental	67
4. Caracterización genética de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68
4.1. Estudio de la diversidad de las cepas por añadas	68
4.1.1. Añada 2014	69
4.1.2. Añada 2015	71
4.1.3. Añada 2016	71
4.1.4. Añada 2017	73
5. Análisis global entre las diferentes añadas estudiadas	75
6. Actividad enzimática de relevancia enológica	79

6.1. Proteasa y β -glucosidasa	80
6.2. Lipasa y esterasa	82
6.3. Celulasa.....	82
7. Análisis químico.....	83
CONCLUSIONES.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXO	117

Índice de Figuras

Figura 1. Recorrido de la variedad Trousseau y sus sinonimias a lo largo del Camino de Santiago, extraído de Martínez (2013B).....	18
Figura 2. Ubicación del viñedo de Melgarajo, S.A. En la comarca del Cea y los Oteros. En el recuadro amarillo se aprecia el detalle de las líneas experimentales de Negro Saurí	41
Figura 3. Aspecto de la sumidad, hoja joven, haz de hoja adulta, envés de hoja adulta, racimo y baya de la variedad Negro Saurí (imagen facilitada por el ITACYL).....	42
Figura 4. Esquema del proceso de aislamiento, conservación e identificación de las levaduras seleccionadas	50
Figura 5. Región del gen de ARNr nuclear amplificado por PCR. Se indican las posiciones de dos secuencias internas transcritas (ITS) y la posición relativa de los cebadores más corrientemente usados (ITS1 e ITS4). Las zonas conservadas se muestran en tonos marrones, y las variables, en tonos burdeos. Las medidas de los amplificados que se obtienen varían según la especie de levadura que se ensaye	52
Figura 6. Condiciones de amplificación por PCR de la región 5,8S-ITS	53
Figura 7. Condiciones de amplificación por PCR de las regiones interdelta (Δ).....	55
Figura 8. Biodiversidad de especies de levadura en uvas, en mosto y durante la fermentación. La distribución de especies se calculó dividiendo el número de aislamientos de una especie en particular por el número total de aislamientos	62
Figura 9. Los factores retenidos del MCA (A). Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 28 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la añada 2014. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,650 y Calinski-Harabasz: 9,983. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos.	70
Figura 10. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 17 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la añada 2015. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,407 y Calinski-Harabasz: 13,674. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos	72
Figura 11. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 44 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la añada 2016. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,637 y Calinski-Harabasz: 17,389. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos	73
Figura 12. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre 21 cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de la añada 2017. Índice de Davies-Bouldin: 0,749 y Calinski-Harabasz: 7,514. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos	74
Figura 13. los factores retenidos del MCA global (A), selección de clústeres (B) biotipos con cepas y distancias (C)	76

Figura 14. Dendrograma de Ward global que muestra la relación genética de los 110 aislados de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa control (Evo CROSS®(CROSS)). Se identificaron siete biotipos (I y VII) basados en los índices de Calinski-Harabasz más alto: 18,717, y el valor del índice de Davies-Bouldin más pequeño: 1,052 78

Figura 15. Mapa de calor de la actividad enzimática: *Metschnikowia pulcherrima* (a), *Hanseniaspora uvarum* (b), *Lachancea thermotolerans* (c) y *Torulaspora delbrueckii* (D) 81

Índice de Tablas

Tabla 1. Precipitación (P [mm]) y temperatura media (Tm [°C]) registradas en la estación meteorológica de Mayorga de Campos (Valladolid) 43

Tabla 2. Productos fitosanitarios utilizados en Melgarajo, S.A. en el periodo 2014-2017 43

Tabla 3. Bandas de marcador de peso molecular utilizadas en el análisis estadístico... 57

Tabla 4. Especie, número de aislado y fuente (2014-2017) 62

Tabla 5. Cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación espontánea por añadas 69

Tabla 6. Análisis químico de la uva y del vino de investigación en las añadas 2014-2017 84

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

ARNr: ARN ribosómico

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool* (búsqueda de alineación local básica)

CMC: carboximetilcelulosa

CGH: *Comparative genomic hybridization* (hibridación genómica comparativa)

D. O.: Denominación de Origen

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (gel de gradiente desnaturalizante)

et al.: y otros

FF: final fermentación

H. P. D.: híbridos productores directos

HTS: *High-throughput sequencing* (secuenciación de alto rendimiento)

IF: inicio fermentación

IMIDRA: Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario

ITACyL: Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León

ITS: *Internal Transcribed Spacer* (secuencias internas transcritas)

M: mosto

MCA: *Multiple Correspondence Analysis* (análisis de correspondencias múltiples)

MF: mitad fermentación

MLST: *Multilocus Sequence Typing* (tipificación de secuencias multilocus)

NS: no-*Saccharomyces*

P: Precipitación

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PFGE: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de campo pulsado)

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismos de nucleótido único)

SSR: *Simple Sequence Repeat* (repeticiones de secuencia simple)

STR: *Short Tandem Repeat* (repeticiones cortas en tándem)

TDI: Tecnología para Diagnóstico e Investigación

TGGE: *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (electroforesis en gel de gradiente de temperatura)

T_m: temperatura media

WMC: *Wine Microbial Consortium* (consorcio microbiano de la uva: levaduras, bacterias del ácido acético y bacterias del ácido láctico)

YED: *Yeast Extract Dextrose* (extracto de levadura dextrosa)

YEPD o YPD: *Yeast Extract Peptone Dextrose* (extracto de levadura peptona dextrosa)

Introducción

1. La vid y las variedades minoritarias

1.1. Origen de la vid

El origen de las vitáceas, el género *Vitis*, se ubica en el periodo del Eoceno inferior y, sobre todo, en el Mioceno, hace unos sesenta y cinco millones de años. Se localiza entre las coordenadas 40° y 70° N, donde aparecen los restos fósiles más antiguos de estas plantas, como los encontrados en Islandia, Groenlandia, Inglaterra, Alemania, Japón y América del Norte. Gran parte de las investigaciones sostienen la hipótesis del origen de las vides antes de la aparición de los continentes, cuya separación habría provocado una evolución distinta en cada uno de ellos (Hidalgo, 1999).

En la actualidad se reconocen unas 60 especies diferentes, que se clasifican en dos secciones, en función de la dotación cromosómica de los individuos (Galet, 1991, como se citó en Laguna, E., 2002, p. 48):

- *Muscadinea* Planch. Esta sección se caracteriza por su dotación cromosómica de $2n = 40$. Se compone de tres especies norteamericanas: *V. rotundifolia* Michx., *V. munsoniana* Simpson y *V. popoioiei* J. H. Fennel.
- *Vitis* L., también conocida como *Euvinis* Planch., se identifica por tener una dotación cromosómica $2n = 38$ y comprende el resto de las especies del género:
 - ✓ Vides americanas:
 - De clima templado
 - Serie oriental: *V. labrusca*, *V. aestivalis* y *V. lincecumii*.
 - Serie central: *V. riparia*, *V. berlandieri* y *V. rupestris*.
 - De clima cálido
 - Serie de la Florida: *V. coriacea*, *V. gigas*, *V. simpsonii* y *V. smalliana*.
 - Serie tropical: *V. bourgoeana* y *V. caribaea*.
 - ✓ Vides asiáticas: *V. davidii* y *V. amurensis*.
 - ✓ Vides euroasiáticas: *V. vinifera*.

En la actualidad, en Europa y Asia coexisten dos formas distintas de *Vitis vinifera*: la forma cultivada (*Vitis vinifera* subsp. *vinifera*) y la forma salvaje (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*), que es considerada la antecesora de la primera (Zohary, 1995).

El proceso de domesticación de la vid parece estar estrechamente relacionado con el descubrimiento del vino. Se seleccionaban las vides que pudieran garantizar un nivel de azúcar suficiente en los mostos para las fermentaciones, con bayas y racimos más grandes, en aras de una producción más abundante y más regular. Se escogían las que poseían flores hermafroditas, ya que aseguraban una mejor polinización de estas y, por lo tanto, una mejor fructificación. Hasta entonces, muchas poseían únicamente flores macho o flores hembra, pero, actualmente, todas nuestras variedades son hermafroditas (This *et al.*, 2006). No obstante, no se conoce con exactitud el periodo que abarcó la domesticación de la vid, como también se desconoce si se trató de uno o varios ciclos, de la misma manera que se ignora el área donde se llevó a cabo (Balda, 2014).

La diversidad genética de la vid en Europa ha sido evaluada mediante marcadores moleculares tanto de variedades cultivadas como silvestres. La mayoría de los autores proponen como resultado un origen mixto de las actuales, cultivadas a partir de material importado inicialmente de Oriente Próximo (asociadas a clorotipos C o D) y el de las poblaciones locales de vides silvestres (asociadas al clorotipo A) (Arroyo-García *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2010).

1.2. Patrimonio genético

La especie *Vitis vinifera* incluye un elevado número de variedades que permanecen aún sin desentrañar. Viala y Vermorel (1902) cifraban la cantidad en 24000 denominaciones diferentes. Por su parte, Alleweldt y Dettweiler (1994) informaban de 10000. Hidalgo (1999) señalaba que el número de variedades o encepamientos existentes sobrepasa varios millares. Según Sotés (2021), se estima que en el mundo hay unas 6000 variedades.

De hecho, en Italia se evaluaron alrededor de 1000 acepciones, de las que resultaron 745 genotipos únicos (Cipriani *et al.*, 2010). En la colección de Vassal, en Francia, se analizaron 2344 genotipos diferentes (Lacombe *et al.*, 2013). En Grecia, según Lefort y Roubelakis-Angelakis (2001), se hallaron unas 663 variedades. En Portugal existen aproximadamente 450, como recogen Lopes *et al.* (2006). En España se han obtenido 185 variedades entre las 700 accesiones existentes en la colección nacional de El Encín (Cabello *et al.*, 2011).

La pérdida de diversidad genética, tanto de las variedades cultivadas como de las poblaciones salvajes de vid, ha ido en aumento desde finales del siglo XIX por la crisis de la filoxera. Solo algunas zonas de suelos arenosos y otras aisladas,

como Canarias, que no se vieron afectadas (y sí favorecidas en la segunda mitad del siglo XX con las políticas agrarias), así como aquellas que han fomentado la transformación de viñedos viejos por cultivo de variedades preferentes en las Denominaciones de Origen han logrado esquivar ese detrimento (Balda, 2014). Otros factores que han acentuado esta pérdida son el desarrollo de estrategias para la multiplicación, los injertos y la selección clonal, que han llevado a una concentración rápida de las variedades utilizadas y a la desaparición de otras.

La necesidad de mantener la diversidad genética es estratégica en las especies agroalimentarias, ya que garantiza la capacidad de respuesta ante las amenazas futuras, y lo es más si se tiene en cuenta la incapacidad de previsión a la que aboca el escenario de cambio climático. Una base genética amplia no solo es esencial para que la especie *Vitis vinifera* L. subsista ante nuevas plagas, enfermedades y restricciones edafo-climáticas, sino que, además, favorece la diferenciación de los vinos y aporta caracteres específicos para experimentar e innovar en su calidad (Santana, 2011).

1.3. Variedades minoritarias y variedades autóctonas

Los términos utilizados para definir las variedades como «minoritarias, locales, autóctonas, antiguas o viejas» suelen usarse con frecuencia de manera inapropiada para definir la misma cosa (Scienza y Valenti, 1999), pues no necesariamente una variedad local es siempre autóctona o una variedad minoritaria es local o antigua. En general, una variedad es también antigua cuando se cultiva en ese lugar desde hace mucho tiempo, pero es muy difícil precisar la escala de referencia. Se complica, además, si se tiene presente que apenas hay datos físicos que nos aporten información clara del momento de introducción, pues una variedad puede ser muy antigua, pero no ser local. Las dificultades para localizar el origen de una variedad también surgen del cambio de nombre que experimentan las mismas al pasar de una región a otra, que las somete a una especie de vernaculización, que provoca que se las acabe denominando de forma local por el uso de expresiones dialectales (Martínez de Toda, 2004). Las variedades locales van adquiriendo sus nombres, en muchos casos, inciertos o derivados de características morfológicas de las plantas o de los frutos, la forma, el tamaño y el color (Negro Saurí; Cea y Los Oteros). De hecho, la denominación Negro Saurí no se registra en ningún tratado ni publicación.

Por tanto, es difícil proponer una definición precisa de la palabra *autóctono* para la viticultura europea occidental, salvo para aquellas variedades derivadas de la domesticación de vides silvestres locales o de la introgresión genética sobre

estas últimas, en palabras de Martínez de Toda (2004), quien también sugiere que sería más correcto hablar de *variedades antiguas, minoritarias y locales* que de *variedades autóctonas*.

Otras propuestas para definir las variedades minoritarias sugieren ceñirse, a ser posible, a aquella variedad cultivada antes del ataque filoxérico citada por García de los Salmenes (1914); o a aquella cuya superficie de cultivo se encuentra muy reducida (inferior al 1% a nivel autonómico y menos de 1000 ha en España), en algunos casos, en peligro de extinción (Cabello, 2016, diapositiva 14).

Yuste (2019), por su parte, sostiene que las variedades minoritarias suelen ser aquellas «cuya superficie cultivada es inferior a 1000 ha en un ámbito geográfico amplio determinado (país, región, etc.), pero cuya apreciación como minoritarias también depende de otros aspectos, tales como uso, valoración, localización, dispersión, etc.».

Martínez de Toda (*et al.*, 2013) señala que en las variedades minoritarias se hallan recursos genéticos de gran valor que podrían conducir al desarrollo de nuevos estilos de vino, que ayudarían a conseguir una mejor adaptación a los cambios climáticos y a lograr una mayor resistencia a plagas y enfermedades.

1.4. Variedades minoritarias en el mundo

De un tiempo a esta parte ha crecido exponencialmente el empleo de variedades minoritarias y autóctonas en todo el mundo, con el objeto expreso de salvaguardar la biodiversidad de las vides propias de cada zona. Los vinos comercializados a partir de estas variedades han ido logrando expandirse globalmente. Se citan varios casos a continuación:

- La variedad de uva tinta Kalecik karasi, autóctona y principal del distrito de Ankara (Turquía), que se emplea para la producción de tintos de gran calidad (Gokce, 1990, como se citó en Kelebeck *et al.*, 2009).
- Grecia destaca por el uso de la variedad de uva tinta Agiorgitiko, cultivada de forma casi exclusiva en Nemea, y que goza del distintivo de Denominación de Origen propio de su país (Koundouras *et al.*, 2006), igual que las variedades de Xinomavro y Mandilaria (Kallithraka *et al.*, 2011).
- En Italia, la variedad de uva Trebbiano di Lugana, en la región del conocido lago de Garda, es la base para obtener el vino blanco de Lugana (Mattivi *et al.*, 2012). En Salento, perteneciente a la región de Apulia, la variedad Negro Amaro es la encargada de brindar tintos jóvenes monovarietales (Tufariello *et al.*, 2012).

- Francia no queda excluida, ya que dispone de 463 variedades autóctonas y 256 minoritarias (Cabello, 2016, diapositiva 5). Se pueden destacar las variedades Magdeleina Noire y San Antoni en la elaboración de tintos y la Guillemot en la de blancos (Canales Sectoriales Interempresas, 2019).

1.5. Variedades minoritarias en España

Siguiendo este viaje por Europa, se llega finalmente a España, donde el cultivo de la vid ha venido revestido de importancia desde la Antigüedad en todo su territorio.

A finales del siglo XIX, surgen las primeras colecciones de variedad de vid que se prospectan y recolectan. La recopilación de material vegetal se inició en 1893 con Manso de Zúñiga, recolectando trece variedades riojanas que formaban la colección de Haro. Actualmente se conservan nueve en la Colección de Variedades de Vid de El Encín, integrada actualmente en la Consejería de Medio Ambiente, Vivienda y Ordenación del Territorio adscrita al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural Agrario y Alimentario (IMIDRA). Tras Manso de Zúñiga, y sin negarle su valor de pionero, la primera colección importante se atribuye a Nicolás García de los Salmones en 1904, que recolectó 1699 variedades, de las cuales solo se dispone en El Encín de 447 accesiones entre viníferas españolas y portainjertos.

Martínez-Zaporta es el primer gran impulsor de la prospección de variedades de vid, y gracias a él se guardan 636 variedades de vinificación, mesa y portainjertos españolas y extranjeras. Bajo la dirección de Hidalgo se produce la mayor incorporación de material vegetal, y actualmente se atesoran 966 variedades de vid, principalmente accesiones nacionales, tanto de mesa como de vinificación. Desde el año 2003, Cabello coordina el equipo, que ha incorporado fundamentalmente variedades españolas de colecciones privadas o institucionales y vides silvestres, con un total de 648 individuos de 65 poblaciones españolas. Hoy en día, 3532 accesiones componen la colección. Por grupos, hay 852 portainjertos, 69 híbridos productores directos (H. P. D.), 111 *Vitis* spp., 1852 variedades de *Vitis vinifera*, (de las cuales 1178 son de vinificación y 674 de mesa) y 648 de *Vitis vinifera sylvestris* (Comunidad de Madrid [s. f.]).

En España, nueve variedades copan el 80% de la superficie plantada, con un potencial de 174 variedades autóctonas y 41 minoritarias, según traslada Cabello (2016, diapositiva 5). De ahí que, en la actualidad, la tendencia de prospección y

recolección se oriente a recuperar variedades minoritarias o autóctonas en casi la totalidad de las provincias españolas (Yuste *et al.*, 2006; Balda *et al.*, 2017; Cabello *et al.*, 2013; Martínez y Pérez, 2000).

1.6. Variedades minoritarias en Castilla y León

La tradición vitivinícola en las tierras castellanas y leonesas es antiquísima, remontándose quizá, según recientes hallazgos arqueológicos del siglo IV a.C., al yacimiento vacceo de Pintia (Valladolid), hasta épocas anteriores a la conquista romana (Sanz-Mínguez *et al.*, 2008).

En Castilla y León la recuperación y estudio de las variedades minoritarias han venido impulsados a partir de 2002 por la Unidad de Cultivos Leñosos y Hortícolas, que forma parte del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Partiendo de una colección inicial de 30 variedades que se conservan en la Finca Zamadueñas, en Valladolid, la investigación se ha extendido por diferentes zonas vitivinícolas de Castilla y León, entre las que cabe señalar las Denominaciones de Origen siguientes: D. O. Arribes, D. O. Bierzo, D. O. Rueda, D. O. León. En dicho proyecto se han identificado y prospectado un apreciable número de variedades. En su conjunto se llegaron a clasificar más de 1000 cepas pertenecientes a 129 variedades diferentes, de las que se escogieron 29 por ser únicas de la zona o de muy pequeño cultivo, generalmente, dispersas en viñedos viejos y cuya relevancia reside en la reconstrucción del patrimonio local (Terroaristas, 2020). De estas variedades casi desconocidas destacan por su elevado interés desde el punto de vista agronómico y enológico las variedades Aurea, Bastardillo Chico (Merenzao), Bruñal, Cenicienta, Estaladiña, Gajo Arroba, Mandón (Garro), Negreda, Puesta en Cruz (Rabigato), Puesto Mayor, Rufete Serrano Blanco, Tinto Jeromo, Verdejo Colorao y Negro Saurí (Merenzao).

Sobresalen por su reconocimiento y autorización como variedades comerciales, hasta el momento, siete de ellas, dentro de las cuales se encuentra la variedad Negro Saurí (Orden APA/475/2019).

1.7. Variedad minoritaria Negro Saurí

Así se denomina a una variedad de vid en la comarca del Cea, Los Oteros y Valdevimbre. Dentro de esta extensa zona vitivinícola, únicamente se la conoce

con este nombre en unos pocos municipios limítrofes de las provincias de Valladolid (Melgar de Abajo) y León (Joarilla de las Matas, San Miguel de Montañán, Valdespino, Villeza y Gordaliza del Pino). Hasta la fecha, no existe documentación en la que sustenten el nombre, que tan solo se conoce por los viticultores de la zona, que así la llamaron desde que alcanza la memoria de los más mayores.

Es considerada una variedad minoritaria dentro de la D. O. León e identificada como sinonimia de la variedad Merenzao (Arranz *et al.*, 2008). Si bien se cataloga como una variedad minoritaria, Negro Saurí está autorizada en varias D. O. como Merenzao (Canarias, Galicia y La Rioja).

La variedad Merenzao es, en realidad, la variedad Trousseau, originaria de la región de Jura, en Francia, de donde llega a Galicia, y de ahí se traslada a Portugal. Como se citó en Martínez (2013a), un estudio sobre la genética y la estructura de las vides del noroeste de España, realizado por Díaz Losada *et al.* en 2012, ha demostrado la impotencia de los cultivos franceses en el origen de los cultivares gallegos, «debido al trabajo desarrollado por los monjes de Europa Central, que contribuyeron a las plantaciones en Galicia después de la Reconquista». Este hecho explicaría también la presencia de la variedad a lo largo del Camino de Santiago, como se citó en Martínez (2013a), la información relativa a las distintas sinonimias: Maturana tinta CI-76 en La Rioja; Merenzao en el Bierzo y en el este y sureste de Galicia en las D. O. Valdeorras, Monterrei y Ribeira Sacra; Bastardo en el suroeste de Galicia y Portugal (Díaz Losada *et al.*, 2013); y María Ordoña también en Galicia (Martínez *et al.*, 2004, como se citó en Martínez, 2013a) (Figura 1).

En cuanto a sus características, es una variedad, en general, de brotación media y maduración temprana. Es sensible al oídio y también a *Botrytis*, por la compacidad del racimo, que suele ser de tamaño mediano-pequeño, con la baya mediana-grande. Mantiene buenas producciones pero generalmente consigue poco color (Arranz *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de la dificultad en conseguir color y de una cierta tendencia a la oxidación, es una variedad con personalidad y con unos aromas y unos sabores muy finos y elegantes. Cuando se logra que exprese sus características, puede llegar a ser sublime y diferente (Arranz *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, se señala su posible uso en la mezcla de elaboraciones junto a variedades locales, así como el «potencial que puede suponer esta casta para una zona deprimida y despoblada como Tierra de Campos», como manifiesta el Master of Wine Pedro Ballesteros (Caballero, 2020).



Figura 1. Recorrido de la variedad Trousseau y sus sinonimias a lo largo del Camino de Santiago, extraído de Martínez (2013b)

2. El papel de las levaduras en el sector agroindustrial y en la vinificación

2.1. Las levaduras en la industria biotecnológica y de los alimentos

El alcance de las levaduras en la industria biotecnológica y en el sector de los alimentos es muy significativo. Si bien sus aplicaciones más conocidas se localizan en la producción de cerveza, bebidas destiladas, pan y vino, existen nuevas líneas de investigación encaminadas a encontrarles nuevas utilidades (Lesaffre Ibérica, 2020). Se pueden señalar algunos ejemplos:

- En la industria biotecnológica, se utilizan en los productos cosméticos, en la obtención de bioetanol como combustible y en la «biotecnología blanca». Concretamente, en esta última se emplea para la fabricación masiva de sustancias bioquímicas destinadas al área de la salud, como es

el caso de los suplementos dietéticos con determinados betaglucanos, que pueden ayudar a solucionar problemas de alergias, colesterol alto, etc.

- En la agricultura, se emplean en la fertilización y protección de cultivos, lo cual hace posible reducir el uso de fertilizantes y fitosanitarios químicos.
- En el sector de los alimentos probióticos, tanto en seres humanos como en animales favorecen el equilibrio de la flora intestinal, potencian el sistema inmunológico, etc.
- En el pan se usan levaduras adaptadas especialmente a la producción de panes congelados, de molde y artesanales más aromáticos.
- En el vino se hace uso de ellas especialmente en la selección de levaduras específicas de las distintas zonas de producción de la uva, con el fin de potenciar el sabor y el aroma de los caldos locales.

2.2. Levaduras vínicas

Los trabajos de Louis Pasteur en el último cuarto del siglo XIX demuestran que las levaduras presentes en las uvas son los microorganismos responsables de las fermentaciones del vino. Mortimer y Polsinelli (1999), por su parte, señalan que en la uva existe una población de levaduras que es la principal fuente de levadura natural en la producción de vino.

Las taxonomías actuales reconocen 149 géneros, que comprenden casi 1500 especies (Kurtzman *et al.*, 2011b). De estas, se han aislado del mosto de uva más de 40 especies (Jolly *et al.*, 2006; Ciani *et al.*, 2010). Las levaduras pueden ser conocidas por dos nombres válidos. El nombre teleomórfico se refiere al estado sexual que produce ascosporas (Kurtzman *et al.*, 2011a), y el nombre anamórfico alude al estado asexual que no forma ascosporas, la clasificación puede ser difícil porque algunas no esporulan fácilmente y, además, la capacidad de formar ascosporas puede perderse durante el almacenamiento a largo plazo (Kurtzman *et al.*, 2011c). Las levaduras asociadas con el ecosistema de la uva/vino generalmente se clasifican en 15 géneros diferentes: *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Kurtzman y Fell, 1998b).

Las levaduras vínicas se encuentran diseminadas por toda la naturaleza. Las generalistas están dotadas de un nicho amplio y ocupan muchos hábitats, mientras que las especializadas se encuentran en hábitats únicos. Algunas son

consideradas como autóctonas (esenciales), y otras, como miembros alóctonos (transitorios o fortuitos) de las comunidades propias de estos ambientes (Pretorius, 2000). Dentro del entorno vitivinícola (hábitat único), se localizan en las superficies de las bayas de uva y de los equipos de las bodegas (Escalante-Minakata e Ibarra-Junquera, 2007), aunque se ha demostrado también que viven en asociación con la vid, y se las puede hallar usualmente sobre la corteza, las hojas y las flores.

2.3. Microbiota asociada al viñedo

Una plétora de estudios se ha centrado en la caracterización de los viñedos y han examinado las uvas y su colonización por una amplia variedad de especies, un fenómeno para el que no existía ninguna explicación obvia.

Barata *et al.* (2012) proponen sistematizar la microbiota del consorcio microbiano de las uvas (WMC: levaduras, bacterias del ácido acético y bacterias del ácido láctico) en tres grupos principales, caracterizados por un comportamiento similar en las uvas:

- Oligotróficas, levaduras basidiomicetos oxidativas, hongos similares a las levaduras *A. pullulans* y bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Oenococcus oeni*).
- Copiotróficas, ascomicetos oxidativas (algunas *Candida* spp.), levaduras apiculadas débilmente fermentativas (*Hanseniaspora* spp.), formadoras de película (*Pichia* spp.) y fermentativas (*C. zemplinina*, *Metschnikowia* spp.).
- Copiotróficas, levaduras fuertemente fermentativas (*Saccharomyces* spp., *Torulaspota* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp. y *Pichia* spp.) y las bacterias del ácido acético aeróbicas obligadas (*Gluconobacter* spp., *Gluconoacetobacter* spp., *Acetobacter* spp.).

Al respecto de la citada microbiota de las bayas, Barata *et al.* (2012) plantearon que la proporción que ocurre entre los grupos de microorganismos depende de la etapa de maduración de la uva y de la disponibilidad de nutrientes. De hecho, el estado de salud es el principal factor que afecta la ecología microbiana de las uvas: las uvas dañadas poseen un mayor número de microbios y una mayor diversidad de especies en comparación con las sanas. Después del envero (inicio de la maduración), la microbiota de las bayas sanas e intactas está dominada por levaduras basidiomicetos (*Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp.) y el hongo similar a la levadura *Aureobasidium pullulans*.

Al acercarse el tiempo de cosecha hay un aumento de poblaciones ascomicetos oxidativas o de fermentación débil (*Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Metschnikowia* spp. y *Pichia* spp.). Al final del ciclo, proliferan las de tipo ascomiceto fuertemente fermentativas por la alta disponibilidad de nutrientes debido al daño de la uva (*Saccharomyces* spp., *Torulaspota* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Lachancea* spp. y *Pichia* spp.).

En cuanto a las especies, las levaduras basidiomicetos oxidativas, sin ningún interés enológico, como *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Filobasidium* spp. y *Aureobasidium pullulans* prevalecen principalmente en el entorno del viñedo (suelo, corteza, hojas, uvas) (Subden *et. al.*, 2003; Prakitchaiwattana *et. al.*, 2004; Renouf *et. al.*, 2005). Entre los ascomicetos, las levaduras fermentativas apiculadas (*Hanseniaspora uvarum* [teleomorpha] *Kloeckera apiculata* [anamorpha]) y las levaduras oxidativas (principalmente del género *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*) predominan en las uvas maduras (Davenport, 1974; Sabate *et. al.*, 2002; Jolly *et. al.*, 2003; Subden *et. al.*, 2003; Prakitchaiwattana *et. al.*, 2004; Renouf *et. al.*, 2005).

Partiendo de las observaciones de estos autores, se espera que la población no-*Saccharomyces* (NS) sea dominante en las primeras etapas del procesamiento del mosto de uva (Zott, 2008). Por el contrario, *Saccharomyces cerevisiae* aparece en concentraciones extremadamente bajas (Fleet, 2003) en la superficie de las bayas sanas y sin daño (0,1%) o en suelos (Martini *et. al.*, 1996), mientras que las bayas dañadas proporcionan inóculos de 10^2 - 10^3 células/ml de mosto (Mortimer y Polsinelli, 1999).

2.4. Terroir y factores que influyen sobre la microbiota

El *terroir* vitivinícola es una zona en la cual se desarrolla el conocimiento colectivo de las interacciones entre el entorno físicamente identificable y las prácticas vitivinícolas aplicadas. Ambos dotan de distintas características a los productos que se originan en ella (Resolución OVI/Viti 333/2010).

Gobbi (2019) propone el concepto de *terroir microbiano* para mejorar las prácticas vitivinícolas sostenibles, dadas las crecientes demandas de calidad en la industria del vino. Dentro de la noción de *terroir*, los ecólogos y microbiólogos inicialmente plantean la hipótesis de que la firma metabólica del vino está parcialmente influenciada por microbios. De hecho, estos son importantes en cualquier etapa del proceso de elaboración del vino, ya que pueden afectar a la

salud y fisiología de las plantas en el viñedo y también realizar el proceso de fermentación en las bodegas. A este aspecto lo denomina *terroir microbiano*.

Mas *et al.* (2015), por su parte, determinan que cada zona tiene una población de microorganismos característica, lo que se podría definir como una «huella microbiológica» de la región.

Estas comunidades microbianas están distribuidas geográficamente; varían en el tiempo y presentan su propia dinámica, de acuerdo con diferentes aspectos relacionados con el cultivo, el manejo del viñedo y el clima (Bokulich *et al.*, 2013). También se ven afectadas por la ubicación geográfica, la variedad de uva y el desarrollo de la vid (Varela y Borneman, 2017).

Muchos de estos aspectos no son independientes, y es de esperar que puedan afectar a la proporción de las levaduras en las diferentes regiones vitivinícolas (Amerine *et al.*, 1967; Longo *et al.*, 1991).

Estudios recientes destacan la contribución de la microbiota asociada a una región vitivinícola, ya que ofrecen la oportunidad de potenciar el vino, con el estilo y las características organolépticas resultantes asociadas a un *terroir* geográfico particular (Csoma *et al.*, 2010; Di Maio *et al.*, 2012).

Por su parte, conocer el *terroir* y los factores que influyen sobre la diversidad de especies determinaría una selección precisa de cepas locales, lo cual podría representar el paso final para lograr vinos pertenecientes por completo a su propio *terroir* (Vaudano, 2019).

2.4.1. Los factores que influyen sobre la microbiota

2.4.1.1. Condiciones climáticas

La diversidad y supervivencia de las levaduras en el viñedo se han relacionado con la dependencia de factores climáticos como la temperatura y la lluvia, entre otras. Las lluvias, la temperatura, etc. parecen ser determinantes, en este sentido, para autores como Cordero-Bueso *et al.* (2011a y 2011b) y Tello *et al.* (2012).

En la misma línea se sitúan Čadež *et al.* (2010), quienes muestran que el efecto de las condiciones climáticas es mayor en la composición de las comunidades microbianas en las bayas en comparación con los fungicidas estudiados. Li *et al.* (2010) refieren que los recuentos de levadura en las uvas de

vino de Wuwei fueron significativamente más bajos que los de las muestras de otros lugares, lo que pudo deberse a las condiciones climáticas específicas de la región de Wuwei.

Otros autores no han encontrado relación entre las condiciones climáticas y la diversidad de levaduras, como Jolly *et al.* (2003), que estudiaron durante tres años la población de levadura no-*Saccharomyces* en cuatro regiones diferentes de Sudáfrica y no encontraron ningún patrón que vinculara especie con zona climática.

Sobre las precipitaciones y su influencia sobre las levaduras, Rousseau y Doneche (2001), Combina *et al.* (2005) y Li *et al.* (2010) sugieren que las lluvias ejercen la mayor influencia sobre la población de levaduras, porque podrían favorecer la liberación de nutrientes, aumentando su disponibilidad para la multiplicación de las levaduras.

Estudios sobre diversidad de especies han señalado que las levaduras oxidativas, como *M. pulcherrima*, aumentan en años con mayor precipitación (Combina *et al.*, 2005; Longo *et al.*, 1991; Poulard *et al.*, 1981). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, la aparición y supervivencia en los viñedos depende de condiciones climáticas (Parish y Carroll, 1985; Longo *et al.*, 1991).

2.4.1.2. Los insectos y las aves

El papel de los insectos y las aves como agentes para la dispersión de levaduras en diferentes hábitats se ha evaluado en diversos estudios.

Valero *et al.* (2007) comprobaron que, en el viñedo, las levaduras pueden ser transportadas del suelo a las uvas por insectos o por el viento. En lo relativo al papel de los insectos como vector de diseminación de las células de *Saccharomyces cerevisiae*, Mortimer y Polsinelli (1999) demostraron la presencia de un flujo de células de *S. cerevisiae* entre el entorno natural y las bodegas; debido a que esta levadura no se transmite por el aire, necesita un vector para moverse.

El papel que desempeñan los insectos continúa en estudio. Algunos autores como Ciani *et al.* (2004) observaron que solo las cepas de la bodega eran responsables de la fermentación del alcohol en cubas; sin embargo, Le Jeune *et al.* (2006) mostraron que las cepas provenientes del viñedo pueden ser parcialmente responsables de la fermentación.

Clavijo *et al.* (2010) detectaron la presencia de cepas comerciales en viñedos adyacentes a las bodegas e indicaron que la diseminación de levaduras comerciales de la bodega al viñedo cercano podría ser frecuente, probablemente por la transmisión de vectores como insectos y avispas.

Stefanini *et al.* (2012) estudiaron cepas de levadura que se aislaron de avispas, uvas y fermentaciones en el mismo viñedo en años diferentes y demostraron que estas cepas eran más similares entre sí que las derivadas de otras ubicaciones ambientales y geográficas.

Con respecto a las aves, Francesca *et al.* (2012) dedujeron en su investigación que las que habitan en viñedos fueron en parte responsables de la diseminación de levaduras fermentativas durante sus actividades de alimentación.

2.4.1.3. Variedad de uva, viñedo y añada

Existe un amplio consenso de que la microflora de la uva depende de la ubicación del viñedo y otros elementos relacionados con el mismo.

Li *et al.* (2010) señalaron que la flora de levadura autóctona presente en la uva difería entre las variedades de vid y la ubicación de cultivo. Knight *et al.* (2015) sostienen que incluso puede llegar a observarse diferencias de un viñedo a otro y de una variedad a otra. Sin embargo, Rementeria *et al.* (2003) no habían encontrado correlación entre el número de levaduras, la variedad de uva o el origen de la uva.

Algunos autores atribuyen los cambios a la población de levaduras, ya sea debido a su número o a las especies, ya sea achacable a factores distintos a la variedad de vid. Por lo tanto, las diferencias en la diversidad de levaduras se han relacionado con el área de muestreo (Capello *et al.*, 2004). Según Valero *et al.* (2007), la diversidad de levaduras puede verse influenciada por la edad y el tamaño del viñedo. También Pretorius y col. (1999) indicaron que las variaciones intraanuales deben atribuirse a factores del viñedo como la edad y el tamaño.

Otras investigaciones han encontrado que la diversidad variaba con el año de cosecha (De la Torre *et al.*, 1999) o vendimia (Beltrán *et al.*, 2002). La distribución de las levaduras dentro de los viñedos parece presentar diferencias en la composición de especies y niveles de concentración entre añadas (Sabate *et al.*, 2002; Settanni *et al.*, 2012; Valero *et al.*, 2007; Zott *et al.*, 2008). La presencia de *Metschnikowia* y *Hanseniaspora* en las bayas varía mucho en

función de la vendimia o añada (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Sabate *et al.*, 2002; Grangeteau, 2015). Vigentini *et al.* (2015) señalaron el efecto añada y, adicionalmente, que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de diferentes bodegas ubicadas en la misma región podrían ser muy similares, destacando una correlación entre cepas y región enológica.

2.4.1.4. Microclimas, origen geográfico y factores genéticos

Diversos estudios han evaluado el efecto de los microclimas, el origen geográfico y los factores genéticos. Setati *et al.* (2012) interpretaron que la mayor heterogeneidad de levadura en muestras de uva recolectadas en diferentes sitios dentro de viñedos individuales se debía a los muchos microclimas existentes, e incluso tenía relación con el sombreado diferencial de las hojas y la estructura del racimo de uva. Belda *et al.* (2016) describieron patrones metabólicos distintivos y agrupación para las levaduras en función de su origen geográfico. Finalmente, los factores genéticos varían de una región a otra según lo descrito por Garofalo *et al.* (2016).

2.4.1.5. Manejo del viñedo y prácticas agrícolas

En relación con el manejo del viñedo, cabe señalar el impacto que el uso de antifúngicos tiene sobre las levaduras, de acuerdo a los estudios de Monteil *et al.* (1986). Ganga y Martínez (2004), detectaron una menor diversidad de especies no-*Saccharomyces* con el uso de fungicidas contra *Botrytis cinerea*. Braconi *et al.* (2006) destacaron la relevancia de los herbicidas en las levaduras.

Pinto (2014), hizo alusión a los tratamientos químicos, sobre los que dedujo que afectan al microbioma de la vid y que son responsables de la aparición de cepas de patógenos resistentes a los pesticidas.

La aparición y supervivencia de *Saccharomyces cerevisiae* en viñedos están relacionadas con las prácticas vitivinícolas, Cordero-Bueso *et al.* (2011a y 2011b), Rosini, (1982), Pretorius *et al.* (1999) y Schuller *et al.* (2012). En el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, Nurgel *et al.* (2005) señalaron que los altos recuentos de *Saccharomyces cerevisiae* en jugo de uva de uvas blancas y tinta cultivadas en Anatolia debido a uso excesivo de sulfito en el viñedo. Ciertas prácticas enológicas aplicadas en la bodega también pueden afectar a la diversidad de levaduras del viñedo circundante (Grangeteau *et al.*, 2016).

También Yanahida *et al.* (1992), Rementeria *et al.* (2003) y Valero *et al.* (2007) concluyeron que las diferencias en la diversidad de levaduras se

relacionan con el sistema agrícola y manejo del suelo. Martini *et al.* (1980), Rosini *et al.* (1982) y Pretorius *et al.* (1999) aludieron a la importancia de la técnica de vendimia y los métodos de cultivo y labranza. Grangeteau *et al.* (2017) indicaron que todas las prácticas agrícolas pueden impulsar no solo la composición de la microbiota relacionada con el suelo y las plantas, sino también la diversidad y la respuesta de las especies relacionadas con la fermentación.

2.5. Levaduras asociadas a la fermentación

La *fermentación* es un proceso bioquímico complejo en el que intervienen varios tipos de microorganismos. Las levaduras son las responsables de la fermentación alcohólica, proceso en el que se consumen azúcares para producir alcohol, dióxido de carbono y otros compuestos químicos tales como ésteres, ácidos orgánicos, etc. (Fleet, 2003).

En el proceso de fermentación, las levaduras se pueden dividir, a grandes rasgos, en dos grupos: las levaduras no-*Saccharomyces* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que es la principal levadura durante la fermentación (Bokulich *et al.*, 2013; Mannazzu *et al.*, 2002).

Respecto a los principales géneros de las levaduras durante el proceso de fermentación, primero surgen las de los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora* y *Candida*, que predominan en las etapas iniciales, seguidas de varias especies de *Metschnikowia* y *Pichia* en las etapas intermedias, cuando el etanol se eleva al $3 \pm 4\%$. Las últimas etapas de las fermentaciones naturales del vino están dominadas invariablemente por las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes al alcohol. Otras levaduras, como las especies de *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, también pueden estar presentes durante la fermentación y, posteriormente, en el vino; algunas de ellas pueden afectar negativamente a la calidad sensorial (Pretorius, 2000).

El término no-*Saccharomyces* (NS) engloba a todas aquellas levaduras de diferentes géneros que están presentes en el mosto y durante las primeras fases de la fermentación, antes de que *S. cerevisiae* las desplace (Tronchoni *et al.*, 2017). También, en menor número, se encuentran en el equipo de bodega (Jolly *et al.*, 2003).

Si bien en el pasado estas levaduras se consideraban como *alterantes de la calidad*, este término cada vez está más ligado a un grupo de levaduras que pueden contribuir positivamente, al aportar variabilidad y tipicidad, y que constituyen una fuente de innovación enológica (Tronchoni *et al.*, 2017). A pesar de su reducción progresiva durante la fermentación del vino, las levaduras no-*Saccharomyces* se consideran miembros importantes del ecosistema mosto-vino y capaces de aumentar la «complejidad» de los perfiles sensoriales de los vinos mediante la producción de una gama masiva de compuestos sensoriales-activos, en realidad, superiores a los asociados habitualmente solo a *Saccharomyces* (Fleet, 2008).

El origen de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación espontánea es bastante controvertido (Pretorius, 2000). Algunos autores consideran que proviene de la comunidad microbiana residente en las bodegas. Otros, como Mortimer y Polsinelli (1999), observaron que las uvas dañadas son ricas depositarias de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que demuestra que el viñedo puede ser un almacén natural. Aponte (2016) también destacó que *Saccharomyces cerevisiae* es miembro de la microbiota del viñedo. También Querol *et al.* (2018) estudiaron este aspecto.

Varios estudios han abordado la contribución de las levaduras no-*Saccharomyces* y sus diferentes aplicaciones en la fermentación del vino (Pramateftaki *et al.*, 2000; Jolly *et al.*, 2003; Combina *et al.*, 2005; Zott *et al.*, 2011) así como de las cepas de *Saccharomyces* (Querol *et al.*, 2018).

Charoenchai *et al.* (1997) y Fernández *et al.* (1999) investigaron sobre las levaduras no-*Saccharomyces* y su aplicación en la vinificación, dada su capacidad para producir enzimas de valor biotecnológico. Asimismo, Strauss *et al.* (2001) evaluaron la capacidad de las levaduras no-*Saccharomyces* de producir enzimas extracelulares, tales como esterasas, glicosidasas, lipasas, glucosidasas, proteasas y celulasas, generalmente involucradas en la hidrólisis de componentes estructurales y relacionadas con el perfil aromático de los vinos.

Más específicamente, durante la fermentación del vino, diferentes especies de no-*Saccharomyces* secretan cantidades significativas de proteasas que producen compuestos olorosos como terpenos, norisoprenoides C13, ésteres y cetonas que afectan a la calidad aromática del vino elaborado (Maturano *et al.*, 2015).

También se ha investigado sobre su aplicación en la vinificación, teniendo en cuenta su capacidad para producir constituyentes volátiles y no volátiles que

contribuyen a la complejidad del vino final (Ciani *et al.*, 2010; Zott *et al.*, 2008; Grangeteau *et al.*, 2015).

A menudo con menor rendimiento de etanol y al no ser posible completar la fermentación (Fleet, 2008), se utilizan en inoculaciones secuenciales con *S. cerevisiae* para obtener vinos con menor graduación alcohólica y diversos aromas (Canónico *et al.*, 2016; Padilla *et al.*, 2016) y sabor (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1998; Fleet *et al.*, 2003). Por este motivo, brindan una solución a la tendencia creciente de los vinos de alto contenido alcohólico, que son en parte atribuibles al calentamiento climático (González *et al.* 2013, Quirós *et al.* 2014, Morales *et al.* 2015, Varela *et al.* 2015).

En la actualidad, en el mercado se encuentran disponibles algunas cepas comerciales de levaduras no-*Saccharomyces*, entre las que se encuentran *T. delbrueckii*, *M. pulcherrima* y *L. thermotolerans* (Roudil *et al.*, 2020).

Desde el punto de vista biotecnológico, *Saccharomyces cerevisiae*, además del etanol, genera muchos otros metabolitos secundarios valiosos, como el glicerol, ácidos orgánicos, moléculas que contienen azufre, ácidos grasos, alcoholes superiores y ésteres. Una interacción entre estos numerosos compuestos químicos contribuye, en cierta medida, a la calidad, principalmente aromática y organoléptica del vino (Fleet, 2008; Lambrechts y Pretorius, 2000; Meersman, Steensels, Paulus *et al.*, 2015a; Meersman, Steensels, Struyf, *et al.*, 2015b).

En el caso de las cepas de *S. cerevisiae* involucradas en la fermentación, estas juegan un papel importante en las características del producto final. La diversidad de cepas de *S. cerevisiae* presentes en la fermentación espontánea contribuye a la composición química y las cualidades sensoriales del vino resultante (Le Jeune *et al.*, 2006).

Capece *et al.* (2012) demostraron que cepas autóctonas de *S. cerevisiae* se adaptan mejor a las condiciones ambientales locales que las cepas no autóctonas. De hecho, cada cepa de *S. cerevisiae* es capaz de producir diferentes tipos y cantidades de compuestos secundarios, que son determinantes en las características organolépticas deseables de un vino (Pretorius, 2000; Romano *et al.*, 2003; Barrajón *et al.*, 2011; Scacco *et al.*, 2012).

También se ha documentado la diversidad entre los aislados de *Saccharomyces* y el impacto de esta diversidad sobre la composición del vino. Csoma *et al.* (2010) evaluaron la diversidad genética y fisiológica de aislados *Saccharomyces* en fermentación espontánea en Hungría y concluyeron que el

genoma de *Saccharomyces cerevisiae* puede ser más flexible, lo que le permite una adaptación más eficiente al continuo entorno cambiante en la fermentación del vino.

Por otro lado, Di Maio *et al.* (2012) estudiaron la biodiversidad en las poblaciones de levaduras enológicas naturales en una pequeña zona de Sicilia (Italia). Del total de cepas de levaduras *Saccharomyces* evaluadas a nivel de fermentación y tecnológico, al menos 209 resultaron superiores a las cepas de levadura industrial.

2.6. Identificación de levaduras

La diversidad de la microbiota del viñedo, la uva y el vino se ha estudiado en profundidad utilizando métodos microbiológicos tradicionales que incluyen microscopía, cultivo en diferentes medios de agar y características bioquímicas (Morgan *et al.*, 2017).

Durante las últimas décadas, se han empleado técnicas moleculares basadas en el análisis del ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la identificación de genes de ARN ribosómico (ARNr) como moléculas diana, así como metodologías dependientes de cultivos, para la identificación de microorganismos después del aislamiento y crecimiento en cultivos puros (Esteve-Zarzoso, 1999; Alessandria *et al.*, 2013).

Con el tiempo, se han ido desarrollando una serie de técnicas para la identificación de cepas de levaduras, que se revisan brevemente a continuación.

2.6.1. Métodos moleculares para la identificación de especie

2.6.1.1. Secuenciación de ADN ribosómico (ADNr)

Las especies de levadura pueden identificarse mediante la comparación de secuencias de nucleótidos de regiones del ADNr. Las dos regiones más comúnmente utilizadas son las regiones D1 y D2, que codifican las subunidades ribosómicas 26S (Kurtzman y Robnett, 1998a) y 18S (James *et al.*, 1997). La disponibilidad de secuencias en las bases de datos de ADN, particularmente para la región D1/ D2 del gen 26S, hace que esta técnica sea útil para asignar levadura desconocida a una especie específica cuando la homología de la secuencia es superior al 99% (Kurtzman y Robnett, 1998a).

2.6.1.2. Análisis de restricción de ADN ribosómico (ADNr)

Consiste en la amplificación por PCR de regiones de ADNr, seguida del análisis de fragmentos amplificados y perfiles de restricción por especie. Una región de ADNr que puede usarse para diferenciar entre especies es la que incluye el gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2. Esta técnica fue utilizada por Guillamón *et al.* (1998) para la identificación rápida de levaduras enológicas y luego fue utilizada por Fernández-Espinar *et al.* (2000) para la identificación de levaduras de vinos de Jerez. Ganga y Martínez (2004) también realizaron un estudio ecológico en fermentaciones controladas. Los fragmentos amplificados y los perfiles de restricción para estas especies con HaeIII, HinfI, CfoI y DdeI están disponibles en línea en <<http://yeast-id.com/>>. Si no se utilizan los perfiles de restricción, se puede secuenciar el ADN ribosómico.

2.6.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)-electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE)

Esta técnica, introducida en la ecología microbiana por Muyzer *et al.* (1993), se basa en la amplificación por PCR y la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). Separa los fragmentos de ADN de la misma longitud en función de las diferencias de secuencia. La migración del ADN se retrasa cuando las cadenas de ADN se disocian a una concentración específica de agente desnaturalizante. Otra técnica relacionada con la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) es la electroforesis en gel de gradiente de temperatura (TGGE). Varios autores han utilizado estos métodos para la identificación de levaduras en fermentaciones de vino (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; Urso *et al.*, 2008).

2.6.2. Métodos moleculares para la diferenciación entre cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

Diversos métodos moleculares permiten la identificación de *Saccharomyces cerevisiae* a nivel de cepa. Son métodos necesarios no solo para investigar la diversidad de esta especie, sino también para seleccionar cepas para su uso como cultivos puros, una práctica muy extendida en las industrias vitivinícolas donde las cepas pueden contribuir a una característica específica del producto final (Dequin, 2001; Suzzi *et al.*, 2012).

2.6.2.1. Hibridación genómica comparativa (CGH)

Esta técnica es capaz de detectar pérdida, ganancia y amplificación del número de copias a nivel cromosómico. Se sabe que la detección de amplificaciones es sensible a menos de 1 Mb. La técnica es sensible a tipos específicos de ganancias en el número de copias y su resolución para supresiones regionales es más limitada. Esta limitación es superada con mejoras en la resolución y el rango dinámico (Weiss *et al.*, 1999), que optimizan el rendimiento mediante el mapeo directo de las aberraciones en la secuencia del genoma. Se ha utilizado para el análisis del polimorfismo cromosómico en vinos espumosos (Nadal *et al.*, 1999) y para investigar la importancia evolutiva del tamaño del genoma de *S. cerevisiae* (Dunn *et al.*, 2005, 2012).

2.6.2.2. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

Este método fue descrito por primera vez por Schwartz y Cantor (1984) y consiste en la aplicación alterna de dos campos eléctricos transversales que posibilita que los cromosomas se vean obligados a cambiar su migración; como resultado, los grandes fragmentos de ADN pueden separarse. Diversos autores han demostrado que este método de análisis de cariotipo es más discriminativo que otros enfoques para la tipificación de levaduras, debido a que es capaz de resaltar polimorfismos en perfiles cromosómicos electroforéticos de poblaciones naturales de *Saccharomyces cerevisiae* en casi todas las regiones vitivinícolas del mundo (Johnston y Mortimer, 1986; Egli *et al.*, 1998; Sipiczki *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012).

2.6.2.3. RFLP-ADNmt

El ADN mitocondrial (ADNmt) de *Saccharomyces cerevisiae* es una molécula pequeña de entre 60 y 80 kb caracterizada por una elevada tasa de mutación. En particular, las mutaciones de sustitución de bases y los polimorfismos de longitud del ADNmt pueden evaluarse mediante el uso de endonucleasas con diferentes sitios diana (por ejemplo, DdeI, HinfI, AluI y RsaI). No todas las enzimas revelan el mismo grado de polimorfismo y los patrones de digestión dependen, en gran medida, de la especie. En el caso específico de *Saccharomyces cerevisiae*, las enzimas más adecuadas para diferenciar entre cepas son HinfI y HaeIII (Guillamón *et al.*, 1994). Este método lo utilizaron Di Maio *et al.* (2012) para estudiar la biodiversidad de las poblaciones de levaduras enológicas aisladas durante varios años en bodegas sicilianas sin previo uso de levaduras comerciales, lo que permitió la diferenciación entre las cepas de levaduras estudiadas.

2.6.2.4. RAPD-PCR

Esta técnica se basa en el uso de un solo cebador corto (8-12 nucleótidos) que amplifica las secuencias de ADN «anónimas». Por lo tanto, las uniones entre el oligonucleótido y el ADN están determinadas por la secuencia corta y aleatoria del cebador, que favorecidas por la baja temperatura de hibridación, conducen a la amplificación de una variedad de fragmentos de ADN distribuidos por todo el genoma. El resultado es un patrón de productos amplificados de diferente peso molecular que pueden ser característicos de la especie o de diferentes cepas o aislados dentro de la misma especie (Bruns *et al.*, 1991; Paffetti *et al.*, 1995). Tofalo *et al.* (2007) utilizaron este enfoque para reconocer cepas de *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente diferentes en cuatro áreas productoras de vino distintas de la región de Apulia (Italia). Los resultados obtenidos mostraron que las diferencias genéticas reflejan la biodiversidad fenotípica.

2.6.2.5. Análisis de microsatélites

Los microsatélites, también conocidos como *repeticiones de secuencia simple* (SSR_s) o *repeticiones cortas en tándem* (STRs), varían sustancialmente en longitud. Los microsatélites son secuencias repetidas de uno a seis pares de bases de ADN que se caracterizan por un alto nivel de polimorfismo. La variabilidad encontrada en estas regiones puede demostrarse mediante amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos, como (GTG) 5, (GAG) 5, (GACA) 4 o M13. Varios trabajos han descrito el uso de microsatélites en *Saccharomyces cerevisiae*, con el objetivo de identificar los loci más polimórficos con una alta diversidad alélica, que se pueden utilizar tanto para la identificación de cepas como para el establecimiento de cepas de origen geográfico o tecnológico. Richards *et al.* (2009) compilaron una base de datos de 246 genotipos para la caracterización de cepas comerciales y autóctonas. Ayoub *et al.* (2006) hallaron que los genotipos que no podían solucionarse mediante microsatélites a veces se solucionaban mediante análisis de secuencia o PCR-interdelta. Vaudano (2019) utilizó este método para distinguir las cepas de *S. cerevisiae* mediante el uso de tres loci de microsatélites altamente polimórficos (SC8132, YOR267C y SCPTS7).

2.6.2.6. Amplificaciones de secuencia δ

Las secuencias δ son secuencias flanqueantes (300 pb), asociadas frecuentemente con los transposones Ty1 y Ty2 que están dispersos por todo el genoma, y son particularmente comunes en regiones cromosómicas terminales (Franco-Duarte *et al.*, 2011). También se encuentran como elementos únicos. El número (de 35 a 55) y la ubicación de estos elementos son variables entre

especies, por lo que las secuencias δ representan marcadores genéticos útiles para la identificación de polimorfismos. Es adecuado para la caracterización de un elevado número de cepas porque es fácil de realizar, económico y rápido. Legras y Karst (2003), para mejorar este método, diseñaron cebadores alternativos (d12 y d21) que se ensamblan cerca de los sitios de unión descritos inicialmente por Ness *et al.* (1993) para los cebadores d1 y d2. Padilla *et al.* (2016) lo utilizaron para evaluar la diversidad genética intraespecífica de cepas de *S. cerevisiae* de ocho fermentaciones espontáneas en siete perfiles electroforéticos diferentes, y hallaron más de una cepa, lo que indica la coexistencia de varias durante el proceso de vinificación.

2.6.2.7. Tipos de secuencias multilocus (MLST)

Otra técnica utilizada para la tipificación de cepas de *S. cerevisiae* es la tipificación de secuencias multilocus (MLST). Ayoub *et al.* (2006) la señalan como valiosa para la tipificación microorganismos. Las cepas son caracterizadas utilizando secuencias de ADN de fragmentos internos de múltiples genes domésticos, donde la variación acumulada es relativamente baja y tiende a ser selectivamente neutra. Es altamente confiable y discriminatoria a nivel de cepa, debido a que se basa en la secuenciación de nucleótidos. Los resultados son fácilmente comparables entre laboratorios. Vigentini *et al.* (2009) emplearon este método para evaluar la biodiversidad genética de cepas comerciales, aisladas en vino, y cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* mediante el cribado de nucleótido (SNP_s) implicado en la producción de vino.

2.6.3. Otras técnicas de identificación de levaduras

En los últimos años, cabe señalar la contribución de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) y otras metodologías, como la metagenómica, en el ámbito del vino, que se están utilizando para desentrañar la diversidad microbiana del viñedo. Concretamente, las técnicas basadas en HTS han permitido, por un lado, obtener la descripción de la composición taxonómica de la comunidad microbiana y, por otro lado, explorar las relaciones filogenéticas y su variabilidad genética (Orgiazzi *et al.*, 2013). Asimismo, han facilitado el estudio de la diversidad microbiana en los viñedos, específicamente, de la influencia de las prácticas de gestión del mismo (Bokulich *et al.*, 2013; Portillo *et al.*, 2016) y en las bodegas e instalaciones (Bokulich *et al.*, 2013).

También están disponibles otras tecnologías de secuenciación masiva, cada una con sus ventajas y desventajas (Shendure, 2008; Suzuki, 2011; Liu, 2012).

Justificación y Objetivos

El cultivo de la vid cuenta con una vasta tradición y amplia base social en las comarcas de Los Oteros y Cea (sureste de León y noroeste de Valladolid). Varios de sus municipios están incluidos en la D. O. León, donde la variedad Prieto Picudo es la principal.

La continua y necesaria adaptación de la vitivinicultura a los cambios y exigencias del nuevo consumidor ha llevado, por una parte, a una mejora generalizada de los vinos y, por otra, a una pérdida de la originalidad que los «liga» a la «zona de producción» (Martínez de Toda, 2004).

Para asegurar una buena diferenciación del producto y tipo de vino es necesario que posea como punto distintivo las características del *terroir* y de las variedades de la vid. El concepto francés de *terroir* establece que la composición de las uvas producidas en una región de cultivo específica estará influenciada por el entorno local, y también incluye la mínima intervención en la modificación del entorno del cultivo para que el mismo sea evidente (Laville, 1990).

Desde hace algunos años existe una tendencia a recuperar las variedades minoritarias o locales. En ellas residen recursos genéticos de gran valor que podrían conducir al desarrollo de nuevos estilos de vino y serían útiles para conseguir una mejor adaptación a los recientes cambios climáticos y para lograr una mayor resistencia a plagas y enfermedades (Martínez de Toda *et al.*, 2013).

Negro Saurí es una variedad minoritaria que han rescatado la empresa Melgarajo, S.A., junto al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla-León (ITACyL) y los centros Coceder/Valdecea, bajo el amparo del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, como aparece publicado en la Orden APA/475/2019, que la reconoce como variedad comercial.

Knight *et al.* (2015) han descrito que la biodiversidad resultante de la microbiota asociada a la vid podría potencialmente identificar un viñedo, vinculando las características del vino específicamente con el *terroir* o el medio ambiente.

Asimismo, se cree que la abundancia y variabilidad de las especies de levadura autóctonas en las uvas depende en gran medida del clima, del suelo, del terreno y de los procedimientos de cosecha de una región (Barata *et al.*, 2012; Capozzi *et al.*, 2015).

En los últimos años existe una demanda creciente de bodegas particulares que seleccionan levaduras dentro de su viñedo para potenciar las características

específicas o la idoneidad de las variedades de uva locales (Tristezza *et al.*, 2014; Schvarczová *et al.*, 2017). De ahí que existan una multitud de especies por investigar, incluidas las específicas de las regiones vitivinícolas geográficas que pueden estar directamente relacionadas con las características organolépticas de los vinos.

En este contexto, el estudio se plantea alcanzar los siguientes objetivos:

- 1) Aislamiento e identificación de levaduras autóctonas asociadas a la variedad minoritaria Negro Saurí.
- 2) Estudio de la dinámica de la población de levaduras desde la uva hasta la fermentación espontánea.
- 3) Evaluación del efecto de las condiciones ambientales y del manejo del viñedo en el *terroir* microbiano.
- 4) Estudio de la diversidad de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante las añadas 2014-2017.
- 5) Caracterización tecnológica mediante cribado enzimático de relevancia enológica.

Material y Métodos

1. Viñedo experimental y selección de la variedad

El estudio se realizó en el viñedo de la empresa vitivinícola Melgarajo, S. A., ubicado en Melgar de Abajo (42° 15' 48,68" N, 5° 9' 56,66" W), dentro de la D. O. León. Las vides que componen el ensayo sobre el que se realizó el trabajo constan de 300 plantas, dispuestas en tres líneas en espaldera y 15 clones experimentales de la variedad Negro Saurí (Figura 2).



Figura 2. Ubicación del viñedo de Melgarajo, S. A. en la comarca del Cea y Los Oteros. En el recuadro amarillo se aprecia el detalle de las líneas experimentales de Negro Saurí

La investigación se centró en la variedad Negro Saurí por ser calificada como una variedad con personalidad que, debido a sus elegantes cualidades de aroma y sabor como vino varietal, ha experimentado un resurgimiento en la región de León (Arranz *et al.*, 2016).

Negro Saurí (Figura 3), considerada una variedad minoritaria dentro de la D. O. León, e identificada como sinonimia de la variedad Merenzao (Arranz *et al.*, 2008), forma parte del Programa de Recuperación y Mejoramiento de la Vid de España del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) (Ibáñez *et al.*, 2015). La variedad Negro Saurí, bajo la sinonimia de Merenzao, está autorizada en varias DD. OO. de España, específicamente, en Canarias, Galicia y La Rioja.

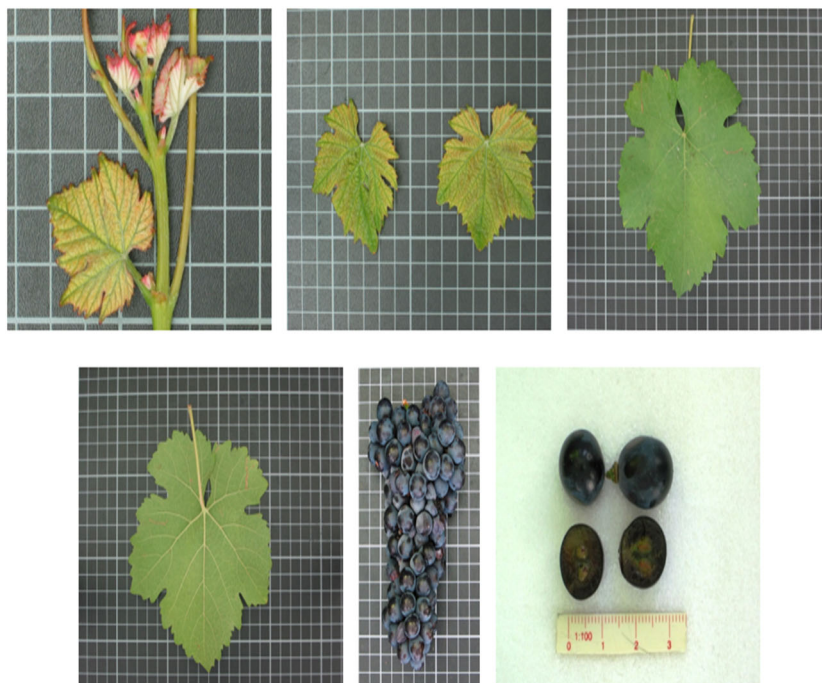


Figura 3. Aspecto de la sumidad, hoja joven, haz de hoja adulta, envés de hoja adulta, racimo y baya de la variedad Negro Saurí (imagen facilitada por el ITACyL)

2. Datos climatológicos y manejo del viñedo

Se realizó un estudio climatológico (Tabla 1) y del manejo de los productos fitosanitarios (fungicidas, herbicidas y nutrientes) (Tabla 2) en cuatro vendimias (2014, 2015, 2016 y 2017), durante las cuales se recogieron las muestras para este trabajo. Entre los factores climatológicos se analizaron la pluviometría y la temperatura en el periodo comprendido entre los meses de octubre a septiembre del año siguiente, correspondientes al ciclo vegetativo de la vid. Del mismo modo, se documentó la formulación y el uso de los productos fitosanitarios en dicho periodo. Ambos estudios fueron llevados a cabo con el fin de analizar la posible

influencia de estos factores sobre la diversidad de levaduras en el periodo estudiado.

Tabla 1. Precipitación (P [mm]) y temperatura media (Tm [°C]) registradas en la estación meteorológica de Mayorga de Campos (Valladolid). (Datos proporcionados por el ITACyL)

	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Total
P 2014	82,2	11,5	60,0	58,6	63,6	21,8	33,3	22,4	10,3	26,8	1,2	38,6	430
P 2015	4,0	89,6	26,3	33,7	14,5	9,0	53,8	23,1	121,2	17,1	2,8	37,4	432
P 2016	84,2	42,2	22	105,2	47,4	31,6	106,4	78,4	2	1,2	3,6	11	535
P 2017	29,2	22,8	21	20,4	56,4	13,6	7,87	30,9	22,21	14,54	15,15	2,63	257

	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Total
Tm 2014	12,4	5,8	2,0	5,5	5,0	7,8	12,3	13,5	18,1	19,8	19,7	18,1	11,7
Tm 2015	14,6	8,5	3,4	1,6	3,7	8,1	10,9	14,7	19,4	22,7	20,2	15,4	12,0
Tm 2016	11,8	8,0	4,9	5,4	5,2	5,9	8,4	12,3	18,3	22,3	21,6	17,7	11,8
Tm 2017	12,8	6,5	3,8	2,3	6,3	8,2	11,4	15,7	21,3	21,6	20,8	16,2	12,3

Tabla 2. Productos fitosanitarios utilizados en Melgarajo, S.A. en el periodo 2014-2017. (Datos facilitados por MELGARAJO S.A.)

AÑO	AGENTE	DESCRIPCIÓN
2014	AMICOS® COMBI	Extracto vegetal. Antiesporulante de hongos y suplemento de micronutrientes (Mn, Zn).
	APACHE®	Clorotalonil 37,5% + propiconazol 6,25% + ciproconazol 5%. Fungicida de amplio espectro.
	ASSISTANT®	Herbicida prebrote y postbrote.
	ATILA®	Glifosato 36%. Herbicida postbrote.
	AZUFRE OROFLEX®	Azufre para espolvoreo. Fungicida de amplio espectro.
	CERCOBIN®	Fungicida de amplio espectro, polivalente, sistémico y de contacto.
	CHOKE	Hidróxido de sodio y soda cáustica.
	CYCLO PLUS®	Ftalimida 40% + metalaxil 10%. Control de mildiu y moho negro.
	EMERALD®	Fluazinam 50 %. Fungicida.
	LATINO®	Miclobutanil (triazol) 12,5%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	NUTRACEICO	Abono boratado en suspensión. Suplemento para la carencia de boro.
	PROFOL PLUS 6-30-37	Abono.
	SFENVALO STAR®	Esfenvalerato (piretroide) 2,5%. Insecticida.
	SUFREVIT®	Azufre 80%. Fungicida y acaricida.
	THIOVIT JET®	Azufre 80%. Control de oídio, óxido y ácaros.
	TOPAS 100EC®	Penconazol 10 %. Control de oídio.

Material y Métodos

2015	ATILA®	Glifosato 36%. Herbicida postbrote.
	BRANDA®	Acilalanina. Control de mildiu.
	CALDO LAINCO	Cobre 20% (sulfato de cobre y calcio). Fungicida de amplio espectro.
	DEEPEST	Disulfuro de tiuram 50%. Fungicida de amplio espectro.
	FANTIC-M®	Benalaxil M 4% + mancozeb 65%. Control de mildiu.
	FLINT®	Trifloxistrobina 50%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	LAITRI	Miclobutanil (triazol) 12,5%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	MEDELINON FLOW	Diclorofenilurea 45%. Herbicida sistémico.
	ORTHOCLIDE®	Ftalimida 80%. Control de oídio.
	PROWL®	Pendimetalina 33%. Herbicida.
2016	BORIGAN™	Borato. Agente humectante.
	COBRE LAINCO	Oxicloruro de cobre 50%. Control de mildiu.
	FLINT®	Trifloxistrobina 50%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	GLITAN	Glifosato. Herbicida postbrote.
	GRANO DE ORO®	Azufre 98,5%. Fungicida.
	KARDA	Glifosato. Herbicida postbrote.
	LAINCOIL	Aceite de horticultura o jardín 83%. Pesticida.
	LAITRI	Miclobutanil (triazol) 12,5%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	MELODY® COMBI	Ftalimida 56,3% + carbamato 9 %. Control de mildiu.
	PRINALUM®	Pendimetalina 33%. Herbicida.
	TACTIC™	Organosilicon surfactante.
2017	ACILIQ NPK	Fertilizante complejo inorgánico.
	ARMETIL®	Ftalimida 40% + metalaxil 10%. Control de mildiu.
	AZUFRE LÍQUIDO 80 PALLARÉS®	Azufre concentrado en suspensión. Acaricida.
	COLLIS®	Boscalida 20% + metil kresoxima 10%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	DELTAPLAN®	Deltametrin 2,5%. Control larvas de polilla.
	GLIFOSATEC®	Glifosato. Herbicida postbrote.
	GLITAN	Glifosato. Herbicida postbrote.
	KARATHANE™ STAR	Meptildinocap 35%. Control de <i>Oidium</i> spp.
	MICLOBUTANIL	Miclobutanil (triazol) 12,5 %. Control de <i>Oidium</i> spp.
	MICROFER CA	Calcio.
	MICROFER MG	Magnesio.
	PROTAMINAL® PLUS	Aminoácidos.
	SOLUCIÓN NITROGENADA	Nitrógeno fertilizante.
	VAMECTIN®	Abamectina 1,8%. Acaricida y pesticida.
ZARPA®	Diflufenican 4% + glifosato 16%. Herbicida.	

3. Procesamiento y análisis de las muestras

3.1. Toma de muestras

Se recogieron dos tipos de muestras durante cuatro añadas consecutivas (2014, 2015, 2016 y 2017). Una correspondía a uva, y otra, a mosto destinado a la fermentación espontánea en la instalación experimental dentro de Melgarajo, S. A., que se utiliza solo para la producción de vino de investigación de Negro Saurí. Para ambos casos se recolectaron uvas con un índice de madurez de ~ 24 Bx.

3.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras de uva (1 kg) se recolectaron asépticamente, a mano y de forma aleatoria, seleccionando uvas de diferentes partes de los racimos, pertenecientes a los tres líneas que forman parte del viñedo experimental. Se recogieron en bolsas de plástico estériles e inmediatamente se llevaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León para su estudio.

Las uvas destinadas al proceso de fermentación espontánea (~ 500 kg) se vendimiaron a mano, en cajas de 20 kg, para posteriormente ser despalladas, prensadas y transferidas a los tanques de acero inoxidable (500 L). Del mosto resultante se tomó una primera muestra, que más tarde se trató con metabisulfito de potasio para someterlo a fermentación sin inocular (espontánea) a 16-18 °C. Se recogieron muestras del mosto durante todo el proceso de fermentación. Estas se depositaron en frascos estériles de 100 mL de capacidad y se transportaron nuevamente para su análisis al mismo laboratorio.

3.3. Medios de cultivo

Si no se indica lo contrario, la preparación de los medios requiere una esterilización en autoclave (121 °C durante 15 min). Los suplementos o aditivos necesarios, de acuerdo al propósito de cada uno de estos medios de cultivo, fueron colocados al final en cada recuadro-lista y señalados con un asterisco (*).

3.3.1. Medio YEPD o YPD

El medio complejo YEPD se utilizó para el aislamiento de las cepas de levaduras y el estudio de la actividad enzimática (Lodder, 1970).

Para el aislamiento de levaduras, el medio YEPD, una vez esterilizado, se atemperó a unos 50 °C de temperatura y se suplementó con el antibiótico cloranfenicol como agente bacteriostático. La composición del medio incluyó los siguientes componentes por litro:

Material y Métodos

YEPD (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Peptona bacteriológica	20,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0
*Cloranfenicol	150 µg mL

3.3.2. Medio YED sólido

Este medio, que es una modificación del anterior, se empleó para el mantenimiento y conservación de las colonias de levaduras. La composición por litro era la siguiente:

YED (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0

3.3.3. Medio YED líquido

La variante líquida, en nuestro caso, se empleó para el crecimiento de preinóculos de levaduras, con la siguiente composición por litro:

YED (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Glucosa	20,0

Para el estudio de la actividad enzimática (proteasa, lipasa, celulasa y β -glucosidasa) seguimos el protocolo propuesto por Strauss *et al.* (2001); para el análisis de la actividad esterasa se siguió el planteado por Binati *et al.* (2019).

3.3.4. Actividad proteasa

La actividad proteasa se evaluó en placas YEPD con leche desnatada en polvo (Sigma-Aldrich). La preparación del medio se realizó separando el medio YEPD de la solución de leche desnatada. Posteriormente, se esterizaron y, al alcanzar alrededor de los 50 °C, se mezclaron ambas fracciones. La composición por litro de medio era la siguiente:

Material y Métodos

YEPD (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Peptona bacteriológica	20,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0
*Leche desnatada en polvo	20,0

3.3.5. Actividad lipasa

Su actividad se determinó en medio YEPD suplementado con tributirina (Sigma-Aldrich). En este caso, el medio YEPD, una vez esterilizado, se atemperó a unos 50 °C y se le adicionó la tributirina. La composición del medio incluyó los siguientes componentes por litro:

YEPD (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Peptona bacteriológica	20,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0
*Tributirina	3,0 mL

3.3.6. Actividad celulasa

La producción de celulasa se determinó en medio YEPD suplementado con carboximetilcelulosa (CMC, Sigma). La preparación del medio se realizó por separado: primero, el medio YEPD y, después, la solución con CMC. A continuación, se esterizaron y, al alcanzar alrededor de los 50 °C, se mezclaron ambas fracciones. La composición por litro de medio era la siguiente:

YEPD (g/L)	
Extracto de levadura	10,0
Peptona bacteriológica	20,0
Glucosa	20,0
Agar	20,0
*Carboximetilcelulosa	4,0

3.3.7. Actividad esterase

Se evaluó la presencia de la actividad esterase en un medio compuesto. Para la preparación de este medio, primero se disolvieron los componentes en agua destilada, se ajustó el pH = 6,8 y se esterilizó. Después, se enfrió hasta alcanzar los 50 °C, momento en el cual se le añadió Tween® 80 estéril. El medio presentaba la siguiente composición por litro:

	(g/L)
Peptona bacteriológica	10,0
NaCl	5,0
CaCl ₂	0,1
Agar	15,0
*Tween® 80 estéril	5,0 mL

3.3.8. Actividad β-glucosidasa

La actividad β-glucosidasa se llevó a cabo en un medio selectivo. Para la preparación se mezclaron los componentes en agua destilada y se ajustó el pH = 5 antes de esterilizar. Previo enfriamiento, se añadieron 2 mL de una solución de citrato de amonio férrico al 1%. Su composición se detalla a continuación:

	(g/L)
Base nitrogenada de levadura	6,7
Arbutina	5,0
Agar	20,0
*Citrato de amonio férrico	20 mL

4. Soluciones y tampones empleados en los medios de cultivo

Las soluciones empleadas durante esta investigación fueron las siguientes:

- **Citrato férrico 1% (p/v):** se pesó 1 g y se disolvió en 100 mL de agua destilada. Fue esterilizado por filtración amicrobica (tamaño de poro: 0,22 μm).
- **Cloranfenicol 34 mg/mL (en etanol):** se pesaron 0,034 g y se disolvieron en etanol al 100% hasta completar un volumen de 10 mL. Se conservó a -20 °C.

- **Etanol 70% (v/v):** 70 mL de etanol completado con agua hasta un volumen final de 100 mL.
- **Glicerol 80% (v/v):** se tomaron 80 mL de glicerol y se completó el volumen con agua hasta los 100 mL. Se esterilizó en autoclave.
- **Solución salina (NaCl 0,9% [p/v]):** se pesaron 0,9 g de cloruro sódico, se disolvieron en agua y se ajustó la solución a un volumen final de 100 mL. Se esterilizó en autoclave.

Las soluciones tampón utilizadas fueron las siguientes:

- **Tampón TAE (50x):** se mezclaron 242 g de Tris-HCl, 57,1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8) y agua destilada hasta completar el volumen final de 1 L.
- **Tampón TE:** se mezclaron 10 mM de Tris-HCl y 1 mM de EDTA (pH 8). Se esterilizó en autoclave.
- **Tampón de Carga (6X):** se mezclaron azul de bromofenol al 25% (Sigma) 0,25 g, xilencianol al 25% (Sigma) 0,25 g y sacarosa al 40% (Sigma) 40 g y agua destilada hasta completar un volumen final de 100 mL. La mezcla se esterilizó en autoclave y se conservó a 4 °C, protegida de la luz.

5. Aislamiento e identificación genética de las levaduras en uva, mosto y fermentación espontánea

5.1. Aislamiento y conservación de levaduras

Para el aislamiento de las levaduras, las muestras de uva (1 kg) se homogeneizaron asépticamente utilizando un mezclador Stomacher® 400 (Seward Ltd., Inglaterra) durante 1 min a intensidad normal. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas en solución salina al 0,9% y se sembraron alícuotas (0,1 mL) de muestras tanto de uvas homogeneizadas como de mosto en la superficie de placas de YEPD sólido con pH de 4,5 y suplementado con 150 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Sigma-Aldrich) para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 30 °C durante 2-3 días.

Después de la incubación, los diversos tipos de colonias visibles obtenidas en cada una de las diluciones se usaron para el aislamiento. Fueron elegidas al azar, según la forma, el color, las características de la superficie y la frecuencia (Kurtzman y Fell, 1998b). Se evitaron especies ubicuas de *A. pullulans* y basidiomicetos sin interés para los objetivos enológicos de este trabajo. Los

aislados puros se sembraron en YED sólido y se observaron al microscopio óptico para identificar la morfología de las células.

Para su conservación, los cultivos de levadura se preservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio YED líquido con glicerol al 30% como crioprotector para su posterior identificación genética (Figura 4).



Figura 4. Esquema del proceso de aislamiento, conservación e identificación de las levaduras seleccionadas

6. Identificación genética de las levaduras

La identificación de las levaduras objeto de estudio se llevó a cabo por detección molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Mullis *et al.* (1986), que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento concreto de ADN utilizando iniciadores o cebadores (*primers*) específicos de la zona del genoma que se desea amplificar.

6.1. Extracción del ADN de levaduras

Con antelación a la realización de la PCR, es necesario extraer el ADN genómico. Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Lööke *et al.* (2011), usando colonias de levadura individuales (o células recolectadas de 100 µL de cultivo YED líquido [DO₆₀₀ 0,4]). El sedimento de ADN fue disuelto en 100 µL de agua y los restos fueron retirados por centrifugación (15 000 × g durante 1 min) utilizando un equipo Centrifuge 5415 R (Eppendorf). Por último, el sobrenadante, que contenía el ADN, se transfirió a otro microtubo (Eppendorf) y se conservó a -20 °C para ser utilizado en la PCR.

6.2. Amplificación del ADN por PCR

La identificación de las levaduras se realizó mediante la amplificación por PCR de la unidad de repetición del ARNr formada por el gen 5,8S y las regiones (no codificantes) espaciadoras transcritas internas ITS 1 e ITS 2 (White *et al.*, 1990) (Figura 5, extraída de Carro y Piña, 2000). Para ello, se usaron los cebadores oligonucléotidos, de acuerdo con la metodología descrita por Esteve-Zaroso *et al.* (1999):

ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

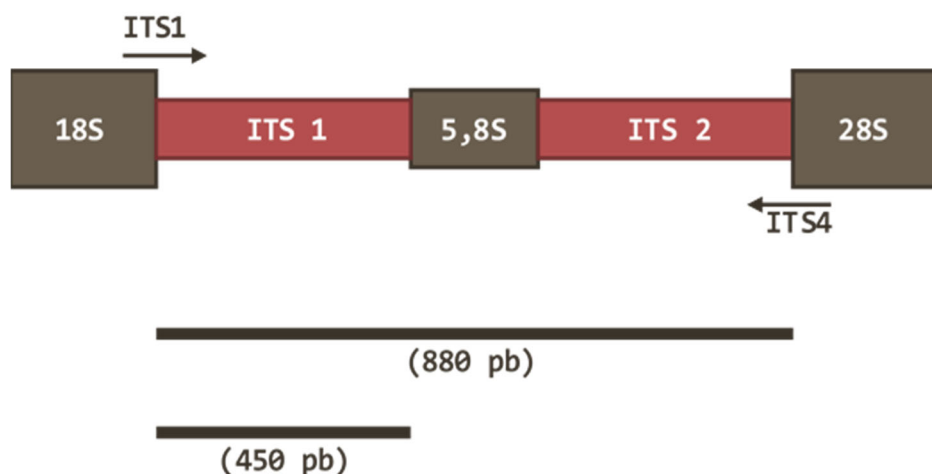


Figura 5. Región del gen de ARNr nuclear amplificado por PCR. Se indican las posiciones de dos secuencias internas transcritas (ITS) y la posición relativa de los cebadores más corrientemente usados (ITS1 e ITS4). Las zonas conservadas se muestran en tonos marrones, y las variables, en tonos burdeos. Las medidas de los amplificados que se obtienen varían según la especie de levadura que se ensaye. (Imagen extraída de Carro y Piña, 2000)

Las muestras para las reacciones de amplificación por PCR se dispusieron en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Para ello se preparó una mezcla de reacción con un volumen final de 50 μ L compuesta por:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Cebador ITS1	(10 μ M)	0,5 μ L
Cebador ITS4	(10 μ M)	0,5 μ L
dNTPs	40 mM	0,5 μ L
Biotoools DNA polimerasa <i>Taq</i>	(1 U/ μ L)	0,5 μ L
Tampón PCR	10x	5,0 μ L
MgCl ₂	(15 mM)	1,5 μ L
Agua libre de ADN/ARN		39,5 μ L
ADN extraído (molde)		2,0 μ L
Volumen total		50,0 μL

El proceso de reacción se llevó a cabo con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de la amplificación en 35 ciclos, con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, anillamiento a 55,5 °C durante 2 min, extensión a 72 °C durante 2 min, y con una extensión final a 72 °C durante 10 min (Figura 6).

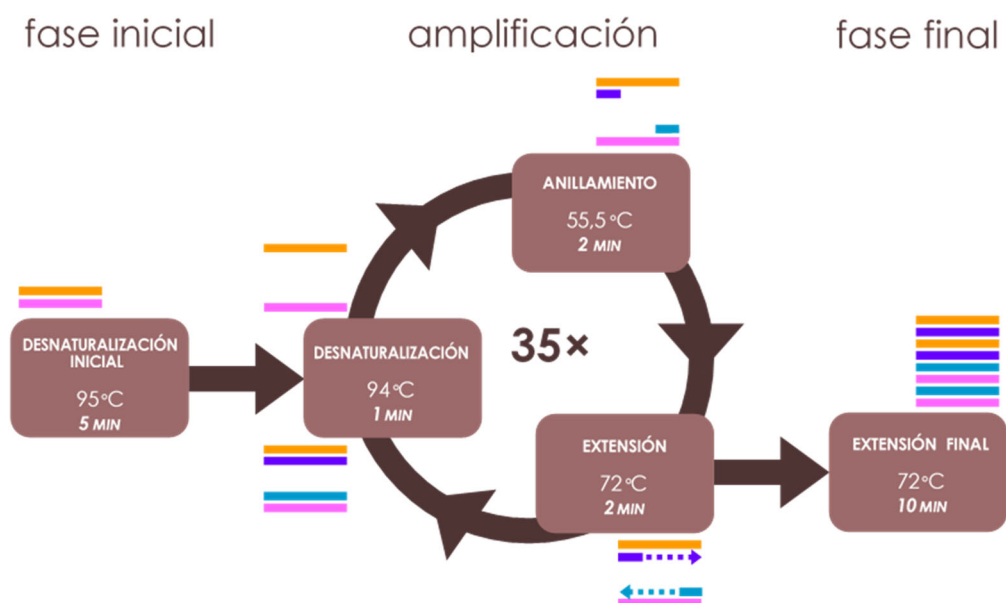


Figura 6. Condiciones de amplificación por PCR de la región 5,8S-ITS

6.3. Visualización del ADN mediante electroforesis en geles de agarosa

Los resultados obtenidos de la PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración variable de 0,5 a 3% (p/v). Los geles se prepararon en tampón TAE 1x [Tris (40 mM), ácido acético (20 mM) y EDTA (1 mM, pH 8)]. El tamaño y la calidad (cantidad, intensidad, número de bandas, etc.) de los fragmentos de ADN amplificados se estimaron utilizando HyperLadder™ 100 bp (Bioline) como marcadores de peso molecular. Para la electroforesis se empleó el mismo tampón, y la separación se realizó en el equipo Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad) a un voltaje de 90 V durante 1,5 h.

Una vez concluido el proceso de electroforesis, la tinción del gel se llevó a cabo con RedSafe™ como agente intercalante de ADN, que es luminiscente por exposición a luz ultravioleta. La adición de un tampón de carga 6x facilitó la carga y el rastreo de cada muestra. El patrón de banda se visualizó mediante un transiluminador (luz UV), y el resultado fue registrado con el sistema de fotodocumentación GelPrinter y analizado con el programa 1D Manager, ambos de Tecnología para Diagnóstico e Investigación (TDI).

6.4. Análisis de la secuenciación de ADN

Para purificar el ADN, se extrajeron los fragmentos procedentes de la PCR utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. El ADN purificado fue remitido al Servicio de Secuenciación de ADN del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León. Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparados utilizando el programa de herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) dentro de la base de datos NCBI (Madden *et al.*, 1996).

7. Caracterización genética de *Saccharomyces cerevisiae*

El estudio de la diversidad genética de las cepas identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* se realizó mediante la ampliación por PCR de las regiones interdelta (δ), que flanquean los retrotransposones Ty1 en el genoma de la levadura, según el protocolo descrito por Ness *et al.* (1993).

Con anterioridad a la realización de la amplificación por PCR fue necesario obtener el ADN de las levaduras. El procedimiento de aislamiento se llevó a cabo de acuerdo con el método propuesto por Liu *et al.* (2014) y utilizando el kit Master Pure Yeast Purification (Epicentre Biotechnologies), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

La pareja de cebadores $\delta 12$ y $\delta 21$ específicos empleados en la ampliación de regiones interdelta consta de las siguientes secuencias (Legras y Karst, 2003):

$\delta 12$ (5'-TCAACAATGGAATCCCAAC-3')

$\delta 21$ (5'-CATCTTAACACCGTATATGA-3')

Esta amplificación se realizó en una mezcla de reacción de 25 μ L, compuesta por:

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN	CANTIDAD
Cebador $\delta 12$	(10,0 μ M)	2,0 μ L
Cebador $\delta 21$	(10,0 μ M)	2,0 μ L
dNTPs	5 mM	1,0 μ L
Polimerasa Mango <i>Taq</i>	(5 U/ μ L)	0,5 μ L
Tampón PCR	5x	5,0 μ L
MgCl ₂	(15 mM)	1,25 μ L
Agua libre de ADN/ARN		12,25 μ L
ADN extraído (molde)		1,0 μ L
Volumen total		25,0 μL

El programa del termociclador incluyó una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min, seguida de la etapa de ampliación de 35 ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación, bajo las siguientes condiciones: en la fase de desnaturalización se utilizó una temperatura de 95 °C durante 30 seg; en el anillamiento se aplicó una temperatura de 46 °C durante 30 seg y, en la elongación, se empleó una temperatura de 72 °C durante 90 seg. Después de finalizar los ciclos, se efectuó la etapa de elongación final de 10 min a 72 °C (Figura 7).

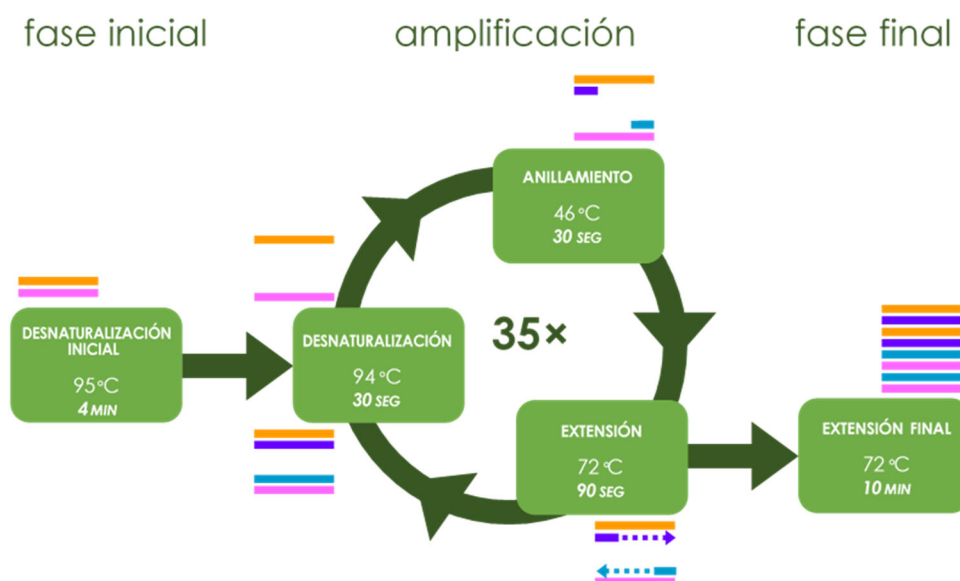


Figura 7. Condiciones de amplificación por PCR de las regiones interdelta (δ)

Los productos de la PCR se separaron en geles de agarosa al 2%, y se estimó el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados utilizando HyperLadder™ de 50 pb (Bioline) como marcador de peso molecular de acuerdo al apartado 4.6.3. Los amplicones obtenidos se utilizaron para el análisis estadístico (ver apartado. 4.10).

8. Cribado de la actividad enzimática

8.1. Actividad enzimática

Para estudiar la actividad enzimática extracelular de las levaduras aisladas, cada enzima se evaluó en medios de cultivo específicos. Para preparar el inóculo se depositó una colonia de cada una de las cepas estudiadas en 5 mL de medio YED líquido y se incubó a 30 °C con agitación a 150 rpm en un orbital durante toda la noche.

Para estandarizar los cultivos de cada una de las cepas analizadas se siguió el protocolo propuesto por Albertin *et. al.* (2016). La determinación de actividades enzimáticas fue cribada mediante ensayos puntuales en placas de Petri en medios diferenciales descritos a continuación.

8.1.1. Proteasa

La actividad proteolítica fue evaluada en medio YEPD con leche desnatada en polvo (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante cinco días a 30 °C. Un halo claro alrededor de la colonia la identificó como positiva.

8.1.2. Lipasa

La actividad lipolítica se determinó usando YEPD suplementado con tributirina (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante siete días a 28 °C. Un halo claro alrededor de la colonia indicó la presencia de actividad lipasa.

8.1.3. Celulasa

La producción de la actividad celulolítica se evaluó en medio YEPD suplementado con carboximetilcelulosa (CMC, Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante cinco días a 30 °C. Las colonias se revelaron de acuerdo el método propuesto por Kasana *et. al.* (2008). Un halo transparente alrededor de la colonia indicó actividad celulasa positiva.

8.1.4. Esterasa

Se determinó la presencia de actividad esterásica en un medio compuesto. Después de 72 h de incubación, un halo opaco alrededor de las colonias indicó un resultado positivo.

8.1.5. β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se llevó a cabo en un medio selectivo. Las placas se incubaron durante cinco días a 30 °C. Las colonias que mostraron actividad se identificaron por la decoloración del medio a un color marrón.

9. Análisis químico

Para este análisis, de cada vendimia estudiada, las muestras provenientes de uvas fueron enviadas a la Estación Enológica de Rueda (ITACyL), y las de vino, a los laboratorios Vinotecnia, S.L.

9.1. Análisis químico de la uva

Para el análisis de la riqueza fenólica de las uvas Negro Saurí se examinaron los siguientes parámetros químicos: °Brix, densidad, azúcares reductores (g/L-1), pH, acidez total (g/L-1), ácido L-málico (g/L-1), ácido tartárico (g/L-1), potasio (g/L-1) e índice de polifenoles totales (IPT).

9.2. Análisis químico del mosto

En el mosto se analizaron los siguientes parámetros químicos: porcentaje de alcohol (v/v), pH, acidez total (g/L⁻¹) y acidez volátil (g/L⁻¹).

10. Análisis estadístico

Los patrones de secuencia interdelta se utilizaron para construir una matriz de presencia/ausencia (binario 0/1), de acuerdo con Mercado *et. al.* (2010). A todas las bandas visibles se les asignó un número basado en la posición relativa al marcador de peso molecular de ADN; a cada posición se le estipuló una puntuación para indicar la presencia (1) o ausencia (0) de banda. En la Tabla 3 se recogen las 25 bandas de marcador de peso molecular. Se utilizaron 22 para la construcción de dendrogramas (en negrita se señalan las tres bandas no utilizadas), para estudiar la relación genética entre las cepas.

Tabla 3. Bandas de marcador de peso molecular utilizadas en el análisis estadístico

2000	1800	1600	1500	1400	1300	1200	1100	1000	800	750	700	600
550	500	450	400	350	300	250	200	180	150	100	50	

Se realizaron cuatro réplicas del experimento, con el fin de depurar los resultados obtenidos. Para cada cepa y para cada indicador, se analizó

conjuntamente el resultado de las cuatro réplicas. Los resultados obtenidos permitieron depurar la muestra de cepas, confirmando el valor si la cepa presentaba tres o cuatro resultados iguales. Las cepas con dos resultados de cada tipo se consideraron de valor dudoso, y para ellas se repitió el análisis PCR.

Para clasificar las cepas estudiadas en función de la similitud entre los patrones de las bandas, se construyeron cinco dendrogramas, uno por cada vendimia y uno global, con las 110 cepas activas y la cepa suplementaria (CROSS). Para la construcción de cada uno, el análisis estadístico se realizó según Lebart *et al.* (1995):

- En primer lugar, debido a que los datos descritos tienen un valor asignado de 0 ó 1 en cada una de las 22 bandas PCR, se aplicó un análisis de correspondencias múltiples (MCA) de Dazy y Le Barzic (1996) para depurar la información.
- Partiendo de las componentes seleccionadas del análisis MCA anterior, cada dendrograma se realizó con un método de conglomerados jerárquico aglomerativo, tomando la distancia euclídea cuadrada y el algoritmo de Ward (Granato *et al.*, 2018).
- Por último, el número de grupos de cada dendrograma se identificó tomando como referencia los indicadores de Davies-Bouldin y Calinski-Harabasz (Arbelaitz *et al.*, 2013). Se utilizó el *software* estadístico Coheris Analytics SPAD (2017).

Resultados y Discusión

1. Microbiota asociada a la variedad minoritaria Negro Saurí

El estudio del aislamiento de cepas de levaduras se ha llevado a cabo durante cuatro añadas consecutivas (de 2014 a 2017) para realizar una comparación entre ellas, al mismo tiempo que preservar la comunidad de levaduras que pudieran tener una posible aplicación como marca regional única en el sabor y aroma del vino.

2. Aislamiento e identificación de levaduras en uva, mosto y fermentación espontánea

El aislamiento de levaduras se realizó a partir de muestras de uva, mosto y en la fermentación espontánea. Tras realizar diluciones seriadas, estas se sembraron en medio YEPD suplementado con cloranfenicol.

La identificación de las levaduras se realizó a partir de la morfología de las colonias, de acuerdo al método propuesto por Kurtzman y Fell (1998b) y la amplificación por PCR del gen 5,8S de ARNr con las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS1 e ITS2), siguiendo el método descrito por Esteve-Zarzoso *et al.* (1999). Las especies se identificaron mediante la comparación de los datos de la secuencia de ADN de las bandas de PCR de diferentes tamaños con las secuencias disponibles en la base de datos NCBI (GenBank), utilizando el programa de búsqueda de homología de nucleótidos estándar Basic Local Alignment Search Tool (Madden *et al.*, 1996) (BLAST, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>).

En este estudio se aislaron un total de 159 levaduras autóctonas presentes en muestras de uva, mosto y en la fermentación espontánea (Tabla 4).

Se identificaron cinco especies de levaduras, entre las cuales se hallaron *Saccharomyces cerevisiae* y cuatro especies no-*Saccharomyces*: *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans* (anteriormente conocida como *Kluyveromyces thermotolerans*), *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspora delbrueckii*. La distribución porcentual de cada especie identificada dependió del material de origen (uva, mosto o fermentación espontánea) y de la añada en particular (Tabla 4 y Figura 8). Este estudio es similar a informes anteriores de la microbiota asociada con Prieto Picudo, cultivado en la D. O. León (Álvarez-Pérez *et al.*, 2015) y con uvas Cariñena y Garnacha de la región vitivinícola del Priorat de Tarragona, España (Sabate *et al.*, 2002).

Tabla 4. Especie, número de aislado y fuente (2014-2017)

Levadura		<i>Metschnikowia pulcherrima</i>				<i>Lachancea thermotolerans</i>				<i>Hanseniaspora uvarum</i>				<i>Torulaspora delbrueckii</i>				<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Fuente	Año	2014	2015	2016	2017	2014	2015	2016	2017	2014	2015	2016	2017	2014	2015	2016	2017	2014	2015	2016	2017
	Uva		3	3	3	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mosto		1	1	1	4	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-
FERMENTACIÓN ESPONTÁNEA	Inicial	2	1	1	4	1	-	-	-	2	-	-	4	-	-	-	0	0	4	4	4
	Media	1	0	0	3	0	-	-	-	0	-	-	1	-	-	-	2	5	5	5	6
	Final	0	0	0	0	0	-	-	-	0	-	-	0	-	-	-	0	24	7	35	11

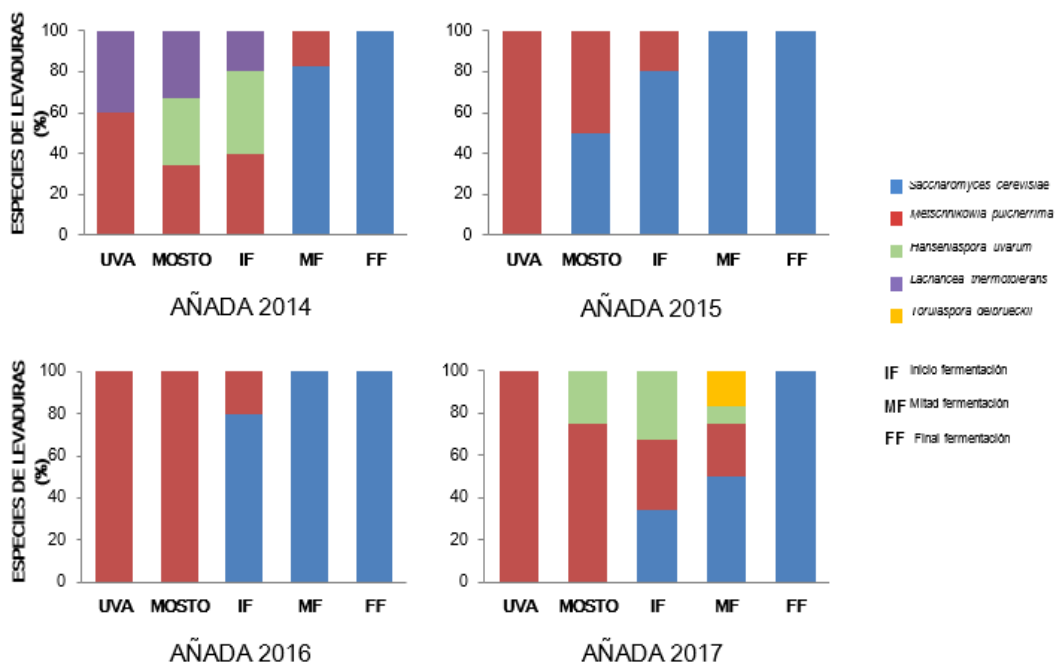


Figura 8. Biodiversidad de especies de levadura en uvas, en mosto y durante la fermentación. La distribución de especies se calculó dividiendo el número de aislamientos de una especie en particular por el número total de aislamientos

2.1. Uva

M. pulcherrima fue la única especie aislada en la uva en cada añada, excepto en 2014, cuando también se identificó *L. thermotolerans* (Tabla 4 y Figura 8). Este resultado confirma lo indicado por Garofalo *et al.* (2016), que *M. pulcherrima* es uno de los principales géneros de levaduras asociado a la superficie de la uva. Sin embargo, Li *et al.* (2010) y Vaudano *et al.* (2019) lo consideran un género menos prevalente.

L. thermotolerans es una especie que tiene una amplia diversidad genotípica y fenotípica (Hranilovic *et al.*, 2017), pero la prevalencia de *K. thermotolerans* puede diferir dependiendo de la fuente de uva, dado que es una de las más frecuentemente aisladas en tres variedades tintas de la Serranía de Ronda en Málaga (España). Clavijo *et al.*, 2010).

Aunque, en nuestro trabajo, *H. uvarum* no pudo aislarse de las uvas muestreadas, numerosos autores han indicado el predominio de esta especie apiculada (*H. uvarum* y su anamorfo, *K. apiculata*) en variedades de uvas y en lugares diferentes (Barata *et al.*, 2012; Brysch-Herzberg y Seidel, 2015; Combina *et al.*, 2005; Raspor *et al.*, 2006; Sabate *et al.*, 2002; Vaudano *et al.*, 2019).

En ninguna de las añadas se pudo aislar *T. delbrueckii* de las muestras de uva, aun cuando ha sido identificada en bayas de uva (Albertin *et al.*, 2014), y señalada como típica representante de la flora en la superficie de la uva (Van Breda *et al.*, 2013).

Numerosos estudios han analizado la presencia de levaduras en la superficie de la uva (Fleet, 2008) y varios autores han informado de que *Saccharomyces cerevisiae* no se pudo detectar (Kántor *et al.*, 2017; Yanagida *et al.*, 1992), en concordancia con nuestro trabajo. No obstante, otros autores sugieren que esta levadura es poco frecuente y señalan que una de cada mil bayas puede ser positiva (Mortimer y Polsinelli, 1999), mientras que Sun *et al.* (2014) indicaron que esta levadura fue detectada en el 8% de las uvas investigadas en China.

Aureobasidium pullulans es una especie bien documentada en las uvas, cuya presencia es independiente de la variedad o práctica vitivinícola (Agarbati *et al.*, 2019). El uso de azufre elemental y cobre (como oxiclورو y sulfato cuprocálcico) ha dado lugar a su adaptación y ha hecho que el hongo sea capaz de desintoxicar el azufre (Killham *et al.*, 1981) y el cobre (Gadd *et al.*, 1988). En esta investigación las colonias de hongos de *A. pullulans* se aislaron, aunque no se identificaron de acuerdo con el apartado de aislamiento y conservación de levaduras (5.1) de este trabajo, debido a su baja presencia en comparación

con *Metschnikowia* spp., *L. thermotolerans* y *H. uvarum*, y a su incapacidad fermentativa, por lo que tiene un interés enológico limitado (Belda *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2020).

2.2. Mosto

En el mosto de uva la presencia de *M. pulcherrima* fue menor en las cuatro añadas, en proporción similar a otras especies presentes, a excepción de *L. thermotolerans* y *S. cerevisiae*. *H. uvarum* fue la única especie presente durante las añadas 2014 y 2017, mientras que *L. thermotolerans* solo se halló en 2014. *Saccharomyces cerevisiae* se observó en el mosto en igual proporción que *M. pulcherrima* en 2015 (Tabla 4 y Figura 8).

De acuerdo con informes previos sobre la presencia de *L. thermotolerans* en el mosto, nuestros resultados son similares a lo señalado por Combina *et al.* (2005), que encontraron esta especie en menor frecuencia en el mosto.

En ninguna de las añadas se identificó *T. delbrueckii* en las muestras de mosto, aun cuando ha sido señalada como típica representante del mismo (Jolly *et al.*, 2006).

En tanto, la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en el mosto en la cosecha de 2015 podría confirmar lo indicado por otros autores (Pretorius, 2000) en cuanto que *S. cerevisiae* se presenta en niveles extremadamente bajos en uvas sanas y sin daños, lo que dificulta su recuperación sin enriquecimiento por fermentación.

2.3. Fermentación espontánea

Para cada añada se muestreó la fermentación espontánea al inicio, a la mitad y al final. Se observaron diferencias entre añadas en las especies encontradas. Si bien *Saccharomyces* parece competir con las especies no-*Saccharomyces* en función del número de aislamientos seleccionados e identificados al azar, se observaron diferencias en la rapidez con la que esto ocurrió (Tabla 4 y Figura 8).

En 2014, las levaduras identificadas al inicio de la fermentación fueron *M. pulcherrima* (40%), *H. uvarum* (40%) y *L. thermotolerans* (20%). *Saccharomyces cerevisiae* no dominó (83%) hasta la mitad de la fermentación, mientras que, en 2015 y 2016, su dominio más rápido alude a que la fermentación espontánea se inició antes del estrujado (en 2015) o poco después (como en 2016). En ambos

casos, *M. pulcherrima* fue la única otra especie identificada. En 2017, la sucesión microbiana fue más compleja, en la cual predominaron las especies distintas de no-*Saccharomyces* durante el inicio y a la mitad de la fermentación, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* solo dominó al final de la fermentación. Este estudio es similar a amplias investigaciones sobre fermentación espontánea realizadas en Italia (Tristezza *et al.*, 2013), España (Padilla *et al.*, 2016; Sabate *et al.*, 1998), EE. UU. (Bougreau *et al.*, 2019) y Canadá (Martiniuk *et al.*, 2016).

Varios autores han descrito el potencial de la *M. pulcherrima* en la vinificación, en particular, en la calidad general del vino cuando se usa en fermentaciones mixtas (Parapouli *et al.*, 2010), en el biocontrol a través de su actividad antimicrobiana contra otros hongos y bacterias (Oro *et al.*, 2014) o en la disminución del contenido de etanol de los vinos (Aplin *et al.*, 2019; Contreras *et al.*, 2015; Varela *et al.*, 2016) además del impacto en los diferentes aspectos de la calidad del vino, tales como el contenido de polifenoles y antocianinos, la intensidad del color, la turbidez o su filtrabilidad (Belda *et al.*, 2016).

Asimismo, dos revisiones recientes han resaltado el potencial enológico de *L. thermotolerans* y su influencia en características relevantes para el vino (Benito, 2018; Morata *et al.*, 2018).

Al inicio de la fermentación, *H. uvarum* estuvo presente en las muestras tomadas en la bodega experimental, lo que corrobora que suele ser una especie predominante al inicio de la fermentación espontánea (Fleet, 2008; Tristezza *et al.*, 2013). Nuestros resultados fueron similares a los de Grangeteau *et al.* (2015), quienes lograron el aislamiento de *Hansenispora* del mosto de uva y el ambiente de la bodega (fuera de la vendimia), pero no en las uvas. También señalaron la posibilidad de que algunas especies no-*Saccharomyces* puedan persistir de un año a otro en el ambiente de la bodega para luego dominar durante la fermentación.

El potencial enológico de *H. uvarum* es apuntado por Mateo *et al.* (1991) y Romano *et al.* (1997), debido a su buena capacidad como productora de ésteres. Además, esta levadura apiculata puede secretar varias enzimas (β -glucosidasa y proteasa) que interactúan con compuestos precursores derivados de la uva, como los terpenos, lo que contribuye a una mejora en la expresión del aroma varietal (Jolly *et al.*, 2006; Zott *et al.*, 2008).

Entre las especies recolectadas en la fermentación espontánea, *T. delbrueckii* se encontró a mitad de la fermentación. De acuerdo con estudios previos, también se halló *T. delbrueckii* en la fermentación espontánea. Albertin *et al.* (2014) y Ciani

et al. (2006) señalaron que puede sobrevivir hasta las últimas etapas de la fermentación y producir bajos niveles de ácido acético.

Diversos estudios se han centrado en el papel de la *T. delbrueckii* por su impacto positivo y distintivo en el aroma general del vino (Belda *et al.*, 2017; Canonico *et al.*, 2015; Loira *et al.*, 2014; Renault *et al.*, 2016). Además, se ha propuesto su uso para la producción de vino espumoso (Canonico *et al.*, 2018; González-Royo *et al.*, 2015; Medina-Trujillo *et al.*, 2017).

Entre las especies recolectadas de las muestras al final de la fermentación espontánea no se encontró *T. delbrueckii* ni tampoco se identificó *H. uvarum*, aunque esta última se halla al final de la fermentación en algunas situaciones (Wang *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2018). Los resultados obtenidos sugieren que *Saccharomyces cerevisiae* se muestra como la especie dominante para completar la fermentación, de acuerdo con Bisson y Walker (2015).

3. Efecto de las condiciones climáticas y del manejo del viñedo en el *terroir* microbiano

3.1. Influencia de las condiciones climáticas

Durante los cuatro años del estudio se recopilaron datos de temperatura y precipitación de la estación meteorológica de Mayorga de Campos (Valladolid), para verificar las variaciones estacionales extremas que pudieran haber afectado la maduración y la calidad de la uva, así como la aparición de enfermedades, parámetros que podrían influir en la dinámica microbiana (Tabla 1).

Revisando los datos recopilados, se comprueba que las temperaturas estacionales fueron similares en las cuatro añadas consecutivas. Durante el periodo activo de la vid de los cuatro años de estudio, la temperatura media fue de 17,2 °C, coincidente con el valor mostrado en 2015. Por su parte, 2014 y 2016 fueron un 2% más frescos, mientras que 2017 fue un 4% más caluroso.

Sin embargo, Las precipitaciones variaron. En 2016 fueron un 29,4% mayores, en tanto que en 2017 fueron un 62,2% menores que la precipitación media del periodo estudiado (413,5 mm). Ambos años fueron considerablemente más secos en la época de cosecha (septiembre) respecto de la media (22,4 mm) con 49,1% en 2016 y 11,7% en 2017. En 2014 y 2015 hubo un 72,3% y un 66,9% más de lluvia, respectivamente.

La presencia de especies de levadura en las uvas depende de las condiciones climáticas (Nisiotu *et al.*, 2007). En nuestro estudio, en las muestras de uva y de mosto se obtuvo un número reducido de aislados, lo que dificultó la comparación entre las poblaciones microbianas individuales por añadas, según los datos meteorológicos.

Entre los factores climáticos que influyen en el desarrollo de microorganismos, la lluvia parece ser el más importante. Está bien documentado que las altas precipitaciones favorecen la proliferación de microorganismos en las uvas, con efectos perjudiciales para la calidad del vino (Jackson y Lombard, 1993). Por otro lado, Longo *et al.* (1991) mostraron que las condiciones de lluvia influyen en la distribución y proporción de especies de levadura oxidativas durante la fermentación espontánea. Asimismo, Čadež *et al.* (2010) hallaron que lluvias abundantes en cosechas muy frías conducen al incremento de las poblaciones de levaduras. Otros autores han sugerido que esta influencia se debe a que favorecen la liberación de nutrientes, lo que aumentaría la disponibilidad para la multiplicación de levaduras (Rousseau y Doneche, 2001; Combina *et al.*, 2005).

Sin embargo, en este trabajo no se pudo establecer una relación entre las diferencias en la precipitación durante los cuatro años considerados, así como tampoco entre la variación de las lluvias, debido al pequeño número de aislados asociados a la variedad Negro Saurí.

3.2. Impacto del manejo fitosanitario en el viñedo experimental

La diversidad y el equilibrio entre las especies de levadura asociada con las uvas depende de múltiples factores, como las prácticas del viñedo Bisson *et al.* (2009). Los estudios han demostrado que los viñedos que emplean sistemas convencionales de manejo integrado de plagas, prácticas orgánicas, biodinámicas y ecofitosanitarias albergan diferentes comunidades de hongos (David *et al.*, 2014; Setati *et al.*, 2015; Kecskeméti *et al.*, 2016).

En nuestro estudio, en muestras de uva y mosto, el número reducido de levaduras y la diversidad de las mismas pudo estar relacionado con el uso de fungicidas orgánicos (azufre, cobre) e inorgánicos (Tabla 2). Esto corrobora los datos publicados sobre la influencia de los regímenes de rociado de fungicidas en la diversidad y número de levaduras (Russo *et al.*, 2019; Agarbati *et al.*, 2019; Kosel *et al.*, 2019; Čadež *et al.*, 2010). Si bien estos fungicidas están dirigidos al control de *Oidium*, también inhiben otros ascomicetos, incluidas las levaduras no-

Saccharomyces del vino, debido a su acción de amplio espectro. Son ejemplos de esta influencia la biosíntesis de ergosterol, afectada por el uso de penconazol y propiconazol (triazoles) o de ciproconazol; la síntesis de ARN, modificada por la influencia de fenilamidas del tipo acilalaninas (metalaxil); las estrobilurinas sintéticas, como la trifloxistrobina, y las arilaminopiridinas (fluazinam) que inhiben la respiración mitocondrial, del mismo modo que otros fungicidas del tipo de las ftalimidias, como Captan y Folpet, que tienen un modo de acción de inhibición múltiple, no específico o puntual (Lewis *et al.*, 2016).

Asimismo, nuestros datos indican que en las muestras de uva hay una clara prevalencia de la especie *M. pulcherrima* y que *Saccharomyces* es poco frecuente. En particular, se ha demostrado que el uso de agentes antifúngicos en viñedos afectan la diversidad de levaduras en las uvas. Por ejemplo, la aplicación de fungicidas promueve un aumento en el tamaño de las poblaciones de *Metschnikowia* (Regueiro *et al.*, 1993) y una disminución en el tamaño de las poblaciones de *Saccharomyces* (Valero *et al.*, 2007).

4. Caracterización genética de *Saccharomyces cerevisiae*

Una vez identificadas las cepas que pertenecían a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, se seleccionaron mediante el análisis de secuencias interdelta para evaluar la diversidad genética y determinar las relaciones clonales. Las cepas individuales fueron identificables mediante la amplificación de las secuencias delta que flanquean los retrotransposones Ty1 dentro del genoma de la levadura descritos por Ness *et al.* (1993). El número y la posición cromosómica dependen de la cepa. Se utilizaron los cebadores $\delta 12$ y $\delta 21$ propuestos por Legras y Karst (2003) con el fin de identificar diferencias polimórficas mayores.

4.1. Estudio de la diversidad de las cepas por añadas

En este trabajo, *Saccharomyces cerevisiae* representó la especie más abundante. Se analizaron 110 cepas autóctonas en distintas etapas de la fermentación espontánea durante cuatro añadas consecutivas (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas autóctonas de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación espontánea por añadas

Fuente	Añada							
	2014		2015		2016		2017	
Mosto	no disponible		0415		no disponible		no disponible	
IF			0615	1115	0916	1016	1617	1817
			1215	1315	1116	1216	2117	2217
			1415					
MF	1514	1614	1515	1615	1316	1416	2417	3217
	1714	1914	1715	1815	1516	1616	3317	3517
	2214		1915		1716		3617	3717
	1814	2014	2015	2115	1816	1916	3817	3917
	2114	2314	2215	2315	2016	2116	4017	4117
	2414	2514	2415	2515	2216	2316	4217	4317
	2614	2714			2416	2516	4417	4517
	2814	2914			2616	2716	4617	4717
	3014	3114			2816	2916	4817	
	3214	3314			3016	3116		
	3414	3514			3216	3316		
	3614	3714			3416	3516		
	3814	3914			3616	3716		
	4014	4214			3816	3916		
	4314				4016	4116		
					4216	4316		
					4416	4516		
					4616	4716		
					4816	4916		
					5016	5116		
					5216			

M: mosto; IF: inicio fermentación; MF: mitad fermentación; FF: final fermentación

4.1.1. Añada 2014

En la primera añada se analizaron 28 cepas. La cepa identificada como 4114 se eliminó del estudio debido a que varias bandas presentaron valores contradictorios (dos valores ausencia y dos valores presencia). Las cepas analizadas se distribuyeron en siete biotipos, aplicando los índices de Davies-Bouldin: 0,650 y de Calinski-Harabasz: 9,983 (Figura 9). El biotipo I representó el mayor porcentaje respecto al total de los aislados (46,3%) con 13 cepas. Concretamente, se subdividió en cuatro grupos de cepas relacionadas genéticamente, destacando dos patrones de secuencia interdelta (3414, 3314, 2914, 2714) y (1614, 1514), aludiendo al aislamiento clonal de dos cepas. Las cepas 1914 y 2114 fueron genéticamente únicas dentro del mismo. El biotipo II (17,9%), con cinco cepas, se subdividió en dos subgrupos (3114-1714), casi idénticos, y (3514-4214), con cierta similitud; todos estaban separados de la cepa

2014. Los biotipos III, IV y VII (3,6%), con el menor porcentaje de participación, formaron cepas individuales (3814, 2214, 2314). El biotipo V representó el 7,2%, con dos cepas casi idénticas (3014, 2814). El biotipo VI (17,9%), con cinco cepas, estaba representado por dos conjuntos de cepas similares: (4314, 3914), por un lado, y (2414, 2614), así como la cepa individual 3614. El biotipo VI parece haber divergido de los biotipos V y IV (Figura 9 (B)).

El posicionamiento de los grupos en el primer plano factorial del Análisis de Correspondencias Múltiple (MCA) permite identificar esta añada como la de mayor variabilidad, dado que el primer plano factorial retuvo menos información que en el resto de las añadas y se requiere retener más factores para hacer la clasificación (Figura 9 (A)). Concretamente, se observó que la principal característica del biotipo I fue la presencia de la banda 450 en todas las cepas, así como la mayor presencia de las bandas 1200 y 800 dentro de la añada. El biotipo II destacó por la ausencia de la banda 450. La diversidad de esta añada también se refleja en los cuatro biotipos de una sola cepa: biotipo III (presencia de la banda 200), biotipo IV (presencia de la banda 550), biotipo V (presencia de la banda 180, que es propia de esta añada) y biotipo VII (presencia de la banda 300). En el biotipo VI, se agrupan las cepas con ausencias de las bandas 1400 y 800 (Figura 9 (C)).

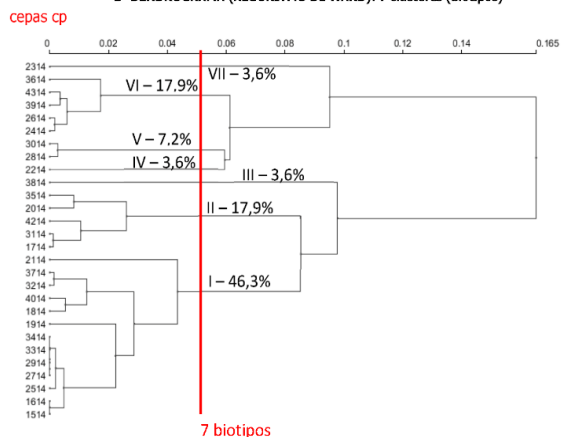
A- FACTORES RETENIDOS EN MCA PARA REALIZAR DENDROGRAMA

Factor	Valor propio	% de varianza replicada	Acumulada % de varianza explicada	Tasas modificadas de Senozzi (%)	Criterio de Kaiser (retenidos)
1	0,198	19,8	19,8	58,8	X
2	0,146	14,6	34,5	23,7	X
3	0,118	11,8	46,3	11,2	X
4	0,093	9,3	55,6	4,0	X
5	0,082	8,2	63,8	2,0	X
6	0,064	6,4	70,2	0,2	X
7	0,060	6,0	76,2	0,1	X

C- BANDAS SIGNIFICATIVAS: CARACTERIZACIÓN DE LOS GRUPOS

Biotipo (recuento)	Valor test: p<0,05			
	Etiqueta de Banda	Categoría	Categoría en Biotipo	% Categoría en Añada
I (13)	450	1	100	57,1
	1200	1	92,3	53,6
	800	1	92,3	67,9
	750	1	46,2	25,0
II (5)	500	1	60	10,7
	450	0	100	42,9
III (1)	200	1	100	Una cepa 3,6
IV (1)	550	1	100	Una cepa 3,6
V (2)	180	1	100	7,2
VI (5)	1400	0	100	17,9
	800	0	100	32,1
VII (1)	300	1	100	Una cepa 3,6

B- DENDROGRAMA (ALGORITMO DE WARD): 7 clústeres (biotipos)



Criterio -2014 AÑADA	5 clústeres	7clústeres
Inercia intra-cluster	0,319	0,198
Inercia inter-cluster	0,444	0,564
Inercia explicada (%)	58,210	74,042
Índice de Calinski-Harabasz	8,009	9,983
Índice de Davies-Bouldin's	0,855	0,650

Figura 9. Los factores retenidos del MCA (A). Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 28 cepas de Saccharomyces cerevisiae de la añada 2014. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,650 y Calinski-Harabasz: 9,983. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos.

4.1.2. Añada 2015

En esta añada, las 17 cepas se distribuyeron en siete biotipos, aplicando los índices de Davies-Bouldin: 0,407 y de Calinski-Harabasz: 13,674 (Figura 10). El biotipo I representó el mayor porcentaje respecto al total de los aislados (52,9%), con nueve cepas. Se subdividió en tres subgrupos: dos de secuencias idénticas (1915, 2015) y (1315, 1215, 615, 415), aludiendo a aislados clonales de dos cepas, y la cepa 1115, genéticamente distinta del resto. Los biotipos II y III representaron un 11,8% del total, con dos cepas relacionadas (2415, 2315) y (1615, 1515), respectivamente. Los biotipos restantes (5,9% del total) presentaban cepas únicas genéticamente distintas: IV (1815), V (1715), VI (2115) y VII (1415) (Figura 10 (B)).

En esta añada distinguimos como particularidad que una sola cepa, representada por los aislados clonales 1915 y 2015, procedía de la mitad y del final de la fermentación, respectivamente. Asimismo, en el mosto (2015) y al inicio (1915) se encontraron dos aislamientos clonales de otra cepa; mientras que (1115, 2215), nuevamente diferentes, se aislaron al inicio y al final de la fermentación, respectivamente, lo cual podría indicar una sucesión dinámica de cepas autóctonas durante la fermentación (Tabla 5).

El biotipo I se definió como «biotipo medio de cosecha», ya que el porcentaje de presencia o ausencia de las bandas analizadas es similar al comportamiento que define la añada. El biotipo II se identificó por presencia de la banda 1300, típica de esta añada, y el biotipo III, con la banda 100. El resto de los biotipos estaban formados por una única cepa: biotipo IV (presencia de la banda 300); biotipo V (con la banda 50); biotipo VI (presencia de la banda 400). El biotipo VII (1415) estaba formado por la única cepa con ausencia de las bandas 1400 y 450 (Figura 10 (C)).

4.1.3. Añada 2016

En la tercera añada, con 44 cepas, se identificaron siete biotipos, aplicando los índices de Davies-Bouldin: 0,637 y de Calinski-Harabasz: 17,389 (Figura 11). En el biotipo I, el más numeroso (63,6%), con 28 cepas, se identificaron seis patrones de secuencia interdelta: (5016, 3716, 3016, 2816, 2716), (3916, 3816), (4916, 4816, 4616), (5216, 2216), (4316, 4216, 4016, 3616, 3416) y (0916, 1016, 2116). El biotipo III (2,3%) se representó por otra secuencia interdelta con dos cepas idénticas (1716, 1816), y el biotipo V (11,4%), por cinco cepas, dos de las cuales son patrones interdelta (2316, 1916). Las cepas individuales formaron el biotipo II (4116) y el biotipo IV (3516) (Figura 11 (B)).

Resultados y Discusión

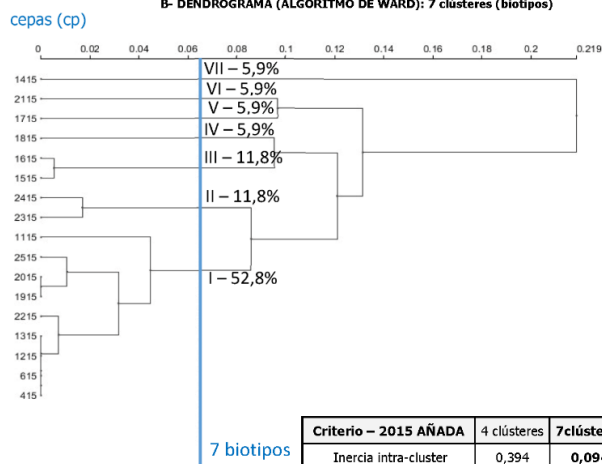
A- FACTORES RETENIDOS EN MCA PARA REALIZAR DENDROGRAMA

Factor	Valor propio	% de varianza explicada	Acumulada % de varianza explicada	Tasas modificadas de Benzecri (%)	Criterio de Kaiser (retenidos)
1	0,246	24,6	24,6	69,2	X
2	0,170	17,0	41,6	17,9	X
3	0,156	15,6	57,2	12,2	X
4	0,105	10,5	67,6	0,6	X
5	0,098	9,8	77,4	0,1	X
6	0,091	9,1	86,5	0,0	X

C- BANDAS SIGNIFICATIVAS: CARACTERIZACIÓN DE LOS GRUPOS

Valor test: p<0,05				
Biotipo (recuento)	Etiqueta de Banda	Categoría	% Categoría en Biotipo	% Categoría en AÑADA
I (9)	Bandas o categorías no significativas		Biotipo medio de la añada	
II (2)	1300	1	100,0	11,8
III (2)	100	1	100,0	11,8
IV (1)	300	1	100	Una cepa 5,9
V (1)	50	1	100	Una cepa 5,9
VI (1)	400	1	100	Una cepa 5,9
VII (1)	1400	0	100	Una cepa 5,9
	450	0	100	

B- DENDROGRAMA (ALGORITMO DE WARD): 7 clústeres (biotipos)



Criterio – 2015 AÑADA	4 clústeres	7clústeres
Inercia intra-cluster	0,394	0,094
Inercia inter-cluster	0,471	0,771
Inercia explicada (%)	54,427	89,136
Índice de Calinski-Harabasz	5,175	13,674
Índice de Davies-Bouldin's	1,045	0,407

Figura 10. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 17 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la añada 2015. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,407 y Calinski-Harabasz: 13,674. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos

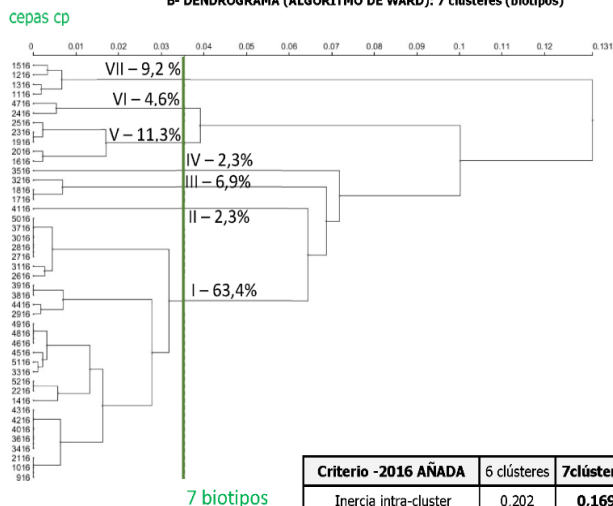
El análisis numérico de las bandas (Figura 11 (C)) mostró que la principal característica del biotipo I fue la ausencia de la banda 550 y la presencia de la banda 500 en 27 de las 28 cepas analizadas. El biotipo II representó la única cepa de la añada con presencia de la banda 1000 y ausencia de la banda 1400, mientras que el biotipo IV se identificó con la única cepa en términos de reversión en la presencia / ausencia de esas mismas bandas. El biotipo II se diferenció del biotipo IV, en términos de reversión, en presencia / ausencia de las bandas 1000 y 1400. El resto de biotipos identificó cepas con características peculiares de esta añada: biotipo III (con presencia de la banda 250); el biotipo V formado por cinco cepas (con presencia de la banda 1200 y ausencia de la banda 750); el biotipo VI, representado por dos cepas específicas de la añada (que tenían la banda 200); y el biotipo VII, cuyas cepas se distinguieron por la ausencia de la banda 450 y la presencia de las bandas 100 y 500 (esta última es específica de la añada).

Resultados y Discusión

A- FACTORES RETENIDOS EN MCA PARA REALIZAR DENDROGRAMA

Factor	Valor propio	% de varianza explicada	Acumulada % de varianza explicada	Tasas modificadas de Benzecri	Criterio de Kaiser (retenidos)
1	0,174	17,4	17,4	57,9	X
2	0,144	14,4	31,8	26,3	X
3	0,119	11,9	43,7	8,9	X
4	0,112	11,2	54,8	5,8	X
5	0,096	9,6	64,4	1,1	X

B- DENDROGRAMA (ALGORITMO DE WARD): 7 clústeres (biotipos)



C- BANDAS SIGNIFICATIVAS: CARACTERIZACIÓN DE LOS GRUPOS

Biotipo (recuento)	Valor test: p<0,05			
	Etiqueta de Banda	Categoría	% Categoría en Biotipo	% Categoría En AÑADA
I (28)	500	1	92,9	77,3
	550	0	100,0	90,9
II (1)	1000	1	100,0	Una cepa
	1400	0	100,0	2,2
III (3)	250	1	100,0	6,8
	1000	0	100,0	Una cepa
IV (1)	1400	1	100,0	2,2
	750	0	100,0	27,3
V (5)	1200	1	100,0	29,5
	200	1	100,0	4,4
VII (4)	550	1	100,0	9,1
	450	0	100,0	34,1
	100	1	100,0	36,4

Criterio -2016 AÑADA	6 clústeres	7clústeres
Inercia intra-cluster	0,202	0,169
Inercia inter-cluster	0,442	0,476
Inercia explicada (%)	68,617	73,821
Índice de Calinski-Harabasz	16,617	17,389
Índice de Davies-Bouldin's	0,707	0,637

Figura 11. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre las 44 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la añada 2016. Se identificaron siete biotipos genéticos (I a VII). Índice de Davies-Bouldin: 0,637 y Calinski-Harabasz: 17,389. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos

4.1.4. Añada 2017

En la última añada, 21 cepas se distribuyeron en siete biotipos, aplicando los índices de Davies-Bouldin: 0,749 y de Calinski-Harabasz: 7,514 (Figura 12). En el biotipo I (33%), con siete cepas, se identificaron dos patrones de secuencia interdelta (4117, 3817, 3717) y (3317, 2417). En el biotipo II (9,5%), formado por dos cepas (4017, 3617); en el biotipo III (19%), con cuatro cepas, se identificó un patrón de secuencia interdelta (4717, 4617). En el biotipo IV (9,5%) se agruparon dos cepas. (4517, 3917). En el biotipo V (19%), cuatro cepas (4317, 2217, 1817) y la cepa (3217), diferente de las demás. Por último, los biotipos VI y VII (4,8%) se formaron por cepas individuales (4217, 4817). (Figura 12 (B)).

El ambiente de fermentación del vino es extremadamente duro y dinámico, con diferentes tipos de estrés (azúcar, deficiencia de nutrientes, acidez, etanol) impuestos a las levaduras. El hallazgo de cepas como la 1617 (biotipo I) solo se encontró al principio de la fermentación, mientras que otras, como la 3517 (biotipo I) y la 3617 (biotipo II), estaban en la mitad de la fermentación. Esto alude a una

sucesión en la que las cepas menos tolerantes son superadas por las más aptas. Una cepa (formada por los clonales 3717, 3817, 4117) se aisló durante la mitad de la fermentación, lo que sugiere que era tolerante y no competía con otras (Tabla 5).

El análisis de las bandas se recoge en la (Figura 12 (C)). El biotipo I, el más numeroso, se identificó como «biotipo medio», dado que no presentaba bandas con diferencias estadísticamente significativas. El resto de biotipos identificaron cepas con características especiales en esta añada: el biotipo II reunió las únicas cepas del año con presencia de la banda 400; el biotipo III identificó las cepas con ausencia de la banda 800 (también de todas las cepas analizadas), y el biotipo V, las cepas con presencia de la banda 450. El biotipo IV está formado por la única cepa con presencia de la banda 1300 en el año. Finalmente, se definen el biotipo VI (con presencia de la banda 300) y el biotipo VII (con presencia de la banda 550).

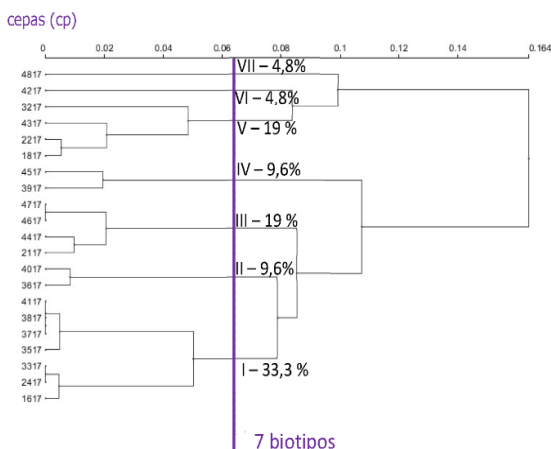
A- FACTORES RETENIDOS EN MCA PARA REALIZAR DENDOGRAMA

Factor	Valor propio	% de varianza explicada	Acumulada % de varianza explicada	Tasas modificadas de Benzecri	Criterio de Kaiser (retenidos)
1	0,216	21,6	21,6	56,8	X
2	0,178	17,8	39,5	30,0	X
3	0,125	12,5	52,0	6,8	X
4	0,122	12,2	64,2	5,9	X
5	0,091	9,1	73,3	0,6	X
6	0,079	7,9	81,1	0,0	X

C- BANDAS SIGNIFICATIVAS: CARACTERIZACIÓN DE LOS GRUPOS

Biotipo (recuento)	Etiqueta de Banda	Valor test: p<0,05		
		Categoría	% Categoría en Biotipo	% Categoría en AÑADA
I (7)	Bandas o categorías no significativas		Biotipo medio de la añada	
II (2)	400	1	100,0	9,6
III (4)	800	0	100,0	19,0
IV (2)	1300	1	100,0	9,5
V (4)	450	1	100,0	26,6
VI (1)	300	1	100	Una cepa 4,8
VII (1)	550	1	100	Una cepa 4,8

B- DENDROGRAMA (ALGORITMO DE WARD): 7 clústeres (biotipos)



Criterio -2017 AÑADA	4 clústeres	7clústeres
Inercia intra-cluster	0,441	0,192
Inercia inter-cluster	0,371	0,619
Inercia explicada (%)	45,697	76,306
Índice de Calinski-Harabasz	4,769	7,514
Índice de Davies-Bouldin's	1,066	0,749

Figura 12. Los factores retenidos del MCA (A) Dendrograma de Ward (B) de la relación genética entre 21 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de la añada 2017. Índice de Davies-Bouldin: 0,749 y Calinski-Harabasz: 7,514. Las bandas significativas (C) permiten la caracterización de los biotipos

Varios autores han estudiado las poblaciones de levadura durante varias añadas consecutivas. Torrija *et al.* (2001) indicaron que las poblaciones de levadura eran diferentes cada año, aunque se encontraron algunas cepas de *Saccharomyces* en tres años consecutivos en la misma bodega. En nuestro trabajo, la población de levaduras encontrada fue diversa y transitoria. La añada

2014 fue la de mayor variabilidad. La añada 2015 mostró homogeneidad, mientras que la añada 2016 evidenció la menor variabilidad genética, a pesar de tener mayor cantidad de aislados muestreados. La añada 2017 se caracterizó por la heterogeneidad observada dentro de la población autóctona de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta alta diversidad de la población microbiana encontrada en nuestro estudio también fue informada por Vigentini *et al.* (2015) en el estudio de las poblaciones de levaduras, durante tres años consecutivos, en dos territorios lombardos diferentes, en el que se indicó que el efecto vendimia superaba al efecto de la zona geográfica de aislamiento. Sin embargo, Cordero-Bueso *et al.* (2011c) señalaron que las poblaciones de levadura son estables en un ambiente vitivinícola a lo largo del tiempo.

5. Análisis global entre las diferentes añadas estudiadas

En esta investigación se evaluó la relación genética entre las cepas aisladas durante cuatro añadas consecutivas (28 de 2014; 17 de 2015; 44 de 2016 y 21 de 2017) mediante la construcción de un dendrograma global compilado. Para las pruebas comparativas se utilizó como control la levadura enológica seleccionada (Evo Cross® (CROSS)) de origen Lallemend, empleada como levadura comercial en la zona de trabajo.

Las 110 cepas autóctonas y la cepa control (CROSS) se distribuyeron en siete biotipos. Se obtuvieron después de aplicar un análisis de correspondencias múltiple (MCA). Seguidamente, se aplicó el método de Ward a los factores retenidos (Figura 13 (A)). Se tomaron como referencia los índices de Davies-Bouldin: 1,052 y de Calinski-Harabasz: 18,717 (Figura 13 (B)).

En cuanto a la distribución de los biotipos, el biotipo I identificó un 12,7% del total de los aislados (Figura 13 (C) y Figura 14). De las 14 cepas, 13 fueron diferentes, destacando un solo patrón de secuencia interdelta (3317, 2417) que procedía de la mitad de la fermentación (Tabla 5). La distribución temporal de todas las cepas de este biotipo indicó un «flujo» de cepas individuales durante el curso de la fermentación. Por ejemplo, durante la añada 2014, se encontraron cuatro cepas pertenecientes al biotipo I en FF (2414, 2614, 3614, 4314), mientras que 1415 estaba en IF en 2015 y 4116 en FF (añada 2016). En la añada 2017, cuatro cepas (1617, 1817, 2117, 2217) se hallaron al inicio de la fermentación, mientras que tres se encontraron en la mitad de la fermentación (2417, 3217, 3317) (Tabla 5). Estos hallazgos sugieren que ni siquiera las cepas de este biotipo

Resultados y Discusión

se identifican con la cepa de referencia. La cepa control CROSS formó parte del biotipo I y mostró mayor similitud con la cepa 3614 (Figura 13 (C) y Figura 14).

TABLA A: VALORES PROPIOS Y FACTORES RETENIDOS para Análisis Clúster
9 factores - 64,5 %

Factor	Valor propio	% de varianza explicada	Acumulada % de varianza explicada	Tasas modificadas de Benzecri	Criterio de Kaiser (retenidos)
1	0,110	11,0	11,0	40,5	X
2	0,106	10,6	21,5	35,4	X
3	0,076	7,6	29,1	9,0	X
4	0,071	7,1	36,2	6,3	X
5	0,068	6,8	43,0	4,8	X
6	0,061	6,1	49,1	2,5	X
7	0,056	5,6	54,7	1,0	X
8	0,053	5,3	59,9	0,5	X
9	0,046	4,6	64,5	0,0	X

TABLA B: SELECCIÓN DE CLÚSTERES
Índice Calinski-Harabasz (mayor valor);
Índice Davies-Bouldin's (menor valor)

Criterio	5 clústeres	6 clústeres	7 clústeres
Inercia Intra-cluster	0,392	0,350	0,309
Inercia inter-cluster inercia	0,254	0,295	0,337
Inercia explicada (%)	39,302	45,751	52,160
Índice Calinski-Harabasz (pseudo F)	16,997	17,542	18,717
Índice Davies-Bouldin's	1,385	1,203	1,052

TABLA C: 7 BIOTIPOS (CEPAS Y DISTANCIAS)

I		III		III continuación		Código en dendrograma	IV		VI		Código en dendrograma	VI continuación	
Cepa	Distancia	Cepa	Distancia	Cepa	Distancia		Cepa	Distancia	Cepa	Distancia		Cepa	Distancia
1415	0,277	3416	0,234	1416	0,392		4317	0,774	4516	0,148		3214	0,513
4116	0,299	3616	0,234	1714	0,392		4417	0,574	1915	0,148		1515	0,519
2117	0,34	4016	0,234	2315	0,410	C_109	4517	0,778	2015	0,148		2416	0,595
4314	0,392	4216	0,234	2014	0,410		4817	0,702	1514	0,148		1115	0,595
2217	0,465	4316	0,234	3917	0,414		1116	0,537	1614	0,148		4716	0,607
3914	0,5	916	0,263	5116	0,429		1216	0,511	1916	0,241		1814	0,765
1817	0,617	1016	0,263	3116	0,432		1316	0,653	2316	0,241		4214	0,782
1617	0,623	2116	0,263	3816	0,458		1516	0,587	415	0,241		4014	1,031
2417	0,687	3717	0,280	3916	0,458	C_100	2214	0,472	615	0,241			
3317	0,687	3817	0,280	2415	0,458				1215	0,241			
2414	0,712	4117	0,280	4617	0,494				1315	0,241			
3217	0,75	2716	0,280	4717	0,494				2714	0,241			
2614	0,813	2816	0,280	2016	0,522				2914	0,241			
3614	1,145	3016	0,280	3617	0,553				3314	0,241			
CROSS	1,373	3716	0,280	4017	0,575				3414	0,241			
		5016	0,280	2115	0,577				2215	0,288			
		2515	0,289	1616	0,633				2516	0,299			
		2216	0,292	3216	0,993				3316	0,310			
		5216	0,292	1716	0,998				4616	0,333			
		3114	0,319	1816	0,998				4816	0,333	C_106		
		2916	0,340	2114	1,055				4916	0,333			
		2616	0,353	1715	1,635				2514	0,454			
		3517	0,353	3516	1,863				1615	0,478			
		4416	0,368						3714	0,478	C_108		

VII
Cepa
3814

Figura 13. Los factores retenidos del MCA global (A), selección de clústeres (B) biotipos con cepas y distancias (C)

El biotipo II, con un 1,8% del total de los aislados, estaba formado por dos cepas idénticas (2814, 3014), localizadas al final de la fermentación (Tabla 5) y constituyó el biotipo V descrito en la añada de 2014.

El biotipo III (42,7%) es el más numeroso del total de los aislados, con 47 cepas. Se identificaron 10 aislamientos clonales (Figura 13 (C) y Tabla 5), cuatro de ellos, formados exclusivamente por cepas de la añada 2016 y uno exclusivo de la añada 2017, y el resto de los aislados clonales estaban formados por cepas de diferentes añadas, que se describen a continuación.

En cuanto a los cuatro aislados clonales correspondientes a 2016, disponemos del primer patrón de secuencia interdelta, compuesto por tres cepas de diferentes etapas de la fermentación (IF: 0916, 1016; FF: 2116). El segundo y tercer patrón de secuencia interdelta están formados por cepas del final de la fermentación (FF: 3416, 3616, 4016, 4216, 4316) y (FF: 2216, 5216). El último patrón exclusivo de esta añada mezcló dos cepas de diferentes etapas de la fermentación (MF: 1716; FF: 1816). El único aislado interdelta de la añada del 2017 agrupó dos cepas del final de la fermentación (4617, 4717).

Los otros cinco restantes aislados clonales identificaron cepas de diferentes añadas y distintas etapas de fermentación: el más numeroso agrupó ocho cepas que se encontraron mayoritariamente al final de la fermentación (FF: 3817, 4117, 2716, 2816, 3016, 3716, 5016), excepto en la mitad de la fermentación de la cepa (MF: 3717). El aislado clonal de tres cepas del final de la fermentación lo constituyeron las cepas (FF: 2415, 3616, 3916). Los otros tres aislados clonales con dos cepas lo formaron el aislado que indica flujo en la fermentación y sucesión dinámica de cepas autóctonas (MF: 3517; FF: 2616) y los dos que solo se corresponden con una etapa de fermentación (MF: 1416, 1714FF: 2014, 2315).

El biotipo IV (8,2% del total) incluyó nueve cepas genéticamente similares, pero de diferentes añadas y de distintas etapas de la fermentación: añada 2014 (MF: 2214), añada 2016 (IF: 1116, 1216; MF: 1316, 1516) y añada 2017 (FF: 4317, 4417, 4517, 4817) (Figura 13 (C) y Tabla 5). Cabe señalar que en este biotipo no apareció ninguna cepa de la añada 2015.

El biotipo V (4,6% del total) se formó con cinco cepas de diferentes añadas y de diferentes etapas de la fermentación (MF: 1914, 1815; FF: 2314, 3514, 4217), pero ninguna de la añada 2016 (Figura 13 (C) y Tabla 5).

El biotipo VI (29,1% del total) es el segundo más numeroso, con 32 cepas. Se identificaron cinco patrones de secuencia interdelta, uno de ellos formado exclusivamente por cepas de la añada 2016, y los otros cuatro, formados por cepas de diferentes añadas (Figura 13 (C) y Tabla 5). En particular, la añada 2016 también agrupó cepas de la misma etapa de la fermentación (FF: 4616, 4816, 4916). Curiosamente, el patrón de secuencia interdelta más numeroso de todo el

estudio se identificó en este biotipo: 10 cepas de diferentes añadas y de distintas etapas de la fermentación y una cepa exclusiva del mosto (M: 0415; IF: 0615, 1215, 1315; FF: 1916, 2316, 2714, 2914, 3314, 3414); otro de los patrones estaba formado por cinco cepas de diferentes etapas (MF: 1915, 1514, 1614; FF: 4516, 2015); el resto de los patrones, con dos cepas (MF: 1615; FF: 3714) e (IF: 115; FF: 2416).

El biotipo VII (0,9%) representó el menor porcentaje respecto al total constituido por la única cepa que formaba el biotipo III en la descripción de la añada 2014 (FF: 3814). (Figura 13 (C) y Tabla 5).

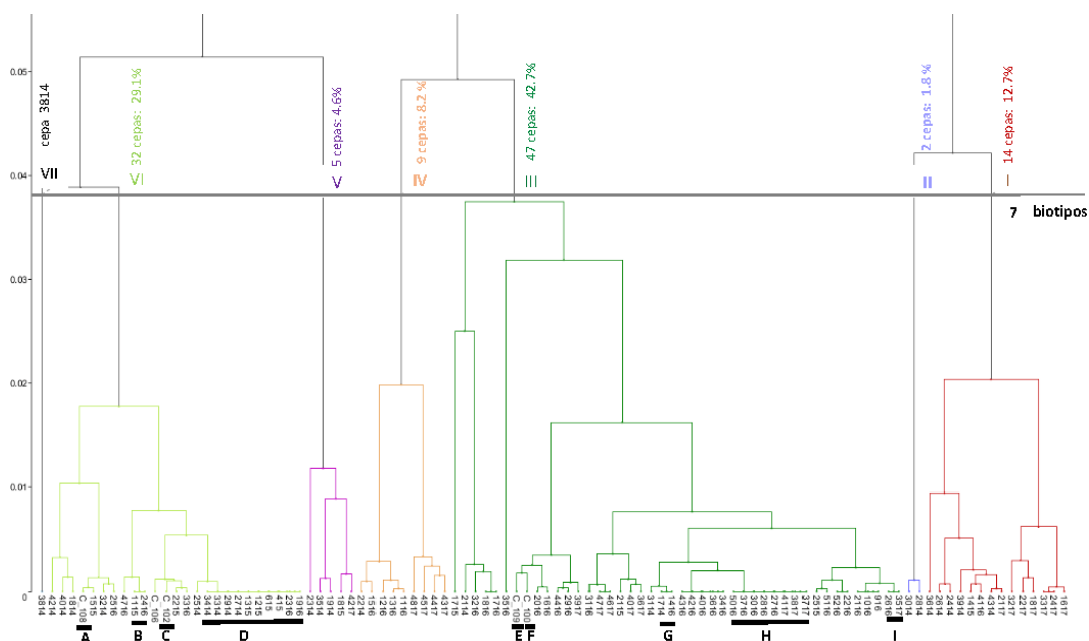


Figura 14. Dendrograma de Ward global que muestra la relación genética de los 110 aislados de *Saccharomyces cerevisiae* y la cepa control (Evo Cross®(CROSS)). Se identificaron siete biotipos (I y VII) basados en los índices de Calinski-Harabasz más alto: 18,717, y el valor del índice de Davies-Bouldin más pequeño: 1,052

En términos de cultivos iniciadores útiles, de todos los aislados clonales descritos se identificaron un total de nueve cepas tolerantes al etanol (A a I) que se repiten en dos o más añadas: siete se encontraron en dos añadas (A, B, E, F, G, H, I) y solo dos (C, D) persistieron durante tres años consecutivos (Figura 14); no se detectó que ninguna de las cepas persistiera durante los cuatro años consecutivos.

Teniendo en cuenta solo las cepas no repetidas, se identificaron 70 cepas distintas en las cuatro añadas: las 12 cepas que estuvieron presentes en una o

más añadas y las 82 cepas diferentes en cada añada (24 cepas de 2014, 13 cepas de 2015, 28 cepas de 2016 y 17 cepas de 2017). Por consiguiente, 61 cepas son las consideradas de cosecha única, mientras que las nueve restantes son las persistentes entre añadas, lo que sugiere que son parte de la microbiota residente en la bodega experimental que se encontraba a 17 km de la bodega vecina más cercana y a 3 km del viñedo experimental. Clavijo *et al.* (2010) destacan hallazgos similares, aunque identificaron cepas comerciales en las fermentaciones de laboratorio y concluyeron que las cepas se transfirieron de la bodega a viñedos cercanos a través de la transmisión de insectos, la propagación de lías de levadura en el viñedo y la escorrentía de las operaciones rutinarias de la bodega. Las levaduras persistieron en una sola añada, lo que es contrario a nuestras cepas «implantadas en bodega». Si bien es posible la transferencia de insectos desde la bodega o entre parcelas vecinas, es probable que las cepas sean autóctonas, dado que las cepas comerciales no se utilizaron para la vinificación experimental. Todavía existe cierto debate sobre si la variedad de uva o la ubicación pueden influir en la población indígena de *Saccharomyces*. Clavijo *et al.* (2010) identificaron poblaciones separadas en tres variedades de uva (Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon), mientras que la investigación de Capece *et al.* (2016), que examinaron 11 variedades cultivadas en un solo viñedo, aludió a cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae* nativas asociadas con un *terroir* particular. Sin embargo, Santamaría *et al.* (2019), en un estudio reciente en once bodegas en la región de La Rioja, mostraron que las cepas variaban con la vendimia y ninguna era común a las bodegas vecinas o la zona. También, en un estudio que utilizó secuenciación delta PCR, Sun *et al.* (2017) concluyeron que no solo las poblaciones de *Saccharomyces* difieren entre las variedades de uva, sino también entre las uvas de vino y de mesa, así como la ubicación geográfica tanto en un nivel local (región) como a escala global (país).

6. Actividad enzimática de relevancia enológica

En este estudio se determinó la actividad enzimática de las cepas de levaduras no-*Saccharomyces* *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspota delbrueckii* aisladas durante las añadas 2014-2017. Las actividades proteasa, lipasa, β -glucosidasa, esterasa y celulasa fueron evaluadas por su implicación en varios procesos tecnológicos en la vinificación.

6.1. Proteasa y β -glucosidasa

La percepción visual de los vinos se ve afectada por los problemas causados por inestabilidad o quiebra proteica. En la actualidad, esto se solventa decantando con bentonita. El uso de enzimas proteasas para la degradación por hidrólisis de estas proteínas se perfila como una alternativa al uso de la bentonita para la clarificación, opción que tendría menor incidencia sobre la calidad sensorial final de los vinos (Belda *et al.*, 2015).

Otra de las características organolépticas definitorias de la calidad de los vinos es el aroma. Los *terpenos* son un tipo de compuesto varietal que contribuye a mejorar el aroma del vino. La mayoría están unidos a moléculas de azúcar con las que forman unos compuestos inodoros. Durante el proceso de fermentación la acción de la enzima β -glucosidasa los descompone y se separa el terpeno del azúcar (Maicas y Mateo, 2015); es así, en su forma libre, como los terpenos coadyuvan al enriquecimiento aromático del vino.

La actividad proteasa fue, junto a la actividad β -glucosidasa, la más abundante en la población de levaduras estudiadas (Figura 15). Belda *et al.* (2016) informaron sobre hallazgos similares en estudios previos.

La actividad proteolítica y β -glucosidasa se observó alrededor del 80% de las cepas de *M. pulcherrima* (Figura 15). De acuerdo con nuestro trabajo, Binati *et al.* (2019) hallaron resultados positivos en estas actividades enzimáticas en *Metschnikowia* ssp. Sin embargo, Barbosa *et al.* (2018) destacan la ausencia de actividad proteolítica en esta especie. Mendes Ferreira *et al.* (2001) señalaron que, debido a la alta actividad β -glucosidasa de la especie *M. pulcherrima*, se convierte en una candidata potencial para ser usada en la ruptura de compuestos terpénicos, para la liberación de estos aromas.

Con respecto a *H. uvarum* se encontró actividad proteolítica en el 80% de las cepas y nula actividad β -glucosidasa (Figura 15). Belda *et al.* (2016) señalaron la actividad proteolítica como una actividad muy extendida cuando se considera la población total de levaduras, en concordancia con nuestros resultados. Cabe señalar que la capacidad de algunas cepas de *H. uvarum* para producir enzimas β -glucosidasas se encontró en otros estudios enzimáticos. Albertin *et al.* (2016) hallaron crecimiento en las placas de arbutina, aunque no se pudo observar el halo distintivo, pero Rosi *et al.* (1994) dieron a conocer una disminución notable de la actividad β -glucosidasa a valores de pH por debajo de 4 en la mayoría de especies de levaduras no-*Saccharomyces* examinadas.

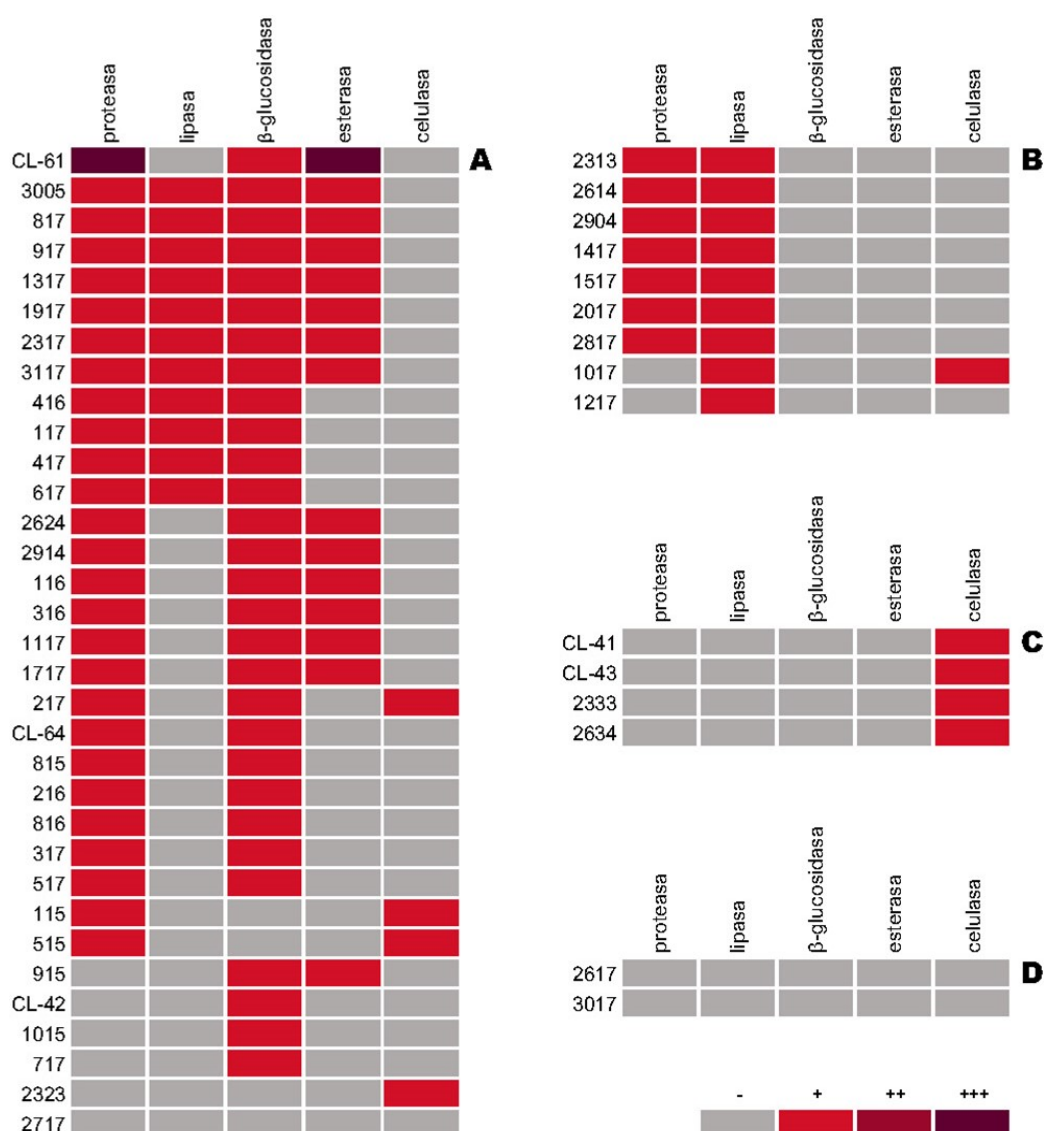


Figura 15. Mapa de calor de la actividad enzimática: *Metschnikowia pulcherrima* (A), *Hanseniaspora uvarum* (B), *Lachancea thermotolerans* (C) y *Torulasporea delbrueckii* (D)

Las cepas de las especies *L. thermotolerans* y *T. delbrueckii* no mostraron actividad proteolítica ni actividad β -glucosidasa, coincidiendo con los resultados obtenidos por Belda *et al.* (2016).

6.2. Lipasa y esterasa

Gracias a la acción de las lipasas, los ácidos grasos libres procedentes de la uva o los microorganismos pueden ser degradados. Asimismo, las esterasas catalizan la síntesis de ésteres que contribuyen al aroma secundario de los vinos (Escribano *et al.*, 2017).

La actividad lipasa se halló en el 100% de las cepas de *H. uvarum* y en el 33% de las cepas de *M. pulcherrima*; las dos especies restantes no mostraron esta actividad (Figura 15). Lin *et al.* (2020), en un estudio que utilizó el mismo método para la detección de esta actividad, encontraron resultados positivos en todos los aislados analizados, en discrepancia con nuestro trabajo.

La actividad esterasa se observó en el 45% de las cepas de *M. pulcherrima* (Figura 15). Escribano *et al.* (2017) encontraron actividad en el 100% de los aislados, a diferencia de nuestros resultados. Sin embargo, Binati *et al.* (2019) comunicaron que, en el conjunto de las actividades enzimáticas estudiadas, la esterasa, en *Metschnikowia* spp., es la característica más discriminante de estas levaduras, en concordancia con los resultados de nuestra investigación, en la que la actividad de la esterasa fue nula en el resto de las especies.

6.3. Celulasa

Los terpenoles glucosídicamente ligados se encuentran principalmente en los hollejos de las uvas. Así, la degradación enzimática de la pared celular causada por las carbohidrolasas (pectinasa, celulasa, xilanasas y glucanasas) contribuye a la liberación de esos precursores de las bayas al mosto. Se ha propuesto que la degradación de la pared celular de la uva permite que muchos compuestos aromáticos o potenciales aromáticos formen parte del mosto, dando como resultado un mejor perfil aromático (Pérez-González *et al.*, 1993).

L. thermotolerans mostró actividad celulasa en el 100% de las cepas estudiadas (Figura 15). Escribano *et al.* (2017) describieron esta especie no-*Saccharomyces* en la que estaban presentes las cuatro actividades carbohidrolasas (pectinasa, celulasa, xilanasas y glucanasas), señalando la actividad celulasa en la mayoría de las cepas analizadas, de acuerdo con nuestro trabajo.

La actividad celulasa se halló en un menor grado en las especies *M. pulcherrima* (12%) y *H. uvarum* (11%) (Figura 15). Strauss *et al.* (2001) y Merín *et al.* (2015) obtuvieron resultados similares que describen la presencia de actividad celulasa en algunas levaduras Ascomycota (*M. pulcherrima* y *H. uvarum*).

Por último, la especie *Torulaspota delbrueckii* presentó resultados negativos para todas las actividades enzimáticas analizadas (Figura 15). Ganga y Martínez (2004) señalaron que la secreción de cada enzima no es característica de un determinado género o especie, pero depende de la cepa de levadura analizada, o también pudiera explicarse por la pequeña representación de esta especie dentro del número total de cepas de levaduras estudiadas.

7. Análisis químico

La Tabla 6 recoge los parámetros enológicos primarios de las muestras de la uva y del vino de investigación durante las añadas 2014-2017.

En la uva, se observaron valores de Brix y pH adecuados, excepto en la añada 2017. El pH fue sustancialmente más elevado, motivado por las elevadas temperaturas y bajas precipitaciones que dan lugar al estrés hídrico, causante de elevadas concentraciones de potasio. Resultados similares fueron encontrados por Vicente (2017) acerca del efecto de las condiciones meteorológicas sobre las concentraciones de potasio.

El vino de investigación, sin paradas durante la fermentación espontánea, mostró bajos valores de acidez volátiles en todas las añadas, lo cual indica que el proceso de elaboración estuvo bien ejecutado, dando lugar a vinos correctos para el aislamiento de las levaduras.

La composición química tanto de la uva como del vino de investigación en las añadas estudiadas no mostró diferencias sustanciales que puedan haber influido significativamente en el desarrollo de las levaduras asociadas a la variedad minoritaria Negro Saurí.

Tabla 6. Análisis químico de la uva y del vino de investigación en las añadas 2014-2017

UVA (dato promedio de 15 clones)									
AÑO	Brix	Densidad	Azúcar	pH	Acidez total (gL ⁻¹)	Ácido málico (gL ⁻¹)	Ácido tartárico (gL ⁻¹)	Potasio (mgL ⁻¹)	I.P.T.
2014	24,5	1,103	244,4	-	-	1,78	8,0	1528	12,7
2015	24,5	1,102	244,3	3,31	5,72	2,25	5,7	1534	14,7
2016	24,4	1,103	242,8	3,43	4,84	1,98	4,8	1594	14,5
2017	24,6	1,103	245,5	3,49	5,98	2,47	7,4	1973	14,3

VINO (procedente de la fermentación)				
AÑO	Alcohol % (v/v)	pH	Acidez total (gL ⁻¹)	Acidez volátil (gL ⁻¹)
2014	14,1	3,48	4,0	0,36
2015	13,5	3,37	3,9	0,34
2016	13,8	3,55	4,1	0,25
2017	14,5	3,71	3,6	0,25

I.P.T.: Índice de Polifenoles totales

Acidez total (gL⁻¹ en ácido sulfúrico)

Acidez volátil (gL⁻¹ en ácido acético)

Conclusiones

1. Las principales especies de levaduras asociadas a la variedad minoritaria Negro Saurí son *Saccharomyces cerevisiae* y cuatro especies no-*Saccharomyces*: *Metschnikowia pulcherrima*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora uvarum* y *Torulaspota delbrueckii*.

2. No se pudo determinar la relación entre la variedad de uva, la ubicación geográfica y las condiciones climáticas, pero sí la influencia del uso de fitosanitarios en el *terroir* microbiano.

3. La actividad proteasa y β - glucosidasa fue la más abundante entre la población de levaduras no-*Saccharomyces*. La especie *M. pulcherrima* mostró actividad β - glucosidasa y proteasa. *H. uvarum* presentó actividad proteasa y lipasa, y *L. thermotolerans* fue la única especie con actividad celulolítica. La especie *T. delbrueckii* no mostró actividad enzimática.

4. La población de *Saccharomyces cerevisiae* resultó diversa y transitoria en las cuatro añadas estudiadas, como muestra el hecho de que las añadas 2014 de 2017 resultaran heterogéneas, frente a la homogeneidad presentada por la correspondiente a la de 2015. La añada de 2016, por su parte, evidenció la menor variabilidad genética.

5. Se identificaron 61 cepas de «cosecha única» en la población de *Saccharomyces cerevisiae*, y nueve aisladas perennes, de las cuales, cinco se encontraron en dos o más añadas. Por ello, estas 70 cepas se proponen para una investigación más profunda en los estudios de fermentación, con el fin de determinar si son útiles como cultivos iniciadores para la industria vitivinícola.

Referencias Bibliográficas

- Agarbati, A., Canonico, L., Ciani, M. y Comitini, F. (2019). The impact of fungicide treatments on yeast biota of Verdicchio and Montepulciano grape varieties. *PLoS ONE*, 14, e0217385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217385>
- Albertin, W., Setati, M. E., Miot-Sertier, C., Mostert, T. T., Colonna-Ceccaldi, B., Coulon, J., Girard, P., Moine, V., Pillet, M., Salin, F., Bely, M. Divol, B. y Masneuf-Pomarede, I. (2016). *Hanseniaspora uvarum* from Winemaking Environments Show Spatial and Temporal Genetic Clustering. *Frontiers in Microbiology*, vol. 6, art. 1569. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01569>
- Alessandria, V., Giacosa, S., Campolongo, S., Rolle, L., Rantsiou, K. y Cocolin, L. (2013). Yeast population diversity on grapes during on-vine withering and their dynamics in natural and inoculated fermentations in the production of icewines. *Food Research International*, 54, 139-147. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.018>
- Alleweldt, G. y Dettweiler, E. (1994). *The genetic Resources of Vitis: World List of Grapevine Collections*. (2ª ed.). Geilweilerhof.
- Álvarez-Pérez, J. M., Garzón-Jimeno, E. y Coque, J. J. R. (2015). Population of indigenous yeast strains from Prieto Picudo grapes in different growing areas of Denomination of Origin «Tierra de León». *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*, 72(1), 17-26. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:11013>
- Amerine, M. A., Berg, H. W. y Cruess, W. V. (1967). *The technology of wine making*. (2ª ed.). The AVI Publishing Company.
- Aplin, J. J., White, K. P. y Edwards, C. G. (2019). Growth and metabolism of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Washington state vineyards in media and high sugar grape musts. *Food Microbiology*, 77, 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.004>
- Aponte, M. y Blaiotta, G. (2016). Potential Role of Yeast Strains Isolated from Grapes in the Production of Taurasi DOCG. *Frontiers in Microbiology*, 7, 809. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00809>
- Arbelaitz, O., Gurrutxaga, I., Muguerza, J., Pérez, J. M. y Perona, I. (2013). An extensive comparative study of cluster validity indices. *Pattern Recognition*, 46, 243-256. <https://doi.org/10.1016/j.patcog.2012.07.021>
- Arranz, C., Yuste, J., Hidalgo, E., Santana, J. C., Ortiz, J. M., Martín, J. P., Albuquerque, M. V., Barajas, E., Castaño, F. J. y Rubio, J. A. (2008). Variedades de vid cultivadas en la Sierra de Francia. Importancia, identificación, sinonimias y homonimias. *La Semana Vitivinícola*, 3223, 1414-1420.

- Arranz, C., Barajas, E., Yuste, J. y Rubio, J. A. (2016). *Guía de variedades minoritarias I. Variedades minoritarias de Castilla y León*, 45-58. Comunidad de Madrid. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.
- Arroyo-García, R., Ruiz-García, L., Bolling, L., Ocete, R., López, M. A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H. I., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M. K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S., Cenis, J. L., Costantini, L., Goris-Lavets, S., Grando, M. S., Klein, B. Y., McGovern, P. E., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K. A., Snoussi, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J. M., Lefort, F. y 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. [http://doi.org/ 10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x](http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x)
- Ayoub, M. J., Legras, J. L., Saliba, R. y Gaillardin, C. (2006). Application of multi locus sequence typing to the analysis of the biodiversity of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from Lebanon. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 699-711. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02817.x>
- Balda, P. (2014). Identificación y caracterización completa (ampelográfica, genética, agronómica, enológica, fenológica, aminoacídica, aromática y sensorial) de variedades tintas minoritarias de la D. O. Ca. Rioja. [Tesis doctoral]. Universidad de La Rioja.
- Balda, P. y Martínez de Toda, F. (2017). *Variedades minoritarias de vid en La Rioja*. Gobierno de La Rioja. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/321006350>
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. y Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 243-259. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025>
- Barbosa, C., Lage, P., Esteves, M., Chambel, L., Mendes-Faia, A. y Mendes-Ferreira, A. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Metschnikowia pulcherrima* strains from Douro wine region. *Fermentation*, 4(e8). <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
- Barrajón, N., Capece, A., Arévalo-Villena, M., Briones, A. y Romano, P. (2011). Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28, 1080-1086. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.016>
- Belda, I., Ruíz, J., Alonso, A., Marquina, D., Navascués, E. y Santos, A. (2015). Actividades enzimáticas de levaduras no-*Saccharomyces* para su aplicación enológica http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/actividades_enzimaticas_no_saccharomyces_cienc0715.htm

- Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D. y Santos, A. (2016). Unraveling the enzymatic basis of wine «flavorome»: a phylo-functional study of wine related yeast species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 12.
- Belda, I., Ruiz, J., Beisert, B., Navascués, E., Marquina, D., Calderón, F., Rauhut, D., Benito, S. y Santos, A. (2017). Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in wine sequential fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 257, 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028>
- Beltrán, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., Rozes, N. y Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287-293. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00097>
- Benito, S. (2018). The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 6775-6790. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
- Binati, R. L., Innocente, G., Gatto, V., Celebrin, A., Polo, M., Felis, G. E. y Torriani, S. (2019). Exploring the diversity of a collection of native non-*Saccharomyces* yeasts to develop co-starter cultures for winemaking. *Food Research International*, 122, 432-442. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.043>
- Bisson, L. F., Joseph, C. M. L. y Domizio, P. (2009). *Yeasts*. En König, H. (Ed.): *Biology of microorganisms on grapes in must and in wine*. Springer, 65.
- Bisson, L. F. y Walker, G. A. (2015). The microbial dynamics of wine fermentation. *Advances in Fermented Foods and Beverages*. Woodhead Publishing.
- Bokulich, N. A., Ohta, M., Richardson, P. M. y Mills, D. A. (2013). Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS ONE*, 8, e66437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437>
- Bougreau, M., Ascencio, K., Bugarel, M., Nightingale, K. y Loneragan, G. (2019). Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes. *PLoS One*, 14, 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216246>
- Braconi, D., Sotgiu, M., Millucci, L., Paffetti, A., Tasso, F., Alisi, C., Martini, S., Rappuoli, R., Lusini, P., Sprocati, A. R., Rossi, C. y Santucci, A. (2006). Comparative analysis of the effects of locally used herbicides and their active ingredients on a wild-type wine *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3163-3172. <https://doi.org/10.1021/jf052453z>

- Bruns, T. D., White, T. J. y Taylor, J. W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 524-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.22.110191.002521>
- Brysch-Herzberg, M. y Seidel, M. (2015). Yeast diversity on grapes in two German wine growing regions. *International Journal of Food Microbiology*, 214, 137-144.
- Caballero, N. (21 de septiembre de 2020). Tres Master of Wine destacan el potencial de variedades de uva minoritarias de Castilla y León. *El Norte de Castilla y León*. Recuperado de: <https://www.elnortedecastilla.es/degustacastillayleon/castillayleon/devinos/tres-master-wine-20200921142659-nt.html>
- Cabello, F., Ortiz, J. M., Muñoz-Organero, G., Rodríguez, I., Benito, A., Rubio de Miguel, C., García, S. y Saiz, R. (2011). *Variedades de vid en España*. Editorial Agrícola Española.
- Cabello, F., Saiz, R. y Muñoz, G. (2013). Estudio de variedades españolas minoritarias de vid. Recuperado de: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/variedades_minoritarias_cienc0213.htm
- Cabello, F. (2016). Variedades minoritarias de vid como valor regional añadido [Diapositiva de Power Point]. Federación Española de Asociaciones de Enólogos. Recuperado de: <https://docplayer.es/52522193-Variedades-minoritarias-de-vid-como-valor-regional-anadido-felix-cabello-saenz-de-santa-maria.htm>
- Čadež, N., Zupan, J. y Raspor, P. (2010). The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Research*, 10, 619-630. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00635.x>
- Canales Sectoriales Interempresas. (2019, 26 de marzo). Valovitis, la fuerza de los viñedos del macizo pirenaico. Recuperado de: <https://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/240362-Valovitis-la-fuerza-de-los-vinedos-del-macizo-pirenaico.html#cabello>
- Canonico, L., Comitini, F. y Ciani, M. (2015). Influence of vintage and selected starter on *Torulasporea delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae* sequential fermentation. *European Food Research and Technology*, 241, 827-833. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2507-x>
- Canonico, L., Comitini, F., Oro, L. y Ciani, M. (2016). Sequential fermentation with selected immobilized non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Frontiers in Microbiology*, 7, 278-278. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>

- Canonico, L., Comitini, F. y Ciani, M. (2018). *Torulasporea delbrueckii* for secondary fermentation in sparkling wine production. *Food Microbiology*, 74, 100-106. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.009>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. y Romano, P. (2012). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneously fermenting grapes from an Italian «heroic vinegrowing area». *Food Microbiology*, 31, 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.010>
- Capece, A., Granchi, L., Guerrini, S., Mangani, S., Romaniello, R., Vincenzini, M. y Romano, P. (2016). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1018. <https://doi.org/10.3389/fmicb>
- Capello, M. S., Bleve, G., Grieco, F., Dellaglio, F. y Zacheo, G. (2004). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1274-1280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02412.x>
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F. y Spano, G. (2015). Microbial *terroir* and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. *Microbiological Research*, 181, 75-83.
- Carro, D., Piña, B. (2000). Identificación de cepas de levaduras de interés enológico. *Revista de enología*. Recuperado de: http://www.acenologia.com/ciencia52_1.htm
- Charoenchai, C., Fleet, G. H., Henschke, P. A. y Todd, B. E. N. T. (1997). Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2, 2-8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1997.tb00109.x>
- Ciani, M., Mannazzu, I., Marinangeli, P., Clementi, F. y Martini, A. (2004). Contribution of wineryresident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 159-164. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020284.05802.d7>
- Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. (2006). Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 239-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.012>
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I. y Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: A new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123-133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
- Cipriani, G., Spadotto, A., Jurman, I., Di Gaspero, G., Crespan, M., Meneghetti, S., Frare, E., Vignani, R., Cresti, M., Morgante, M., Pezzotti, M., Pe, E., Policriti, A. y

- Testolin, R. (2010). The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin. *Theoretical and Applied Genetics*, 121, 1569-1585. <http://doi.org/10.1007/s00122-010-1411-9>
- Clavijo, A., Calderón, I. L. y Paneque, P. (2010). Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the Serranía de Ronda (Spain) vine-growing region. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.010>
- Coheris Analytics SPAD (2017). *Software SPAD*, versión 9.0.39.
- Comunidad de Madrid. (s.f.). *Colección de El Encín*. En *Colección de variedades de vid*. Recuperado de: <https://www.comunidad.madrid/servicios/medio-rural/coleccion-variedades-vid>
- Combina, M., Mercado, L., Borgo, P., Elia, A., Jofré, V., Ganga, A., Martínez, C. y Catania, C. (2005). Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1055-1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02540.x>
- Contreras, A., Curtin, C. y Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential «collaboration» between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1885-1895. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A., Tello, J., Aporta, I., Vélez, M. D. y Valero, E. (2011a). Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.040>
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. y Valero, E. (2011b). Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021>
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. y Valero, E. (2011c). Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiology Ecology*, 77, 429-437. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01124.x>
- Csoma, H., Zakany, N., Capece, A., Romano, P. y Sipiczki, M. (2010). Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *International*

- Journal of Food Microbiology*, 140(2-3), 239-248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.024>
- Cunha, J., Texeira, M., Brazão, J., Carneiro, L. C., Fevereiro, P., Veloso, M. y Eiras Díaz, J. E. J. (2010). Genetic diversity in Portuguese native *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera* and ssp. *sylvestris*. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46(SI), S54-S56. <http://doi.org/10.17221/2447-CJGPB>
- Davenport, R. R. (1974). Micro ecology of yeasts and yeast like organisms associated with an English vineyard. *Vitis*, 13, 123-130. https://doi.org/10.1007/978-3-540-85463-0_3
- David, V., Terrat, S., Herzine, K., Claisse, O., Rousseaux, S., Tourdot-Maréchal, R. Masneuf-Pomarede, I., Ranjard, L. y Alexandre, H. (2014). High-throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 41, 811-821. <https://doi.org/10.1007/s10295-0141427-2>
- Dazy, F. y Le Barzic, J.-F. (1996). *L'analyse des données évolutives: Méthodes et applications*. Technip Publishers.
- De la Torre, M., Millán, M., Pérez-Juan, P., Morales, J. y Ortega, J. (1999). Indigenous yeasts associated with two *Vitis vinifera* grape varieties cultured in southern Spain. *Microbios*, 100, 27-40.
- Dequin, S. (2001). The potential of genetic engineering for improving to their karyotype pattern. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 369-377. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00008-9](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00008-9)
- Di Maio, S. Polizzotto, G., Di Gangi, E., Foresta, G., Genna, G., Verzera, A., Scacco, A., Amore, G. y Oliva, D. (2012). Biodiversity of indigenous *Saccharomyces* populations from old wineries of South-Eastern Sicily (Italy): Preservation and economic potential. *PLoS ONE*, 7, e30428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030428>
- Dunn, B., Levine, R. P. y Sherlock, G. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics*, 6, 53. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-6-53>
- Dunn, B., Richter, C., Kvitek, D. J., Pugh, T. y Sherlock, G. (2012). Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Research*, 22, 908-924. <https://doi.org/10.1101/gr.130310.111>
- Egli, C. M., Edinger, W. D., Mittrakul, C. M. y Henick-Kling, T. (1998). Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory

- character of Riesling and Chardonnay wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 779-789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>
- Escalante-Minakata, P. e Ibarra-Junquera, V. (2007). Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas. *BioTecnología*, 11(3).
- Escribano, R., González-Arenzana, L., Garijo, P., Berlanas, C., López-Alfaro, I., López, R., Gutiérrez, A. R. y Santamaría, P. (2017). Screening of enzymatic activities within different enological non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1555-1564. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2587-7>
- Esteve-Zarzoso, B., Manzanares, P., Ramón, D. y Quero, A. (1998). The role of non-*Saccharomyces* yeasts in industrial winemaking. *International Microbiology*, 1(2) 143-148.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337. <http://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>
- Fernández, M. T., Úbeda, J. F. y Briones, A. I. (1999). Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiology Letters*, 173, 223-229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13506.x>
- Fernández-Espinar, M., Esteve-Zarzoso, B., Querol, A. y Barrio, E. (2000). RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flour yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78, 87-97. <http://doi.org/10.1023/a:1002741800609>.
- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research*, 8, 979-995. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
- Francesca, N., Canale, D. E., Settanni, L. y Moschetti, G. (2012). Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environmental Microbiology Report*, 4, 105-112. <https://doi.org/10.1111/j.17582229.2011.00310.x>
- Franco-Duarte, R., Mendes, I., Gomes, A. C., Santos, M. A. S., De Sousa, B. y Schuller, D. (2011). Genotyping of *Saccharomyces cerevisiae* strains by interdelta sequence typing using automated microfluidics. *Electrophoresis* 32(12), 1447-1455. <https://doi.org/10.1002/elps.201000640>

- Gadd, G. M. y De Rome, L. (1988). Biosorption of copper by fungal melanin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29, 610-617. <https://doi.org/10.1007/BF00260993>
- Ganga, M. A. y Martínez, C. (2004). Effect of wine yeast monoculture practice on the biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 76-83. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02080.x>
- Garofalo, C., Tristezza, M., Grieco, F., Spano, G. y Capozzi, V. (2016). From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to «Nero di Troia» autochthonous grape cultivar. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 59. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2017-4>
- Gobbi, A. (2019). Exploring the Molecular Basis of Microbial Wine-*Terroir*. From Deep Soil Horizons to Grapevines and Wines. [Tesis doctoral]. Aarhus University.
- González, R., Quirós, M. y 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, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.06.015>
- González-Royo, E., Pascual, O., Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Esteve-Zarzoso, B., Mas, A., Canals, J. M. y Zamora, F. (2015). Oenological consequences of sequential inoculation with non-*Saccharomyces* yeasts (*Torulasporea delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima*) and *Saccharomyces cerevisiae* in base wine for sparkling wine production. *European Food Research and Technology*, 240, 999-1012. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2404-8>
- Granato, D., Santos, J. S., Escher, G. B., Ferreira, B. L. y Maggio, R. M. (2018). Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 72, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.006>
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Rousseaux, S., Von Wallbrunn, C., Alexandre, H. y Guilloux-Benatier, M. (2015). Diversity of yeast strains of the genus *Hanseniaspora* in the winery environment: What is their involvement in grape must fermentation? *Food Microbiology*, 50, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.03.009>
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Von Wallbrunn, C., Alexandre, H. y Guilloux-Benatier, M. (2016). Persistence of two non-*Saccharomyces* yeasts (*Hanseniaspora* and *Starmerella*) in the cellar. *Frontiers in Microbiology*, 7, 268. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00268>

- Grangeteau, C., Roullier-Gall, C., Rousseaux, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., Alexandre, H. y Guilloux-Benatier, M. (2017). Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microbial Biotechnology*, 10, 354-370. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428>
- Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T. y Querol, A. (1994). Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 708-714. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-708>
- Guillamón, J. M., Sabaté, J., Barrio, E., Cano, J. y Querol, A. (1998). Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 387-392. <http://doi.org/10.1007/s002030050587>
- Hidalgo, L. (1999). *Tratado de viticultura general*. Ediciones Mundi-Prensa.
- Hranilovic, A., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Jiranek, V. y Albertin, W. (2017). The evolution of *Lachancea thermotolerans* is driven by geographical determination, anthropisation and flux between different ecosystems. *PLoS ONE*, 12, e0184652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184652>
- Hu, K., Jin, G. J., Mei, W. C., Li, T. y Tao, Y. S. (2018). Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. *Food Chemistry*, 239, 495-501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.151>
- Ibáñez, J., Carreño, J., Yuste, J. y Martínez-Zapater, J. M. (2015). Grapevine breeding and clonal selection programmes in Spain. En A. Reynolds (Ed.): *Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry*, 183-209. Woodhead Publishing.
- Jackson, D. I. y Lombard, P. B. (1993). Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 409-429.
- James, S. A., Cai, J., Roberts, I. N. y Collins, M. D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47, 453-460. <http://doi.org/10.1099/00207713-47-2-453>
- Johnston, J. R. y Mortimer, R. K. (1986). Electrophoretic karyotyping of laboratory and commercial strains of *Saccharomyces* and other yeasts. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 569-572. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-4-569>

- Jolly, N., Augustyn, O. y Pretorius, I. (2003). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 35-42. <http://doi.org/10.21548/24-2-2640>
- Jolly, N., Augustyn, O. y Pretorius, I. (2006). The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 15-39. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
- Kallithraka, S., Kim, D., Tsakiris, A. y Paraskepvoulos, I. (2011). Sensory assessment and chemical measurement of astringency of Greek wines: Correlations with analytical polyphenolic composition. *Food Chemistry*, 126(4), 1953-1958. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.04>
- Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M., y Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 71, 502-508. <https://doi.org/10.1515/prolas-2017-0087>
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. y Gulati, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57(5), 503-507. <http://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>
- Kecskeméti, E., Berkelmann-Löhnertz, B. y Reineke, A. (2016). Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS ONE*, 11:e0160852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160852>
- Kelebeck, H., Cambas, A., Selli, S. (2009). Effects of different maceration times and pectolytic enzyme addition on the anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Kaleci Karzai wines. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33(3), 296-311. <http://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00245.x>
- Killham, K., Lindley, N. D. y Wainwright, M. (1981). Inorganic sulfur oxidation by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 629-631.
- Knight, S., Klaere, S., Fedrizzi, B. y Goddard, M. R. (2015). Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: Evidence for a microbial aspect to *terroir*. *Scientific Reports*, 5, 14233. <https://doi.org/10.1038/srep14233>
- Kosel, J., Raspor, P. y Čadež, N. (2019). Maximum residue limit of fungicides inhibits the viability and growth of desirable non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25, 43-52. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12364>

- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y. y Van Leeuwen, C. (2006). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of non irrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5077-5086. <http://doi.org/10.1021/jf0605446>
- Kurtzman, C. P. y Robnett, C. J. (1998a). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371. <https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (1998b). *The Yeasts, A Taxonomic Study*. (4^a ed.). Elsevier Science Publishers, 1055.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. y Boekhout, T. (eds.) (2011a). Definition, classification and nomenclature of the yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, vol. 1. (5^a ed.). Elsevier Science Publishers, 3-5.
- Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. (2011b). *The Yeasts, A Taxonomic Study*. (5^a ed.). Elsevier Science Publishers.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T. y Robert, V. (2011c). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, vol. 1 (5^a ed.). Elsevier Science Publishers, 87-110. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Lacombe, T., Boursiquot, J. M., Laucou, V., Di Vecchi-Staraz, M., Péros, J. P. y This, P. (2013). Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 126, 401-414. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-012-1988-2>
- Laguna, E. (2002). Sobre las formas naturalizadas de *Vitis* L. (*vitaceae*) en la Comunidad Valenciana, I. Especies. *Flora Montiberica*, (23), 47-50. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/284463830_Sobre_las_formas_naturalizadas_de_Vitis_en_la_Comunidad_Valenciana_I_Las_especies
- Lambrechts, M. G. y Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-125. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>
- Laville, P. (1990). Le *terroir*, un concept indispensable a l'elaboration et á la protection des appellations d'origine comme a la gestation des vignobles: le cas de la France. *Bull. OIV*, 217, 709-710.
- Le Jeune, C., Erny, C., Demuyter, C. y Lollier, M. (2006). Evolution of the population of *Saccharomyces cerevisiae* from grape to wine in a spontaneous fermentation. *Food Microbiology*, 23, 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.02.007>

- Lebart, L., Morineau, A. y Piron, M. (1995). *Statistique Exploratoire Multidimensionnelle*. Dunod Publishers.
- Lefort, F. y Roubelakis-Angelakis, K. K. A. (2001). Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 101-108. Recuperado de: <https://www.ajevonline.org/content/52/2/101>
- Legras, J. L. y Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiology Letters*, 221, 249-255. [https://doi.org/10.1016/S03781097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S03781097(03)00205-2)
- Lesaffre Ibérica (2020). Los nuevos usos de las levaduras. Recuperado de: <https://www.lesaffre.es/levaduras-nuevos-usos/>
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J. y Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22, 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, S., Cheng, C., Li, Z., Chen, J., Yan, B., Han, B. y Reeves, M. (2010). Yeast species associated with wine grapes in China. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1-2), 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.009>.
- Lin, M. M.-H., Boss, P. K., Walker, M. E., Sumbly, K. M., Grbin, P. R. y Jiranek, V. (2020). Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 312, 108373. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. y Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- Liu, Y., Wang, C., Joseph, C. M. L. y Bisson, L. F. (2014). Comparison of two PCR-based genetic fingerprinting methods for assessment of genetic diversity in *Saccharomyces strains*. *American Journal of Enology and Viticulture* 65(1), 109-116. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13056>
- Lodder, J. (1970). *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publishing Company.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M. A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I. y Suárez-Lepe, J. A. (2014). Influence of sequential fermentation with *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 915-922. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>

- Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. y Villa, T. G. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 141-144. Recuperado de: <https://www.ajevonline.org/content/42/2/141.article-info>
- Lööke, M., Kristjuhan, K. y Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50(5), 325-328. <http://doi.org/10.2144/000113672>
- Lopes, M. S., Rodrigues, M., Eiras-Dias, J. E., Mendonça, D. y Da Câmara, A. (2006). Discrimination of Portuguese grapevines based on microsatellite markers. *Journal of Biotechnology*, 127, 34-44. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.06.006>
- Madden, T. L., Tatusov, R. L. y Zhang, J. (1996). Application of Network BLAST Server. *Methods in Enzymology*, vol. 266, 131-141. Academic Press.
- Maicas, S. y Mateo, J. J. (2015). Enzyme contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine production. *Universal Journal of Microbiology Research*, 3(2), 17-25. <http://doi.org/10.13189/ujmr.2015.030202>
- Mannazzu, I., Clementi, F. y Ciani, M. (2002). In Biodiversity and Biotechnology of Wine. *Yeasts*, 19-34.
- Martínez de Toda, F. (2004). Interés de las variedades minoritarias y locales para la producción de vinos de calidad. En *XXXVI Jornadas de Estudio de la Viña a la Copa: los Retos Actuales del Vino*. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA). Recuperado de: https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2004/comunicaciones/2004_Ponencia_02.pdf
- Martínez de Toda, F., Sancha, J. C. y Balda, P. (2013). Principales variedades de vid recuperadas en la DOC Rioja. http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/variedades_recuperadas_rioja_cienc0213.htm
- Martínez, O. (2013a). Caracterización enológica de vinos elaborados con variedades minoritarias de La Rioja con diferentes vinificaciones y añadas. [Tesis doctoral]. Universidad de La Rioja. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/41562.pdf>
- Martínez, O. (2013b). Figura 3. Recorrido de la variedad Trousseau y sus sinonimias a lo largo del Camino de Santiago [Fotografía]. CC BY NC ND <https://dialnet.unirioja.es/descarga/tesis/41562.pdf>
- Martínez, M. C. y Pérez, J. E. (2000). The forgotten vineyard of the Asturias Principedom (north of Spain) and ampelographic description of its grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.). *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 370-378. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10261/65986>

- Martini, A., Federichi, F. y Rosini, G. (1980). A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Canadian Journal of Microbiology*, 26, 856-859. <https://doi.org/10.1139/m80-149>
- Martini, A., Ciani, M. y Scorzetti, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 435-440. Recuperado de: <https://www.ajevonline.org/content/47/4/435>
- Martiniuk, J. T., Pacheco, B., Russell, G., Tong, S., Backstrom, I. y Measday, V. (2016). Impact of commercial strain use on *Saccharomyces cerevisiae* population structure and dynamics in Pinot Noir vineyards and spontaneous fermentations of a Canadian winery. *PLoS ONE*, 11, e0160259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160259>
- Mas, A., Padilla, B., Esteve-Zarzoso, B. y Beltrán, G. (2015). Utilización de inóculos mixtos de levaduras autóctonas como herramienta para reproducir la huella microbiológica de la zona. Recuperado de: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/inoculos_mixtos_levaduras_autoctonas_cienc0715.htm
- Mateo, J. J., Jiménez, M., Huerta, T. y Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 153-160. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90102-U](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90102-U)
- Mattivi, F., Fedrizzi, B., Zenato, A., Tiefenthaler, P., Tempesta, S., Perenzoni, D., Cantarella, P., Simeoni, F. y Vrhovsek, U. (2012). Development of reliable analytical tools for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. *Analytica Chimica Acta*, 732, 194-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.051>
- Maturano, Y. P., Assof, M., Fabani, M. P., Nally, M. C., Jofre, V., Rodríguez, A. L. A., Toro, M. E., Catelanos, F. L. I. y Vázquez, F. (2015). Enzymatic activities produced by mixed *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* cultures: relationship with wine volatile composition. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108: 1239-1256. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0578-0>
- Medina-Trujillo, L., González-Royo, E., Sieczkowski, N., Heras, J., Canals, J. M. y Zamora, F. (2017). Effect of sequential inoculation (*Torulaspora delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae*) in the first fermentation on the foaming properties of sparkling wine. *European Food Research and Technology*, 243(4), 681-688. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2781-2>
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M. Koffi, J., Vrancken, G. y Verstrepen, K. (2015a). Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6166-6176. <https://doi.org/10.1128/AEM.00133-15>

- Meersman, E., Steensels, J., Struyf, N., Paulus, T., Saels, V., Mathawan, M., Allegaert, L., Vrancken, G. y Verstrepen, K. (2015b). Tuning chocolate flavor through development of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures with increased acetate ester production. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 732-746. <https://doi.org/10.1128/AEM.02556-15>
- Mendes Ferreira, A., Clímaco, M. C. y Mendes-Faia, A. (2001). The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components-a preliminary study. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 67-71. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01348.x>
- Mercado, L., Jubany, S., Gaggero, C., Masuelli, R. W. y Combina, M. (2010). Molecular relationships between *Saccharomyces cerevisiae* strains involved in winemaking from Mendoza, Argentina. *Current Microbiology*, 61(6), 506-514. <http://doi.org/10.1007/s00284-010-9645-y>
- Merín, M. G., Martín, M. C., Rantsiou, K., Cocolin, L. y Morata de Ambrosini, V. I. (2015). Characterization of pectinase activity for enology from yeasts occurring in Argentine Bonarda grape. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 815-823. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140160>
- Monteil, H., Blazy-Mangen, F. y Michel, G. (1986). Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Science des Aliments*, 6, 349-360.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M. y González, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 3993-4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Morata, A. Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M.^a A., González, C. y Suárez Lepe, J. A. (2018). *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation*, 4(3), 53. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
- Morgan, H. H., Du Toit, M. y Setati, M. E. (2017). The Grapevine and Wine Microbiome: Insights from Throughput Amplicon Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 8, 820. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00820>
- Mortimer, R. y Polsinelli, M. (1999). On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology*, 150, 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80036-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80036-9)
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. y Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology*, 51, 263-273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Muyzer, G., De Waal, E. C. y Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase

- chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Nadal, D., Carro, D., Fernández-Larrea, J. y Piña, B. (1999). Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1944-1950. <http://doi.org/10.1128/aem.65.4.1688-1695.1999>
- Ness, F., Lavallee, F., Dubourdieu, D., Aigle, M. y Dulau, L. (1993). Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(1), 89-94. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620113>
- Nisiotou, A. A., Spiropoulos, A. E. y Nychas, G.-J. E. (2007). Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 21, 6705-6713. <https://doi.org/10.1128/AEM.01279-07>
- Nurgel, C., Erten, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., Selli, S. (2005). Yeast flora during the fermentation of wines made from *Vitis vinifera* L. cv Emir & Kalecik Karasi grown in Anatolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 1187-1194. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-1106-6>
- Orden APA/475/2019, de 15 de abril, por la que se dispone el cambio de denominación de variedades incluidas en el Registro de Variedades Comerciales. *Boletín Oficial del Estado*, núm. 100, de 26 de abril de 2019, 42601-42601. Recuperado de: https://boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2019-6238
- Orgiazzi, A., Bianciotto, V., Bonfante, P., Daghino, S., Ghignone, S., Lazzari, A., Lumini, E., Mello, A., Napoli, C., Perotto, S., Vizzini, A., Bagella, S., Murat, C. y Girlanda, M. (2013). 454 Pyrosequencing analysis of fungal assemblages from geographically distant, disparate soils reveals spatial patterning and a core mycobiome. *Diversity*, 5(1), 73-98. <https://doi.org/10.3390/d5010073>
- Oro, L., Ciani, M. y Comitini, F. (2014). Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1209-1217. <https://doi.org/10.1111/jam.12446>
- Padilla, B., Gil, J. V. y 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, 411-411. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Paffetti, C., Barberio, C., Casalone, E., Cavalieri, D., Fani, R., Fia, G. D., Mori, E. y Polsinelli, M. (1995). DNA fingerprinting by random amplified polymorphic DNA and restriction fragment length polymorphism is useful for yeast typing. *Research in Microbiology*, 146, 587 y 594. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80565-1](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80565-1)

- Parapouli, M., Hatziloukas, E., Drainas, C., Perisynakis, A. (2010). The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 37, 85-93. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0651-7>
- Parish, M. E. y Carroll, D. E. (1985). Indigenous yeasts associated with muscadine (*Vitis rotundifolia*) grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 165-169. Recuperado de: <https://www.ajevonline.org/content/36/2/165>
- Pérez-González, J., González, R., Querol, A., Sendra, J. y Ramón, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing b-(1, 4) endoglucanase and its use in microvinification processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), 2801-2806. <https://doi.org/10.1128/aem.59.9.2801-2806.1993>
- Pinto, C., Pinho, D., Sousa, S., Pinheiro, M., Egas, C. y Gomes, A. (2014). Unravelling the diversity of grapevine microbiome. *PLoS ONE*, 9(1): e85622. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085622>
- Portillo, M. C., Franquès, J., Areque, I., Reguant, C. y Bordons, A. (2016). Bacterial diversity of Grenache and Carignan grapes surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 219, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002>
- Poulard, A., Simon, L. y Cuinier, C. (1981). Caractères de la microflore levurienne du vignoble Nantais. *Vignes Vins*, 300, 14-18.
- Prakitchaiwattana, C. J., Fleet, G. H. y Heard, G. M. (2004). Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *Fems Yeast Research*, 4(8), 865-877. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.05.004>
- Pramateftaki, P. V., Lanardis, P. y Typas, M. A. (2000). Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 236-248. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01102.x>
- Pretorius, I. S., Van der Westhuizen, T. J. y Augustyn, O. P. H. (1999). Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 20(2). <https://doi.org/10.21548/20-2-2234>
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 675-729. [http://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8<675](http://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8<675)

- Querol, A., Pérez-Torrado, R., Alonso-del-Real, J., Minebois, R., Stribny, J., Oliveira, B. y Barrio, E. (2018). New trends in the uses of yeast in oenology. *Advances in Food and Nutrition Research*, 85, 177-210. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.002>
- Quirós, M., Rojas, V., González, R. y Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Raspor, P., Milek, D. M., Polanc, J., Smole Možina, S. y Čadež, N. (2006). Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.017>
- Regueiro, L. A., Costas, C. L. y Rubio, J. E. L. (1993). Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 405-408. Recuperado de: <https://www.ajevonline.org/content/44/4/405>
- Rementería, A., Rodríguez, J. A., Cadaval, A., Amenábar, R., Muguruza, J. R., Hernando, F. L. y Sevilla, M. J. (2003). Yeast associated with spontaneous fermentations of white wines from the '«Txakoli de Bizkaia»' region (Basque Country, North Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 86, 201-207. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00289-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00289-7)
- Renault, P., Coulon, J., Moine, V., Thibon, C. y Bely, M. (2016). Enhanced 3-sulfanylhexasan-1-ol production in sequential mixed fermentation with *Torulaspora delbrueckii*/*Saccharomyces cerevisiae* reveals a situation of synergistic interaction between two industrial strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00293>
- Renouf, V., Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A. (2005). Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 316-327. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00031.x>
- Resolución Oiv/Viti 333/2010. Definición de *terroir* vitivinícola.
- Richards, K. D., Goddard, M. R. y Gardner, R. C. (2009). A database profile genotypes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(3), 355-359. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9346-3>
- Romano, P., Suzzi, G., Domizio, P. y Fatichenti, F. (1997). Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 71, 239-242. <https://doi.org/10.1023/a:1000102006018>

- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caruso, M. y Capece, A. (2003). Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 169-180. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
- Rosi, I., Vinella, M. y Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 519-527. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04396.x>
- Rosini, G. (1982). Influenza della microflora saccaromicetico della cantina sulla fermentazione del mosto d'uva. *Vigne Vini*, 9, 43-46.
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G. y Capozzi, V. (2020). Non-*Saccharomyces* commercial starter cultures: Scientific trends, recent patents and innovation in the wine sector. *Recent Patents in Food, Nutrition and Agriculture*, 11(1), 27-39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Rousseau, S. y Doneche, B. (2001). Effect of water activity (a_w) on the growth of some epiphytic microorganisms isolated from grape berry. *Vitis*, 40, 75-78.
- Russo, P., Berbegal, C., De Ceglie, C., Grieco, F., Spano, G. y Capozzi, V. (2019). Pesticide residues and stuck fermentation in wine: New evidences indicate the urgent need of tailored regulations. *Fermentation*, 5, 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010023>
- Sabate, J., Cano, J., Querol, A., Guillamón, J. M. (1998). Diversity of *Saccharomyces* strains in wine fermentations: Analysis for two consecutive years. *Letters of Applied Microbiology*, 26, 452-455. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.1998.00369.x>
- Sabate, J., Cano, J., Esteve-Zarzoso, B. y Guillamón, J. M. (2002). Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiology Research*, 157, 267-274. <https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163>
- Santamaría, P., López, R., Del Patrocinio Garijo, M., Escribano, R., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I. y Rosa, A. (2019). Biodiversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations: Typical cellar or zone strains? *Advances in Grape and Wine Biotechnology*. En Morata y Loira, I. (Ed.), 1-15. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84870>
- Santana, J. C. (2011). Identificación genética, estructura y orígenes de las variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) cultivadas en Castilla y León. [Tesis doctoral]. Universidad de Valladolid. Recuperado de: <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=i8SP2%2FpUH0Y%3D>

- Sanz-Mínguez, C., Romero-Carnicero, F. y Górriz-Gañán, C. (2008). *El vino en Pintia: nuevos datos y lecturas*. En F. Burillo Mozota (Ed.), *VI Simposio sobre Celtíberos: Ritos y Mitos*. Fundación Segeda-Centro de Estudios Celtibéricos.
- Scacco, A., Oliva, D., Di Maio, S., Polizzotto, G., Genna, G., Tripodi, G., Lanza, C. A. y Verzerad, A. (2012). Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their influence on the quality of Cataratto, Inzolia and Grillo white wines. *Food Research International*, 46, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.038>
- Schuller, D., Cardoso, F., Sousa, S., Gomes, P., Gomes, A. C., Santos, M. A. S. y Casal, M. (2012). Genetic diversity and population structure of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from different grape varieties and winemaking regions. *PLoS ONE*, 7, 32 507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032507>
- Schvarczová, E. V. A., Štefániková, J., Jankura, E. y Kolek, E. (2017). Selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of typical Pinot Gris wines. *Journal of Food and Nutrition Research*, 56, 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.03.004>
- Schwartz, D. C. y Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37, 65-67. [https://doi.org/10.1016/00928674\(84\)90301-5](https://doi.org/10.1016/00928674(84)90301-5)
- Scienza, A. y Valenti, L. (1999). *Vitigni Antichi della Lombardia*. Ed. Università degli Studi di Milano.
- Setati, M. E., Jacobson, D., Andong, U.-C. y Bauer, F. (2012). The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One*, 7: e52609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052609>
- Setati, M. E., Jacobson, D. y Bauer, F. F. (2015). Sequence-based analysis of the *Vitis vinifera* L. cv Cabernet Sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01358>
- Settanni, L., Sannino, C., Francesca, N., Guarcello, R. y Moschetti, G. J. (2012). Yeast ecology of vineyards within Marsala wine area (western Sicily) in two consecutive vintages and selection of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114, 606-614. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.07.010>
- Shendure, J. y Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26, 1135-1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>
- Sipiczki, M., Romano, P., Capece, A. y Paraggio, M. (2004). Genetic segregation of natural *Saccharomyces cerevisiae* strains derived from spontaneous

- fermentation of Aglianico wine. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1169-1175. <http://doi.org/10.1111/j.13652672.2004.02254.x>
- Sotés, V. (2021). Erosión genética de las variedades de vid cultivadas en España. *Terruños*, 31, 20-29.
- Stefanini, I., Dapporto, L., Legras, J. L., Calabretta, A., Di Paola, M., De Filippo, C., Viola, R., Capretti, P., Polsinelli, M., Turillazzi, S. y Cavalieri, D. (2012). Role of social wasps in *Saccharomyces cerevisiae* ecology and evolution. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 13 398-13 403. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208362109>
- Strauss, M. L., Jolly, N. P., Lambrechts, M. G. y Van Rensburg, P. (2001). Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 182-90. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01379.x>
- Subden, R., Husnik, J., Van Twest, R., Van Der Merwe, G. y Van Vuuren, H. (2003). Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula ice wine must. *Food Research International*, 36, 747-751. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00034-6)
- Sun, Y., Guo, J., Liu, F. y Liu, Y. (2014). Identification of indigenous yeast flora isolated from the five winegrape varieties harvested in Xiangning, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(3). <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0105-0>
- Sun, Y., Qin, Y., Pei, Y., Wang, G. C., Lucy, C. M., Bisson, L. y Yanlin Liu, Y. (2017). Evaluation of Chinese *Saccharomyces cerevisiae* wine strains from different geographical origins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 68, 73. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.16059>
- Suzuki, S., Ono, N., Furusawa, C., Ying, B.W. y Yomo, T. (2011). Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. *PLoS One*, 6, e19534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019534>.
- Suzzi, G., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A., Perpetuini, G. y Tofalo, R. (2012). Effect of grape indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains on Montepulciano d'Abruzzo red wine quality. *Food Research International*, 46(1), 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.046>
- Tello, J., Cordero-Bueso, G., Aporta, I., Cabellos, J. M. y Arroyo, T. (2012). Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 302-315. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x>
- Terroaristas. (10 de noviembre de 2020). En busca de la diversidad perdida. Recuperación de variedades minoritarias en Castilla y León. Recuperado de:

<http://terroaristas.com/2020/11/10/en-busca-de-la-diversidad-perdida-recuperacion-de-variedades-minoritarias-en-castilla-y-leon/>

- This, P., Lacombe, T. y Thomas, M. R. (2006). Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22(9), 511-519. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008>
- Tofalo, R., Torriani, S., Chaves López, C., Martuscelli, M., Paparella, A. y Suzzi, G. (2007). A survey of *Saccharomyces* populations associated with wine fermentations from the Apulia region (South Italy). *Annals of Microbiology*, 57, 545-552. <https://doi.org/10.1007/BF03175353>
- Torrija, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M. y Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79, 345-352. <https://doi.org/10.1023/A:1012027718701>
- Tristezza, M., Vetrano, C., Bleve, G., Spano, G., Capozzi, V., Logrieco, A., Mita, G. y Grieco, F. (2013). Biodiversity and safety aspects of yeast strains characterized from vineyards and spontaneous fermentations in the Apulia Region, Italy. *Food Microbiology*, 36, 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.001>
- Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Grieco, F., Mita, G. y Grieco, F. (2014). Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of Susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *International Journal of Microbiology*, 10, 897-928. <https://doi.org/10.1155/2014/897428>
- Tronchoni, J., Morales, P. y González, R. (2017). Aplicación de levaduras no *Saccharomyces* en enología. *Acenología*. Recuperado de: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/aplicacion_levaduras_no_saccharomyces_cienc0817.htm
- Tufariello, M., Capone, S. y Siciliano, P. (2012). Volatile components of Negroamaro red wines produced in Apulian Salento area. *Food Chemistry*, 132, 2155-2164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.122>
- Urso, R., Rantsiou, K., Dolci, P., Rolle, L., Comi, G. y Cocolin, L. (2008). Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1053-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00364.x>
- Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. y Dequin, S. (2007). Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 317-329. <http://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00161.x>

- Van Breda, V., Jolly, N. y Wyka, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 2-3, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>
- Varela, C., Dry, P. R., Kutyna, D. R., Francis, I. L., Henschke, P. A., Curtin, C. D. y Chambers, P. J. (2015). Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Foreword to the Special Edition of the Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 670-679. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12187>
- Varela, C., Sengler, F., Solomon, M. y Curtin, C. (2016). Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chemistry*, 209, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>
- Varela, C. y Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111-128. <https://doi.org/10.1002/yea.3219>
- Vaudano, E., Quintero, G., Costantini, A., Pulcini, L., Pessione, E. y García-Moruno, E. (2019). Yeast distribution in Grignolino grapes growing in a new vineyard in Piedmont and the technological characterization of indigenous *Saccharomyces* spp. strains. *International Journal of Food Microbiology*, 289, 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.016>
- Viala, P. y Vermorel, V. (1902-1910). *Traité Général d' Ampélographie*. Masson et Cie.
- Vicente, A. (2017). Efectos del riego moderado y el aclareo de racimos en el comportamiento fisiológico, agronómico y cualitativo de *Vitis vinifera* L. cv. Verdejo. [Tesis doctoral]. Universidad de Valladolid.
- Vigentini, I., Fracassetti, D., Picozzi, C. y Foschino, R. (2009). Polymorphisms of *Saccharomyces cerevisiae* genes involved in wine production. *Current Microbiology*, 58, 211-218. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9310-x>
- Vigentini, I., De Lorenzis, G., Fabrizio, V., Valdetara, F., Faccincani, M., Panont, A. C., Picozzi, C., Imazio, S., Failla, O. y Foschino, R. (2015). The vintage effect overcomes the *terroir* effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepo Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology*, 161, 362-373. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000004>
- Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A. y Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular Ecology*, 21, 5404-5417. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05732.x>
- Wang, C., García-Fernández, D., Mas, A. y Esteve-Zarzoso, B. (2015). Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing,

- quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1156. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01156>
- Weiss, M. M., Hermsen, M. A. J. A., Meijer, G. A., Van Grieken, N. C. T., Baak, J. P. A., Kuipers, E. J. y van Diest, P. J. (1999). Comparative genomic hybridisation. *Journal of Clinical Pathology. Molecular Pathology*, 52, 243-251. <https://doi.org/10.1136/mp.52.5.243>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En Innis, Gelfand, Shinsky y White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322. Academic Press. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Yanahida, F., Ichinose, F., Shinohara, T. y Goto, S. (1992). Distribution of wild yeasts in the white grape varieties at central Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 38, 501-504. <https://doi.org/10.2323/jgam.38.501>
- Yuste, J., Martín, J. P., Rubio, J. A., Hidalgo, E., Recio, P., Santana, J. C., Arranz, C. y Ortiz, J. (2006). Identification of autochthonous grapevine varieties in the germplasm collection at the ITA of «Castilla y León» in Zamadueñas Station, Valladolid. Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4(1). <https://doi.org/10.5424/sjar/2006041-175>
- Yuste, J. (2019). Variedades minoritarias: importancia, experiencia de recuperación en Castilla y León y perspectiva de futuro. *Tierras*, 273, 46-56.
- Zohary, D. (1995). Domestication of the Grapevine *Vitis vinifera* L. in the Near East. En Mc Govern, P. E.: *The origins and Ancient History of Wine*. Gordon and Breach.
- Zott, K., Miot-Sertier, C., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A. y Masneuf-Pomarede, I. (2008). Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.001>
- Zott, K., Thibon, C., Bely, M., Lonvaud-Funel, A., Dubourdieu, D. y Masneuf-Pomarede, I. (2011). The grape non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 210-215. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.026>

Anexo

González-Alonso, I., Walker, M.E., Vallejo-Pascual, M.E., Naharro-Carrasco, G and Jiraneck, V. (2021). Capturing yeast associated with grapes and spontaneous fermentations of the Negro Saurí minority variety from an experimental vineyard near León. *Scientific Reports*, 11, 3748. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83123-1>