



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**DOCTORADO EN BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA**

**TESIS DOCTORAL**

**La microbiota de viñedos de Castilla  
y León como capital natural  
generador de servicios ecosistémicos**

AUTOR:

**Isabel García Izquierdo**

DIRECTORES:

Mercedes Tamame González

Fernando Rodríguez López

Victor Colino Rabanal

**Salamanca, 2023**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y AMBIENTALES  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA (IBFG)



**LA MICROBIOTA DE VIÑEDOS DE CASTILLA Y LEÓN COMO  
CAPITAL NATURAL GENERADOR DE SERVICIOS  
ECOSISTÉMICOS**

Memoria para optar al Grado de Doctor  
en la Universidad de Salamanca

**TESIS DOCTORAL  
ISABEL GARCÍA IZQUIERDO  
SALAMANCA, 2023**



VNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA



10  
años

INSTITUTO  
DE BIOLOGÍA FUNCIONAL  
Y GENÓMICA

D. Fernando Rodríguez López, profesor Titular del Área de Economía Aplicada, Investigador en los Grupos de investigación de “Economía y Políticas Públicas”, “Grupo de Justicia, Sistema Penal y Criminología” y “Biodiversidad, Diversidad Humana y Biología de la Conservación” y Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales en la Universidad de Salamanca; D<sup>a</sup>. Mercedes Tamame González, Científico Titular (CSIC) en el Instituto de Biología Funcional y Genómica e IP del Grupo Regulación traduccional y Biotecnología de levaduras; y D. Víctor Colino Rabanal, investigador del Grupo de investigación en Economía y Políticas Públicas, así como en el Grupo de Investigación de Biodiversidad, Diversidad Humana y Biología de la Conservación en la Universidad de Salamanca

#### INFORMAN:

En calidad de directores de la Memoria de Tesis Doctoral cuyo título es: *LA MICROBIOTA DE VIÑEDOS DE CASTILLA Y LEÓN COMO CAPITAL NATURAL GENERADOR DE SERVICIOS ECOSISTÉMICOS*, realizada por la Graduada en Ciencias Ambientales y Posgraduada en Biología celular y molecular D<sup>a</sup>. Isabel García Izquierdo, consideran finalizado el trabajo y autorizan la presentación, a fin de que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente. Y para que así conste, firmamos el presente informe en Salamanca, a 19 de septiembre de 2023.

Vº Bº

D. Fernando Rodríguez

Vº Bº

D<sup>a</sup>. Mercedes Tamame

VºBº

D. Víctor Colino

## **A mi abuelo**

*“Usamos la naturaleza porque es valiosa,  
pero la perdemos porque es gratis”*

*Pavan Sukhdev*

## AGRADECIMIENTOS

Hace 5 años comencé un nuevo capítulo en la historia de mi vida. Capítulo que está a punto de finalizar y dejar su huella para siempre, dando pie a otro nuevo, en el que cómo no, la protagonista deberá hacer frente a nuevos retos, más o menos complicados, pero diferentes, al fin y al cabo.

¡Qué fácil parece escribir este pequeño apartado y qué difícil es en realidad! No podemos compararlo con el resto del trabajo (que madre mía...), pero aquí también se genera mucha incertidumbre y dudas. No te quieres olvidar de agradecer nada a nadie (es de bien nacido ser agradecido, ¿no?) y tampoco encuentras las palabras exactas. No obstante, allá voy.

Quiero comenzar agradeciendo este trabajo a mis tres directores: Mercedes, Fernando y Víctor. Os he dado mucha guerra y quebraderos de cabeza, pero espero que os haya dejado al menos una pequeña huella (para bien), al menos, una décima parte de lo que me habéis dejado vosotros a mí. Estos últimos meses han sido un tornado de emociones para todos, pero no estaría aquí si no fuera por vosotros. Gracias por darme esta enorme oportunidad. Gracias por cada enseñanza dentro y fuera de la tesis, a cualquier hora, siempre. Gracias por vuestra buena voluntad siempre para todo, incluso para saltar vallas si es necesario y aguantar que cante Manolo Escobar o Disney en los viajes (especialmente esto va por tí, Víctor). Gracias por la calma y escucharme siempre que ha sido necesario. Gracias por permitirme conocer lugares y personas maravillosas. Si adoraba la ciencia, gracias a vosotros tres, ahora más aún.

Para continuar, me gustaría agradecer el estar aquí a mis padres, con vuestra lucha, esfuerzo y trabajo constante, me habéis permitido lograr estudiar todo lo necesario, mantenerme económicamente siempre que lo he necesitado (la vida de la ciencia...) e inculcarme unos valores tremendos. Tampoco me puedo olvidar de mi media mitad, mi hermana, Celia. Todos juntos somos el tándem perfecto. Hemos superado grandes dificultades, enfermedades, incertidumbre y, nunca hemos perdido la esperanza. Sois el hombro sobre el que llorar, la compañía para reír y, en definitiva, mi HOGAR. Esta tesis es gracias a vosotros.

A toda mi familia, y en especial a los que no están (yayos, Fermín, Tein...).

A Isma, por no dejar que me caiga, levantarme siempre y apoyarme, vaya donde vaya, haga lo que haga. Elegí el mejor compañero de vida. Tu frase favorita es “a ver cuándo acabamos la tesis” y razón no te falta, porque la has sufrido conmigo y, al final, es un poco tuya.

A todos mis compañeros en esta aventura, no voy a poner diez mil nombres porque alguno me dejaría en el tintero, pero todos sabéis que os corresponde un trocito de este agradecimiento. A todos mis compañeros del IBFG (en especial a Rosana, a ti si tengo que nombrarte, gracias por tanto). Gracias por el apoyo moral que nos damos unos a otros, por los cafés, por las comidas, por las cenas fuera de nuestro nicho, por tantas y tantas horas compartidas, gracias. A mis compañeros de la Facultad de Ciencias Agrarias y Ambientales, aunque no nos entendamos muchas veces y tengamos humores muy

diferentes (no os juzgo, es lo que tiene que seáis físicos 😊), no me imagino este último año sin vosotros, gracias. A mis compañeros de la UCAV por los ánimos y la esperanza siempre.

A todos mis amigos, tanto de Medina como de Salamanca. Os prometo recuperar el tiempo perdido de todos estos años. No sabéis la suerte que tengo de teneros en mi vida. Sois mi otra familia.

Al equipo de I+D+i de Puratos, a la Organización COST Action y a todos mis compañeros allí. Gracias por permitirme vivir en Bélgica un sueño. Me llevo personas muy importantes, rincones de ensueño y un máster en cervezas.

Gracias en especial a todas las bodegas y viticultores que tan amablemente me acogieron y me permitieron recopilar muestras para este trabajo. Sin vosotros si que no hubiera sido posible.

Por último, gracias a mi ángel de la guarda, mi pedacito de cielo, mi abuelo. Ojalá hubieras podido llegar al final del camino a mi lado, pero sé que te fuiste muy orgulloso de que tu nieta era científica. Espero que sigas igual de orgulloso de mí ahora, hemos llegado al final, lo hemos conseguido. Te prometí dedicarte cada uno de mis logros... aquí va el primero.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	9
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	12
<i>Servicios ecosistémicos aportados por la microbiota en viñedos y vino: revisión</i> .....	12
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA MICROBIOTA Y EL VINO</b> .....	14
<b>TERROIR Y MICROBIOTA VÍNICA</b> .....	16
<b>SERVICIOS ECOSISTÉMICOS PRESTADOS POR LA MICROBIOTA EN VIÑEDOS Y VINOS</b> .....	19
1. Servicios ecosistémicos de aprovisionamiento.....	19
2. Servicios ecosistémicos de regulación.....	21
3. Servicios ecosistémicos culturales.....	23
<b>VALORACIÓN ECONÓMICA DE LOS SERVICIOS ECOSISTÉMICOS DE LA MICROBIOTA EN LOS VIÑEDOS Y EL VINO</b> .....	24
<b>GESTIÓN DE LOS VIÑEDOS Y SERVICIOS ECOSISTÉMICOS DE LA MICROBIOTA</b> .....	26
<b>HACIA UNA AGRICULTURA INTELIGENTE: LA MICROBIOTA COMO SOLUCIÓN NATURAL EN VIÑEDOS Y BODEGAS</b> .....	27
<b>REFERENCIAS</b> .....	29
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	47
<i>¿El paisaje circundante condiciona la microbiota presente en viñedos?</i> .....	47
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	47
<b>METODOLOGÍA</b> .....	48
1. <b>ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	48
2. <b>DISEÑO CUASIEXPERIMENTAL</b> .....	49
3. <b>ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS</b> .....	52
4. <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	54
<b>RESULTADOS</b> .....	54
<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
<b>REFERENCIAS</b> .....	60
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	65
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	68
<i>Servicios ecosistémicos aportados por el microbioma vitivinícola de Castilla y León</i> .....	68
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	68
<b>METODOLOGÍA</b> .....	69

1. <b>ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	69
2. <b>BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	71
<b>RESULTADOS</b> .....	72
<b>A. Core microbiano</b> .....	72
<b>B. Tipicidad microbiana</b> .....	73
<b>DISCUSIÓN</b> .....	75
<b>REFERENCIAS</b> .....	76
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>81</b>
<i>Análisis de la microbiota fúngica y aislamiento de levaduras de mostos de bodegas de Castilla y León</i> .....	<b>81</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	81
Biodiversidad de levaduras en los mostos de uva .....	82
Tendencias en la selección de levaduras para producir vinos innovadores.....	85
Aislamiento e identificación de levaduras .....	87
<b>OBJETIVOS</b> .....	88
<b>METODOLOGÍA</b> .....	89
1. Medios de cultivo .....	89
2. Aislamiento de levaduras de mostos sin fermentar y fermentados.....	89
3. Identificación de las especies de levadura aisladas en cultivo .....	90
4. Discriminación intraespecífica de cepas de levadura.....	92
5. Distinción de cepas <i>Saccharomyces</i> por secuencias interdelta.....	94
6. Análisis de la microbiota fúngica de mostos sin fermentar (micobioma).....	95
<b>RESULTADOS</b> .....	96
1. Levaduras aisladas de mostos y mostos fermentados en laboratorio .....	96
2. Análisis metataxonómico de la microbiota fúngica de los mostos.....	105
<b>DISCUSIÓN</b> .....	110
1. Respecto al aislamiento de levaduras en medios de cultivo .....	110
2. Respecto al análisis del micobioma de los mostos .....	111
<b>REFERENCIAS</b> .....	112
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>121</b>



## JUSTIFICACIÓN

La microbiota es la gran protagonista en los procesos de fermentación alcohólica y, en su caso, maloláctica del vino. No sólo hace posible el proceso, sino que proporciona caracteres diferenciadores al vino y, por tanto, facilita su producción, sus peculiaridades, su identidad y, por consiguiente, su valor. Todo ello puede visualizarse desde una perspectiva agregada, poniendo el foco en el volumen de vino que se vende en los diferentes mercados, o bien desde una perspectiva del aporte de los ecosistemas, en la cual el foco se sitúa en la forma en la que contribuyen los distintos elementos de la naturaleza para generar valor a la sociedad a través de distintos servicios ecosistémicos. En este trabajo, el análisis se enfoca en la microbiota, como elemento de la naturaleza, y su capacidad para generar servicios ecosistémicos de aprovisionamiento, regulación y culturales, cuyo valor se puede estimar para tomar mejores decisiones, tanto privadas como públicas.

El concepto de *terroir* incluye a las comunidades microbianas asociadas a ambientes y procesos vitivinícolas, pues pueden influir en las cualidades organolépticas propias de los vinos de una región y en la salud de los viñedos ([Belda et al., 2017](#); [Carrau et al., 2020](#); [Pretorius, 2020](#)). Parte de las especies de esa comunidad microbiana llega desde el viñedo a las bodegas y está presente durante los procesos de fermentación alcohólica y/o maloláctica aportando caracteres diferenciadores al vino, razón por la que han sido ampliamente estudiadas ([Capozzi et al., 2015](#); [Carpena et al., 2020](#); [Mendes Ferreira & Mendes-Faia, 2020](#); [Mas & Portillo, 2022](#)). El denominado en su conjunto *microbioma del vino* se ha estudiado de forma más exhaustiva durante los últimos años, gracias a la implementación de técnicas de secuenciación de alto rendimiento (*high throughput sequencing*, HTS), empleando equipos de ultrasecuenciación de ADN de nueva generación (*next generation sequencing*, NGS) ([Liu et al., 2019](#); [Cruz-Silva et al., 2023](#)). Dichas técnicas permiten determinar la biodiversidad de especies que conforman las comunidades microbianas asociadas a distintos ambientes vitivinícolas, comunidades que pueden sufrir variaciones en la composición de especies como consecuencia de perturbaciones edafoclimáticas, de la gestión agronómica de los viñedos e incluso de la presencia o ausencia de vegetación circundante a los mismos ([Hartman et al., 2018](#); [Miura et al., 2019](#); [Ladin et al., 2021](#); [Naidoo et al., 2022](#); [Steiner et al., 2023](#)). De hecho, dentro de este marco de análisis, una de las hipótesis analizadas en este trabajo es si las comunidades microbianas asociadas al suelo, plantas de vid y uvas de los viñedos de cuatro Denominaciones de Origen de Castilla y León ubicados a lo largo de la cuenca del río Duero varían en biodiversidad de especies en función de la presencia o ausencia de bosque circundante, puesto que esos viñedos se encuentran en ocasiones cerca de bosques de coníferas y/o fagáceas. Esta variabilidad podría correlacionarse con el estado de salud del viñedo, o con diferencias en las particularidades de los vinos debidas a la biodiversidad de especies de levaduras presentes durante las fermentaciones de los mostos en las bodegas.

El **objetivo principal** de este trabajo fue construir un marco de análisis que permitiese realizar la identificación y valoración del capital natural microbiano vinculado al sector vitivinícola de Castilla y León.

Con ese fin, se propusieron cuatro **objetivos específicos**:

1. Analizar las correlaciones entre algunas variables bióticas (tipos de vides, uvas, flora circundante) y abióticas (clima, tipo de terreno, técnicas de cultivo, paisaje) con la composición porcentual de especies del microbioma asociado a cada viñedo, evaluando su posible influencia y valor en los servicios ecosistémicos.
2. Investigar si se detectan microorganismos fitopatógenos en la microbiota de los suelos o plantas de vid, así como especies microbianas que podrían ejercer una función de desplazamiento de otras alterantes en los ecosistemas de varios viñedos de Castilla y León, con el correspondiente efecto en forma de servicios ecosistémicos de regulación.
3. Construir un marco de análisis que sea de utilidad para la valoración de los servicios ecosistémicos asociados a especies microbianas beneficiosas para la fermentación vínica, presentes en viñedos y/o en mostos, así como de especies fúngicas o bacterianas con capacidades potenciales para actuar como agentes de control biológico en viñedos ubicados en tres zonas geográficas de Castilla y León.
4. Analizar la microbiota de los mostos y aislar e identificar levaduras a partir de muestras proporcionadas por bodegas de cuatro Denominaciones de Origen (D.O.), con el fin de identificar algunas cepas nuevas que pudiesen emplearse para la obtención de vinos innovadores en Castilla y León.

## REFERENCIAS

- Belda, I.; Zorraonandia, I.; Perisin, M.; Palacios, A.; Acedo, A. From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front. Microbiol.* **2017** 8, 821. [DOI: 10.3389/fmicb.2017.00821](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821)
- Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. *Microbiol. Res.* **2015** 181, 75-83. [DOI: 10.1016/j.micres.2015.10.005](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.10.005)
- Carpena, M.; Fraga-Corral, M.; Otero, P.; Nogueira, R.A.; Garcia-Oliveira, P.; Prieto, M.A.; Simal-Gandara, J. Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods* **2020** 10(1), 51. [DOI: 10.3390/foods10010051](https://doi.org/10.3390/foods10010051)
- Carrau, F.; Boido, E.; Ramey, D. Yeasts for low input winemaking: Microbial terroir and flavor differentiation. *Adv. Appl. Microbiol.* **2020** 111, 89-121. [DOI: 10.1016/bs.aambs.2020.02.001](https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.02.001)
- Cruz-Silva, A.; Laureano, G.; Pereira, M.; Dias, R.; Moreira da Silva, J.; Oliveira, N.; Gouveia, C.; Cruz, C.; Gama-Carvalho, M.; Alagna, F.; Duarte, B.; Figueiredo, A. A new perspective for vineyard terroir identity: looking for microbial indicator species by long read nanopore sequencing. *Microorganisms* **2023** 11(3), 672. [DOI: 10.3390/microorganisms11030672](https://doi.org/10.3390/microorganisms11030672)
- Ferreira, A.M.; Mendes-Faia, A. The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods* **2020** 9(9), 1231. [DOI: 10.3390/foods9091231](https://doi.org/10.3390/foods9091231)
- Hartman, K.; van der Heijden, M.G.A.; Wittwer, R.A.; Banerjee, S.; Walser, J.C.; Schlaeppli, K. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*. **2018** 16(6), 14. [DOI: 10.1186/s40168-017-0389-9](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9)

- Ladin, Z.S.; Ferrell, B.; Dums, J.T.; Moore, R.M.; Levia, D.F.; Gregory Shriver, W.; D'Amico, V.; Trammell, T.L.E.; Setubal, J.C.; Wommack, K.E. Assessing the efficacy of eDNA metabarcoding for measuring microbial biodiversity within forest ecosystems. *Sci. Rep.* **2021** *11*, 1629. [DOI: 10.1038/s41598-020-80602-9](https://doi.org/10.1038/s41598-020-80602-9)
- Liu, D.; Zhang, P.; Chen, D.; Howell, K. From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front. Microbiol.* **2019** *10*, 2679. [DOI: 0.3389/fmicb.2019.02679](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679)
- Mas, A.; Portillo, M.C. Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial terroir complexity: A mini-review. *Int. J. Food Microbiol.* **2022** *367*, 109592. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109592](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109592)
- Mendes Ferreira, A.; Mendes-Faia, A. The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods* **2020** *9(9)*, 1231. [DOI: 10.3390/foods9091231](https://doi.org/10.3390/foods9091231)
- Miura, T.; Sánchez, R.; Castañeda, L.E.; Godoy, K.; Barbosa, O. Shared and unique features of bacterial communities in native forest and vineyard phyllosphere. *Ecol. Evol.* **2019** *9(6)*, 3295-3305. [DOI: 10.1002/ece3.4949](https://doi.org/10.1002/ece3.4949)
- Naidoo, Y.; Valverde, A.; Pierneef, R.E.; Cowan, D.A. Differences in precipitation regime shape microbial community composition and functional potential in Namib Desert Soils. *Microb. Ecol.* **2022** *83(3)*, 689-701. [DOI: 10.1007/s00248-021-01785-w](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01785-w)
- Pretorius, I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Res.* **2020** *20(1)*, foz084. [DOI: 10.1093/femsyr/foz084](https://doi.org/10.1093/femsyr/foz084)
- Steiner, M.; Pingel, M.; Falquet, L.; Giffard, B.; Griesser, M.; Leyer, I.; Preda, C.; Uzman, D.; Bacher, S.; Reineke, A. Local conditions matter: minimal and variable effects of soil disturbance on microbial communities and functions in European vineyards. *PLoS One* **2023** *18(1)*, e0280516 [DOI: 10.1371/journal.pone.0280516](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280516)

# CAPÍTULO 1

## *Servicios ecosistémicos aportados por la microbiota en viñedos y vino: revisión*

*Nota: artículo recibido en la revista Agronomy en septiembre de 2023 (en revisión)*

### RESUMEN

En este artículo se revisa el estado de los conocimientos sobre el papel de la microbiota en la prestación de servicios ecosistémicos de producción, regulación y culturales en el sector vitivinícola. Este proceso comenzó con la domesticación de la vid en Asia hace 11.000 años, aunque no fue hasta el siglo XIX cuando la enología se estableció como disciplina científica, gracias a las investigaciones de Louis Pasteur. Recientemente, los avances en las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) han permitido identificar la dinámica microbiana durante la vinificación, ayudando a los enólogos a comprender y controlar mejor el proceso de fermentación. La microbiota del viñedo y del vino se presenta, por tanto, como un activo natural que produce beneficios a las personas, que pueden etiquetarse o clasificarse como servicios ecosistémicos de aprovisionamiento (características del vino y su producción), de regulación (almacenamiento de carbono, regulación de la calidad del suelo, control biológico de plagas y enfermedades...) o culturales (valores estéticos de los paisajes de viñedos, disfrute académico del vino, sensación de añoranza en las regiones vitivinícolas...). Los servicios ecosistémicos prestados por la microbiota pueden valorarse en términos monetarios, preferiblemente operando técnicas de valoración sobre cadenas lógicas como las sugeridas por el marco SEEA-EA. El documento concluye con una revisión de las prácticas de gestión que pueden aumentar el valor de los servicios ecosistémicos de la microbiota, y el papel de la agricultura inteligente en esta tarea.

### INTRODUCCIÓN

La transformación humana de la naturaleza a escala global, sobre todo en las últimas décadas, ha provocado un marcado descenso de los indicadores relacionados con la salud de los ecosistemas y la biodiversidad ([IPBES, 2019](#)) y, con ello, una disminución de los beneficios que todos los humanos obtenemos de ella, los servicios ecosistémicos. Los servicios ecosistémicos pueden definirse como las condiciones y procesos a través de los cuales los ecosistemas naturales y las especies que los componen sostienen y hacen posible la vida humana ([Daily, 1997](#); [Fu et al., 2013](#)). Las principales clasificaciones los agrupan en tres grandes categorías: de aprovisionamiento, de regulación y culturales ([Haines-Young & Potschin, 2018](#); [SEEA-EA, 2021](#)). El concepto de servicios ecosistémicos es la principal herramienta para calcular el valor del capital natural ([Costanza et al., 1997](#)).

Minimizar las consecuencias negativas de estas transformaciones sobre el medio ambiente requiere que cada uno de los sectores productivos adopte prácticas que reduzcan (o incluso neutralicen) su impacto neto sobre los ecosistemas y la biodiversidad, y que, dentro de su ámbito de actuación, puedan maximizar el flujo de beneficios que obtenemos de la naturaleza. Uno de los sectores productivos con mayor impacto es la agricultura, a la que se le pide que satisfaga la demanda de alimentos de una población mundial creciente ([Robertson & Swinton, 2005](#); [Ali & Dahlhaus, 2022](#)). De hecho, uno de los principales retos de la agricultura del siglo XXI es la generación de paisajes multifuncionales en los que se produzcan alimentos (servicio ecosistémico de aprovisionamiento) y se promueva el suministro de otros muchos servicios de regulación y culturales ([Huang et al., 2015](#); [TEEB, 2018](#)).

El sector vitivinícola no es ajeno a este objetivo. En la actualidad, los viñedos ocupan 7,3 millones de hectáreas en todo el mundo, produciendo hasta 260 millones de hectolitros para satisfacer un consumo mundial estimado en 236 millones de hectolitros ([OIV, 2022](#)). En diferentes regiones vitivinícolas se están realizando esfuerzos en forma de proyectos piloto para integrar los servicios ecosistémicos, la biodiversidad y la multifuncionalidad como elementos relevantes en la toma de decisiones sobre la gestión de los viñedos ([Bindi & Nunes, 2016](#); [Winkler et al., 2017](#); [Winter et al., 2018](#); [García et al., 2018](#); [Paiola et al., 2020](#); [Candiago et al., 2023](#)). Sin embargo, a pesar de ser un proveedor de servicios ecosistémicos relevantes, el papel de la microbiota es comúnmente ignorado en la mayoría de los desarrollos ([Han et al., 2023](#)).

Dado el potencial de aportar soluciones basadas en la naturaleza dentro del paradigma de una agricultura no sólo respetuosa con el medio ambiente sino también productora de naturaleza, esta revisión pretende recopilar y analizar críticamente el estado del conocimiento sobre el papel de la microbiota en la provisión de servicios ecosistémicos en el sector vitivinícola, especialmente en los viñedos, pero también en las bodegas. La revisión se estructura en varios apartados que incluyen una visión histórica de los principales avances científicos sobre microbiota y vino, el concepto de terroir y la biogeografía de la microbiota, los servicios ecosistémicos que proporciona la microbiota tanto en viñedos como en bodegas, el impacto que los sistemas de gestión agrícola tienen sobre esta microbiota y por tanto sobre los servicios ecosistémicos, y las metodologías para la cuantificación de esta contribución en términos económicos. Por último, se discuten el potencial y las limitaciones de este enfoque, las principales líneas de investigación futura y las posibles aplicaciones.

## EVOLUCIÓN DEL CONOCIMIENTO SOBRE LA MICROBIOTA Y EL VINO

Hace aproximadamente 11.000 años, las vides se domesticaron en Asia occidental para producir uvas de mesa y de vino ([Dong et al., 2023](#)) además, existen pruebas de prácticas enológicas de hace unos 7.000 años (5400-5000 a.C.) en la región del Cáucaso meridional ([McGovern et al., 2017](#)). Probablemente, estos primeros vinos fueron la combinación fortuita de la química y la biología, concretamente de la microbiota presente en las uvas ([Belda et al., 2017](#)). Las variedades domesticadas de Asia occidental se extendieron a otras partes del mundo a través de las primeras comunidades agrícolas. En Egipto, los restos arqueológicos aportan pruebas del cultivo de la vid en el río Nilo desde el periodo predinástico (4000-3100 a.C.) ([Guasch Jané et al., 2013](#)). Las cerámicas encontradas en China (región de Jiahu) datadas de hace 4000 años, contenían restos de ácido tartárico y tartrato aportando una prueba de los procesos de fermentación y almacenamiento del vino ([McGovern et al., 2004](#); [Li & Wang, 2022](#)). En Europa, el cultivo de la vid se extendió a lo largo de las rutas comerciales, y ya en el tercer milenio a.C. se plantaron viñedos en la Península Ibérica, incluso antes de la llegada de los fenicios ([Stevenson, 1985](#)). En la antigua Grecia (800 a.C.), el vino se consideraba un alimento básico de la vida cotidiana, lo que impulsó la plantación de vides en sus colonias. Sin embargo, la domesticación más avanzada del vino tuvo lugar en el Imperio Romano. Los romanos ya realizaron los primeros injertos en el siglo I a.C. ([This et al., 2006](#)), cuando empezaron a utilizar no sólo las tradicionales ánforas, sino también cubas de madera (51 a.C.) para conservar el vino. Sin embargo, por lo que respecta a la microbiota, aún no ha sido posible encontrar muestras de microorganismos anteriores al año 1000 a.C., siendo *Saccharomyces cerevisiae* la primera levadura fermentativa identificada ([Cavaliere et al., 2003](#); [da Silva Fernandes et al., 2022](#)).

Aunque la enología ha evolucionado históricamente junto con la producción y elaboración del propio vino, se estableció como disciplina científica en el siglo XIX con las investigaciones llevadas a cabo por Pasteur sobre el papel de los microorganismos en la fermentación del vino. Así, Pasteur obtuvo la primera patente sobre fermentación alcohólica en 1857 y describió el papel de las cepas de levadura en la producción de diferentes vinos ([Pasteur, 1866](#); [Carrau et al., 2015](#)). También estudió las enfermedades de la viticultura y obtuvo una patente sobre la conservación del vino mediante pasteurización ([Cavaillon & Legout, 2022](#)). Gracias a su contribución, en 1890 Hermann Müller llevó a cabo la primera inoculación de mosto de uva con un cultivo puro de levadura, dando lugar así al concepto de fermentación controlada, que ha sobrevivido hasta nuestros días con ciertas mejoras en el control y la fiabilidad del proceso ([Marsit & Dequin, 2015](#)). La enología ha seguido evolucionando desde entonces, estudiando las interacciones de la microbiota tanto en la fermentación alcohólica como en la fermentación maloláctica para la producción de vino ([Belda et al., 2016](#); [Englezos et al., 2022](#)). Otro esfuerzo de investigación se ha centrado en el proceso de domesticación de cepas de levaduras enológicas, es decir, la selección artificial de cepas con características deseables mejoradas y adaptadas a ambientes con diferentes factores de estrés como cambios de temperatura, acidez o estrés oxidativo entre otros ([Pretorius, 2000](#); [Bauer & Pretorius, 2000](#)). Actualmente sabemos que *S. cerevisiae* destaca entre el gran número de especies de levaduras implicadas en las diferentes etapas de la fermentación, por su elevada capacidad fermentativa, tolerancia al etanol y fuerte resistencia a la toxicidad de

diferentes metabolitos, pudiendo así prevalecer en las etapas finales de la fermentación ([Querol et al., 2018](#); [Ortiz-Álvarez et al., 2021](#); [Gonzalez & Morales, 2022](#); [Bai et al., 2022](#)). También se están empleando mucho en enología levaduras de otras especies, conocidas como *no Saccharomyces*, principalmente en fermentaciones mixtas ([Jolly et al., 2018](#)). Para lograr combinar propiedades deseables de distintas cepas de *Saccharomyces*, se han seleccionado híbridos naturales de *S. cerevisiae* con otras especies del mismo género y también se han obtenido híbridos sintéticos no modificados genéticamente (organismos no OMG) que ya se han empleado como cultivos iniciadores (fermentos puros o, en inglés, *starters*) para fermentaciones controladas ([Pérez-Torrado et al., 2017](#)). Así, híbridos de *S. cerevisiae* x *S. uvarum* se generaron con diferentes métodos ([Sipiczki, 2008](#); [Origone et al., 2018](#)), para mejorar la tolerancia al frío ([Origone et al., 2018](#); [García-Ríos & Guillamón, 2019](#)).

En la actualidad, el uso de cultivos iniciadores está muy extendido en las bodegas, contribuyendo a modular el perfil aromático del vino gracias a la producción de determinadas enzimas, como la esterasa, la  $\beta$ -glucosidasa y las enzimas proteolíticas y pectinolíticas. Además, determinadas cepas pueden aumentar el contenido de glicerol o disminuir el contenido de alcohol de los vinos ([Sidari et al., 2021](#); [Mateo & Maicas, 2016](#)). Sin embargo, al mismo tiempo, el uso de cultivos iniciadores puede representar un riesgo para la pérdida de diversidad genética de las poblaciones de levaduras autóctonas de los mostos ([Chalvanti et al., 2020](#)).

En los últimos años, los investigadores han podido analizar las comunidades microbianas que colonizan distintos nichos ecológicos con alta resolución, incluyendo la presencia de microorganismos no cultivables y, basándose en la presencia de sus genomas especialmente, el uso de técnicas basadas en la secuenciación de alto rendimiento (HTS) y las técnicas “ómicas”, como la metataxonómica, metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica y metabolómica, han abierto un nuevo escenario en la investigación vitivinícola. Estas tecnologías proporcionan un potente enfoque para una comprensión más completa de la complejidad de las comunidades microbianas en diferentes nichos ambientales, ayudando a una mayor monitorización y diagnóstico entre otros aspectos ([Belda et al., 2017](#); [Belda et al., 2021](#)). Así, los estudios basados en HTS han permitido identificar la dinámica microbiana durante la vinificación, ayudando a los enólogos a comprender y controlar mejor el proceso de fermentación y a mejorar la calidad del producto final ([Bokulich et al., 2012](#); [Portillo & Mas, 2016](#); [Stefanini et al., 2016](#); [Sirén et al., 2019](#); [Li et al., 2022](#)). Los avances son aún mayores en el papel que desempeña la microbiota en los viñedos. Estas técnicas han permitido la identificación y caracterización de diversas poblaciones microbianas en el ecosistema del viñedo, incluyendo bacterias, hongos, arqueas y otros microorganismos que juegan un papel esencial en la salud y productividad del viñedo ([Cobos et al., 2022](#)). Las tecnologías ómicas permiten conocer el potencial funcional de las comunidades microbianas en procesos como el ciclo de los nutrientes, la supresión de enfermedades o las interacciones planta-microbio ([Aleynova et al., 2022](#)). Esta investigación ha ayudado a entender cómo los microorganismos beneficiosos pueden mejorar la salud de las plantas, la absorción de nutrientes y la resistencia general a los factores de estrés ambiental ([Larsen et al., 2023](#)). Además, las técnicas NGS han ayudado a descifrar los componentes microbianos que contribuyen a las características distintivas de los vinos de diferentes regiones, el *terroir* ([Fabres et al., 2017](#); [Gobbi et al., 2022](#); [Fernandes et al., 2023](#)). En general, la información obtenida a

través de estos métodos tiene el potencial de transformar las prácticas de gestión de los viñedos y contribuir a una producción de vino más sostenible y eficiente ([Liu et al., 2019](#); [Perpetuini et al., 2022](#); [Griggs et al., 2021](#)).

## **TERROIR Y MICROBIOTA VÍNICA**

Al catar un vino, algunos de los primeros aspectos diferenciadores percibidos (aromas, acidez, color, etc.) están relacionados con la zona en la que se producen las interacciones fisicoquímicas, biológicas y culturales del viñedo: el *terroir* ([van Leeuwen & Seguin, 2006](#); [Liu et al., 2019](#); [Giffard et al., 2022](#)). Este término, no exento de polémica, se utiliza con frecuencia a pesar de su escasa comprensión generalizada (Lewin, 2010; [Pretorius, 2020](#)). En la definición tradicional de la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV), el *terroir* se refería inicialmente a una "zona en la que se desarrolla el conocimiento colectivo de las interacciones entre el entorno físico y biológico identificable y las prácticas vitivinícolas aplicadas", incluidas las características específicas del suelo, la topografía, el clima, el paisaje y la biodiversidad (Reglamento OIV/VITI 333/2010). Dados los avances en la comprensión del papel de la microbiota en la diferenciación del vino y del viñedo, la literatura reciente ya la considera parte integrante de este *terroir* ([Martins et al., 2013](#); [Gilbert et al., 2014](#); [Cruz-Silva et al., 2023](#)).

En términos biogeográficos, dado que los microorganismos operan en un nicho ecológico particular con unas condiciones ambientales específicas, es de esperar encontrar diferencias espaciales en las comunidades microbianas presentes en cada región ([Martiny et al., 2006](#); [Bokulich et al., 2014](#); [Li et al., 2022](#)). De hecho, se ha demostrado la existencia de una biogeografía microbiana asociada a los viñedos. La distribución de la microbiota está influida por factores geográficos, medioambientales y de gestión, generando un *terroir microbiano* característico de cada región que aporta cualidades distintivas a los vinos ([Gayevski & Goddard, 2012](#); [Vadour et al., 2014](#); [Burns et al., 2015](#); [Zarraonandia et al., 2015](#); [Liu et al., 2020](#); [Rivas et al., 2021](#); [Larsen et al., 2023](#)) (Figura 1.1). La investigación sobre este *terroir microbiano* ha demostrado que algunas OTU (unidades taxonómicas operativas) del microbioma son capaces de actuar como firma geográfica de un viñedo o de una región vinícola ([Mezzasalma et al., 2018](#)).

Las diferencias en los patrones espaciales de las comunidades microbianas de los viñedos se manifiestan a diferentes escalas. Así, se han observado diferencias considerables entre viñedos de distintas partes del mundo ([Tronchoni et al., 2022](#)) y entre regiones vitícolas ([Taylor et al., 2014](#); [Morrison-Whittle & Goddard, 2018](#); [Kioroglou et al., 2019](#); [Kamilari et al., 2021](#)). Los factores paisajísticos y las variaciones locales en el nicho ecológico también conducen a diferencias significativas a escala local ([Setati et al., 2015](#); [Portillo et al., 2016](#); [Knight et al., 2020](#); [Yan et al., 2022](#)). Se ha comprobado la existencia de una variabilidad microbiana intraviñedo incluso superior a la existente entre distintas parcelas de viñedo ([Setati et al., 2012](#); [Chalvantzis et al., 2021](#)). Es decir, es posible identificar una jerarquía dentro de las distancias espaciales, siguiendo una amplia tendencia según la cual



cuanto mayor es la distancia, más diversa es la microbiota ([Gobbi et al., 2022](#)). Al mismo tiempo, se ha descrito globalmente un núcleo común de géneros, o incluso de especies ([Tronchoni et al., 2022](#)) (Figura 1.1).

El aislamiento por distancia geográfica está en cierto modo condicionado por la heterogeneidad ambiental, que define los patrones espaciales de la microbiota en los viñedos. Las diferencias climáticas y edáficas entre zonas contribuyen a las disimilitudes de la comunidad microbiana entre viñedos ([Zhou et al., 2021](#); [Wei et al., 2022](#)). A escala del paisaje vitícola, los factores que subyacen a estos patrones espaciales también están relacionados con las prácticas vitícolas ([Setati et al., 2015](#); [Kecsseméti et al., 2016](#); [Grangateau et al., 2017](#); [Morrison-Whittle et al., 2017](#)), la variedad de uva ([Bokulich et al., 2014](#); [Portillo et al., 2016](#); [Tronchoni et al., 2022](#)) o las condiciones microclimáticas ([Portillo et al., 2016](#); [Knight et al., 2020](#); [Zhang et al., 2020](#); [Martins et al., 2020](#)). Los ecosistemas circundantes también parecen estar implicados en la composición de las comunidades microbianas de los viñedos. Así, los bosques cercanos conforman las comunidades fúngicas del viñedo, no sólo por las levaduras naturales que albergan, sino también por los insectos sociales (por ejemplo, las avispas) que actúan como vectores de transporte de microorganismos del bosque a las uvas ([Christiaens et al., 2014](#); [Miura et al., 2017](#); [Mozzachiodi et al., 2022](#); [Valentini et al., 2022](#)).

El microbioma de los viñedos también muestra diferencias significativas entre el suelo y las propias vides. El suelo actúa como principal reservorio de microbiota y muestra un cierto nivel de concurrencia con las diferentes partes de la vid (raíces, hojas, flores y uvas) ([Zarraonaindia et al., 2015](#); [Mezzasalma et al., 2018](#)). Mientras que la diversidad bacteriana disminuye del suelo a las partes aéreas ([Martins et al., 2013](#); [Andreolli et al., 2017](#)), el principal cambio en la diversidad específica fúngica se produce entre el suelo y la rizosfera ([Martínez-Diz et al., 2019](#)).

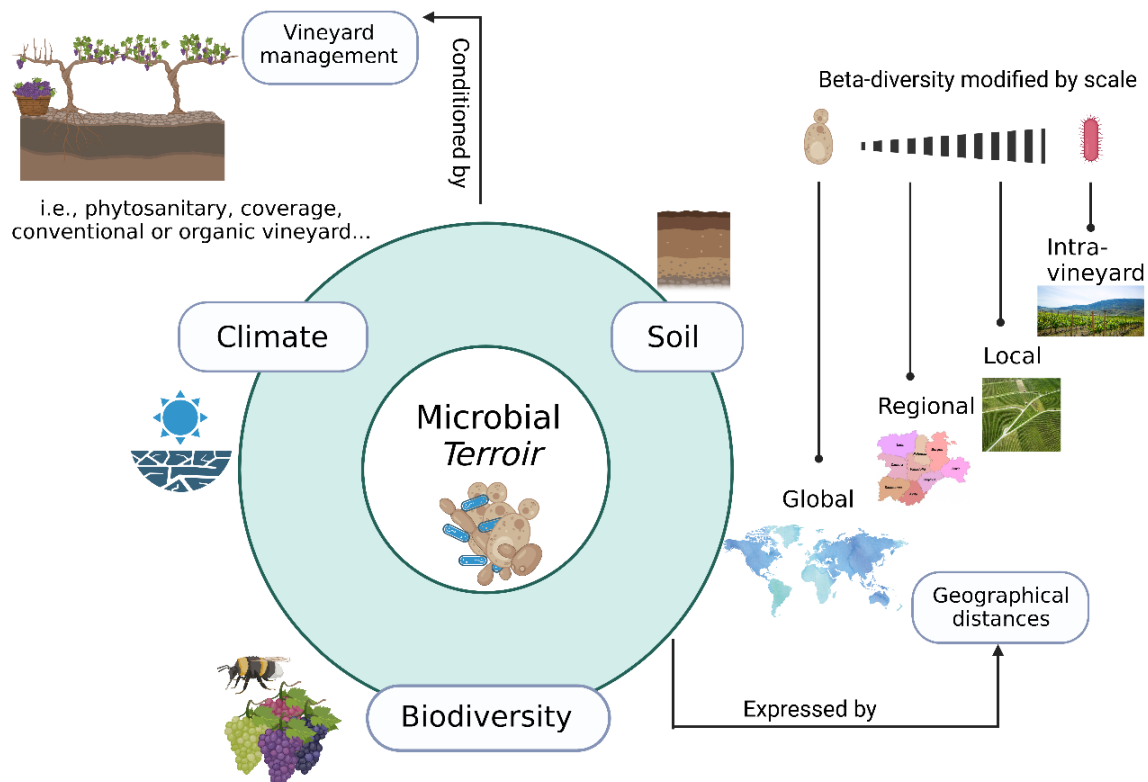
La variedad de vid también condiciona las comunidades microbianas de los viñedos. Por ejemplo, especies bacterianas como *Enterococcus*, *Massilia*, *Kocuria*, *Pseudomonadales* y *Pantoea* son más propensas a aparecer en variedades como Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon y Zinfandel, mientras que especies como *Bacillus*, *Turicibacter* y *Romboutsia* tienen una mayor prevalencia en Pinot Noir. En cuanto a las especies fúngicas, *Cladosporium*, *Phoma* y *Sporormiella* aparecen en Zinfander, Lon y Gem ([Zhang et al., 2020](#); [Cureau et al., 2021](#); [Bao et al., 2022](#)).

Los patrones espaciales de hongos y bacterias suelen diferir, lo que se explica en parte por las variaciones en las respuestas a los efectos medioambientales o a las prácticas de gestión de los viñedos ([Lauber et al., 2008](#); [Tedersoo et al., 2014](#); [Knight et al., 2015](#); [Bokulich et al., 2016](#); [Paolinelli et al., 2023](#); [Ghită et al., 2023](#)). Así, mientras que a escala global la distancia espacial explica la diversidad beta en ambos, el clima está más relacionado con la diversidad alfa en los hongos que en las bacterias ([Gobbi et al., 2022](#)), aunque algunas bacterias también responden a las variables climáticas ([Wei et al., 2022](#)). Además, la dispersión de los hongos por el viento es probablemente más limitada que la de las bacterias debido al mayor tamaño de las esporas en comparación con las células bacterianas ([Jones & Harrison, 2004](#); [Smets et al., 2016](#); [Miura et al., 2017](#)). Como resultado, cuanto mayor es la distancia más diversas son las comunidades fúngicas, un patrón que es mucho menos marcado en los géneros bacterianos. Así, mientras que los

hongos son más específicos del lugar, las bacterias tienden a tener distribuciones más amplias, pero al mismo tiempo con notables diferencias locales e intraviñedo ([Taylor et al., 2014](#); [Coller et al., 2019](#); [Liu et al., 2020](#)). En definitiva, los hongos, más representativos de cada territorio, definen en mayor medida la firma geográfica microbiana de las diferentes regiones vitícolas y viñedos ([Morrison-Whittle & Goddard, 2018](#); [Steenwerth et al., 2021](#)).

Las diferencias en el microbioma podrían aparecer no sólo en el espacio, sino también en el tiempo. Aunque apenas se han estudiado las variaciones interanuales en la microbiota de un viñedo, algunas investigaciones han descubierto que la añada puede afectar significativamente a la biodiversidad de los microorganismos asociados al viñedo ([Sabate et al., 2002](#); [Bokulich et al., 2014](#); [Vigentini et al., 2015](#); [Huang et al., 2022](#)). Por el contrario, en otros casos, los estudios muestran que las diferencias entre añadas no son demasiado significativas ([Chalvanti et al., 2021](#)). Además, durante el periodo de crecimiento de la vid, la diversidad  $\alpha$  experimenta un descenso, mientras que la  $\beta$  experimenta un aumento. Esta tendencia implica que los microbiomas son remodelados progresivamente por las interacciones entre huéspedes y microbios ([Wei et al., 2022](#)).

Lo que ocurre en el viñedo se traslada a la bodega. Todas las interacciones ecológicas que tienen lugar entre la microbiota, la planta y el medio ambiente desempeñan un papel importante en el resultado de la fermentación del vino, ya que se ha demostrado que hasta el 60% de la biodiversidad microbiana del mosto puede proceder de taxones derivados del suelo, las hojas y las uvas de la vid ([Zhang et al., 2020](#); [Kamilari et al., 2021](#); [Cureau et al., 2021](#); [Conacher et al., 2021](#)), siendo las comunidades presentes en el mosto recién cosechado más similares a las que se encuentran en las bayas, mientras que a medida que avanza la fermentación se van pareciendo cada vez más a las comunidades presentes en la corteza de la vid ([Pinto et al., 2015](#); [Morrison-Whittle & Goddard, 2018](#); [Alonso et al., 2019](#)). Es decir, es posible identificar biomarcadores microbianos asociados a cada *terroir* entre las diferentes etapas de la fermentación y para las diferentes variedades de uva de vinificación ([Kamilari et al., 2021](#)). Además, las superficies de las bodegas albergan poblaciones estacionalmente fluctuantes de bacterias y hongos, con cierta relevancia en la fermentación del vino ([Bokulich et al., 2013](#)).



**Figura 1.1.** Factores como el clima, el suelo y la biodiversidad circundante condicionan el microbioma del *terroir* microbiano específico de cada viñedo (centro de la figura). Estos factores están condicionados por las prácticas de gestión del cultivo (esquina superior izquierda). La interacción entre todos estos elementos define una biogeografía de la microbiota en los viñedos con diferencias expresadas en las distintas distancias geográficas y en la que los hongos son más específicos del lugar y las bacterias tienden a tener distribuciones más cosmopolitas (parte derecha). Esta imagen se generó con el programa [BioRender](#).

## SERVICIOS ECOSISTÉMICOS PRESTADOS POR LA MICROBIOTA EN VIÑEDOS Y VINOS

La microbiota proporciona servicios ecosistémicos tanto para los viñedos como para la calidad del producto final. Esta revisión utiliza la clasificación de servicios ecosistémicos propuesta por el Sistema de Contabilidad Ambiental y Económica (SEEA) de las Naciones Unidas, que identifica tres grupos principales: de aprovisionamiento, de regulación y culturales ([SEEA, 2021](#)).

### 1. Servicios ecosistémicos de aprovisionamiento

Dentro de la categoría de servicios ecosistémicos de aprovisionamiento, la microbiota está estrechamente vinculada a la producción de vino a través de la fermentación. Aporta, además, una notable diversidad genética que puede beneficiar a la industria vitivinícola y a los cultivos vitícolas.

*Servicios de aprovisionamiento de biomasa (cultivos)*. Sin microbiota, el ser humano sencillamente no tendría vino. Desempeña un papel fundamental en la fermentación, transformando el mosto de uva en vino. Gracias a estudios basados en HTS, se ha demostrado la existencia de un gran pool microbiano que incluye hongos y bacterias en la fermentación espontánea del vino ([Bokulich et al., 2012](#); [Piao et al., 2015](#); [Stefanini et al., 2016](#); [Belda et al., 2021](#)). Las diferentes cepas de levaduras enológicas han sido "domesticadas" a lo largo de los años, adaptándose por mecanismos evolutivos a ambientes con muchos factores de estrés que se dan en el proceso de fermentación ([Pretorius, 2000](#); [Bauer & Pretorius, 2000](#); [Querol et al., 2003](#)). Así, en lo que respecta a la fermentación alcohólica, las especies autóctonas de los géneros *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia* intervienen en los primeros pasos del proceso, produciendo metabolitos secundarios (ácidos, alcoholes, ésteres, etc.) y enzimas (esterasas, lipasas, proteasas, etc.) que pueden afectar a la calidad final del vino ([Tello et al., 2011](#)). Estas especies pueden crecer a bajas concentraciones de etanol, pero cuando éste supera el 5-7% y la abundancia de azúcares fermentados empieza a disminuir, empiezan a decaer y mueren ([Bae et al., 2006](#)). Otras especies de levaduras como *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces*, también pueden estar presentes durante la fermentación y posteriormente en el vino, algunas de las cuales son capaces de afectar negativamente a su calidad sensorial ([Pretorius, 2000](#)). *S. cerevisiae*, debido a su alta capacidad fermentativa, tolerancia al etanol y fuerte resistencia a la toxicidad de diferentes metabolitos, prevalece en las etapas finales de la fermentación ([Jolly et al., 2014](#); [Ortiz-Álvarez et al., 2021](#)), siendo casi la única especie en fermentaciones con cultivos puros (*starter* comerciales), o bien, acompañado de otras especies como *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Hanseniaspora guilliermondii* y *Dekkera anomala* en fermentaciones espontáneas ([Tello et al., 2011](#); [Kamilari et al., 2021](#); [Li et al., 2022](#)). Para la fermentación maloláctica, *Oenococcus oeni* es la especie dominante ([Henick-Kling, 1993](#); [Lonvaud-Funel, 1999](#); [Fleet, 2003](#)). Aparte del crecimiento gradual de diferentes especies de levadura durante la fermentación, también se ha descrito la existencia de un desarrollo en sucesión subyacente de diferentes cepas dentro de cada especie ([Bae et al., 2006](#)).

La microbiota desempeña un papel notable en las características organolépticas del vino. Por ejemplo, las especies de levaduras beneficiosas de *Debaryomyces* pueden producir enzimas como las  $\beta$ -glucosidasas, que aumentan la concentración de compuestos organolépticos deseables en los vinos ([Varela & Borneman, 2017](#)). *Lachancea thermotolerans*, *Pichia kluyveri*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Metschnikowia spp.* pueden mejorar el sabor y el aroma de los vinos ([Jolly et al., 2014](#); [Domizio et al., 2014](#); [Belda et al., 2016](#); [Pretorius, 2020](#)); especies de bacterias de géneros como *Lactobacillus* contribuyen a la síntesis de ésteres metílicos e isobutílicos y a la formación de fragancias afrutadas rojas y negras del vino; *Fructobacillus* está estrechamente relacionado con la síntesis de alcoholes aromáticos y la generación de sabores afrutados ([Zhang et al., 2022](#)).

En las fermentaciones espontáneas, el conjunto de microorganismos del suelo presentes también en la baya de la uva, y los que sólo están presentes en las bayas (procedentes de los insectos, pájaros, etc.), producen vinos con mayor complejidad que los elaborados con fermentos puros, proporcionando un *bouquet* de sabores percibido como más atractivo para los consumidores ([Tempère et al., 2018](#); [Alonso et al., 2019](#); [Conacher et al., 2021](#);

[Tan et al., 2022](#)). Estos vinos de fermentación espontánea son prácticamente imposibles de reproducir en añadas posteriores o en algunas regiones, debido principalmente a las diferencias de *terroir* ([Belda et al., 2017](#); [Pérez-Torrado et al., 2017](#)). Por otra parte, estos vinos son imprevisibles, ya que a veces se producen paradas de fermentación o pueden deteriorarse debido a la aparición de ciertas especies de levaduras indeseables como *Brettanomyces* sp. ([Jackson, 2009](#)).

*Servicios de material genético.* La microbiota enológica constituye además un importante reservorio de gran diversidad genética, con una amplia variedad de especies y cepas de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, algunas de ellas, generadas a través de mutaciones que causan variaciones nucleotídicas, por la transferencia horizontal de genes o hibridación intraespecífica ([Guillamón & Barrio, 2017](#); [González & Morales, 2022](#)). Es probable que esta diversidad genética favorezca la resistencia al cambio climático en la producción de vino ([Piao et al., 2015](#); [Portillo & Mas, 2016](#); [Belda et al., 2021](#)), pueda explotarse para obtener vinos de mayor calidad ([Amato et al., 2017](#); [Gao et al., 2022](#); [Zhao et al., 2022](#)) y sirva también para generar híbridos no modificados genéticamente que empleados como fermentos puros no supriman completamente la flora microbiana nativa ([Carrau et al., 2021](#)). Las cepas y especies más buscadas son las que fermentan bien y producen menos etanol, más glicerol y compuestos aromáticos atractivos. Algunas de estas levaduras son de especies no *Saccharomyces*, como *Hanseniaspora vineae*, *Metschnikowia fructicola* ([Carrau et al., 2021](#)), u otras especies de *Saccharomyces* pertenecientes al complejo *sensu stricto* ([Scannell et al., 2011](#); [Borneman & Pretorius, 2015](#)), como *S. kudriavzevii*, que puede producir distintos compuestos aromáticos e incluso altas cantidades de alcoholes superiores, como el feniletanol y fermentar a baja temperatura. *S. uvarum* también produce compuestos aromáticos como alcoholes y ésteres. *S. bayanus* es criotolerante, lo que permite fermentaciones a temperaturas más bajas ([Boynton & Greig, 2014](#); [Marsit & Dequin, 2015](#); [Alsammar & Delneri, 2020](#); [Pontes et al., 2020](#); [Tapia et al., 2022](#); [Karabegovic et al., 2022](#)). Además, las fermentaciones secuenciales con levaduras no-*Saccharomyces* como *Meyerozyma guilliermondii* y *Hanseniaspora uvarum* junto con *S. cerevisiae* potencian los aromas florales y afrutados en los vinos ([Gao et al., 2022](#)).

## 2. Servicios ecosistémicos de regulación

Las interacciones entre las comunidades biológicas (incluida la microbiota) y las propiedades físicas y químicas del medio edáfico son fundamentales para los procesos, funciones y servicios ecosistémicos proporcionados por la naturaleza en los viñedos, como el almacenamiento de carbono ([Giffard et al., 2022](#)), la regulación de la calidad del suelo ([Zahid et al., 2022](#)), la formación de la estructura del suelo ([Pulleman et al., 2012](#)) o el control biológico de plagas y enfermedades ([Burns et al., 2016](#); [Giffard et al., 2022](#); [Darriaut et al., 2023](#)).

*Almacenamiento de carbono.* Siendo los viñedos una fuente potencial de almacenamiento de carbono ([Williams et al., 2020](#)), con diferencias entre las edades de las vides ([Song et al., 2023](#)) y las variedades de uva ([Zhang et al., 2021](#)), los microorganismos del suelo son de gran importancia en la regulación de la dinámica del carbono orgánico ([Sun et al.,](#)

2021), ya que taxones como *Patescibacterias*, *Synergistetes*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus* o *Atribacteria* pueden degradar el carbono orgánico para producir ácidos orgánicos ([Yang et al., 2021](#)).

*Servicios de regulación de la calidad del suelo.* Las comunidades microbianas juegan un papel fundamental en la dinámica de los nutrientes del suelo, y cualquier cambio en sus actividades y funciones tiene el potencial de poner en peligro los ciclos biogeoquímicos del suelo, afectando en última instancia a la disponibilidad de nutrientes para las plantas ([Nannipieri et al., 2003](#); [Wagg et al., 2014](#); [Rashid et al., 2016](#); [Giffard et al., 2022](#)). Así, existen consorcios microbianos específicos que lideran la fijación de nitrógeno y la mineralización de nutrientes, metabolizando, por ejemplo, formas recalcitrantes de N, K y P para liberar estos elementos esenciales para la nutrición de la vid ([Kuzyakov & Xu, 2013](#); [Jacoby et al., 2017](#); [Scandellari, 2017](#)).

*Servicios de retención de suelos y sedimentos.* Dadas las características del cultivo, su gestión y su ubicación en zonas topográficamente complejas, los viñedos presentan un contexto particularmente favorable para la pérdida de suelo en comparación con otras tierras agrícolas ([Le Bissonais et al., 2001](#); [Brenot et al., 2008](#)). Determinadas especies microbianas pueden contribuir a reducir el problema. En este sentido, los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) del subfilo *Glomeromycotina* promueven la formación de agregados en el suelo y, por tanto, la prevención de la erosión del suelo ([Petgen et al., 1997](#); [Rillig & Mumej, 2006](#); [Schreiner, 2007](#); [Oehl & Koch, 2018](#); [Torres et al., 2021](#)). Los HMA desarrollan una densa red micelial en el suelo ([Cavagnaro et al., 2005](#); [Wilson et al., 2009](#)) que, junto con la secreción de sustancias pegajosas de naturaleza proteica ([Rillig et al., 2002](#)), pueden tener una acción aglutinante sobre las partículas del suelo y mejorar su estructura, lo que conduce a un aumento de la estabilidad estructural y de la calidad del suelo ([Caravaca et al., 2006](#); [Bedini et al., 2009](#); [Rillig et al., 2014](#)). Así, se espera que una reducción de los HMA presentes aumente el riesgo de erosión ([Trouvelot et al., 2015](#)).

*Servicios de control biológico.* Comprender la ecología microbiana de los viñedos tiene implicaciones para la gestión de enfermedades y el desarrollo de enfoques más sostenibles y ecológicos para proteger las vides. Las bacterias presentes en la rizosfera y endosfera de los sarmientos y ramas de la vid, como *Achromobacter xylosoxidans*, *Bacillus subtilis* o *Pseudomonas fluorescens*, pueden producir sideróforos que limitan la disponibilidad de hierro, reduciendo así la presencia de microorganismos patógenos. Algunas bacterias también degradan los factores de virulencia (por ejemplo, el ácido oxálico) producidos por los patógenos de las plantas, reduciendo así la gravedad de los daños ([Bettenfeld et al., 2022](#)). En este sentido, aprovechando las funcionalidades que proporciona la microbiota, se están empezando a sustituir productos químicos utilizando cepas bacterianas seleccionadas, hongos endófitos o levaduras que muestran respuestas defensivas frente a patógenos de la vid ([Hanada et al., 2009](#)) como el oídio producido por *Uncinula necator*, el mildiu producido por *Plasmopara viticola* o *Botrytis cinerea*, que pueden afectar negativamente a la calidad del producto final ([Gadoury et al., 2001](#); [Steel et al., 2013](#)). Este control biológico lo proporcionan especies como *Lysobacter capsici* (AZ78), *Trichoderma sp.* ([Harman et al., 2004](#); [Perazzolli et al., 2014](#); [Mutawila et al., 2016](#); [Darriaut et al., 2022](#); [Carro-Huerta et al., 2023](#)) o *Aureobasidium pullulans* ([Panther et al., 2012](#); [Pinto et al., 2018](#); [Döring et al., 2019](#)). El uso de estos

microorganismos en lugar de fungicidas químicos ayuda a la producción de vinos ecológicos certificados ([Point et al., 2012](#); [Kernaghan et al., 2017](#)). El control biológico con microorganismos es un campo de investigación activo en el que se están realizando avances significativos. Por ejemplo, recientemente se han aislado en suelos de viñedos ecológicos cepas de *Arthrobacter sp.*, *Rhodococcus sp.* y *Bacillus mycoides* con una excelente capacidad para reducir el crecimiento de micotoxinas procedentes de los hongos *Aspergillus carbonarius*, *A. niger* y *A. flavus* ([De la Huerta-Bengoechea et al., 2022](#)). Además, algunas levaduras derivadas del mosto de uva también son eficaces contra patógenos como *B. cinerea* ([Maluleke et al., 2022](#)), lo que las convierte en candidatas potenciales para su aplicación industrial como agentes de control biológico.

*Población de nursery y servicios de mantenimiento del hábitat.* La microbiota puede proporcionar mejores condiciones del suelo para el desarrollo de la vid. Por ejemplo, se sabe que la presencia del hongo *Aerobasidium pullulans* metaboliza el azufre inorgánico utilizado como fertilizante y pesticida, y absorbe el cobre empleado como fungicida, que en altas concentraciones es tóxico para la planta ([Pancher et al., 2012](#); [Döring et al., 2019](#)).

### 3. Servicios ecosistémicos culturales

Más allá de los servicios de aprovisionamiento, se ha creado una cultura ancestral en torno al vino, que se expresa en un rico patrimonio material e inmaterial, y que se basa en última instancia en el proceso de fermentación llevado a cabo por la microbiota. Estos servicios culturales se expresan en forma de enoturismo, los valores estéticos de los paisajes de viñedos, el desarrollo científico de la enología, el disfrute erudito del vino, la identidad y el sentido de pertenencia a las regiones vitivinícolas, el simbolismo e incluso ciertos valores espirituales ([Tempesta et al., 2010](#); [Winter et al., 2018](#); [Giffard et al., 2022](#)).

*Servicios relacionados con la recreación.* El enoturismo incluye todas las actividades turísticas relacionadas con el mundo del vino: catas de vino, visitas a viñedos y bodegas en diferentes regiones vinícolas, festivales y otros eventos organizados relacionados con el vino, etc. ([Montella, 2017](#)). Las diferencias entre los *terroir* de producción vinícola son las que confieren "tipicidad" e "identidad" al vino producido en distintos territorios y, en última instancia, un "sentido de lugar" a las comunidades vinculadas a su producción.

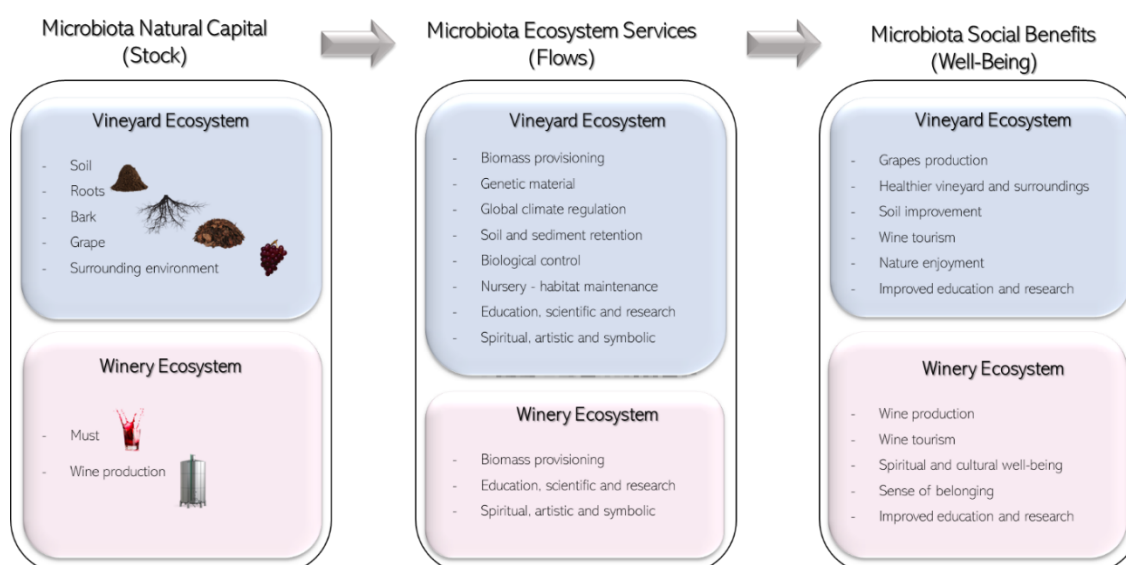
*Servicios de amenidad visual.* La belleza del paisaje aumenta el valor de mercado de los productos relacionados con el vino ([van Leeuwen & Seguin, 2006](#); [Tempesta et al., 2010](#); [Winter et al., 2018](#)). Dado que los seres humanos prefieren estéticamente las plantas sanas, y que la diversidad fúngica y bacteriana de las hojas está estrechamente relacionada con el estado de salud de las vides ([Pinto et al., 2015](#)), la microbiota también está relacionada con la apreciación visual de los paisajes de viñedos.

*Servicios educativos, científicos y de investigación.* La diversidad que proporcionan los diferentes terruños fomenta la investigación científica en el campo de la microbiología enológica, destinada a desentrañar las interacciones entre la microbiota, la vid y el producto final ([van Leeuwen et al., 2004](#); [Giffard et al., 2022](#)).

*Servicios espirituales, artísticos y simbólicos.* El vino está vinculado a diversos mitos, ritos y cultos religiosos desde hace miles de años (Stanislawski, 1975; Rosso, 2012; Kirkpatrick, 2014; Onofri & Boatto, 2020). Así, el dios griego Dioniso, reinterpretado como Baco en la mitología romana, fue el revelador de la cultura del vino. Entre las divinidades egipcias, Hathor, diosa del vino, fue esculpida en las ánforas utilizadas para almacenarlo, mientras que Osiris daba al pueblo instrucciones sobre cómo cosechar la vid y almacenar el vino. Los sumerios incorporaron a la diosa Geshtinanna, nombre que significa "madre vid", como se encuentra en varias inscripciones.

## VALORACIÓN ECONÓMICA DE LOS SERVICIOS ECOSISTÉMICOS DE LA MICROBIOTA EN LOS VIÑEDOS Y EL VINO

Los servicios ecosistémicos que presta la microbiota a los viñedos y al vino son valiosos porque aumentan el bienestar de la sociedad. Las conexiones conceptuales entre el capital natural de la microbiota y la mejora del bienestar pueden concebirse como una cuerda que une los ecosistemas, los servicios ecosistémicos intermedios, los servicios ecosistémicos finales y el valor creado para los beneficiarios, como la de la Figura 1.2.



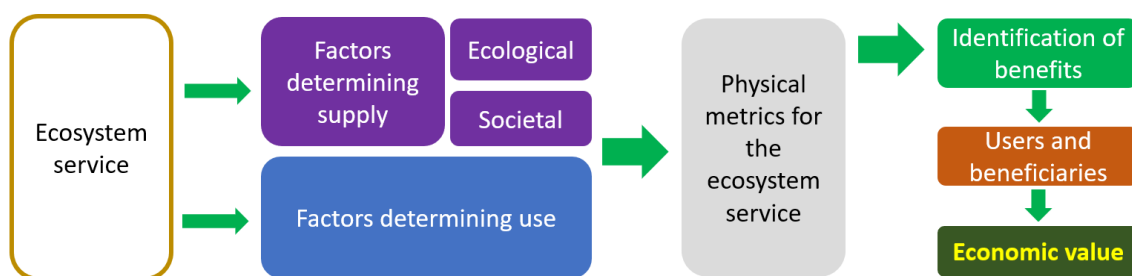
**Figura 1.2.** Beneficios sociales de la microbiota de viñedos y bodegas como capital natural

Convertir estas conexiones de valor en términos monetarios puede ser útil para la toma de decisiones (véase más adelante). Para ello se pueden utilizar las técnicas habituales de valoración económica, aplicadas con frecuencia para la valoración económica de los activos medioambientales y los servicios ecosistémicos que proporcionan. Estas técnicas y sus resultados no están exentos de debate, pero su aceptación general es mayor si las conexiones de valor están claras, los beneficiarios están identificados y los beneficios para ellos pueden evaluarse en cierta medida.



En marzo de 2021, la Comisión de Estadística de las Naciones Unidas planteó el Sistema de Contabilidad Ambiental-Económica-Contabilidad de los Ecosistemas de las Naciones Unidas (UN SEEA-EA) como la nueva norma para que los países informen sobre el estado de su capital natural. Este marco está llamado a definir la base común para la valoración económica de los servicios ecosistémicos en los próximos años, por lo que merece la pena inspirarse en él a la hora de abordar los elementos específicos de este ámbito.

UN SEEA-EA aboga por el uso de precios de cambio reales o inferidos como principal fuente de información para la valoración económica de los servicios ecosistémicos, en lugar de precios sombra estimados. Por lo tanto, se prefieren las técnicas de valoración basadas en precios o costes de mercado a las creencias y juicios, ya procedan de expertos o de usuarios. La identificación de cadenas lógicas para la evaluación del valor como la de la Figura 1.3, sugerida también en este nuevo marco, es una forma adecuada de divulgar y ordenar los pasos de valoración desde el servicio ecosistémico hasta su valor económico.



**Figura 1.3.** Cadena lógica simplificada desde un servicio ecosistémico hasta su valor económico

Hay varias razones por las que puede ser útil estimar el valor económico de los servicios ecosistémicos de la microbiota. En primer lugar, el uso de términos monetarios permite la agregación de diferentes flujos físicos. En segundo lugar, proporciona un marco en el que pueden sopesarse y compararse los servicios de diversos ecosistemas. En tercer lugar, puede ayudar a tomar decisiones de preservación con conocimiento de causa. En cuarto lugar, puede ayudar a identificar líneas de investigación prometedoras.

Para alcanzar estos objetivos, la valoración económica de los servicios ecosistémicos proporcionados por la microbiota en viñedos y vinos no puede abarcar todo el conjunto de valores de toda la microbiota a la vez, por una razón muy sencilla: sin microbiota no tendríamos vino, por lo que podríamos llegar al resultado erróneo de que el valor de la microbiota es igual al valor total añadido por la industria vitivinícola, descuidando el resto de contribuciones y, por supuesto, errando el tiro (Han *et al.*, 2023). En su lugar, debemos centrarnos necesariamente en el valor añadido por determinados microorganismos específicos, es decir, el valor marginal añadido a los viñedos y al vino debido a su presencia, o bien el valor marginal perdido debido a su desaparición.

La valoración económica de los servicios de aprovisionamiento de biomasa por parte de cierta microbiota, por ejemplo, puede realizarse estimando su valor añadido específico

como *starters*, o su papel en la producción de enzimas que mejoran las características organolépticas, y la diversidad genética puede valorarse estimando la resiliencia al cambio climático, o bien la capacidad para combinar atributos aromáticos. En la categoría de servicios ecosistémicos de regulación también, por ejemplo, los servicios de control biológico pueden valorarse calculando el precio de los productos químicos que pueden sustituirse por cepas bacterianas, hongos endofíticos o levaduras que muestren respuestas defensivas frente a los patógenos de la vid. Por otro lado, los servicios ecosistémicos culturales procedentes de una microbiota específica pueden valorarse calculando la cantidad de dinero que están dispuestas a pagar las personas que visitan viñedos ecológicos o bodegas que utilizan levaduras autóctonas, así como el sobreprecio que los consumidores están dispuestos a pagar por los vinos ecológicos. Las cadenas lógicas que siguen el esquema de la Figura 3 pueden identificarse para cada servicio ecosistémico con el fin de obtener una estimación del valor económico una vez delimitados los beneficios y los beneficiarios.

## **GESTIÓN DE LOS VIÑEDOS Y SERVICIOS ECOSISTÉMICOS DE LA MICROBIOTA**

Las diferencias en la gestión de los viñedos pueden modificar las comunidades microbianas ([Chou \*et al.\*, 2018](#)), lo que probablemente repercute en el tipo y la cantidad de servicios ecosistémicos proporcionados. Así, algunos estudios sugieren que, junto con la localización geográfica y el clima, la gestión del viñedo está relacionada con la diversidad de taxones de levaduras presentes en las uvas ([Cordero-Bueso \*et al.\*, 2011](#); [Zhou \*et al.\*, 2021](#); [Pretorius, 2022](#); [Quiquerez \*et al.\*, 2022](#)). En términos de composición bacteriana, la gestión del viñedo también parece tener un impacto directo en la organización de sus comunidades ([Hartmann \*et al.\*, 2015](#); [Burns \*et al.\*, 2016](#)). Estas diferencias también pueden alcanzar y materializarse en el microbioma del zumo ([Bagheri \*et al.\*, 2015](#)), aunque otros autores no han encontrado evidencias de cambio ([Morrison-Whittle \*et al.\*, 2017](#); [Chou \*et al.\*, 2018](#)).

Las prácticas de gestión como el uso de cultivos de cobertura, el laboreo o las enmiendas del suelo pueden influir en las comunidades microbianas de los viñedos ([Giffard \*et al.\*, 2022](#)). Las cubiertas verdes en los viñedos pueden aumentar la biodiversidad microbiana ([Capó-Bauçà \*et al.\*, 2019](#)), mejorando la salud del suelo y el ciclo de nutrientes, promoviendo un ecosistema del viñedo más resistente y equilibrado. La presencia de cubiertas verdes aumenta la entrada de materia orgánica en el suelo a través de los residuos vegetales y los exudados radiculares. A medida que estos materiales se descomponen, proporcionan una fuente de nutrientes para la comunidad microbiana, mejorando la fertilidad del suelo y favoreciendo el crecimiento y la salud de las vides. Al mismo tiempo, las cubiertas verdes contribuyen a prevenir la erosión, regenerar la biodiversidad del suelo ([Daane \*et al.\*, 2018](#); [Paiola \*et al.\*, 2020](#)) o mejorar el servicio de amenidad visual ([Rodríguez-Entrena \*et al.\*, 2017](#)). No obstante, la evidencia empírica ha indicado que los resultados de la gestión entre hileras pueden fluctuar debido a las condiciones edafoclimáticas subyacentes ([Chapela-Oliva \*et al.\*, 2022](#)). Considerando los insumos agrícolas, las enmiendas orgánicas como el estiércol y el compost son una fuente

directa de carbono para la microbiota del suelo y otros organismos que conducen a un mayor crecimiento de las plantas y a un retorno de los residuos vegetales al medio ambiente ([Bünemann et al., 2006](#); [Okur et al., 2009](#)). Comparativamente, los sistemas de fertilización orgánica condujeron a un notable incremento de la biomasa microbiana, indujeron cambios en la estructura y composición de la comunidad microbiana del suelo y mejoraron la actividad microbiana en contraposición con el enfoque de fertilización inorgánica ([Geisseler & Scow, 2014](#); [García-Orenes et al., 2016](#)). Además, el uso de fertilizantes nitrogenados puede conducir a la acidificación del suelo, con efectos negativos considerables sobre la microbiota presente en el suelo ([Paungfoo-Lonhienne et al., 2015](#); [Nascimbene et al., 2013](#); [Amaral et al., 2023](#)). Los fungicidas alteran las comunidades microbianas de la superficie de la uva, siendo el efecto de los utilizados en agricultura ecológica (azufre, cobre) más fuerte que el de los utilizados en agricultura convencional ([Okur et al., 2009](#); [Milanovic et al., 2013](#); [Karimi et al., 2021](#); [Ostandie et al., 2021](#)). También se ha demostrado que herbicidas químicos como el glifosato inducen alteraciones de los microorganismos del suelo ([Mandl et al., 2018](#))

Dado que las prácticas de gestión afectan a la microbiota, es de esperar que los diferentes sistemas de cultivo, ya sean convencionales, orgánicos o biodinámicos, también desempeñen un papel, como han demostrado algunas investigaciones ([Probst et al., 2008](#); [Vega-Avila et al., 2015](#); [Patrignani et al., 2016](#); [Morrison-Whittle et al., 2017](#)). Así, se encuentra una mayor diversidad fúngica en la viticultura ecológica y biodinámica, lo que parece estar relacionado con los fertilizantes orgánicos ([Pancher et al., 2012](#); [Döring et al., 2019](#)). En los viñedos ecológicos hay una mayor presencia de *Aureobasidium pullulans* (que puede metabolizar azufre inorgánico y absorber cobre) mientras que en los viñedos gestionados convencionalmente predominaba *Sporidiobolus pararoseus* (productor de carotenoides) ([Schmid et al., 2011](#)). Por otro lado, se han detectado niveles más altos de *Alternaria* spp. patógena y levaduras *Rhodotorula* y *Sporidiobolus* en viñedos convencionales frente a los ecológicos, formando un patrón general de diversidad fúngica reducida con predominio de unos pocos taxones fúngicos en estos viñedos convencionales probablemente debido al uso de fungicidas sistémicos ([Kernaghan et al., 2017](#)). Otros tipos de gestión también pueden afectar a la microbiota del viñedo. Por ejemplo, la alteración del microclima del viñedo bajo cobertizos contra la lluvia reduce las enfermedades causadas por *Alternaria* o *Colletotrichum* spp. ([Huang et al., 2022](#)).

## **HACIA UNA AGRICULTURA INTELIGENTE: LA MICROBIOTA COMO SOLUCIÓN NATURAL EN VIÑEDOS Y BODEGAS**

En las próximas décadas, el sector agrícola se enfrentará a grandes retos a la hora de proporcionar alimentos a una población mundial en aumento, pero, al mismo tiempo, los cultivos intensivos basados en el uso de fertilizantes minerales, productos agroquímicos y agua están teniendo un impacto negativo en la biodiversidad y los servicios ecosistémicos ([Power, 2010](#)). La producción vitivinícola no es ajena a estos problemas medioambientales ([Viers et al., 2013](#)). De hecho, en este tipo de cultivo, ciertos riesgos pueden resultar aún más graves. La ubicación de los viñedos en laderas empinadas, unida a la irregularidad de los regímenes pluviométricos (exacerbada por el cambio climático),

puede provocar una erosión y degradación importantes del suelo, comprometiendo significativamente a su estructura y productividad global ([Cerdan et al., 2010](#); [Biddoccu et al., 2016](#); [Chrysargyris et al., 2018](#)).

En este contexto, la "agricultura inteligente" gira en torno al aprovechamiento de la tecnología punta para mejorar la producción agrícola en términos de calidad, cantidad y sostenibilidad ([Wolfert et al., 2017](#)). Dado que sus objetivos principales implican intervenciones precisas y específicas para cada lugar, la microbiota debe desempeñar un papel fundamental en estos avances ([Hartman et al., 2018](#)). Alimentando una comunidad microbiana diversa y próspera, los gestores de los viñedos pueden promover prácticas de cultivo de la vid respetuosas con el medio ambiente. Sin embargo, aunque ya existen muchos productos comercializados basados en el uso de la microbiota como agentes de control biológico, bioestimulantes o biofertilizantes, una gestión inteligente debería ir más allá y estar dirigida a promover como solución basada en la naturaleza en cada viñedo la microbiota que proporcione servicios ecosistémicos relevantes mientras se reduce la que pueda proporcionar funcionalidades negativas. Por lo tanto, es necesario pasar rápidamente de la promesa a la práctica ([Guerry et al., 2015](#)), intentando generalizar el enfoque de los servicios ecosistémicos a las prácticas de gestión de los viñedos, incluida la microbiota.

Todavía queda un importante trabajo por hacer en la identificación de los taxones presentes en las comunidades microbianas de los viñedos, con algunos grupos mal descritos en los que todavía no es posible identificar géneros o especies ([Gobbi et al., 2022](#)). No obstante, el mayor reto sigue siendo asignar especies a funciones ecosistémicas. Esto no es sencillo, ya que las redundancias son comunes y diferentes comunidades microbianas pueden proporcionar la misma función ([Chen et al., 2022](#)). Además, es necesario seguir investigando los factores que afectan al microbioma (conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos en cada nicho ecológico) y a las composiciones de especies componentes de las comunidades microbianas, especialmente los factores relacionados con las prácticas de gestión de los viñedos (suelos verdes, laboreo, vegetación circundante, enmiendas del suelo, etc.). Una vez identificadas las funcionalidades aportadas por taxones específicos, es necesario investigar cómo responde la dinámica poblacional de estos taxones, y de las distintas cepas microbianas, a las diferentes prácticas agrícolas. Todos estos conocimientos podrían permitir la aplicación de estrategias ventajosas que, por ejemplo, tengan en cuenta las restricciones impuestas por la dispersión limitada de los hongos y la influencia significativa de las condiciones ambientales sobre las bacterias ([Larsen et al., 2023](#)). El margen para aplicaciones y desarrollos biotecnológicos también es amplio y muy relevante, explotando propiedades microbianas como la capacidad de mantenerse y replicarse sin necesidad de inoculaciones repetidas ([Suman et al., 2022](#)). Además, habría que centrar más esfuerzos de investigación en cómo esta microbiota se transfiere finalmente a las propiedades del vino y contribuye a su calidad y a la valorización del *terroir*, lo que de hecho implica mejorar nuestros conocimientos sobre el valor de los servicios ecosistémicos.

Nótese que, en términos de valoración de los servicios ecosistémicos, aparte de los valores de uso relacionados con los servicios de aprovisionamiento, regulación y culturales, el mantenimiento de la microbiota tiene también un valor de opción al mantener abierta la

posibilidad de un beneficio futuro de las comunidades microbianas ([Traeger, 2014](#); [Pascual et al., 2015](#)), ya sea en forma de servicios de aprovisionamiento, regulación o culturales. Además, la microbiota en los viñedos también ofrece un valor de seguro en términos de aumento de la resiliencia de los ecosistemas, que sirve como red de seguridad contra el cambio global, protegiendo a los seres humanos y a los ecosistemas de posibles pérdidas de bienestar ([Baumgärtner & Strunz, 2014](#); [Dallimer et al., 2020](#); [Paul et al., 2020](#); [Primmer & Paavola, 2021](#)). Este valor de seguro reduce la probabilidad de futuros descensos en el suministro de servicios ecosistémicos como resultado de cambios en las comunidades microbianas ([Baumgärtner, 2007](#); [Baumgärtner & Strunz, 2014](#)).

En conjunto, el análisis de los servicios ecosistémicos prestados por los microorganismos en los viñedos y en la producción de vino revela la contribución esencial de estas comunidades invisibles para los ojos al funcionamiento y la sostenibilidad de los sistemas vitícolas. Desde la influencia en la salud del suelo y la vitalidad de la vid hasta la fermentación y el perfil sensorial del vino, los microorganismos demuestran ser actores clave para lograr resultados óptimos. Su interacción compleja y simbiótica con el entorno vitícola desencadena una serie de beneficios, entre los que se incluyen la mejora de la calidad del producto final y la resistencia del viñedo frente a factores adversos. Este análisis no sólo pone de relieve la importancia de un enfoque holístico en la elaboración del vino, sino también el potencial de futuras investigaciones para profundizar en los mecanismos que subyacen a la prestación de servicios ecosistémicos, promoviendo así prácticas agrícolas y vitivinícolas más sostenibles y resilientes ([Colwell, 1997](#)).

## REFERENCIAS

- Aleynova, O.A.; Nityagovsky, N.N.; Suprun, A.R.; Ananov, A.A.; Dubrovina, A.S.; Kiselev, K.V. The diversity of fungal endophytes from wild grape *Vitis amurensis* Rupr. *Plants* **2022**, *11*(21), 2897. [DOI: 10.3390/plants11212897](https://doi.org/10.3390/plants11212897)
- Ali, G.; Dahlhaus, P. Roles of Selective Agriculture Practices in sustainable agriculture performance: A systematic review. *Sustainability* **2022**, *14*, 3185. [DOI: 10.3390/su14063185](https://doi.org/10.3390/su14063185)
- Alonso, A.; de Celis, M.; Ruiz, J.; Vicente, J.; Navascués, E.; Acedo, A.; Ortiz-Álvarez, R.; Belda, I.; Santos, A.; Gómez-Flechoso, M.A.; Marquina, D. Looking at the origin: Some insights into the general and fermentative microbiota of vineyard soils. *Fermentation* **2019**, *5*(3), 78. [DOI: 10.3390/fermentation5030078](https://doi.org/10.3390/fermentation5030078)
- Alsammar, H.; Delneri, D. An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Res.* **2020**, *20*(3), foaa013. [DOI: 10.1093/femsyr/foaa013](https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa013)
- Amaral, H.F.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Sena, J.O.A. de; Colozzi-Filho, A.; Andrade, D.S. Seasonal variations in soil chemical and microbial indicators under conventional and organic vineyards. *Acta Sci-Agron.* **2023**, *45*(1), e56158. [DOI: 10.4025/actasciagron.v45i1.56158](https://doi.org/10.4025/actasciagron.v45i1.56158)
- Amato, M.; Ballco, P.; López-Galán, B.; De Magistris, T.; Verneau, F. Exploring consumers' perception and willingness to pay for "Non-Added Sulphite" wines through experimental auctions: a case study in Italy and Spain. *Wine Econ. Policy* **2017**, *6*(2), 146-154. [DOI: 10.1016/j.wep.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.wep.2017.10.002)

- Andreolli, M.; Lampis, S.; Vallini, G. Diversity, distribution and functional role of bacterial endophytes in *Vitis vinifera*. In Endophytes: Biology and biotechnology; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer Cham, 2017; Volume 5, 233–266. [DOI: 10.1007/978-3-319-66541-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-66541-2_10)
- Bae, S.; Fleet, G.H.; Heard, G.M. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*(4), 712-727. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02890.x)
- Bagheri, B.; Bauer, F.; Setati, M. The diversity and dynamics of indigenous yeast communities in grape must from vineyards employing different agronomic practices and their influence on wine fermentation. *S. Af. J. Enol. Vitic.* **2015**, *36*, 243–251 [ISSN 2224-7904](https://doi.org/10.1080/00375312.2015.1083444)
- Bai, F.Y.; Han, D.Y.; Duan, S.F.; Wang, Q.M. The ecology and evolution of the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)* **2022**, *13*(2), 230. [DOI: 10.3390/genes13020230](https://doi.org/10.3390/genes13020230)
- Bao, L.; Sun, B.; Wei, Y.; Xu, N.; Zhang, S.; Gu, L.; Bai, Z. Grape cultivar features differentiate the grape rhizosphere microbiota. *Plants (Base)* **2022**, *11*(9), 1111. [DOI 10.3390/plants11091111](https://doi.org/10.3390/plants11091111)
- Bauer, F.F.; Pretorius, I.S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine – a review. *S. Afri. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 27-51. [DOI: 10.21548/21-1-3557](https://doi.org/10.21548/21-1-3557)
- Baumgärtner, S. The insurance value of biodiversity in the provision of ecosystem services. *Nat. Resour. Model.* **2007**, *20*, 87-127. [DOI: 10.1111/j.1939-7445.2007.tb00202.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-7445.2007.tb00202.x)
- Baumgärtner, S.; Strunz S. The economic insurance value of ecosystem resilience. *Ecol. Econ.* **2014**, *101*, 21-32. [DOI: 10.1016/j.ecolecon.2014.02.012](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2014.02.012)
- Bedini, S.; Pellegrino, E.; Avio, L.; Pellegrini, S.; Bazzoffi, P.; Argese, E.; Giovannetti, M. Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* **2009**, *41*, 1491–1496. [DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.04.005](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.005)
- Belda, I.; Navascués, E.; Marquina, D.; Santos, A.; Calderón, F.; Benito, S. Outlining the influence of non-conventional yeasts in wine ageing over lees. *Yeast* **2016**, *33*(7), 329-38. [DOI: 10.1002/yea.3165](https://doi.org/10.1002/yea.3165)
- Belda, I.; Zarraonaindia, I.; Perisin, M.; Palacios, A.; Acedo, A. From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “terroir” concept. *Front. Microbiol.* **2017a**, *8*, 821. [DOI: 10.3389/fmicb.2017.00821](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821)
- Belda, I.; Palacios, A.; Fresno, J.; Ortega, H.; Acedo, A. WineSeq: A new tool for the study of the functional biodiversity of soils, and its use as a biomarker and guide for vitiviculture practices. *BIO Web of Conferences* **2017b**, *9*(1), 01012. [DOI: 10.1051/bioconf/20170901012](https://doi.org/10.1051/bioconf/20170901012)
- Belda, I.; Gobbi, A.; Ruiz, J.; de Celis, M.; Ortiz-Álvarez, R.; Acedo, A.; Santos, A. Microbiomics to define wine terroir. In: Cifuentes A, ed. *Comprehensive Foodomics* **2021**, Amsterdam: Elsevier [DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22875-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22875-8)
- Bettenfeld, P., Cadena I Canals, J., Jacquens, L., Fernandez, O.; Fontaine, F.; van Schaik, E.; Courty, P.E.; Trouvelot, S. The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant health. *J. Adv. Res.* **2022**, *40*, 1-15. [DOI: 10.1016/j.jare.2021.12.008](https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.12.008)
- Biddoccu, M.; Ferraris, S.; Opsi, F.; Cavallo, E. Long-term monitoring of soil management effects on runoff and soil erosion in sloping vineyards in Alto Monferrato (North–West Italy). *Soil Till. Res.* **2016**, *155*, 176-189. [DOI: 10.1016/j.still.2015.07.005](https://doi.org/10.1016/j.still.2015.07.005)

- Bindi, M.; Nunes, P.A.L.D. Vineyards and vineyard management related to ecosystem services: Experiences from a wide range of enological regions in the context of global climate change. *J. Wine Econ.* **2016**, *11*, 66-68. DOI: [10.1017/jwe.2016.2](https://doi.org/10.1017/jwe.2016.2)
- Bokulich, N.A.; Joseph, C.L.; Allen, G.; Benson, A.K.; Mills, D.A. Next-generation sequencing reveals significant bacterial diversity of botrytized wine. *PLoS One* **2012**, *7*(5), e36357. DOI: [10.1371/journal.pone.0036357](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036357)
- Bokulich, N.A.; Ohta, M.; Richardson, P.M.; Mills, D.A. Monitoring seasonal changes in winery-resident microbiota. *PLoS One* **2013**, *8*(6), e66437. DOI: [10.1371/journal.pone.0066437](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066437)
- Bokulich, N.A.; Thorngate, J.H.; Richardson, P.M.; Mills, D.A. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage and climate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*(1), E139-E148. DOI: [10.1073/pnas.1317377110](https://doi.org/10.1073/pnas.1317377110)
- Bokulich, N.A.; Collins, T.S.; Masarweh, C.; Allen, G.; Heymann, H.; Ebeler, S.E.; Mills, D.A. Associations among wine grape microbiome, metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *Mbio* **2016**, *7*(3), e00631-16. DOI: [10.1128/mbio.00631-16](https://doi.org/10.1128/mbio.00631-16)
- Borneman A.R.; Pretorius, I.S. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics* **2015**, *199*(2), 281-91. DOI: [10.1534/genetics.114.173633](https://doi.org/10.1534/genetics.114.173633)
- Boynton, P.J.; Greig, D. The ecology and evolution of non-domesticated *Saccharomyces* species. *Yeast* **2014**, *31*, 449-462. DOI: [10.1002/yea.3040](https://doi.org/10.1002/yea.3040)
- Brenot, J.; Quiquerez, A.; Petit, C.; Garcia, J.P. Erosion rates and sediment budgets in vineyards at 1-m resolution based on stock unearthing (Burgundy, France). *Geomorphology* **2008**, *100*, 345–355. DOI: [10.1016/j.geomorph.2008.01.005](https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2008.01.005)
- Bünemann, E.; Schwenke, G.; Zwieten, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms – a review. *Aust. J. Soil Res.* **2006**, *44*, 379-406. DOI: [10.1071/SR05125](https://doi.org/10.1071/SR05125)
- Burns, K.N.; Kluepfel, D.A.; Strauss, S.L.; Bokulich, N.A.; Cantu, D.; Steenwerth, K.L. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biol. Biochem.* **2015**, *91*, 232-247. DOI: [10.1016/j.soilbio.2015.09.002](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.002)
- Burns, K.N.; Bokulich, N.A.; Cantu, D.; Greenhut, R.F.; Kluepfel, D.A.; O’Geen, A.T.; Strauss, S.L.; Steenwerth, K.L. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by vineyard management. *Soil Biol. Biochem.* **2016**, *103*, 337–348. DOI: [10.1016/j.soilbio.2016.09.007](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.09.007)
- Candiago, S.; Winkler, K.J.; Giombini, V.; Giupponi, C.; Vigl, L.E. An ecosystem service approach to the study of vineyard landscapes in the context of climate change: a review. *Sustain. Sci.* **2023**, *18*, 997–1013. DOI: [10.1007/s11625-022-01223-x](https://doi.org/10.1007/s11625-022-01223-x)
- Capó-Bauçà, S.; Marqués, A.; Llopis-Vidal, N.; Bota, J.; Baraza, E. Long-term establishment of natural green cover provides agroecosystem services by improving soil quality in a Mediterranean vineyard. *Ecol. Eng.* **2019**, *127*, 285-291. DOI: [10.1016/j.ecoleng.2018.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.12.008)
- Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Azcón, R.; Roldán, A. Formation of stable aggregates in rhizosphere soil of *Juniperus oxycedrus*: effect of AM fungi and organic amendments. *Appl. Soil Ecol.* **2006**, *33*, 30–38. DOI: [10.1016/j.apsoil.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.09.001)
- Carrau, F.; Gaggero, C.; Aguilar, P.S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*(3), 148-54. DOI: [10.1016/j.tibtech.2014.12.009](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.009)

- Carrau, F.; Henschke, P. *Hanseniaspora vineae* and the concept of friendly yeasts to increase autochthonous wine flavor diversity. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 702093. DOI: [10.3389/fmicb.2021.702093](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.702093)
- Carro-Huerga, G.; Mayo-Prieto, S.; Rodríguez-González, Á.; Cardoza, R.E.; Gutiérrez, S.; Casquero, P.A. Vineyard management and physicochemical parameters of soil affect native *Trichoderma* populations, sources of biocontrol agents against *Phaeoacremonium minimum*. *Plants* **2023**, *12*(4), 887. DOI: [10.3390/plants12040887](https://doi.org/10.3390/plants12040887)
- Cavagnaro, T.R.; Smith, F.A.; Smith, S.E.; Jakobsen, I. Functional diversity in arbuscular mycorrhizas: exploitation of soil patches with different phosphate enrichment differs among fungal species. *Plant. Cell Environ.* **2005**, *28*, 642–650. DOI: [10.1111/j.1365-3040.2005.01310.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01310.x)
- Cavaillon, J.M.; Legout, S. Louis Pasteur: Between myth and reality. *Biomolecules* **2022**, *12*, 596. DOI: [10.3390/biom12040596](https://doi.org/10.3390/biom12040596)
- Cavaleri, D.; McGovern, P.E.; Hartl, D.L.; Mortimer, R.; Polsinelli, M. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *J. Mol. Evol.* **2003**, *57*, 226–232 DOI: [10.1007/s00239-003-0031-2](https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2)
- Cerdan, O.; Govers, G.; Le Bissonnais, Y.; Van Oost, K.; Poesen, J.; Saby, N.; Gobin, A.; Vacca, A.; Quinton, J.; Auerswald, K.; Klik, A.; Kwaad, F.J.P.M.; Raclot, D.; Ionita, I.; Rejman, J.; Rousseva, S.; Muxart, T.; Roxo, M.J.; Dostal, T. Rates and spatial variations of soil erosion in Europe: A study based on erosion plot data. *Geomorphology* **2010**, *122*(1-2), 167-177. DOI: [10.1016/j.geomorph.2010.06.011](https://doi.org/10.1016/j.geomorph.2010.06.011)
- Chalvantzi, I.; Banilas, G.; Tassou, C.; Nisiotou, A. Patterns of genetic diversity and the invasion of commercial starters in *Saccharomyces cerevisiae* vineyard populations of Santorini Island. *Foods* **2020**, *9*(5), 561. DOI: [10.3390/foods9050561](https://doi.org/10.3390/foods9050561)
- Chalvantzi, I.; Banilas, G.; Tassou, C.; Nisiotou, A. Biogeographical regionalization of wine yeast communities in Greece and environmental drivers of species distribution at a local scale. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 705001. DOI: [10.3389/fmicb.2021.705001](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705001)
- Chapela-Oliva, C.; Winter, S.; Ochoa-Hueso, R. Edaphoclimatic drivers of the effect of extensive vegetation management on ecosystem services and biodiversity in vineyards. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2022**, *339*, 108115. DOI: [10.1016/j.agee.2022.108115](https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108115)
- Chen, H.; Ma, K.; Lu, C.; Fu, Q.; Qiu, Y.; Zhao, J.; Huang, Y.; Yang, Y.; Schadt, C.W.; Chen, H. Functional redundancy in soil microbial community based on metagenomics across the globe. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 878978. DOI: [10.3389/fmicb.2022.878978](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.878978)
- Chou, M.Y.; Vanden Heuvel, J.; Bell, T.H.; Panke-Buisse, K.; Kao-Kniffin, J. Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11039. DOI: [10.1038/s41598-018-29346-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-29346-1)
- Christiaens, J.; Franco, L.M.; Cools, T.L.; De Meester, L.; Michiels, J.; Wenseleers, T.; Hassan, B.A.; Yaksi, E.; Verstrepen, K.J. The fungal aroma gene ATF1 promotes dispersal of yeast cells through insect vectors. *Cell Rep.* **2014**, *9*(2), 425-432. DOI: [10.1016/j.celrep.2014.09.009](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.009)
- Chrysargyris, A.; Xylia, P.; Litskas, V.; Mandoulaki, A.; Antoniou, D.; Boyias, T.; Stavrinides, M.; Tzortzakis, N. Drought stress and soil management practices in grapevines in Cyprus under the threat of climate change. *J. Water Clim. Change* **2018**, *9*(4), 703–714. DOI: [10.2166/wcc.2018.135](https://doi.org/10.2166/wcc.2018.135)



- Cobos, R.; Ibáñez, A.; Diez-Galán, A.; Calvo-Peña, C.; Ghoshizadeh, S.; Coque, J.J.R. The grapevine microbiome to the rescue: Implications for the biocontrol of trunk diseases. *Plants* **2022**, *11*(7), 840. DOI: [10.3390/plants11070840](https://doi.org/10.3390/plants11070840)
- Coller, E.; Cestaro, A.; Zanzotti, R.; Bertoldi, D.; Pindo, M.; Larger, S.; Albanese, D.; Mescalchin, E.; Donati, C. Microbiome of vineyard soils is shaped by geography and management. *Microbiome* **2019**, *7*, 140. DOI: [10.1186/s40168-019-0758-7](https://doi.org/10.1186/s40168-019-0758-7)
- Colwell, R.R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *18*, 302-307. DOI: [10.1038/sj.jim.2900390](https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900390)
- Conacher, C.G.; Luyt, N.A.; Naidoo-Blassoples, R.K.; Rossouw, D.; Setati, M.E.; Bauer, F.F. The ecology of wine fermentation: a model for the study of complex microbial ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, *105*(8), 3027-3043. DOI: [10.1007/s00253-021-11270-6](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11270-6)
- Cordero-Bueso, G.; Arroyo, T.; Serrano, A.; Valero, E. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*(1), 23-29. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021)
- Costanza, R.; d'Arge, R.; de Groot, R.; Farber, E.; Grasso, M.; Hannon, B.; Limburgo, K.; Naeem, S.; O'Neill, R.V.; Paruelo, J.; Raskin, R.G.; Sutton, P.; van den Belt, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **1997**, *387*, 253-260. DOI: [10.1038/387253a0](https://doi.org/10.1038/387253a0)
- Cruz-Silva, A.; Laureano, G.; Pereira, M.; Dias, R.; Moreira da Silva, J.; Oliveira, N.; Gouveia, C.; Cruz, C.; Gama-Carvalho, M.; Alagna, F.; Duarte, B.; Figueiredo, A. A new perspective for vineyard terroir identity: looking for microbial indicator species by long read nanopore sequencing. *Microorganisms* **2023**, *11*(3), 672. DOI: [10.3390/microorganisms11030672](https://doi.org/10.3390/microorganisms11030672)
- Cureau, N.; Threlfall, R.; Marasini, D.; Lavefve, L.; Carbonero, F. Year, location, and variety impact on grape-associated mycobiota of Arkansas-grown wine grapes for wine production. *Microbial Ecol.* **2021**, *82*, 845-858. DOI: [10.1007/s00248-021-01705-y](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01705-y)
- da Silva Fernandes, F.; de Souza, E.S.; Carneiro, L.M.; Alves Silva, J.P.; de Souza, J.V.B.; da Silva Batista, J. Current ethanol production requirements for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Microbiol.* **2022**, *2022*, 7878830. DOI: [10.1155/2022/7878830](https://doi.org/10.1155/2022/7878830)
- Daane, K.M.; Hogg, B.N.; Wilson, H.; Yokota, G.Y. Native grass ground covers provide multiple ecosystem services in Californian vineyards. *J. Appl. Ecol.* **2018**, *55*, 2473-2483. DOI: [10.1111/1365-2664.13145](https://doi.org/10.1111/1365-2664.13145)
- Daily, G.C. Nature's services. Societal dependence on natural ecosystems. Island Press, 1997, Washington, D.C. 392pp. ISBN 1-55963-475-8
- Dallimer, M.; Martin-Ortega, J.; Rendon, O.; Afionis, S.; Bark, R.; Gordon, I.J.; Paavola, J. Taking stock of the empirical evidence on the insurance value of ecosystems. *Ecol. Econ.* **2020**, *167*, 106451. DOI: [10.1016/j.ecolecon.2019.106451](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2019.106451)
- Darriaut, R.; Lailheugue, V.; Masneuf-Pomarède, I.; Marguerit, E.; Martins, G.; Company, S.; Ballestra, P.; Upton, S.; Ollat, N.; Lauvergeat, V. Grapevine rootstock and soil microbiome interactions: Keys for a resilient viticulture. *Hortic Res.* **2022**, *9*, uhac019. DOI: [10.1093/hr/uhac019](https://doi.org/10.1093/hr/uhac019)
- Darriaut, R.; Tran, J.; Martins, G.; Ollat, N.; Masneuf-Pomarède, I.M.; Lauvergeat, V. In grapevine decline, microbiomes are affected differently in symptomatic and asymptomatic soils. *App. Soil Ecol.* **2023**, *183*, 104767. DOI: [10.1016/j.apsoil.2022.104767](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104767)

De la Huerta-Bengoechea, P.; Gil-Serna, J.; Melguizo, C.; Ramos, A.J.; Prim, M.; Vázquez, C.; Patiño, B. Biocontrol of mycotoxigenic fungi using bacteria isolated from ecological vineyard soils. *J. Fungi* **2022**, *8*, 1136. DOI: [10.3390/jof8111136](https://doi.org/10.3390/jof8111136)

Domizio, P.; Liu, Y.; Bisson, L.F.; Barile, D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine. *Food Microbiol.* **2014**, *43*, 5-15. DOI: [10.1016/j.fm.2014.04.005](https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.005)

Dong, Y.; Duan, S.; Xia, Q.; Liang, Z.; Dong, X.; Margaryan, K.; Musayev, M.; Goryslavets, S.; Zdunić, G.; Bert, P.F.; Lacombe, T.; Maul, E.; Nick, P.; Bitskinashvili, K.; Bisztray, G.D.; Drori, E.; De Lorenzis, G.; Cunha, J.; Popescu, C.F.; Arroyo-Garcia, R.; Arnold, C.; Ergül, A.; Zhu, Y.; Ma, C.; Wang, S.; Liu, S.; Tang, L.; Wang, C.; Li, D.; Pan, Y.; Li, J.; Yang, L.; Li, X.; Xiang, G.; Yang, Z.; Chen, B.; Dai, Z.; Wang, Y.; Arakelyan, A.; Kuliyevev, V.; Spotar, G.; Girollet, N.; Delrot, S.; Ollat, N.; This, P.; Marchal, C.; Sarah, G.; Laucou, V.; Bacilieri, R.; Röckel, F.; Guan, P.; Jung, A.; Riemann, M.; Ujmajuridze, L.; Zakalashvili, T.; Maghradze, D.; Höhn, M.; Jahnke, G.; Kiss, E.; Deák, T.; Rahimi, O.; Hübner, S.; Grassi, F.; Mercati, F.; Sunseri, F.; Eiras-Dias, J.; Dumitru, A.M.; Carrasco, D.; Rodríguez-Izquierdo, A.; Muñoz, G.; Uysal, T.; Özer, C.; Kazan, K.; Xu, M.; Wang, Y.; Zhu, S.; Lu, J.; Zhao, M.; Wang, L.; Jiu, S.; Zhang, Y.; Sun, L.; Yang, H.; Weiss, E.; Wang, S.; Zhu, Y.; Li, S.; Sheng, J.; Chen, W. Dual domestications and origin of traits in grapevine evolution. *Science* **2023**, *379*(6635), 892–901. DOI: [10.1126/science.add8655](https://doi.org/10.1126/science.add8655)

Döring, J.; Collins, C.; Frisch, M.; Kauer, R. Organic and biodynamic viticulture affect biodiversity and properties of vine and wine: A systematic quantitative review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2019**, *70*, 3. DOI: [10.5344/ajev.2019.18047](https://doi.org/10.5344/ajev.2019.18047)

Englezos, V.; Jovial, N.P.; Gianvito, P.D.; Rantsiou, K.; Cocolín, L. Microbial interactions in winemaking: Ecological aspects and effect on wine quality. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *127*, 99-113. DOI: [10.1016/j.tifs.2022.06.015](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.06.015)

Fabres, P.J.; Collins, C.; Cavagnaro, T.R.; Rodríguez-López, C.M. A concise review on multi-omics data integration for terroir analysis in *Vitis vinifera*. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1065. DOI: [10.3389/fpls.2017.01065](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01065)

Fernandes, P.; Afonso, I.M.; Pereira, J.; Rocha, R.; Rodrigues, A.S. Epiphytic microbiome of Alvarinho wine grapes from different geographic regions in Portugal. *Biology* **2023**, *12*(2), 146. DOI: [10.3390/biology12020146](https://doi.org/10.3390/biology12020146)

Fleet, G.H. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*(1-2), 11-22. DOI: [10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)

Fu, B.; Wang, S.; Su, C.; Forsius, M. Linking ecosystem processes and ecosystem services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* **2013**, *5*(1), 4-10. DOI: [10.1016/j.cosust.2012.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.12.002)

Gadoury, D.M.; Seem, R.C.; Pearson, R.C.; Wilcox, W.F.; Dunst, R.M. Effects of powdery mildew on vine growth, yield, and quality of concord grapes. *Plant Dis.* **2001**, *85*(2), 137-140. DOI: [10.1094/PDIS.2001.85.2.137](https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.2.137)

Gao, P.; Peng, S.; Sam, F.E.; Zhu, Y.; Liang, L.; Li, M.; Wang, J. Indigenous non-*Saccharomyces* yeast with  $\beta$ -Glucosidase activity in sequential fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: A strategy to improve the volatile composition and sensory characteristics of wines. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 845837. DOI: [10.3389/fmicb.2022.845837](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845837)

Garcia, L.; Celette, F.; Gary, C.; Ripoche, A.; Valdes-Gomez, H.; Metay, A. Management of service crops for the provision of ecosystem services in vineyards: A review. *Agric. Ecosys. Environ.* **2018**, *251*, 158-170. DOI: [10.1016/j.agee.2017.09.030](https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.030)

- García-Orenes, F., Roldán, A., Morugán-Coronado, A., Linares, C., Cerdà, A., Caravaca, F. Organic fertilization in traditional Mediterranean grapevine orchards mediates changes in soil microbial community structure and enhances soil fertility. *Land. Degrad. Dev.* **2016**, *27*, 1622–1628. [DOI: 10.1002/ldr.2496](https://doi.org/10.1002/ldr.2496)
- García-Rios, E.; Guillamón, J.M. Mechanisms of Yeast Adaptation to Wine Fermentations. *Prog. Mol. Subcell Biol.* **2019** *58*, 37-59. [DOI: 10.1007/978-3-030-13035-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-13035-0_2)
- Gayevski, V.; Goddard, M.R. Geographic delineations of yeast communities and populations associated with vines and wines in New Zealand. *ISME J.* **2012**, *6*(7), 1281-90. [DOI:10.1038/ismej.2011.195](https://doi.org/10.1038/ismej.2011.195)
- Geisseler, D.; Scow, K.M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. *Soil Biol. Biochem.* **2014**, *75*, 54-63. [DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.03.023](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2014.03.023)
- Ghiță, S.; Hnatiuc, M.; Ranca, A.; Artem, V.; Mădălina-Andreea, C. Studies on the short-term effects of the cease of pesticides use on vineyard microbiome. In *Vegetation dynamics, changing ecosystems and human responsibility*; Hufnagel, L.; El-Esawi, M.A. Eds.; Intechopen: London, UK, 2023; pp. 1-10. [DOI: 10.5772/intechopen.105706](https://doi.org/10.5772/intechopen.105706)
- Giffard, B.; Winter, S.; Guidoni, S.; Nicolai, A.; Castaldini, M.; Cluzeau, D.; Coll, P.; Cortet, J.; Le Cadre, E.; d’Errico, G.; Forneck, A.; Gagnarli, E.; Griesser, M.; Guernion, M.; Lagomarsino, A.; Landi, S.; Le Bissonnais, Y.; Mania, E.; Mocali, S.; Preda, C.; Priori, S.; Reineke, A.; Rusch, A.; Schroers, H.J.; Simoni, S.; Steiner, M.; Temneanu, E.; Bacher, S.; Costantini, E.A.C.; Zaller, J.; Leyer, I. Vineyard management and its impacts on soil biodiversity, functions, and ecosystem services. *Front. Ecol. Evol.* **2022**, *10*, 850272. [DOI: 10.3389/fevo.2022.850272](https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850272)
- Gilbert, J.A.; van der Lelie, D.; Zorraonaindia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*(1), 5–6. [DOI: 10.1073/pnas.1320471110](https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110)
- Gobbi, A.; Acedo, A.; Imam, N.; Santini, R.G.; Ortiz-Álvarez, R.; Ellegaard-Jensen, L.; Belda, I.; Hansen, L.H. A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 241. [DOI: 10.1038/s42003-022-03202-5](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5)
- Gonzalez, R.; Morales, P. Truth in wine yeast. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15*(5), 1339-1356. [DOI:10.1111/1751-7915.13848](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13848)
- Grangeteau, C.; Roullier-Gall, C.; Rousseaux, S.; Gougeon, R. D.; Schmitt-Kopplin, P.; Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Wine microbiology is driven by vineyard and winery anthropogenic factors. *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10*, 354–370. [DOI: 10.1111/1751-7915.12428](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12428)
- Griggs, R.G.; Steenwerth, K.L.; Mills, D.A.; Cantu, D.; Bokulich, N.A. Sources and assembly of microbial communities in vineyards as a functional component of winegrowing. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 673810. [DOI: 10.3389/fmicb.2021.673810](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673810)
- Guasch Jané, M.R.; Fonseca, S.; Ibrahim, M. “IREP EN KEMET” Wine of ancient Egypt: Documenting the viticulture and winemaking scenes in the Egyptian tombs. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* **2013**, 157-161. [DOI: 10.5194/ISPRSANNALS-II-5-W1-157-2013](https://doi.org/10.5194/ISPRSANNALS-II-5-W1-157-2013)
- Guerry, A.D.; Polasky, S.; Lubchenco, J.; Chaplin-Kramer, R.; Daily, G.C.; Griffin, R.; Ruckelshaus, M.; Bateman, I.J.; Duraiappah, A.; Elmqvist, T.; Feldman, M.W.; Folke, C.; Hoekstra, J.; Kareiva, P.M.; Keeler, B.L.; Li, S.; McKenzie, E.; Ouyang, Z.; Reyers, B.; Ricketts, T.H.; Rockström, J.; Tallis, H.; Vira, B. Natural capital and ecosystem services informing decisions: from promise to practice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112*, 7348-7355. [DOI:10.1073/pnas.1503751112](https://doi.org/10.1073/pnas.1503751112)

- Guillamón, J.M.; Barrio, E. Genetic polymorphism in wine yeasts: Mechanisms and methods for its detection. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 806. [DOI: 10.3389/fmicb.2017.00806](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00806)
- Haines-Young, R.; Potschin, M.B. Common International Classification of Ecosystem Services (CICES) v5.1 and Guidance on the application of the revised structure. 2018. Available at: [www.cices.eu](http://www.cices.eu)
- Han, K.Y.; Kröger, L.; Buchholz, F.; Dewan, I.; Quaas, M.; Schulenbur, H.; Reusch, T.B.H. The economics of microbiodiversity. *Ecol. Econ.* **2023**, *204*, 107664. [DOI:10.1016/j.ecolecon.2022.107664](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2022.107664)
- Hanada, R.E.; Pomelia, A.W.V.; Soberanis, W.; Loguercio, L.L.; Pereira, J.O. Biocontrol potential of *Trichoderma martiale* against the black-pod disease (*Phytophthora palmivora*) of cacao. *Biol. Control* **2009**, *50*(2), 143-149. [DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.04.005](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.04.005)
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*(1), 43-46. [DOI:10.1038/nrmicro797](https://doi.org/10.1038/nrmicro797)
- Hartman, K.; van der Heijden, M.G.A.; Wittwer, R.A.; Banerjee, S.; Walser, J.C.; Schlaeppli, K. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome* **2018**, *6*(1), 14. [DOI: 10.1186/s40168-017-0389-9](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9)
- Hartmann, M.; Frey, B.; Mayer, J.; Mäder, P.; Widmer, F. Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. *ISME J.* **2015**, *9*, 1177-1194. [DOI:10.1038/ismej.2014.210](https://doi.org/10.1038/ismej.2014.210)
- Henick-Kling, T. Modification of wine flavour by malolactic fermentation. In 10th International Oenological Symposium, Breisach, Germany, 3-5 May 1993, pp. 290–306. International Association for Winery Technology and Management
- Huang, J.; Tichit, M.; Poulot, M.; Darly, S.; Li, S.; Petit, C.; Aubry C. Comparative review of multifunctionality and ecosystem services in sustainable agriculture. *J. Environ. Manage.* **2015**, *149*, 138-147. [DOI: 10.1016/j.jenvman.2014.10.020](https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.10.020)
- Huang, R.; Shen, L.; Yu, H.; Jiang, J.; Qin, Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Song, Y. Evaluation of rain-shelter cultivation mode effects on microbial diversity during Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) maturation in Jingyang, Shaanxi, China. *Food Res. Int.* **2022**, *156*, 111165. [DOI:10.1016/j.foodres.2022.111165](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111165)
- IPBES. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. Díaz, S., Settele, J.; Brondízio, E.S.; Ngo, H.T.; Guèze, M.; Agard, J.; Arneth, A.; Balvanera, P.; Brauman, K.A.; Butchart, S.H.M.; Chan, K.M.A.; Garibaldi, L.A.; Ichii, K.; Liu, J.; Subramanian, S.M.; Midgley, G.F.; Miloslavich, P.; Molnár, Z.; Obura, D.; Pfaff, A.; Polasky, S.; Purvis, A.; Razaque, J.; Reyers, B.; Roy Chowdhury, R.; Shin, Y.J.; Visseren-Hamakers, I.J.; Willis, K.J.; Zayas, C.N. (Eds.) 2019; IPBES Secretariat, Bonn, Germany. 56 pp. [DOI:10.5281/zenodo.355357](https://doi.org/10.5281/zenodo.355357)
- Jackson, R.S. Nature and origin of wine quality. In *Wine tasting: A professional handbook*, 2<sup>nd</sup> ed. Jackson, R.S., Ed.; Academic Press: California, United States, 2009; pp. 387-426.
- Jacoby, R.; Peukert, M.; Succurro, A.; Koprivova, A.; Kopriva, S. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition – Current knowledge and future directions. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1617. [DOI: 10.3389/fpls.2017.01617](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617)

- Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 215-237. DOI: [10.1111/1567-1364.12111](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111)
- Jones, A.M.; Harrison, R.M. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. *Sci. Total Environ.* **2004**, *326*, 151-180. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2003.11.021](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.11.021)
- Kamilari, E.; Mina, M.; Karallis, C.; Tsaltas, D. Metataxonomic analysis of grape microbiota during wine fermentation reveals the distinction of Cyprus regional terroirs. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 726483. DOI: [10.3389/fmicb.2021.726483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726483)
- Karabegović, I.; Malićanin, M.; Popović, N.; Stamenković Stojanović, S.; Lazić, M.; Stanojević, J.; Danilović, B. Native non-Saccharomyces yeasts as a tool to produce distinctive and diverse Tamjanika grape wines. *Foods* **2022**, *11*(13), 1935. DOI: [10.3390/foods11131935](https://doi.org/10.3390/foods11131935)
- Karimi, B.; Masson, V.; Guillard, C.; Leroy, E.; Pellegrinelli, S.; Giboulot, E.; Maron, P.A.; Ranjard, L. Ecotoxicity of copper input and accumulation for soil biodiversity in vineyards. *Environ. Chem. Lett.* **2021**, *19*, 2013-2030. DOI: [10.1007/s10311-020-01155-x](https://doi.org/10.1007/s10311-020-01155-x)
- Keckskeméti, E.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Reineke, A. Are epiphytic microbial communities in the carposphere of ripening grape clusters (*Vitis vinifera* L.) different between conventional, organic, and biodynamic grapes? *PLoS One* **2016**, *11*, e0160852. DOI: [10.1371/journal.pone.0160852](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160852)
- Kernaghan, G.; Mayerhofer, M.; Griffin, A. Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol. *Can. J. Microbiol.* **2017**, *63*(7), 583-595. DOI: [10.1139/cjm-2016-0740](https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0740)
- Kioroglou, D.; Kraeva-Deloire, E.; Leigh M. Schmidtke, L.M.; Mas, A.; Portillo, M.C. Geographical origin has a greater impact on grape berry fungal community than grape variety and maturation state. *Microorganisms* **2019**, *7*, 669. DOI: [10.3390/microorganisms7120669](https://doi.org/10.3390/microorganisms7120669)
- Kirkpatrick, J. The jews and their god of wine. *Arch. Für Religionsgeschichte* **2014**, *15*(1), 167-186. DOI: [10.1515/arege-2013-0012](https://doi.org/10.1515/arege-2013-0012)
- Knight, S.J.; Klaere, S.; Fedrizzi, B.; Goddard, M.R. Regional microbial signatures positively correlate with differential wine phenotypes: evidence for a microbial aspect to terroir. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14233. DOI: [10.1038/srep14233](https://doi.org/10.1038/srep14233)
- Knight, S.J.; Karon, O.; Goddard, M.R. Small scale fungal community differentiation in a vineyard system. *Food Microbiol.* **2020**, *87*, 103358. DOI: [10.1016/j.fm.2019.103358](https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103358)
- Kuzyakov, Y.; Xu, X. Competition between roots and microorganisms for nitrogen: mechanisms and ecological relevance. *New Phytol.* **2013**, *198*, 656–669. DOI: [10.1111/nph.12235](https://doi.org/10.1111/nph.12235)
- Larsen, S.; Albanese, D.; Stegen, J.; Franceschi, P.; Collier, E.; Zanzotti, R.; Ioriatti, C.; Stefani, E.; Pindo, M.; Cestaro, A.; Donati, C. Distinct and temporally stable assembly mechanisms shape bacterial and fungal communities in vineyard soils. *Microb. Ecol.* **2023**, *86*, 337–349. DOI: [10.1007/s00248-022-02065-x](https://doi.org/10.1007/s00248-022-02065-x)
- Lauber, C.L.; Strickland, M.; Bradford, M.A.; Fierer, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biol. Biochem.* **2008**, *40*, 2407-2415. DOI: [10.1016/j.soilbio.2008.05.021](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.021)
- Le Bissonnais, Y.; Montier, C.; Jamague, M.; Daroussin, J.; King, D. Mapping erosion risk for cultivated soil in France. *Catena* **2001**, *46*, 207–220. DOI: [10.1016/S0341-8162\(01\)00167-9](https://doi.org/10.1016/S0341-8162(01)00167-9)

- Lewin, B. Wine myths and reality. *Wine appreciation guild*, San Francisco, 636 pp. **2010** ISBN 1934259519
- Li, H.; Wang, H. Chapter 1: The history of Chinese wine. *Overview of Wine in China*, Les Ulis: EDP Sciences, pp. 1-8. **2022**. DOI: [10.1051/978-2-7598-2516-5.c004](https://doi.org/10.1051/978-2-7598-2516-5.c004)
- Li, R.; Yang, S.; Lin, M.; Guo, S.; Han, X.; Ren, M.; Du, L.; Song, Y.; You, Y.; Zhan, J.; Huang, W. The biogeography of fungal communities across different chinese wine-producing regions associated with environmental factors and spontaneous fermentation performance. *Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 636639. DOI: [10.3389/fmicb.2021.636639](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636639)
- Liu, D.; Zhang, P.; Chen, D.; Howell, K. From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2679. DOI: [10.3389/fmicb.2019.02679](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679)
- Liu, D.; Chen, Q.; Zhang, P.; Chen, D.; Howell, K.S. The fungal microbiome is an important component of vineyard ecosystems and correlates with regional distinctiveness of wine. *mSphere* **2020**, *5*(4), e00534-20. DOI: [10.1128/mSphere.00534-20](https://doi.org/10.1128/mSphere.00534-20)
- Lonvaud-Funel, A. Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek* **1999**, *76*(1-4), 317-331. DOI: [10.1023/A:1002088931106](https://doi.org/10.1023/A:1002088931106)
- Maluleke, E.; Jolly, N.P.; Patterson, H.G.; Setati, M.E. Antifungal activity of non-conventional yeasts against *Botrytis cinerea* and non-*Botrytis* grape bunch rot fungi. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 986229. DOI: [10.3389/fmicb.2022.986229](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.986229)
- Mandl, K.; Cantelmo, C.; Gruber, E.; Faber, F.; Friedrich, B.; Zaller, J.G. Effects of glyphosate-, glufosinate- and flazasulfuron-based herbicides on soil microorganisms in a vineyard. *Bull. Env. Contam. Toxic.* **2018**, *101*, 562–569. DOI: [10.1007/s00128-018-2438-x](https://doi.org/10.1007/s00128-018-2438-x)
- Martins, G.; Casini, C.; Da Costa, J.P.; Geny, L.; Lonvaud, A.; Masneuf-Pomarède, I. Correlation between water activity (aw) and microbial epiphytic communities associated with grape berries. *Oeno One* **2020**, *54*(1), 49-61. DOI: [10.20870/oenone.2020.54.1.2435](https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.1.2435)
- Martínez-Diz, M.P.; Andrés-Sodupe, M.; Bujanda, R.; Díaz-Losada, E.; Eichmeier, A.; Gramaje, D. Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecol.* **2019**, *41*, 234–44. DOI: [10.1016/j.funeco.2019.07.003](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.003)
- Martins, G.; Lauga, B.; Miot-Sertier, C.; Mercier, A.; Lonvaud, A.; Soulas, M.L.; Soulas, G.; Masneuf-Pomarède, I. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLoS One* **2013**, *8*(8), e73013. DOI: [10.1371/journal.pone.0073013](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073013)
- Martiny, J.B.H.; Bohannan, B.J.M.; Brown, J.H.; Colwell, R.K.; Fuhrman, J.A.; Green, J.L.; Horner-Devine, M.C.; Kane, M.; Krumins, J.A.; Kuske, C.R.; Morin, P.J.; Naeem, S.; Øvreås, L.; Reysenbach, A.L.; Smith, V.H.; Staley, J.T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 102-112. DOI: [10.1038/nrmicro1341](https://doi.org/10.1038/nrmicro1341)
- Marsit, S.; Dequin, S. Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*(7), fov067. DOI: [10.1093/femsyr/fov067](https://doi.org/10.1093/femsyr/fov067)
- Mateo, J.J.; Maicas, S. Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation* **2016**, *2*(3), 14. DOI: [10.3390/fermentation2030014](https://doi.org/10.3390/fermentation2030014)
- McGovern, P.E.; Zhang, J.; Tang, J.; Zhang, Z.; Hall, G.R.; Moreau, R.A.; Nuñez, A.; Butrym, E.D.; Richards, M.P.; Wang, C.S.; Cheng, G.; Zhao, Z.; Wang, C. Fermented beverages of pre-

- and proto-historic China. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*(51), 17593-17598. [DOI:10.1073/pnas.0407921102](https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102)
- McGovern, P.E.; Jalabadze, M.; Batiuk, S.; Callahan, M.P.; Smith, K.E.; Hall, G.R.; Kvavadze, E.; Maghradze, D.; Rusishvili, N.; Bouby, L.; Failla, O.; Cola, G.; Mariani, L.; Boaretto, E.; Bacillieri, R.; This, P.; Wales, N.; Lordkipanidze, D. Early Neolithic wine of Georgia in the South Caucasus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*(48), E10309-E10318. [DOI:10.1073/pnas.1714728114](https://doi.org/10.1073/pnas.1714728114)
- Mezzasalma, V.; Sandionigi, A.; Guzzetti, L.; Galimberti, A.; Grando, M.S.; Tardaguila, J.; Labra, M. Geographical and cultivar features differentiate grape microbiota in Northern Italy and Spain vineyards. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 946. [DOI: 10.3389/fmicb.2018.00946](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00946)
- Milanovic, V.; Comitini, F.; Ciani, M. Grape berry yeast communities: influence of fungicide treatments. *Int. J. Food. Microbiol.* **2013**, *161*(3), 240-246. [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019)
- Miura, T.; Sánchez, R.; Castañeda, L.E.; Godoy, K.; Barbosa, O. Is microbial terroir related to geographic distance between vineyards? *Environ. Microbiol. Rep.* **2017**, *9*(6), 742-749. [DOI:10.1111/1758-2229.12589](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12589)
- Montella, M.M. Wine tourism and sustainability: a review. *Sustainability* **2017**, *9*, 113. [DOI:10.3390/su9010113](https://doi.org/10.3390/su9010113)
- Morrison-Whittle, P.; Lee, S.A.; Goddard, M.R. Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* **2017**, *246*, 306-313. [DOI: 10.1016/j.agee.2017.05.022](https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.022)
- Morrison-Whittle, P.; Goddard, M.R. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*(1), 75–84. [DOI: 10.1111/1462-2920.13960](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13960)
- Mozzachiodi, S.; Bai, F.Y.; Baldrian, P.; Bell, G.; Boundy-Mills, K.; Buzzini, P.; Čadež N.; Cubillos, F.A.; Dashko, S.; Dimitrov, R.; Fisher, K.J.; Gibson, B.; Gouliamova, D.; Greig, D.; Heisteringer, L.; Hittinger, C.T.; Jecmenica, M.; Koufopanou, V.; Landry, C.R.; Mašínová, T.; Naumova, E.S.; Opulente, D.; Peña, J.J.; Petrovič, U.; Tsai, I.J.; Turchetti, B.; Villarreal, P.; Yurkov, A.; Liti, G.; Boynton, P. Yeasts from temperate forests. *Yeast* **2022**, *39*(1-2), 4-24. [DOI:10.1002/yea.3699](https://doi.org/10.1002/yea.3699)
- Mutawila, C.; Halleen, F.; Mostert, L. Optimisation of time of application of *Trichoderma* biocontrol agents for protection of grapevine pruning wounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2016**, *22*, 279–287. [DOI: 10.1111/ajgw.12218](https://doi.org/10.1111/ajgw.12218)
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G.; Renella, G. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* **2003**, *54*(4), 655-670. [DOI:10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x](https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x)
- Nascimbene, J.; Marini, L.; Ivan, D.; Zottini, M. Management intensity and topography determined plant diversity in vineyards. *PLoS One* **2013**, *8*(10), e76167. [DOI:10.1371/journal.pone.0076167](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076167)
- Oehl, F.; Koch, B. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in no-till and conventionally tilled vineyards. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2018**, *91*, 56-60. [DOI: 10.5073/JABFQ.2018.091.008](https://doi.org/10.5073/JABFQ.2018.091.008)
- OIV-International Organisation of Vine and Wine. State of the world vine and wine sector 2021. **2022**, 20pp.

- Okur, N.; Altindışlı, A.; Çengel, M.; Göçmez, S.; Kayıkçıoğlu, H.H. Microbial biomass and enzyme activity in vineyard soils under organic and conventional farming systems. *Turk. J. Agric. For.* **2009**, *33*(4), 413–423. DOI: [10.3906/tar-0806-23](https://doi.org/10.3906/tar-0806-23)
- Onofri, L.; Boatto, V. On the economic valuation of cultural ecosystem services: A tale of myths, vine and wine. *Ecosyst. Serv.* **2020**, *46*, 101215. DOI: [10.1016/j.ecoser.2020.101215](https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2020.101215)
- Origone, A.C.; Rodríguez, M.E.; Oteiza, J.M.; Querol, A.; Lopes, C.A. *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces uvarum* hybrids generated under different conditions share similar winemaking features. *Yeast* **2018** *35*, 157-171. DOI: [10.1002/yea.3295](https://doi.org/10.1002/yea.3295)
- Ortiz-Álvarez, R.; Ortega-Arranz, H.; Ontiveros, V.J.; Celis, M.; Ravarani, C.; Acedo, A.; Belda, I. Network properties of local fungal communities reveal the anthropogenic disturbance consequences of farming practices in vineyard soils. *Msystems* **2021**, *6*(3), e00344-21. DOI: [10.1128/mSystems.00344-21](https://doi.org/10.1128/mSystems.00344-21)
- Ostandie, N.; Giffard, B.; Bonnard, O.; Joubard, B.; Richart-Cervera, S.; Thiéry, D.; Rusch, A. Multi-community effects of organic and conventional farming practices in vineyards. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 11979. DOI: [10.1038/s41598-021-91095-5](https://doi.org/10.1038/s41598-021-91095-5)
- Paiola, A.; Assandri, G.; Brambilla, M.; Zottini, M.; Pedrini, P.; Nascimbene, J. Exploring the potential of vineyards for biodiversity conservation and delivery of biodiversity-mediated ecosystem services: A global-scale systematic review. *Sci. Total Environ.* **2020**, *706*, 135839. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135839](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135839)
- Pancher, M.; Coel, M.; Corneo, P.E.; Longa, C.M.O.; Yousaf, S.; Pertot, I.; Campisano, A. Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*(12), 4308-4317. DOI: [10.1128/AEM.07655-11](https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11)
- Paolinelli, M.; Martinez, L. E.; García-Lampasona, S.; Diaz-Quirós, C.; Belmonte, M.; Ahumada, G.; Pirrone, M.A.; Farber, M.D.; Escoriaza, G.; Longone, V.; González, M.; Lerena, C.; Combina, M.; Mercado, L. A. Microbiome in soils of Mendoza: microbial resources for the development of agroecological management in viticulture. *OENO One* **2023**, *57*(1), 191–205. DOI: [10.20870/oeno-one.2023.57.1.5585](https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.1.5585)
- Pascual, U.; Termansen, M.; Hedlund, K.; Brussaard, L.; Faber, J.H.; Foudi, S.; Lemanceau, P.; Jørgensen, S.L. On the value of soil biodiversity and ecosystem services. *Ecosyst. Serv.* **2015**, *15*, 11-18. DOI: [10.1016/j.ecoser.2015.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2015.06.002)
- Pasteur, L. Etudes sur le vin. Imprimeurs Imperials. **1866** Paris.
- Patrignani, F.; Montanari, C.; Serrazanetti, D.I.; Braschi, G.; Vernocchi, P.; Tabanelli, G.; Parpinello, G.P.; Versari, A.; Gardini, F.; Lanciotti, R. Characterisation of yeast microbiota, chemical and sensory properties of organic and biodynamic Sangiovese red wines. *Ann. Microbiol.* **2016**, *67*, 99–109. DOI: [10.1007/s13213-016-1241-3](https://doi.org/10.1007/s13213-016-1241-3)
- Paul, C.; Hanley, N.; Meyer, S.T.; Fürst, C.; Weisser, W.W.; Knoke, T. On the functional relationship between biodiversity and economic value. *Sci. Adv.* **2020**, *6*(5), 7712. DOI: [10.1126/sciadv.aax7712](https://doi.org/10.1126/sciadv.aax7712)
- Paungfoo-Lonhienne, C.; Yeoh, Y.K.; Kasinadhuni, N.R.; Lonhienne, T.G.; Robinson, N.; Hugenholtz, P.; Ragan, M.A.; Schmidt, S. Nitrogen fertilizer dose alters fungal communities in sugarcane soil and rhizosphere. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8678. DOI: [10.1038/srep08678](https://doi.org/10.1038/srep08678)
- Perazzolli, M.; Antonielli, L.; Storari, M.; Puopolo, G.; Pancher, M.; Giovannini, O.; Pindo, M.; Pertot, I. Resilience of the natural phyllosphere microbiota of the grapevine to chemical and



- biological pesticides. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, 80(12), 3585–3596. [DOI:10.1128/AEM.00415-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00415-14)
- Pérez-Torrado, R.; Barrio, E.; Querol, A. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2017**, 58(11), 1780-1790. [DOI:10.1080/10408398.2017.1285751](https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1285751)
- Perpetuini, G.; Pio Rossetti, A.; Battistelli, N.; Zulli, C.; Cichelli, A.; Arfelli, A.; Arfelli, G.; Tofalo, R. Impact of vineyard management on grape fungal community and Montepulciano d'Abruzzo wine quality. *Food Res. Int.* **2022**, 158, 111577. [DOI: 10.1016/j.foodres.2022.111577](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111577)
- Petgen, M.; Schropp, A.; Marschner, H.; Roemheld, V. Investigations on the occurrence of arbuscular mycorrhizae in some grape-vine nurseries and the practical management of field inoculation with arbuscular mycorrhizae. *Mitteilungen-Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*, **1997**, 32-46.
- Piao, H.; Hawley, E.; Kopf, S.; DeScenzo, R.; Sealock, S.; Henick-Kling, T.; Hess, M. Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 809. [DOI: 10.3389/fmicb.2015.00809](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00809)
- Pinto, C.; Pinho, D.; Cardoso, R.; Custódio, V.; Fernandes, J.; Sousa, S.; Pinheiro, M.; Egas, C.; Gomes, A.C. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 905. [DOI: 10.3389/fmicb.2015.00905](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905)
- Pinto, C.; Custódio, V.; Nunes, M.; Songy, A.; Rabenoelina, F.; Courteaux, B.; Clément, C.; Gomes, A.C.; Fontaine, F. Understand the potential role of *Aureobasidium pullulans*, a resident microorganism from grapevine, to prevent the infection caused by *Diplodia seriata*. *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 3047. [DOI: 10.3389/fmicb.2018.03047](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03047)
- Point, E.; Tyedmers, P.; Naugler, C. Life cycle environmental impacts of wine production and consumption in Nova Scotia, Canada. *J. Clean. Prod.* **2012**, 27, 11-20. [DOI:10.1016/j.jclepro.2011.12.035](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.035)
- Pontes, A.; Hutzler, M.; Brito, P.H.; Sampaio, J.P. Revisiting the taxonomic synonyms and populations of *Saccharomyces cerevisiae* – Phylogeny, phenotypes, ecology and domestication. *Microorganisms* **2020**, 8(6), 903. [DOI: 10.3390/microorganisms8060903](https://doi.org/10.3390/microorganisms8060903)
- Portillo, M.C.; Mas, A. Analysis of microbial diversity and dynamics during wine fermentation of Grenache grape variety by high-throughput barcoding sequencing. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, 72, 317–321. [DOI: 10.1016/j.lwt.2016.05.009](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.009)
- Portillo, M.C.; Franquès, J.; Araque, I.; Reguant, C.; Bordons, A. Bacterial diversity of grenache and carignan grape surface from different vineyards at Priorat wine region (Catalonia, Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, 219, 56–63. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.002)
- Power, A.G. Ecosystem services and agriculture: trade-offs and synergies. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **2010**, 365, 2959–2971. [DOI: 10.1098/rstb.2010.0143](https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0143)
- Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **2000**, 16(8), 675-729. [DOI:10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8%3C675::AID-YEA585%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8%3C675::AID-YEA585%3E3.0.CO;2-B)
- Pretorius, I.S. Tasting the terroir of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Res.* **2020**, 20(1), foz084. [DOI: 10.1093/femsyr/foz084](https://doi.org/10.1093/femsyr/foz084)
- Pretorius, I.S. Visualizing the next frontiers in wine yeast research. *FEMS Yeast Res.* **2022**, 22(1), foac010. [DOI: 10.1093/femsyr/foac010](https://doi.org/10.1093/femsyr/foac010)

- Primmer, E.; Paavola, J. Insurance value of ecosystems: an introduction. *Ecol. Econ.* **2021**, *184*, 107001. [DOI: 10.1016/j.ecolecon.2021.107001](https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2021.107001)
- Probst, B.; Schöler, C.; Joergensen, R.G. Vineyard soils under organic and conventional management—microbial biomass and activity indices and their relation to soil chemical properties. *Biol. Fert. Soils* **2008**, *44*, 443–450. [DOI: 10.1007/s00374-007-0225-7](https://doi.org/10.1007/s00374-007-0225-7)
- Pulleman, M.; Creamer, R.; Hamer, U.; Helder, J.; Pelosi, C.; Pérès, G.; Rutgers, M. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services – an overview of European approaches. *Curr. Opin. Env. Sust.* **2012**, *4*, 529-538. [DOI: 10.1016/j.cosust.2012.10.009](https://doi.org/10.1016/j.cosust.2012.10.009)
- Querol, A.; Fernández-Espinar, M.T.; del Olmo, M.; Barrio, E. Adaptative evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, *86*(1-2), 3-10. [DOI: 10.1016/S0168-1605\(03\)00244-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00244-7)
- Querol, A.; Pérez-Torrado, R.; Alonso-Del-Real, J.; Minebois, R.; Stribny, J.; Oliveira, B.M.; Barrio, E. New trends in the uses of yeasts in oenology. *Adv. Food Nutr. Res.* **2018**, *85*, 177-210. [DOI: 10.1016/bs.afnr.2018.03.002](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.002)
- Quiquerez, A.; García, J.P.; Dequiedt, S.; Djemiel, C.; Terrat, S.; Mathieu, O.; Sassi, A.; Ranjard, L. Legacy of land-cover changes on soil microbiology in Burgundy vineyards (Pernand-Vergelesses, France). *OENO One* **2022**, *56*, 2. [DOI: 10.20870/oenone.2022.56.2.5432](https://doi.org/10.20870/oenone.2022.56.2.5432)
- Rashid, M.I.; Mujawar, L.H.; Shahzad, T.; Almeelbi, T.; Ismail, I.M.; Oves, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol. Res.* **2016**, *183*, 26-41. [DOI: 10.1016/j.micres.2015.11.007](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.007)
- Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Eviner, V.T. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant Soil* **2002**, *238*, 325–333. [DOI:10.1023/A:1014483303813](https://doi.org/10.1023/A:1014483303813)
- Rillig, M.C.; Mumey, D.L. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* **2006**, *171*(1), 41-53. [DOI:10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x)
- Rillig, M.C.; Aguilar-Trigueros, C.A.; Bergmann, J.; Verbruggen, E.; Veresoglou, S.D.; Lehmann, A. (2014) Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol.* **2014**, *205*(4), 1385–1388. [DOI: 10.1111/nph.13045](https://doi.org/10.1111/nph.13045)
- Rivas, G.A.; Guillade, A.C.; Semorile, L.C.; Delfederico, L. Influence of climate on soil and wine bacterial diversity on a vineyard in a non-traditional wine region in Argentina. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 726384. [DOI: 10.3389/fmicb.2021.726384](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726384)
- Robertson, G.P.; Swinton, S.M. Reconciling agricultural productivity and environmental integrity: a grand challenge for agriculture. *Front. Eco. Environ.* **2005**, *3*, 38-46. [DOI:10.1890/1540-9295\(2005\)003\[0038:RAPAEI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2005)003[0038:RAPAEI]2.0.CO;2)
- Rodríguez-Entrena M.; Colombo, S.; Arriaza, M. The landscape of olive groves as a driver of the rural economy. *Land Use Policy* **2017**, *65*, 164-175. [DOI: 10.1016/j.landusepol.2017.03.017](https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2017.03.017)
- Rosso, A.M. Beer and wine in antiquity: Beneficial remedy or punishment imposed by the Gods? *Acta med-hist. Adriat.* **2012**, *10*(2), 237-262.
- Sabate, J.; Cano, J.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamon, J.M. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol. Res.* **2002**, *157*, 267–274. [DOI: 10.1078/0944-5013-00163](https://doi.org/10.1078/0944-5013-00163)
- Scandellari, F. Arbuscular mycorrhizal contribution to nitrogen uptake of grapevines. *Vitis* **2017**, *56*, 147-154. [DOI: 10.5073/vitis.2017.56.147-154](https://doi.org/10.5073/vitis.2017.56.147-154)

- Scannell, D.R.; Zill, O.A.; Rokas, A.; Payen, C.; Dunham, M.J.; Eisen, M.B.; Rine, J.; Johnston, M.; Hittinger, C.T. The awesome power of yeast evolutionary genetics: New genome sequences and strain resources for the *Saccharomyces sensu stricto* genus. *G3 (Bethesda)* **2011**, *1*(1), 11–25. DOI: [10.1534/g3.111.000273](https://doi.org/10.1534/g3.111.000273)
- Schmid, F.; Moser, G.; Müller, H.; Berg, G. Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: Organic farming benefits natural biocontrol agents. *Appl. Environ. Microb.* **2011**, *77*, 2188-2191. DOI: [10.1128/AEM.02187-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02187-10)
- Schreiner, R.P. Effects of native and nonnative arbuscular mycorrhizal fungi on growth and nutrient uptake of “Pinot noir” (*Vitis vinifera* L.) in two soils with contrasting levels of phosphorous. *Appl. Soil Ecol.* **2007**, *36*(2-3), 205-215. DOI: [10.1016/j.apsoil.2007.03.002](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.03.002)
- Setati, M.E.; Jacobson, D.; Andong, U.; Bauer, F. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. *PLoS One* **2012**, *7*, e52609. DOI: [10.1371/journal.pone.0052609](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052609)
- Setati, M.E.; Jacobson, D.; Bauer, F.F. Sequence-based analysis of the *Vitis vinifera* L. cv cabernet sauvignon grape must mycobiome in three South African vineyards employing distinct agronomic systems. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1-12. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01358](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01358)
- Sidari, R.; Ženišová, K.; Tobolková, B.; Belajová, E.; Cabcárová, T.; Bučková, M.; Puškárová, A.; Planý, M.; Kuchta, T.; Pangallo, D. Wine yeasts selection: Laboratory characterization and protocol review. *Microorganisms* **2021**, *9*(11), 2223. DOI: [10.3390/microorganisms9112223](https://doi.org/10.3390/microorganisms9112223)
- Sipiczki, M. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res.* **2008** *8*(7), 996-1007. DOI: [10.1111/j.1567-1364.2008.00369.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00369.x)
- Sirén, K.; Mak, S.S.T.; Fischer, U.; Hansen, L.H.; Gilbert, M.T.P. Multi-omics and potential applications in wine production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 172–178. DOI: [10.1016/j.copbio.2018.11.014](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.014)
- Smets, W.; Moretti, S.; Denys, S.; Lebeer, S. Airborne bacteria in the atmosphere: Presence, purpose, and potential. *Atmos. Environ.* **2016**, *139*, 214-221. DOI: [10.1016/j.atmosenv.2016.05.038](https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2016.05.038)
- Song, R.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Li, H.; Wang, H. A simple method using an allometric model to quantify the carbon sequestration capacity in vineyards. *Plants* **2023**, *12*(5), 997. DOI: [10.3390/plants12050997](https://doi.org/10.3390/plants12050997)
- Stanislawski, D. Dionysus westward: Early religion and the economic geography of wine. *Geogr. Rev.* **1975**, *65*, 4. DOI: [10.2307/213743](https://doi.org/10.2307/213743)
- Steel, C.C.; Blackman, J.W.; Schmidtke, L.M. Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*(22), 5189–5206. DOI: [10.1021/jf400641r](https://doi.org/10.1021/jf400641r)
- Steenwerth, K.L.; Morelan, I.; Stahel, R.; Figueroa-Balderas, R.; Cantu, D.; Lee, J.; Runnebaum, R.C.; Poret-Peterson, A.T. Fungal and bacterial communities of “Pinot noir” must: effects of vintage, growing region, climate, and basic must chemistry. *PeerJ* **2021**, *9*, e10836. DOI: [10.7717/peerj.10836](https://doi.org/10.7717/peerj.10836)
- Stefanini, I.; Albanese, D.; Cavazza, A.; Franciosi, E.; De Filippo, C.; Donati, C.; Cavalieri, D. Dynamic changes in microbiota and mycobiota during spontaneous ‘Vino Santo Trentino’ fermentation. *Microbial Biotechnol.* **2016**, *9*(2), 195–208. DOI: [10.1111/1751-7915.12337](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12337)
- Stevenson, A.C. Studies in the vegetational history of S. W. Spain II: Palynological investigations at Laguna de Las Madres, S. W. Spain. *J. Biogeogr.* **1985**, *12*(4), 293-314. DOI: [10.2307/2844863](https://doi.org/10.2307/2844863)

- Suman, J.; Rakshit, A.; Ogireddy, S.D.; Singh, S.; Gupta, C.; Chandrakala, J. Microbiome as a key player in sustainable agriculture and human health. *Front. Soil Sci.* **2022**, *2*, 821589. [DOI:10.3389/fsoil.2022.821589](https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.821589)
- Sun, q.; Guoa, S.; Wang, R.; Song, J. Responses of bacterial communities and their carbon dynamics to subsoil exposure on the Loess Plateau. *Sci. Total Environ.* **2021**, *756*, 144-146. [DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.144146](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144146)
- Tan, Y.; Du, H.; Zhang, H.; Fang, C.; Jin, G.; Chen, S.; Wu, Q.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Xu, Y. Geographically associated fungus-bacterium interactions contribute to the formation of geography-dependent flavor during high-complexity spontaneous fermentation. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*(5), e0184422. [DOI: 10.1128/spectrum.01844-22](https://doi.org/10.1128/spectrum.01844-22)
- Tapia, S.M.; Pérez-Torrado, R.; Adam, A.C.; Macías, L.G.; Barrio, E.; Querol, A. Adaptive evolution in the *Saccharomyces kudriavzevii* Aro4p promoted a reduced production of higher alcohols. *Microb. Biotechnol.* **2022**, *15*(12), 2958-2969. [DOI: 10.1111/1751-7915.14154](https://doi.org/10.1111/1751-7915.14154)
- Taylor, M.W.; Tsai, P.; Anfang, N.; Ross, H.A.; Goddard, M.R. Pyrosequencing reveals regional differences in fruit-associated fungal communities. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*(9), 2848-2858. [DOI: 10.1111/1462-2920.12456](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12456)
- Tedersoo, L.; Bahram, M.; Pölme, S.; Kõljalg, U.; Yorou, N.S.; Wijesundera, R.; Villarreal Ruiz, L.; Vasco-Palacios, A.M.; Quang Thu, P.; Suija, A.; Smith, M.W.; Sharp, C.; Saluveer, E.; Saitta, A.; Rosas, M.; Riit, R.; Ratkowsky, D.; Pritsch, K.; Põldmaa, K.; Piepenbring, M.; Phosri, C.; Peterson, M.; Parts, K.; Pärtel, K.; Otsing, E.; Nouhra, E.; Njouonkou, A.L.; Henrik Nilsson, R.; Morgado, L.N.; Mayor, J.; May, T.W.; Majuakim, L.; Lodge, D.J.; Lee, S.S.; Larsson, K.H.; Kohout, P.; Hosaka, K.; Hiiesalu, I.; Henkel, T.W.; Harend, H.; Guo, L.D.; Greslebin, A.; Grelet, G.; Geml, J.; Gates, G.; Dunstan, W.; Dunk, C.; Drenkhan, R.; Dearnaley, J.; De Kesel, A.; Dang, T.; Chen, X.; Buegger, F.; Brearley, F.Q.; Bonito, G.; Anslan, S.; Abell, S.; Abarenkov, K. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* **2014**, *346*, 6213. [DOI: 10.1126/science.1256688](https://doi.org/10.1126/science.1256688)
- TEEB. TEEB for agriculture & food: Scientific and economic foundations. UN Environment: Geneva, Switzerland, 2018.
- Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *112*, 302-315. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x)
- Tempère, S.; Marchal, A.; Barbe, J.C.; Bely, M.; Masneuf-Pomarede, I.; Marullo, P.; Albertin, W. The complexity of wine: clarifying the role of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*(9), 3995-4007. [DOI: 10.1007/s00253-018-8914-8](https://doi.org/10.1007/s00253-018-8914-8)
- Tempesta, T.; Giancristofaro, R.A.; Corain, L.; Salmaso, L.; Tomasi, D.; Boatto, V. The importance of landscape in wine quality perception: An integrated approach using choice-based conjoint analysis and combination-based permutation tests. *Food Qual. Prefer.* **2010**, *21*(7), 827-836. [DOI: 10.1016/j.foodqual.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2010.04.007)
- This, P.; Lacombe, T.; Thomas, M.R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet.* **2006**, *22*, 511-519. [DOI: 10.1016/j.tig.2006.07.008](https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.07.008)
- Torres, N.; Yu, R.; Kurtural, S.K. Inoculation with mycorrhizal fungi and irrigation management shape the bacterial and fungal communities and networks in vineyard soils. *Microorganisms* **2021**, *9*(6), 1273. [DOI: 10.3390/microorganisms9061273](https://doi.org/10.3390/microorganisms9061273)
- Traeger, C.P. On option values in environmental and resource economics. *Resour. Energy Econ.* **2014**, *37*, 242-252. [DOI: 10.1016/j.reseneeco.2014.03.001](https://doi.org/10.1016/j.reseneeco.2014.03.001)

- Tronchoni, J.; Setati, M.E.; Fracassetti, D.; Valdetara, F.; Maghradze, D.; Foschino, R.; Curiel, J.A.; Morales, P.; Gonzalez, R.; Vigentini, I.; Bauer, F.F. Identifying the main drivers in microbial diversity for cabernet sauvignon cultivars from Europe to South Africa: Evidence for a cultivar-specific microbial fingerprint. *J. Fungi* **2022**, *8*(10), 1034. [DOI: 10.3390/jof8101034](https://doi.org/10.3390/jof8101034)
- Trouvelot, S.; Bonneau, L.; Redecker, D.; van Tuinen, D.; Adrian, M.; Wipf, D. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron. Sustain. Dev.* **2015**, *35*, 1449–1467. [DOI:10.1007/s13593-015-0329-7](https://doi.org/10.1007/s13593-015-0329-7)
- United Nations. System of Environmental-Economic Accounting — Ecosystem Accounting (SEEA EA). 2021. Available at: <https://seea.un.org/ecosystem-accounting>
- Vadour, E.; Costantini, E.; Jones, G.V.; Mocali, S. An overview of the recent approaches for terroir functional modelling, footprinting and zoning. *Soil Discussions* **2014**, *1*(1), 827-906. [DOI:10.5194/soild-1-827-2014](https://doi.org/10.5194/soild-1-827-2014)
- Valentini, B.; Barbero, F.; Casacci, L.P.; Luganini, A.; Stefanini, I. Forest influence yeast populations vectored by insects into vineyards. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1039939. [DOI:10.3389/fmicb.2022.1039939](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1039939)
- van Leeuwen, C.; Friant, P.; Chone, X.; Tregoat, O.; Koundouras, S.; Dubourdieu, D. Influence of climate, soil and cultivar on terroir. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, *55*(3), 207-217. [DOI:10.5344/ajev.2004.55.3.207](https://doi.org/10.5344/ajev.2004.55.3.207)
- van Leeuwen, C.; Seguin, G. The concept of *Terroir* in viticulture. *J. Wine Res.* **2006**, *17*(1), 1-10. [DOI: 10.1080/09571260600633135](https://doi.org/10.1080/09571260600633135)
- Varela, C.; Borneman, A.R. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast* **2017**, *43*(3), 111-128. [DOI:10.1002/yea.3219](https://doi.org/10.1002/yea.3219)
- Vega-Avila, A.D.; Gumiere, T.; Andrade, P.A.M.; Lima-Perim, J.E.; Durrer, A.; Baigori, M.; Vazquez, F.; Andreote, F.D. Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *A. Van Leeuw. J. Microb.* **2015**, *107*, 575–588. [DOI: 10.1007/s10482-014-0353-7](https://doi.org/10.1007/s10482-014-0353-7)
- Viers, J.H., Williams, J.N., Nicholas, K.A., Barbosa, O., Kotzé, I., Spence, L., Webb, L.B., Merenlender, A.; Reynolds, M. Vinecology: pairing wine with nature. *Conserv. Lett.* **2013**, *6*, 287-299. [DOI: 10.1111/conl.12011](https://doi.org/10.1111/conl.12011)
- Vigentini, I.; De Lorenzis, G.; Fabrizio, V.; Valdetara, F.; Faccincani, M.; Panont, C.A.; Picozzi, C.; Imazio, S.; Failla, O.; Foschino, R. The vintage effect overcomes the terroir effect: a three year survey on the wine yeast biodiversity in Franciacorta and Oltrepò Pavese, two northern Italian vine-growing areas. *Microbiology* **2015**, *161*(2), 362-373. [DOI: 10.1099/mic.0.000004](https://doi.org/10.1099/mic.0.000004)
- Wagg, C.; Bender, S.F.; Widmer, F.; van der Heijden, M.G.A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*(14), 5266-5270. [DOI: 10.1073/pnas.1320054111](https://doi.org/10.1073/pnas.1320054111)
- Wei, R.T.; Chen, N.; Ding, Y.T.; Wang, L.; Gao, F.F.; Zhang, L.; Liu, Y.H.; Li, H.; Wang, H. Diversity and dynamics of epidermal microbes during grape development of cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in the ecological viticulture model in Wuhai, China. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 935647. [DOI: 10.3389/fmicb.2022.935647](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.935647)
- Williams, J.N.; Morandé, J.A.; Vaghti, M.G., Medellín-Azuara, J.; Viers, J.H. Ecosystem services in vineyard landscapes: a focus on aboveground carbon storage and accumulation. *Carbon Balance Manag.* **2020**, *15*(1), 23. [DOI: 10.1186/s13021-020-00158-z](https://doi.org/10.1186/s13021-020-00158-z)

- Winkler, K.J.; Viers, J.H.; Nicholas, K.A. Assessing ecosystem services and multifunctionality for vineyard systems. *Front. Environ. Sci.* **2017**, *5*, 15. DOI: [10.3389/fenvs.2017.00015](https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00015)
- Wilson, G.W.T.; Rice, C.W.; Rillig, M.C.; Springer, A.; Hartnett, D.C. Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 452–461. DOI: [10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01303.x)
- Winter, S.; Bauer, T.; Strauss, P.; Kratschmer, S.; Paredes, D.; Popescu, D.; Landa, B.; Guzmán, G.; Gómez, J.A.; Guernion, M.; Zaller, J.G.; Batáry, P. Effects of vegetation management intensity on biodiversity and ecosystem services in vineyards: A meta-analysis. *J. Appl. Ecol.* **2018**, *55*, 2484–2495. DOI: [10.1111/1365-2664.13124](https://doi.org/10.1111/1365-2664.13124)
- Wolfert, S.; Ge, L.; Verdouw, C.; Bogaardt, M.J. Big data in smart farming – a review. *Agric Syst.* **2017**, *153*, 69–80. DOI: [10.1016/j.agsy.2017.01.023](https://doi.org/10.1016/j.agsy.2017.01.023)
- Yan, H.; Ge, C.; Zhou, J.; Li, J. Diversity of soil fungi in the vineyards of Changli region in China. *Can. J. Microbiol.* **2022**, *68*(5), 341–352. DOI: [10.1139/cjm-2021-0337](https://doi.org/10.1139/cjm-2021-0337)
- Yang, X.; Yuan J.; Yue F.-J.; Li S.; Wang B.; Mohinuzzaman M.; Liu, Y.; Senesi, N.; Lao, X.; Li, L.; Liu, C.Q.; Ellam, R.M.; Vione, D.; Mostofa, K.M.G. New insights into mechanisms of sunlight- and dark-mediated high-temperature can accelerate diurnal production-degradation transformation of lake fluorescent DOM. *Sci. Total Environ.* **2021**, *760*, 143377. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.143377](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143377)
- Zahid, M.S.; Hussain, M.; Song, Y.; Li, J.; Guo, D.; Li, X.; Song, S.; Wang, L.; Xu, W.; Wang, S. Root-zone restriction regulates soil factors and bacterial community assembly of grapevine. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*(24), 15628. DOI: [10.3390/ijms232415628](https://doi.org/10.3390/ijms232415628)
- Zarraonaindia, I.; Owens, S.M.; Weisenhorn, P.; West, K.; Hampton-Marcell, J.; Lax, S.; Bokulich, N.A.; Mills, D.A.; Martin, G.; Taghavi, S.; van der Lelie, D.; Gilbert, J.A. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* **2015**, *6*(2), e02527-14. DOI: [10.1128/mBio.02527-14](https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14)
- Zhang, S.; Wang, Y.; Chen, X.; Cui, B.; Bai, Z.; Zhuang, G. Variety features differentiate microbiota in the grape leaves. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66*(11), 653–663. DOI: [10.1139/cjm-2019-0551](https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0551)
- Zhang, L.; Xue, T.; Gao, F.; Wei, R.; Wang, Z.; Li, H.; Wang, H. Carbon storage distribution characteristics of vineyard ecosystems in Hongsibu, Ningxia. *Plants* **2021**, *10*(6), 119. DOI: [10.3390/plants10061199](https://doi.org/10.3390/plants10061199)
- Zhang, Z.; Zhang, Q.; Yang, H.; Sun, L.; Xia, H.; Sun, W.; Wang, Z.; Zhang, J. Bacterial communities related to aroma formation during spontaneous fermentation of “cabernet sauvignon” wine in Ningxia, China. *Foods* **2022**, *11*(18), 2775. DOI: [10.3390/foods11182775](https://doi.org/10.3390/foods11182775)
- Zhao, Y.; Liu, S.; Yang, Q.; Han, X.; Zhou, Z.; Mao, J. *Saccharomyces cerevisiae* strains with low-yield higher alcohols and high-yield acetate esters improve the quality, drinking comfort and safety of huangjiu. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111763. DOI: [10.1016/j.foodres.2022.111763](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111763)
- Zhou, J.; Cavagnaro, T.R.; De Bei, R.; Nelson, T. M.; Stephen, J.R.; Metcalfe, A.; Gilliam, M.; Breen, J.; Collins, C.; Rodríguez López, C.M. Wine terroir and the soil bacteria: An amplicon sequencing-based assessment of the Barossa Valley and its sub-Regions. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 597944. DOI: [10.3389/fmicb.2020.597944](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.597944)

## CAPÍTULO 2

### *¿El paisaje circundante condiciona la microbiota presente en viñedos?*

#### INTRODUCCIÓN

El vino es un producto derivado de la fermentación alcohólica de los azúcares del mosto de uvas procedente de viñedos, los cuales actúan como punto de entrada y fijación para las comunidades microbianas ([Griggs et al., 2021](#)). La microbiota influye no solo en la productividad y sanidad de la planta, sino también en la calidad del vino, ya que se encuentra involucrada en casi todos los pasos cruciales del proceso vitivinícola ([Gilbert et al., 2014](#); [Zarraonaindia et al., 2015](#); [Darriaut et al., 2023](#)). Así, la microbiota favorece la resistencia a fitopatógenos, la promoción del crecimiento de las plantas e incluso la mejora de la estructura del suelo desde el punto de vista de su capacidad para retener agua y nutrientes, aportando al vino sustancias beneficiosas (por ejemplo, compuestos aromáticos deseables) además de utilizar los azúcares del mosto durante la fermentación alcohólica ([Zhou et al., 2021](#); [Giffard et al., 2022](#); [Darriaut et al., 2023](#)). Junto con dichas comunidades microbianas beneficiosas para la vid y el vino, también coexisten microorganismos fitopatógenos que se propagan fácilmente por el viñedo. Este conjunto microbiano es capaz de generar un ecosistema complejo y dinámico en todas las etapas vitivinícolas ([Huang et al., 2022](#)).

La composición de estas comunidades microbianas depende de diversas variables entre las que se encuentran la especie de vid, la ubicación geográfica, los niveles de exposición UV, la temperatura, la altitud, el estrés hídrico, el uso de fitosanitarios ([Gupta et al., 2019](#); [Bettenfeld et al., 2022](#)) la humedad, la disponibilidad de nutrientes ([Burns et al., 2016](#)), la densidad de la madera, el estado sanitario de las bayas, las diferentes etapas del ciclo vegetativo ([Cobos et al., 2022](#)), el manejo de la cubierta vegetal, la geoquímica subyacente al suelo, la masa foliar por unidad de área, e incluso la concentración de nitrógeno y fósforo de las hojas ([Griggs et al., 2021](#)).

También, el paisaje circundante es capaz de condicionar las comunidades microbianas presentes en el viñedo ya sea influenciado por las variaciones microclimáticas de la zona, los vectores presentes (por ejemplo, avispas) o los reservorios propios de los diferentes hábitats ([Christiaens et al., 2014](#); [Mozzachiodi et al., 2022](#)). Las fuentes de procedencia de la microbiota vitivinícola y los vectores que intervienen en el proceso aún no se han establecido por completo, pero cada vez disponemos de más información al respecto. En este sentido, se ha demostrado que los monocultivos intensivos (paisajes homogéneos dominados únicamente por un tipo de cultivo) proporcionan un entorno apto para el desarrollo y la propagación de poblaciones especializadas de plagas, mientras que, los paisajes agrícolas complejos (paisajes heterogéneos que incluyen mosaicos de hábitats seminaturales y tierras de cultivo) desempeñan un papel fundamental en el control de plagas puesto que mitigan el crecimiento y la propagación de estas ([O'Rourke & Petersen, 2017](#); [Dainese et al., 2019](#); [Paredes et al., 2020](#)). Se ha comenzado a investigar la influencia que las zonas boscosas podrían ejercer a los viñedos colindantes, aumentando la biodiversidad de las poblaciones microbianas, pudiendo llegar incluso a compartir en

algunos casos casi la mitad de los OTUS estudiados entre ambos parches paisajísticos ([Castañeda et al., 2018](#); [Miura et al., 2019](#)). Este posible trasvase de especies tiene además un papel decisivo en las fermentaciones vínicas, ya que pueden promover la presencia de especies fermentativas, como *S. cerevisiae*, la cual se ha encontrado en insectos capturados en viñedos cercanos a bosques ([Morrison-Whittle & Goddard, 2017](#); [Miura et al., 2019](#); [Valentini et al., 2022](#)), de hecho, levaduras silvestres de especies de *Saccharomyces* se han aislado principalmente de cortezas de robles ([Sampaio & Gonçalves, 2008](#); [Lopes et al., 2010](#); [Zhang et al., 2010](#); [Hyma & Fay, 2013](#); [Iturritxa et al., 2023](#))

Hasta el momento, apenas se ha estudiado qué influencia posee el paisaje circundante sobre las comunidades microbianas de los viñedos y, los estudios llevados a cabo hasta el momento no ofrecen una visión global de la microbiota que puede estar influida por las diferentes composiciones paisajísticas en viñedos. Por esta razón, establecimos como objetivo profundizar en el papel que los hábitats adyacentes tienen en la composición de hongos y bacterias presentes en los viñedos, así como, en el caso de encontrar especies microbianas propias de paisajes circundantes, conocer qué influencia tienen en conjunto sobre la vid. Para ello, se propuso un diseño cuasiexperimental de trabajo mediante el cual se seleccionaron 24 viñedos pertenecientes a 4 denominaciones de origen (D.O.) de la Comunidad Autónoma de Castilla y León (España) agrupados en dos subconjuntos en función de que en el paisaje circundante predominaran viñedos y paisajes agrícolas o hubiera una representación importante de vegetación natural, especialmente bosque. Para poder estudiar el impacto de los tratamientos y/o procesos de cambio en situaciones donde las unidades de observación no se asignan con criterio aleatorio, se utilizó un diseño cuasiexperimental. Este diseño se pensó para que los viñedos de estos dos grupos tuvieran características parecidas en cuanto al resto de factores que sabemos pueden influir en la composición de la microbiota y sólo fueran diferentes respecto al paisaje circundante, de tal forma que, en caso de encontrar variaciones entre ambos, estas pudieran imputarse a este atributo con cierto nivel de confianza.

## **METODOLOGÍA**

### **1. ÁREA DE ESTUDIO**

El estudio se llevó a cabo en viñedos pertenecientes a cuatro Denominaciones de Origen en la región Castilla y León: Arribes, Ribera de Duero, Rueda, y Toro, las cuales se extienden a lo largo del río Duero, uno de los ríos más largos de la península ibérica. La influencia del río Duero tanto a nivel histórico como económico en Castilla y León es de gran importancia. El paisaje que se desarrolla a lo largo de la cuenca del Río Duero es diverso, encontrándose llanuras fértiles y colinas suaves salpicadas de viñedos, olivares y campos de cereales. En este paraje, se encuentran sus clásicas “terrazas” de tierra rojiza utilizadas para el cultivo de la vid. En cuanto al clima de la zona, se trata de un clima mediterráneo continental, con precipitaciones que oscilan entre los 350 y 400 mm anuales, inviernos rigurosos (temperaturas mínimas extremas y una prolongación del



período de heladas) y veranos cortos (no excesivamente calurosos y con importantes oscilaciones térmicas entre el día y la noche).

La *D.O. Ribera de Duero*, con 26.123 ha. y 8.000 viticultores es la mayor de las cuatro. Esta D.O. se desarrolla a una altitud que varía desde los 720 hasta más de 1.000 metros. Sus suelos están formados por capas de arenas limosas o arcillosas con alternancia de capas calizas y concreciones calcáreas. Los vinos son fundamentalmente tintos producidos con la variedad de uva Tempranillo.

La *D.O. Rueda*, con 20.724 ha. y alrededor de 1.600 viticultores, es la más antigua de todas. Se localiza en el sector central de la Meseta del Duero, caracterizado por relieves suaves con amplias terrazas aluviales y diluviales, desarrollada a una altitud de entre 700 y 870 m. Se desarrolla en suelos pardos sobre depósitos alóctonos pedregosos que generan terrenos cascajosos. Los vinos son fundamentalmente blancos, siendo una de las pocas zonas vitivinícolas europeas especializadas en estos vinos, donde la uva principal es la variedad Verdejo.

La *D.O. Toro*, integra 5.418 ha. de viñedos y 981 viticultores. Se desarrolla sobre suelos con textura arenosa en la que abundan en superficie las gravas. Los vinos son fundamentalmente tintos, elaborados con la variedad autóctona “Tinta de Toro”, variedad perteneciente a la uva Tempranillo.

La *D.O. Arribes*, con 291 ha. y 191 viticultores, es la más pequeña de todas, desarrollándose en una zona ambiental diferente, marcada por el encajamiento del Duero y otros afluentes en valles profundos con un relieve muy accidentado, dotando a la misma de diferencias altitudinales que generan una amplia variedad de microclimas. En general, las precipitaciones son más elevadas que en las otras D.O. de estudio, con una composición geológica y edafológica también más compleja, en la que dominan suelos pocos profundos con una textura limo-arenosa y bastante pedregosidad. El paisaje se caracteriza por un mosaico de vegetación natural y diferentes cultivos, con viñedos tanto en la penillanura como en las laderas de los valles, donde suelen emplazarse en bancales. Sus viñedos son preferentemente pequeños, con mezcla de variedades de uva orientados principalmente al autoconsumo.

## **2. DISEÑO CUASIEXPERIMENTAL**

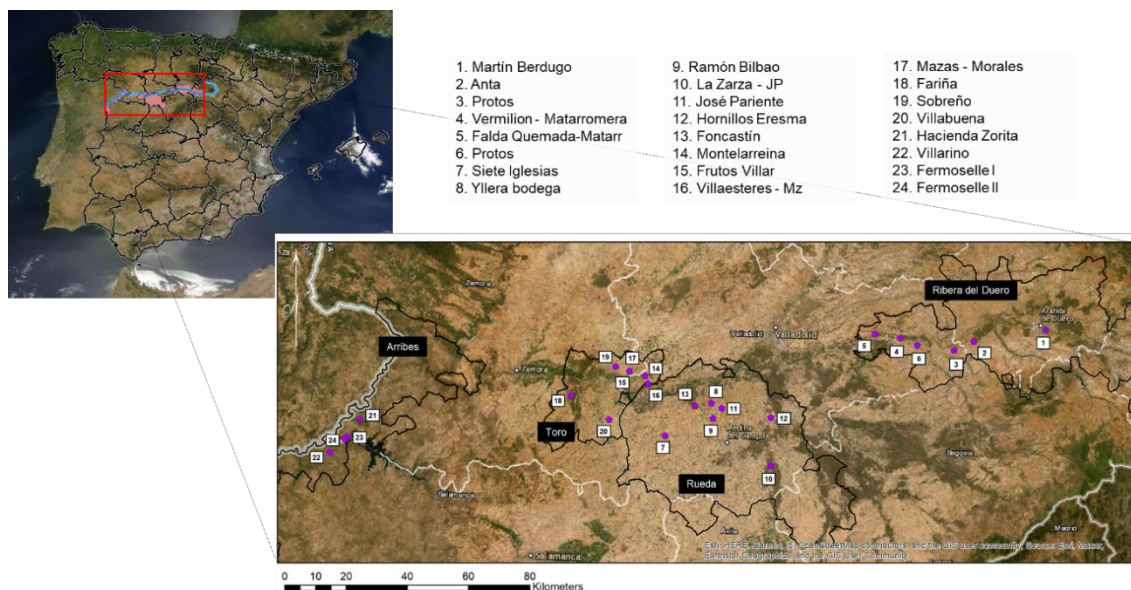
La composición de especies de las comunidades microbianas en un viñedo dado depende de un conjunto de factores relacionados con el clima, el suelo, el manejo o el paisaje circundante. Si se quiere estudiar la importancia de alguno de estos factores, minimizando el número de muestras necesarias, precisamos de un método que permita aislar los efectos concretos del resto. Para ello, empleamos un diseño basado en técnicas de emparejamiento, pensados para construir conjuntos de muestras similares en casi todos los factores, pero que difieren en aquellos cuyos efectos se pretenden estimar, logrando minimizar el efecto que los factores de confusión tuviesen en los resultados obtenidos.

Se trabajó con 24 viñedos pertenecientes a 13 bodegas colaboradoras (Tabal 2.1) y viticultores pertenecientes a las 4 D.O. Todos ellos fueron digitalizados en un Sistema de

Información Geográfica – ArcMap 10.5 (ESRI, Inc., Redlands, USA) para después caracterizar el paisaje circundante con las proporciones de usos de suelos y varios índices de ecología del paisaje empleando Patch Analyst 5.2. Teniendo en cuenta que el área de dispersión de los quirópteros está muy ligada a su estrategia de caza ([Alcalde et al., 2018](#)), determinamos que el área de campeo y su capacidad de dispersión es relativamente pequeña, puesto que apenas llegan a desplazarse 1 kilómetro desde el refugio. Por esta razón, tomamos como referencia un área de influencia de 1.000 metros para la obtención de datos sobre el paisaje circundante a los viñedos, empleando la base de datos de usos de suelo recogidos en el [SIOSE](#).

En el estudio, del conjunto de viñedos pertenecientes a las bodegas colaboradoras, se seleccionaron dos grupos de características similares en cuanto a tamaño, clima, suelo, tipo de uva o manejo, pero que diferían en el hábitat circundante: en uno predominan los viñedos en monocultivo o rodeados de otros cultivos, en el otro se aglutinan viñedos en paisajes en mosaico o próximos a parches de vegetación natural (bosques principalmente) de tamaño notable. Los dos grupos se construyeron por técnicas de emparejamiento. Dado que los viñedos próximos a manchas boscosas son menos frecuentes y se suelen asentar en zonas concretas, primero se seleccionaron estos y luego en cada Denominación de Origen se buscaron (por técnicas de emparejamiento), de entre todos los disponibles, los viñedos en zona de monocultivo más parecidos en cuanto al resto de características. Así, se seleccionaron 3 viñedos de muestras en paisajes homogéneos y 4 en paisajes heterogéneos en cada una de las cuatro Denominaciones de Origen (salvo en Arribes que fueron 2 de cada por la limitaciones para encontrar viñedos en espaldera).

La recogida de muestras de suelo y corteza de vid se llevó a cabo en los meses de mayo y junio de 2021 mientras que la recogida de muestras de uva se realizó en los meses de septiembre y octubre del mismo año. Para las muestras de suelo, se tomaron tres submuestras frescas alrededor de la vid eliminando cualquier capa o suelo de superficie que precisara ser desechado, posteriormente fueron mezcladas para obtener entre 1 y 1,5 kilos por muestra que garantizara la homogeneidad de estas. La muestra se pudo recolectar gracias al uso de una barrena manual cedida por el Departamento de Edafología de la Universidad de Salamanca, la cual facilitó llegar hasta la profundidad real del cultivo. En el caso de la corteza, se procedió en condiciones lo más estériles posibles a la recogida de una pequeña porción de madera gracias a cuchillas desechables sin provocar daños en la planta. Por último, las uvas se obtuvieron seleccionando de forma homogénea y aleatoria por las distintas vides y líneas.



**Figura 2.1.** Emplazamiento de los viñedos incluidos en el estudio

**Tabla 2.1.** Relación de muestras utilizadas para el estudio. Para cada muestra (ID) se detalla la bodega de procedencia, localización, D.O. y tipo de paisaje. Aquellas muestras que no poseen Bodega asociada, pertenecen a viticultores privados de la D.O. correspondiente.

ID	NOMBRE	BODEGA	LOCALIZACION	D.O.	PAISAJE
1	Martín Berdugo	Martín Berdugo	Aranda de Duero	Ribera	Homogéneo
2	Anta	Anta	Nava de Roa	Ribera	Heterogéneo
3	Protos	Protos	Peñafiel	Ribera	Homogéneo
4	Vermilion - Matarromera	– Emina	San Bernardo	Ribera	Heterogéneo
5	Falda Quemada - Matarromera	– Emina	Olivares de Duero	Ribera	Homogéneo
6	Protos Ht	Protos	Padilla de Duero	Ribera	Heterogéneo
7	Siete Iglesias	Privado	Siete Iglesias	Rueda	Heterogéneo
8	Yllera bodega	Yllera	Rueda	Rueda	Homogéneo
9	Ramón Bilbao	Ramón Bilbao	Rueda	Rueda	Homogéneo
10	La Zarza - JP	Privado	La Zarza	Rueda	Heterogéneo
11	José Pariente	José Pariente	La Seca	Rueda	Homogéneo
12	Hornillos Eresma	Privado	Hornillos Eresma	de Rueda	Heterogéneo
13	Foncastín	Yllera	Foncastín	Rueda	Heterogéneo
14	Montelarreina	Monte-La Reina	Los Villaesteres	Toro	Heterogéneo

15	Frutos Villar	Frutos Villar	Los Villaesteres	Toro	Homogéneo
16	Villaesteres – Mz	Mazas	Los Villaesteres	Toro	Heterogéneo
17	Mazas – Morales	Mazas	Morales de Toro	Toro	Heterogéneo
18	Fariña	Fariña	Sanzoles	Toro	Heterogéneo
19	Sobreño	Sobreño	Toro	Toro	Homogéneo
20	Villabuena	Privado	Villabuena del Puente	Toro	Homogéneo
21	Hacienda Zorita	Hacienda Zorita	Fermoselle	Arribes	Homogéneo
22	Villarino	Privado	Villarino de los Aires	Arribes	Heterogéneo
23	Fermoselle I	Privado	Fermoselle	Arribes	Homogéneo
24	Fermoselle II	Privado	Fermoselle	Arribes	Heterogéneo

### 3. ANÁLISIS DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS

Se analizaron un total de 25 muestras de suelo, 25 muestras de corteza y 25 muestras de uva. Todas las muestras fueron sometidas al mismo proceso de recogida, transporte y almacenamiento hasta su posterior análisis mediante técnicas metataxonómicas.

- **Extracción de ADN**

El método de extracción de ADN difirió en función del material de partida de las distintas muestras, incluyéndose en todas las rondas un blanco como control de extracción. Para muestras de corteza y suelo, se utilizó el kit de aislamiento (Qiagen) DNeasy PowerSoil ProDNA siguiendo las instrucciones aportadas. El ADN se diluyó en el tampón adecuado hasta un volumen final de 50 µl. En cuanto a las muestras de uva, para cada baya, se separaron aleatoriamente trozos pequeños (incluyendo piel y pulpa) utilizando pinzas esterilizadas y cuchillas desechables. Se incubaron las muestras en el interior de tubos de 2 mL en nitrógeno líquido y, a continuación, se colocaron en TissueLyser LT (Qiagen) a 50 Hz durante 30 segundos. Las muestras se sometieron a 3 rondas de incubación y trituración hasta su completa disrupción, evitando la descongelación. Posteriormente, se aisló el ADN con el kit Isolate II Plant DNA (Bioline), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA se eluyó de las columnas en buffer hasta un volumen final de 50 µl. Para la cuantificación de ADN se utilizó el ensayo Qubit High Sensitivity dsDNA Assay (Thermo Fisher Scientific).

- **Preparación de genotecas de ADN para la ultrasecuenciación**

Para a preparación de la genoteca de ADN genómico fúngico, un fragmento de la región genómica ITS2 de unos 350 pb (del ITS 5,8S) se amplificó por PCR utilizando los cebadores ITS86F ([Turenne et al., 1999](#)) e ITS4R ([White et al., 1990](#)). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 12,5 µl, que contenía 1,25 µl de ADN molde, 0,5 µl de cada primer, 3,13 µl de Supreme NZYTAq 2x Green Master Mix (NZYTech) y 7,12 µl de agua ultrapura. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos de amplificación

durante 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 49°C y 45 segundos a 72°C, la elongación final se llevó a cabo durante 7 minutos a 72°C. Los índices de cebadores necesarios para multiplexar las diferentes genotecas en el mismo pool de secuenciación se unieron en un segundo paso de amplificación con idénticas condiciones, pero solo 5 ciclos y 60°C como temperatura de anillamiento. El tamaño de la genoteca se verifica en geles de agarosa al 2% teñidos con GreenSafe (NZYTech). A continuación, se purifican las genotecas utilizando perlas magnéticas Mag-Bind RXNPure Plus (Omega Biotek), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las genotecas se agruparon en cantidades equimolares según los resultados de una cuantificación Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific). El pool se secuenció en una fracción de una celda de flujo NovaSeq PE250 (Illumina) para obtener una producción total de 6 gigabases.

Para la preparación de la genoteca de ADN genómico bacteriano el proceso fue similar con algunas diferencias. La amplificación por PCR se realizó de un fragmento de la región del gen bacteriano 16S ARNr de unos 300 pb utilizando los cebadores 515F-Y ([Parada et al., 2016](#)) y 806R ([Apprill et al., 2015](#)). La mezcla de PCR se llevó a cabo con las mismas cantidades utilizadas para la preparación de la genoteca fúngica. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial del ADN a 95°C durante 5 minutos, 25 ciclos durante 95°C durante 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 49°C y 45 segundos a 72°C, la elongación final se llevó a cabo durante 7 minutos a 72°C.

**Tabla 2.2.** Oligonucleótidos empleados como cebadores de la ADN polimerasa en las amplificaciones por PCR de 350 pb del ITS2 y de 300 pb del 16S ARNr

Nombre del primer	Secuencia
ITS86F (Forward)	5' GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA 3'
ITS4R (Reverse)	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'
515F-Y (Forward)	5' GTG YCA GCM GCC GCG GTA A 3'
806R (Reverse)	5' GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT 3'

- **Procesamiento de los datos de secuenciación**

Las lecturas de nucleótidos de los amplicones obtenidos para el ITS2 fúngico y para el 16S bacteriano se obtuvieron utilizando QIIME2 ([Bolyen et al., 2019](#)). En concreto, utilizamos la herramienta DADA2 v.1.16.0 ([Callahan et al., 2016](#)) (implementada en QIIME2) para: eliminar los cebadores de PCR, filtrar las lecturas según su calidad, eliminar el ruido, fusionar las lecturas hacia delante y hacia atrás, eliminar las lecturas quiméricas y agrupar las secuencias resultantes en variantes de secuencia de amplicón (ASV). Debido a que las lecturas de secuenciación eran más largas que los amplicones, podía aparecer ADN no biológico en los extremos de las lecturas, se utilizó Cutadapt v.4.3 ([Martin, 2011](#)) para eliminar las secuencias de cebadores y/o adaptadores).

Las lecturas se filtraron y recortaron con la función *FilterAndTrim* de DADA2. Los modelos de tasa de error se ajustaron utilizando la función *learnErrors*. Luego, se dedujeron ASV para cada muestra utilizando las funciones *derepFastq* y *dada*. Se creó una tabla ASV utilizando *makeSequenceTable*. Las secuencias quiméricas se eliminaron utilizando *removeBimeraDenovo*. Los ASV se clasificaron utilizando *assignTaxonomy* con la base de datos SILVA v.138.1 ([Quast et al., 2013](#)) para el 16S rRNA de bacterias y UNITE (v.9.0) para el ITS de hongos ([Nilsson et al., 2018](#); [Köljalg et al., 2020](#)). Se

eliminaros los ASV no asignados o clasificados como cloroplastos o mitocondrias. La tabla de recuento resultante se normalizó a una profundidad de muestreo de 5800 lecturas por muestra utilizando *rarefy\_even\_depth* del paquete phyloseq ([McMurdie & Holmes, 2013](#)).

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La alfa diversidad se calculó como la biodiversidad comunitaria estimada utilizando el índice de Shannon mientras que la beta diversidad (diferencias entre las muestras) se calculó utilizando la matriz de distancias de Bray-Curtis. También se utilizó el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA), el cual facilita el estudio de las diferentes ASVs puesto que permite la partición de datos multivariados en respuesta a diseños experimentales complejos en los que hay recuentos de abundancias y las variables pueden tener un comportamiento sobredisperso o no normal ([Anderson et al., 2017](#)). El análisis de coordenadas principales (PCoA) se realizó para visualizar la cohesión y separación de las comunidades microbianas que conforman los dos tipos de paisaje circundante en el viñedo. Además, se utilizó el análisis discriminante lineal con efecto del tamaño (LEfSe), diseñado para comparaciones grupales de datos de microbiomas con un enfoque particular en la detección de cambios en la abundancia relativa entre dos o más grupos de muestras con consistencia biológica ([Lin & Das Pedrada, 2020](#)) y el escalado multidimensional no métrico (NMDS) para identificar grupos diferencialmente abundantes entre los dos tipos de composiciones paisajísticas. El análisis estadístico se realizó en R (versión 4.3.0) gracias a los paquetes *permanova* y *stats*.

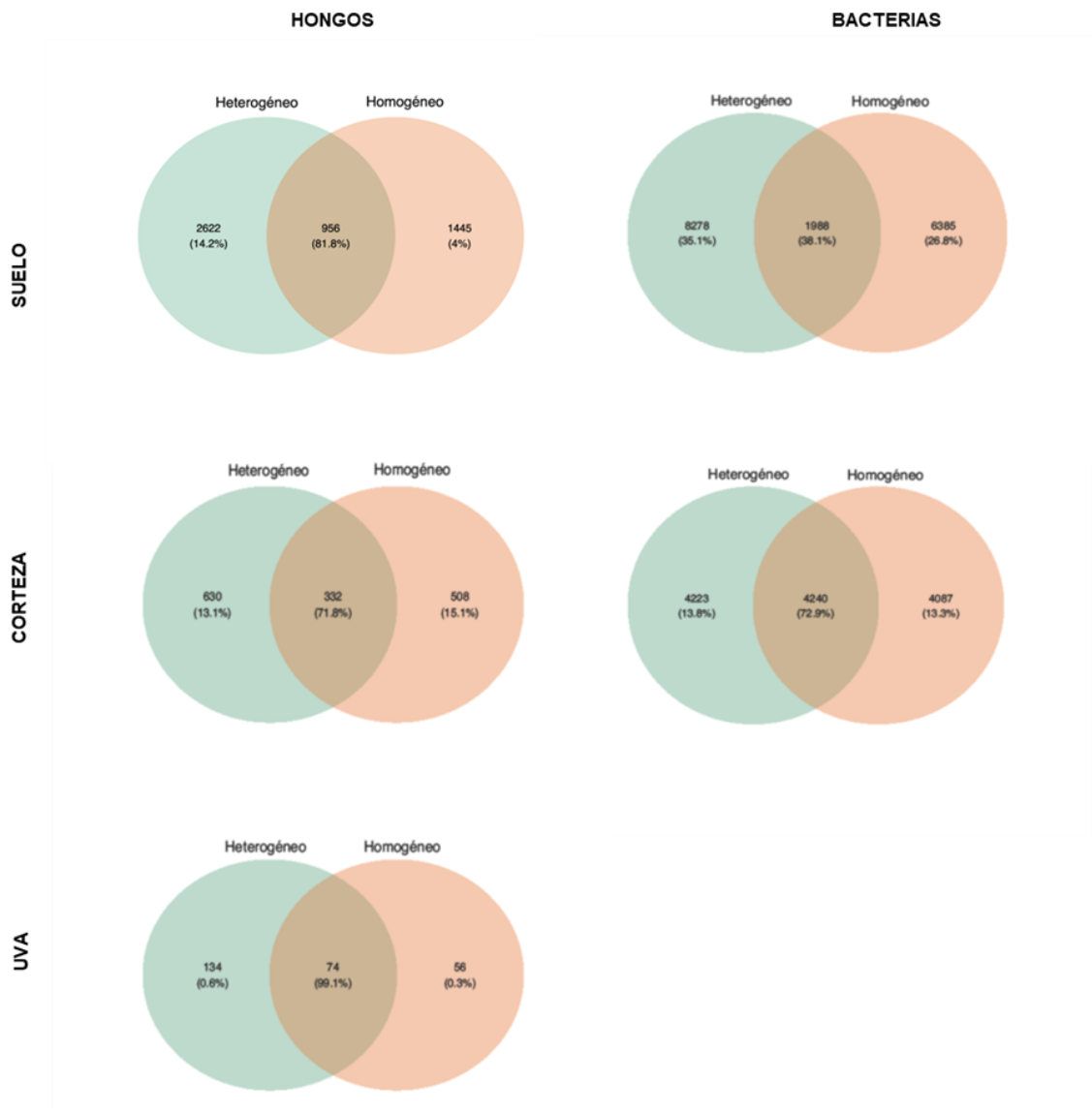
#### RESULTADOS

El perfil de la comunidad bacteriana produjo un total de 2614593 secuencias de alta calidad mientras el perfil fúngico produjo 1394401 secuencias. Tras eliminar quimeras y cloroplastos, obtuvimos 45873 ASVs bacterianas y 40577 ASVs fúngicas con las que finalmente, realizamos nuestro estudio.

Para los reservorios de suelo, corteza y uva (a excepción de los taxones bacterianos de uvas debido a la baja proporción de ASVs presente), encontramos para ambos tipos de paisaje (heterogéneo y homogéneo) que la mayor abundancia relativa de taxones conformaba un *core* vitivinícola. Por otro lado, fuimos capaces de detectar un porcentaje variable (10-35%) que era único para cada tipo de hábitat adyacente, lo que podría conformar un biomarcador propio en función al paisaje circundante (Figura 2.2).



15,1% para hongos y de un 13,3% para bacterias. Por último, en muestras de uva, el porcentaje de hongos en todos los viñedos (tanto en aquellos establecidos en zonas heterogéneas como en homogéneas) era inferior al 1% (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Diagramas de Venn representativos para los taxones únicos y compartidos en ambos tipos de paisaje circundante al viñedo tanto para hongos (columna izquierda) como bacterias (columna derecha)

De acuerdo con los resultados obtenidos del PERMANOVA, las diferencias en las especies componentes de las comunidades microbianas en cuanto al tipo de paisaje circundante presente fueron significativas para los reservorios de corteza y uva en cuanto a los taxones bacterianos, sin embargo, estas diferencias en la microbiota fúngica únicamente fueron significativas en suelo.



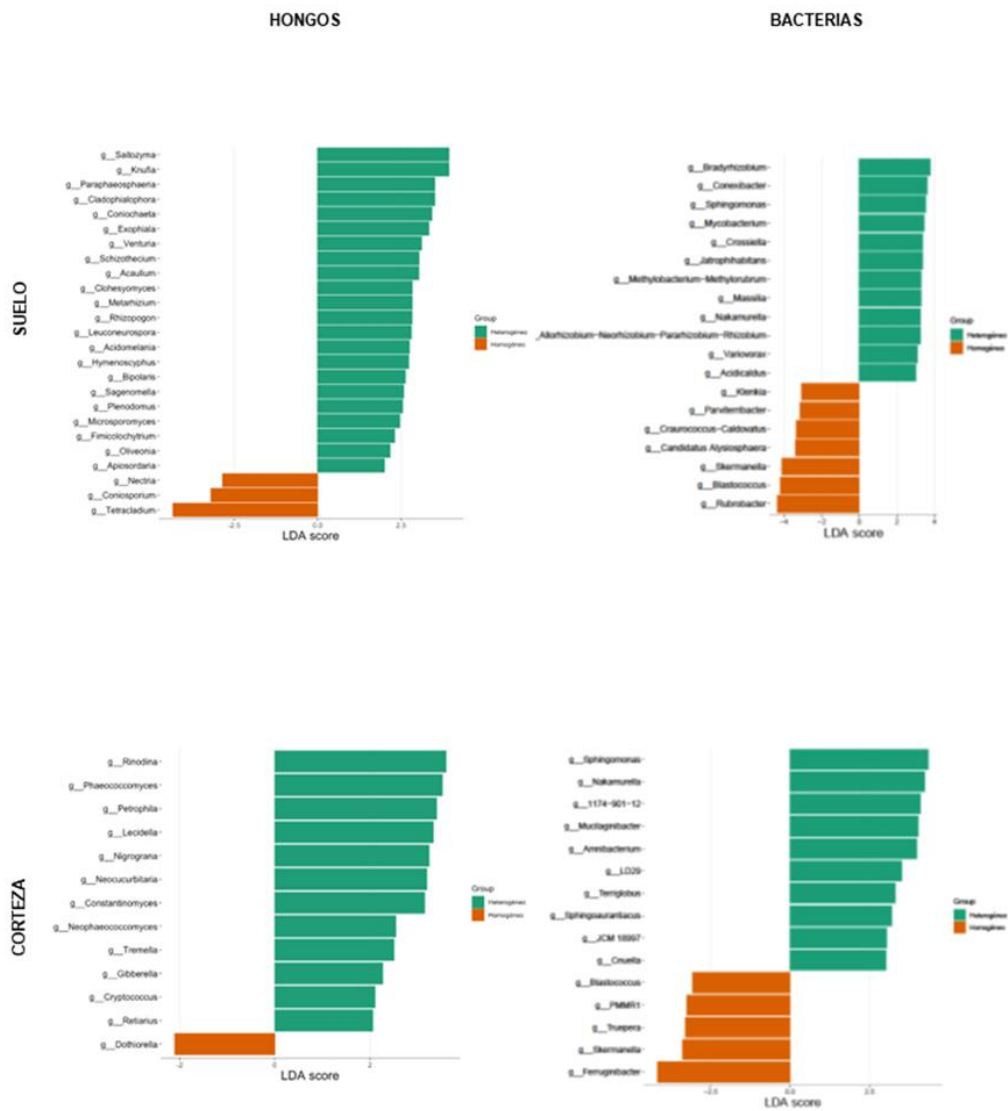
**Tabla 2.2.** Síntesis de los resultados obtenidos en el análisis estadístico PERMANOVA para las muestras de estudio en cada uno de los reservorios, tanto para bacterias (izquierda) como hongos (derecha).

	<b>Hongos</b>	<b>Bacterias</b>
<b>Suelo</b>	p-valor: 0.003 Estadístico F: 2.486 R <sup>2</sup> : 0.097	p-valor: 0.009 Estadístico F: 1.488 R <sup>2</sup> : 0.06
<b>Corteza</b>	p-valor: 0.374 Estadístico F: 1.024 R <sup>2</sup> : 0.042	p-valor: 0.046 Estadístico F: 1.638 R <sup>2</sup> : 0.07
<b>Uva</b>	p-valor: 0.301 Estadístico F: 1.172 R <sup>2</sup> : 0.048	

De acuerdo con el tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LefSe), se encontraron 22 géneros fúngicos predominantes en viñedos con vegetación circundante que pueden actuar como biomarcadores de viñedos en zonas heterogéneas, frente a únicamente 3 géneros de zonas homogéneas. En cuanto a bacterias, se encontraron 12 géneros que podían actuar como biomarcadores de zonas heterogéneas frente a 7 de zonas homogéneas. Una vez detectados los distintos géneros fúngicos y bacterianos, se evaluaron las diferencias de estos para cada uno de los paisajes vitivinícolas respecto al tipo de reservorio en el que se habían hallado.

Tal y como se muestra en la Figura 2.4, los principales taxones bacterianos en muestras de suelo obtenidas de viñedos con paisaje circundante pertenecían a los géneros *Bradyrhizobium*, *Conexibacter*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Crossiella*, *Jatrophihabitans*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Massilia*, *Nakamurella*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Variovorax* y *Acidicaldus*, mientras que en muestras de viñedos con paisaje homogéneo eran *Klenkia*, *Parviterribacter*, *Craurococcus-Caldovatus*, *Candidatus Alysiosphaera*, *Skermanella*, *Blastococcus* y *Rubroacter*. Al analizar las muestras de corteza, se encontró que los principales taxones bacterianos en viñedos ubicados en paisajes heterogéneos pertenecían a los géneros *Sphingomonas*, *Nakamurella*, *1174-901-12*, *Mucilaginibacter*, *Amnibacterium*, *LD29*, *Terriglobus*, *JCM 18997* y *Cnuella*, mientras que en viñedos con paisaje homogéneo los eran *Blastococcus*, *PMMR1*, *Truepera*, *Skermanella* y *Ferruginibacter*.

En cuanto a los taxones fúngicos, para muestras de suelo los taxones predominantes en viñedos con paisaje heterogéneo pertenecían a los géneros *Saitozyma*, *Knufia*, *Paraphaeosphaeria*, *Cladophialophora*, *Coniochaeta*, *Exophiala*, *Venturia*, *Schizothecium*, *Acaulium*, *Clohesyomyces*, *Metarhizium*, *Rhizopogon*, *Leuconeuropa*, *Acidomelania*, *Hymenoscyphus*, *Bipolaris*, *Sagenomella*, *Plenodomus*, *Microsporomyces*, *Fimicolochytrium*, *Oliveonia* y *Apiosordaria*, mientras que para viñedos con paisaje homogéneo eran *Nectria*, *Coniosporium* y *Tetracladium*. Para muestras de corteza en paisaje heterogéneo, los taxones más abundantes pertenecían a los géneros *Rinodina*, *Phaeococcomyces*, *Petrophila*, *Ledicella*, *Nigrograna*, *Neocucurbitaria*, *Constantinomyces*, *Neophaeococcomyces*, *Tremella*, *Gibberella*, *Cryptococcus* y *Retarius*, mientras que en paisajes homogéneos el género predominante era *Dothiorella* (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Géneros predominantes en función del tipo de paisaje circundante a los viñedos para cada uno de los reservorios de estudio (suelo, corteza).

## DISCUSIÓN

Este estudio arroja luz sobre la notable influencia que el paisaje circundante ejerce sobre las comunidades microbianas presentes en los viñedos. Examinando las muestras de suelo, destaca la proporción de taxones bacterianos compartidos entre el viñedo y el paisaje circundante, la cual es muy inferior a la compartida por los taxones fúngicos. En el caso de muestras de corteza, el número de taxones compartidos fue similar en ambas circunstancias. Esta diferencia puede atribuirse a la menor diversidad de taxones presentes en la corteza en comparación con el suelo, donde coexisten una amplia variedad de especies microbianas. Es relevante señalar este fenómeno ha sido previamente documentado por varios autores ([Martins et al., 2013](#); [Andreolli et al., 2017](#); [Martínez-Diz et al., 2019](#)).

El análisis de la biodiversidad y la composición de las comunidades bacterianas solo pudo llevarse a cabo en el suelo y la corteza, ya que las muestras de uva no contenían un número suficiente de secuencias variantes específicas de amplicón 16S (ASVs) para realizar un estudio significativo. Esta limitación podría deberse a diversos factores, como la menor proporción de comunidades microbianas en las bayas de uva debido a su naturaleza de fruto caduco que se regenera cada año y se desarrolla en pocos meses en la planta, o a posibles procesos de selección que tienen lugar en este tipo de fruto. Algunos autores han señalado una selección negativa de bacterias una vez que colonizan las hojas de la vid, así como la ausencia de cambios significativos en la composición microbiana de las uvas, en contraste con lo que ocurre en otros reservorios como el suelo ([Chou et al., 2018](#); [Belda et al., 2020](#)), hecho que también podría tener relación con esta baja proporción.

Cabe resaltar la importancia de algunas de las especies identificadas en las muestras de viñedos situados en paisajes heterogéneos, ya que géneros bacterianos como *Sphingomonas sp.*, *Bradyrhizobium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Variovorax sp.* y *Mucilaginibacter sp.* han sido previamente registrados en suelos forestales ([Lladó et al., 2017](#)). Del mismo modo, géneros fúngicos como *Saitozyma sp.* y *Cryptococcus*, que son levaduras típicas de suelos forestales, se han encontrado en nuestros viñedos ([Yurkov, 2018](#); [Shi et al., 2019](#)). Estas comunidades microbianas compartidas entre viñedos y bosque circundante representan un nuevo hallazgo ya que no se han documentado previamente en otros estudios ([Castañeda et al., 2018](#); [Miura et al., 2019](#)), resaltando así la conexión existente entre los bosques de fagáceas y nuestros viñedos. Algunos autores han sugerido que el suelo de los viñedos actúa como reservorio de la microbiota, albergando no solo comunidades microbianas propias del viñedo, sino también algunas procedentes de entornos circundantes, como bosques, que llegan al viñedo a través de vectores como insectos, humanos o el viento. Estos vectores pueden transportar levaduras silvestres que llegan al viñedo y pueden terminar involucradas en la fermentación, como las pertenecientes al género *Saccharomyces*, que desempeñan un papel clave en el proceso de fermentación de los vinos. Sin embargo, en este estudio no pudimos identificar especies fermentativas que apoyaran este trasvase desde bosques colindantes a los viñedos ([Goddard et al., 2010](#); [Cordero-Bueso et al., 2011](#); [Zarraonaindia et al., 2015](#); [Belda et al., 2020](#)).

Es importante destacar que las especies microbianas encontradas en las partes aéreas de las vides muestran una mayor especialización en comparación con las del suelo, y algunas de ellas incluso participan en el proceso de fermentación ([Zhang et al., 2020](#); [Kamilari et al., 2021](#); [Cureau et al., 2021](#)). Por lo tanto, es posible que los taxones únicos aportados

por el entorno circundante, que actúan como biomarcadores para cada tipo de paisaje, contribuyan a la singularidad de los vinos.

Se ha documentado que los paisajes heterogéneos poseen un potencial significativo para influir en las comunidades microbianas presentes en los cultivos. Esto se debe a que los cultivos que se asemejan a sistemas naturales diversos biológicamente tienen la capacidad de ejercer un impacto positivo en las comunidades microbianas al proporcionar un conjunto más diverso de plantas hospedadoras ([Guzmán et al., 2021](#)). Este fenómeno podría explicar el mayor número de taxones encontrados en los viñedos ubicados en paisajes heterogéneos.

Además, los bosques desempeñan un papel beneficioso en los viñedos adyacentes al ejercer un efecto microclimático que también influye en la microbiota. Investigaciones previas han demostrado que a medida que la temperatura aumenta, se producen cambios en la población y variación en la estructura de las comunidades microbianas y sus genes. Se ha evidenciado que, a medida que la temperatura se eleva, las comunidades microbianas tienden a disminuir en su diversidad, siendo afectadas por este cambio climático ([Zhang et al., 2005](#); [Melillo et al., 2017](#); [Gobbi et al., 2022](#); [Costa et al., 2023](#))

## REFERENCIAS

Alcalde, J.; Flude, S.; Wilkinson, M.; Johnson, G.; Edlmann, K.; Bond, C.E.; Scott, V.; Gilfillan, S.M.V.; Ogaya, X.; Haszeldine, R.S. Estimating geological CO<sub>2</sub> storage security to deliver on climate mitigation. *Nature Communications* 2018 9, 2201. [DOI: 10.1038/s41467-018-04423-1](#)

Anderson, M.J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) 2017 In: Balakrishnan, N.; Colton, T.; Everitt, B.; Piegorsch, W.; Ruggeri, F.; Teugels, T.L. eds. Wiley StatsRef: statistics reference online. Oxford: Wiley 1-15. [DOI: 10.1002/9781118445112.stat07841](#)

Andreolli, M.; Lampis, S.; Vallini, G. Diversity, distribution and functional role of bacterial endophytes in *Vitis vinifera*. In Endophytes: Biology and biotechnology; Maheshwari, D.K., Ed.; Springer Cham, 2017; Volume 5, 233–266. [DOI: 10.1007/978-3-319-66541-2\\_10](#)

Apprill, A.; McNally, S.; Parson, R.; Weber, L. Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *AME* 2015 75, 129-137 [DOI: 10.3354/ame01753](#)

Belda, I.; Gobbi, A.; Ruiz, J.; de Celis, M., Ortiz-Álvarez, R.; Acedo, A.; Santos, A. Microbiomics to define wine *terroir*. In: *Comprehensive Foodomics*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020 pp. 438-451 [ISBN: 978-0-12-816396-2](#)

Bettenfeld, P., Cadena I Canals, J., Jacquens, L., Fernandez, O.; Fontaine, F.; van Schaik, E.; Courty, P.E.; Trouvelot, S. The microbiota of the grapevine holobiont: A key component of plant health. *J. Adv. Res.* 2022, 40, 1-15. [DOI: 10.1016/j.jare.2021.12.008](#)

Burns, K.N.; Bokulich, N.A.; Cantu, D.; Greenhut, R.F.; Kluepfel, D.A.; O’Geen, A.T.; Strauss, S.L.; Steenwerth, K.L. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by vineyard management. *Soil Biol. Biochem.* 2016, 103, 337–348. [DOI:10.1016/j.soilbio.2016.09.007](#)

Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* **2016** *13*, 581-586. DOI: [10.1038/nmeth.3869](https://doi.org/10.1038/nmeth.3869)

Castañeda, L.E.; Barbosa, O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forest. *PeerJ*. **2018** *5*, e3098 DOI: [10.7717/peerj.3098](https://doi.org/10.7717/peerj.3098)

Castañeda, L.E.; Miura, T.; Sánchez, R.; Barbosa, O. Effects of agricultural management on phyllosphere fungal diversity in vineyards and the association with adjacent native forests. *PeerJ*. **2018** *6*, e5715. DOI: [10.7717/peerj.5715](https://doi.org/10.7717/peerj.5715)

Chou, M.Y.; Vanden Heuvel, J.; Bell, T.H.; Panke-Buisse, K.; Kao-Kniffin, J. Vineyard under-vine floor management alters soil microbial composition, while the fruit microbiome shows no corresponding shifts. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 11039. DOI: [10.1038/s41598-018-29346-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-29346-1)

Cobos, R.; Ibáñez, A.; Diez-Galán, A.; Calvo-Peña, C.; Ghoreshizadeh, S.; Coque, J.J.R. The grapevine microbiome to the rescue: Implications for the biocontrol of trunk diseases. *Plants* **2022**, *11*(7), 840. DOI: [10.3390/plants11070840](https://doi.org/10.3390/plants11070840)

Cordero-Bueso, G.; Arroyo, T.; Serrano, A.; Valero, E. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *148*(1), 23-29. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.021)

Costa, J.M.; Egipto, R.; Aguiar, F.C.; Marques, P.; Nogales, A.; Madeira, M. The role of soil temperature in Mediterranean vineyards in a climate change context. *Front. Plant. Sci.* **2023** *14*, 1145137. DOI: [10.3389/fpls.2023.1145137](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145137).

Cureau, N.; Threlfall, R.; Marasini, D.; Lavefve, L.; Carbonero, F. Year, location, and variety impact on grape-associated mycobiota of Arkansas-grown wine grapes for wine production. *Microbial Ecol.* **2021**, *82*, 845-858. DOI: [10.1007/s00248-021-01705-y](https://doi.org/10.1007/s00248-021-01705-y)

Dainese, M.; Martin, E.A.; Aizen, M.A.; Albrecht, M.; Bartomeus, I.; Bommarco, R.; Carvalheiro, L.G.; Chaplin-Kramer, R.; Gagic, V.; Garibaldi, L.A.; Ghazoul, J.; Grab, H.; Jonsson, M.; Karp, D.S.; Kennedy, C.M.; Kleijn, D.; Kremen, C.; Landis, D.A.; Letourneau, D.K.; Marini, L.; Poveda, K.; Rader, R.; Smith, H.G.; Tschantke, T.; Andersson, G.K.S.; Badenhauer, I.; Baensch, S.; Bezerra, A.D.M.; Bianchi, F.J.J.A.; Boreux, V.; Bretagnolle, V.; Caballero-Lopez, B.; Cavigliasso, P.; Cetkovic, A.; Chacoff, N.P.; Classen, A.; Cusser, S.; da Silva E Silva, F.D.; Arjen de Groot, G.; Dudenhöffer, J.H.; Ekroos, J.; Fijen, T.; Franck, P.; Freitas, B.M.; Garratt, M.P.D.; Gratton, C.; Hipólito, J.; Hozschuh, A.; Hunt, L.; Iverson, A.L.; Jha, S.; Keasar, T.; Kim, T.N.; Kishinevsky, M.; Klatt, B.K.; Klein, A.M.; Krewenka, K.M.; Krishnan, S.; Larsen, A.E.; Lavigne, C.; Liere, H.; Maas, B.; Mallinger, R.E.; Pachon, E.M.; Martínez-Salinas, A.; Meehan, T.D.; Mitchell, M.G.E.; Molina, G.A.R.; Nesper, M.; Nilsson, L.; O'Rourke, M.E.; Peters, M.K.; Precas, M.; Potts, S.G.; Ramos, D.d.L.; Rosenheim, J.A.; Rundlöf, M.; Rusch, A.; Sáez, A.; Scheper, J.; Schleuning, M.; Schmack, J.M.; Sciligo, A.R.; Seymour, C.; Stanley, D.A.; Stewart, R.; Stout, J.C.; Sutter, L.; Takada, M.B.; Taki, H.; Tamburini, G.; Tschumi, M.; Viana, B.F.; Westphal, C.; Willcox, B.K.; Wratten, S.D.; Yoshioka, A.; Zaragoza-Trello, C.; Zhang, W.; Zou, Y.; Steffan-Dewenter, I. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. *Sci. Adv.* **2019** *5*(10), eaax0121 DOI: [10.1126/sciadv.aax0121](https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0121)

Darriaut, R.; Tran, J.; Martins, G.; Ollat, N.; Masneuf-Pomarède, I.M.; Lauvergeat, V. In grapevine decline, microbiomes are affected differently in symptomatic and asymptomatic soils. *App. Soil Ecol.* **2023** *183*, 104767. DOI: [10.1016/j.apsoil.2022.104767](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104767)

- Giffard, B.; Winter, S.; Guidoni, S.; Nicolai, A.; Castaldini, M.; Cluzeau, D.; Coll, P.; Cortet, J.; Le Cadre, E.; d'Errico, G.; Forneck, A.; Gagnarli, E.; Griesser, M.; Guernion, M.; Lagomarsino, A.; Landi, S.; Le Bissonnais, Y.; Mania, E.; Mocali, S.; Preda, C.; Priori, S.; Reineke, A.; Rusch, A.; Schroers, H.J.; Simoni, S.; Steiner, M.; Temneanu, E.; Bacher, S.; Costantini, E.A.C.; Zaller, J.; Leyer, I. Vineyard management and its impacts on soil biodiversity, functions, and ecosystem services. *Front. Ecol. Evol.* **2022**, *10*, 850272. [DOI: 10.3389/fevo.2022.850272](https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850272)
- Gilbert, J.A.; van der Lelie, D.; Zorraonaindia, I. Microbial terroir for wine grapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*(1), 5–6. [DOI: 10.1073/pnas.1320471110](https://doi.org/10.1073/pnas.1320471110)
- Gobbi, A.; Acedo, A.; Imam, N.; Santini, R.G.; Ortiz-Álvarez, R.; Ellegaard-Jensen, L.; Belda, I.; Hansen, L.H. A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Commun Biol.* **2022**, *5*, 241 [DOI: 10.1038/s42003-022-03202-5](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5)
- Goddard, M.; Anfang, N.; Tang, R.; Gardner, C.; Jun, C. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *AMI* **2010** *12*(1), 63-73 [DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02035.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02035.x)
- Griggs, R.G.; Steenwerth, K.L.; Mills, D.A.; Cantu, D.; Bokulich, N.A. Sources and assembly of microbial communities in vineyards as a functional component of winegrowing. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 673810. [DOI: 10.3389/fmicb.2021.673810](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673810)
- Gupta, V.V.S.R.; Bramley, R.G.V.; Greenfield, P.; Yu, J.; Herderich, M.J. Vineyard soil microbiome composition related to rotundone concentration in Australian Cool Climate “Peppery” Shiraz Grapes. *Front Microbiol.* **2019** *10* [DOI: 10.3389/fmicb.2019.01607](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01607)
- Guzmán, A.; Montes, M.; Hutchins, L.; DeLaCerde, G.; Yang, P.; Kakouridis, A.; Dahlquist-Willard, R.M.; Firestone, M.K.; Bowles, T.; Kremen, C. Crop diversity enriches arbuscular mycorrhizal fungal communities in an intensive agricultural landscape. *New Phytol.* **2021** *231*(1), 447-459. [DOI: 10.1111/nph.17306](https://doi.org/10.1111/nph.17306)
- Huang, Z.; Liu, B.; Yin, Y.; Liang, F.; Xie, D.; Han, T.; Liu, Y.; Yan, B.; Li, Q.; Huang, Y.; Liu, Q. Impact of biocontrol microbes on soil microbial diversity in ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) *Pest. Manag. Sci.* **2021** *77*(12), 5537-5546 [DOI: 10.1002/ps.6595](https://doi.org/10.1002/ps.6595)
- Hyma, K.E.; Fay, J.C. Mixing of vineyard and oak-tree ecotypes of *Saccharomyces cerevisiae* in North American vineyards. *Mol. Ecol.* **2013** *22*(11), 2917-2930. [DOI: 10.1111/mec.12155](https://doi.org/10.1111/mec.12155)
- Iturrutxa, E.; Hill, A.E.; Torija, M.J. Profiling potential brewing yeast from forest and vineyard ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **2023** *394*, 110187. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110187](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110187)
- Kamilari, E.; Mina, M.; Karallis, C.; Tsaltas, D. Metataxonomic analysis of grape microbiota during wine fermentation reveals the distinction of Cyprus regional terroirs. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 726483. [DOI: 10.3389/fmicb.2021.726483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726483)
- Kirmchair, M.; Huber, L.; Porten, M.; Rainer, J.; Strasser, H. *Metarhizium anisopliae*, a potential agent for the control of grape phylloxera. *Biocontrol* **2004** *49*, 295-303 [DOI:10.1023/B:BICO.0000025387.13747.74](https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000025387.13747.74)
- Köljalg, U.; Abarenkov, K.; Nilsson, R.H.; Larsson, K.H.; Taylor, A.F.S. The UNITE Database for Molecular Identification and for Communicating Fungal Species. *Biodivers. Inf. Sci. Stand* **2019** *3*, e37402 [DOI: 10.3897/biss.3.37402](https://doi.org/10.3897/biss.3.37402)

- Lin, H.; Das Pedrada, S. Analysis of microbial compositions: a review of normalization and differential abundance analysis. *Npj Biofilms and Microbiomes* **2020** *6*, 60 [DOI: 10.1038/s41522-020-00160-w](https://doi.org/10.1038/s41522-020-00160-w)
- Lladó, S.; López-Mondéjar, R.; Baldrian, P. Forest soil bacteria: diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2017** *81*(2), e00063-16. [DOI: 10.1128%2FMMBR.00063-16](https://doi.org/10.1128%2FMMBR.00063-16)
- Martínez-Diz, M.P.; Andrés-Sodupe, M.; Bujanda, R.; Díaz-Losada, E.; Eichmeier, A.; Gramaje, D. Soil-plant compartments affect fungal microbiome diversity and composition in grapevine. *Fungal Ecol.* **2019**, *41*, 234–44. [DOI: 10.1016/j.funeco.2019.07.003](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2019.07.003)
- Martin, M. Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads *EMBnet* **2011** *17*(1). [DOI: 10.14806/ej.17.1.200](https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200)
- Martins, G.; Lauga, B.; Miot-Sertier, C.; Mercier, A.; Lonvaud, A.; Soulas, M.L.; Soulas, G.; Masneuf-Pomarède, I. Characterization of epiphytic bacterial communities from grapes, leaves, bark and soil of grapevine plants grown, and their relations. *PLoS One* **2013**, *8*(8), e73013. [DOI:10.1371/journal.pone.0073013](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073013)
- McMurdie, P.J.; Holmes, S. phyloseq: An R package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data *PLoS One* **2013** *8*(4), e61217. [DOI:10.1371/journal.pone.0061217](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217)
- Melillo, J.M.; Frey, S.D.; DeAngelis, K.M.; Werner, W.J.; Bernard, M.J.; Bowles, F.P.; Pold, G.; Knorr, M.A.; Grandy, A.S. Long-term pattern and magnitude of soil carbon feedback to the climate system in a warming world. *Science* **2017** *358*(6359), 101-105. [DOI:10.1126/science.aan2874](https://doi.org/10.1126/science.aan2874)
- Miura, T.; Sánchez, R.; Castañeda, L.E.; Godoy, K.; Barbosa, O. Shared and unique features of bacterial communities in native forest and vineyard phyllosphere. *Ecol. Evol.* **2019** *9*(6), 3295-3305. [DOI: 10.1002/ece3.4949](https://doi.org/10.1002/ece3.4949)
- Morrison-Whittle, P.; Lee, S.A.; Goddard, M.R. Fungal communities are differentially affected by conventional and biodynamic agricultural management approaches in vineyard ecosystems. *Agric. Ecosys. Environ.* **2017**, *246*, 306-313. [DOI: 10.1016/j.agee.2017.05.022](https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.05.022)
- Nilsson, R.H.; Larsson, K.H.; Taylor, A.F.S.; Bengtsson-Palme, J.; Jeppesen, T.S.; Schigel, D.; Kennedy, P.; Picard, K.; Glöckner, F.O.; Tedersoo, L.; Saar, I.; Koljalg, U.; Abarenkov, K. The UNITE database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classifications. *Nucleic Acids Research* **2019** *47*, D259-D264 [DOI: 10.1093/nar/gky1022](https://doi.org/10.1093/nar/gky1022)
- O'Rourke, M.E.; Petersen, M.J. Extending the “resource concentration hypothesis” to the landscape-scale by considering dispersal mortality and fitness costs. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2017** *249*, 1-3 [DOI: 10.1016/j.agee.2017.07.022](https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.022)
- Parada, A.E.; Needham, D.M.; Fuhrman, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Env. Microbiol.* **2016** *18*(5), 1403-1414 [DOI: 10.1111/1462-2920.13023](https://doi.org/10.1111/1462-2920.13023)
- Paredes, D.; Rosenheim, J.A.; Chaplin-Kramer, R.; Winter, S.; Karp, D.S. Landscape simplification increases vineyard pest outbreaks and insecticide use. *Ecol. Letters* **2020** *24*(1), 73-83 [DOI: 10.1111/ele.13622](https://doi.org/10.1111/ele.13622)

Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acid Res.* **2013** *41*, D591-D596 [DOI: 10.1093/nar/gks1219](https://doi.org/10.1093/nar/gks1219)

Sampaio, J.P.; Gonçalves, P. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *App. Environ. Microbiol.* **2008** *74*(7), 2144-2152. [DOI: 10.1128/AEM.02396-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02396-07)

Shi, L.; Dossa, G.G.O.; Paudel, E.; Zang, H.; Xu, J.; Harrison, R.D. Changes in Fungal Communities across a Forest Disturbance Gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019** *85*(12), e00080-19. [DOI: 10.1128%2FAEM.00080-19](https://doi.org/10.1128%2FAEM.00080-19)

Turenne, C.; Sanche, S.E.; Hoban, D.J.; Karlowsky, J.A.; Kabani, A.M. Rapid Identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System. *J. Clinical Microbiol.* **1999** *37*(6) [DOI: 10.1128/jcm.37.6.1846-1851.1999](https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1846-1851.1999)

Valentini, B.; Barbero, F.; Casacci, L.P.; Luganini, A.; Stefanini, I. Forest influence yeast populations vectored by insects into vineyard. *Front. Microbiol.* **2022** *13*, 1039939 [DOI:10.3389/fmicb.2022.1039939](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1039939)

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and Direct Sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols* **1990** 315-322 [DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1)

Yurkov, A.M. Yeast of the soil – obscure but precious. *Yeast* **2018** *35*(5), 369-378. [DOI:10.1002%2Fyea.3310](https://doi.org/10.1002%2Fyea.3310)

Zarraonaindia, I.; Owens, S.M.; Weisenhorn, P.; West, K.; Hampton-Marcell, J.; Lax, S.; Bokulich, N.A.; Mills, D.A.; Martin, G.; Taghavi, S.; van der Lelie, D.; Gilbert, J.A. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* **2015**, *6*(2), e02527-14. [DOI:10.1128/mBio.02527-14](https://doi.org/10.1128/mBio.02527-14)

Zhang, W.; Parker, K.M.; Luo, Y.; Wan, S.; Wallace, L.L.; Hu, S. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Glob. Chang. Biol.* **2005** *11*(2), 266-277. [DOI: 10.1111/j.1365-2486.2005.00902.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.00902.x)

Zhang, H.; Skelton, A.; Gardner, R.C.; Goddard, M.R. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids. *FEMS Yeast Res.* **2010** *10*(7), 941-947. [DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00681.x](https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00681.x).

Zhang, S.; Wang, Y.; Chen, X.; Cui, B.; Bai, Z.; Zhuang, G. Variety features differentiate microbiota in the grape leaves. *Can. J. Microbiol.* **2020**, *66*(11), 653-663. [DOI: 10.1139/cjm-2019-0551](https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0551)

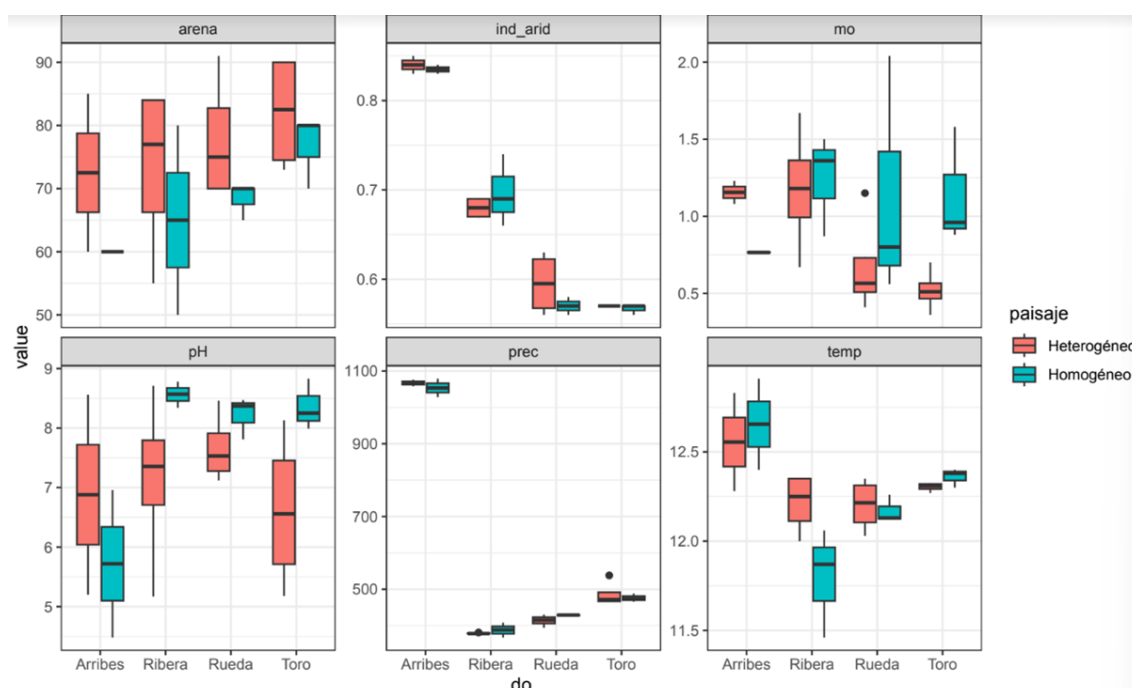
Zhou, J.; Cavagnaro, T.R.; De Bei, R.; Nelson, T. M.; Stephen, J.R.; Metcalfe, A.; Gilliam, M.; Breen, J.; Collins, C.; Rodríguez López, C.M. Wine terroir and the soil bacteria: An amplicon sequencing-based assessment of the Barossa Valley and its sub-Regions. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 597944. [DOI: 10.3389/fmicb.2020.597944](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.597944)



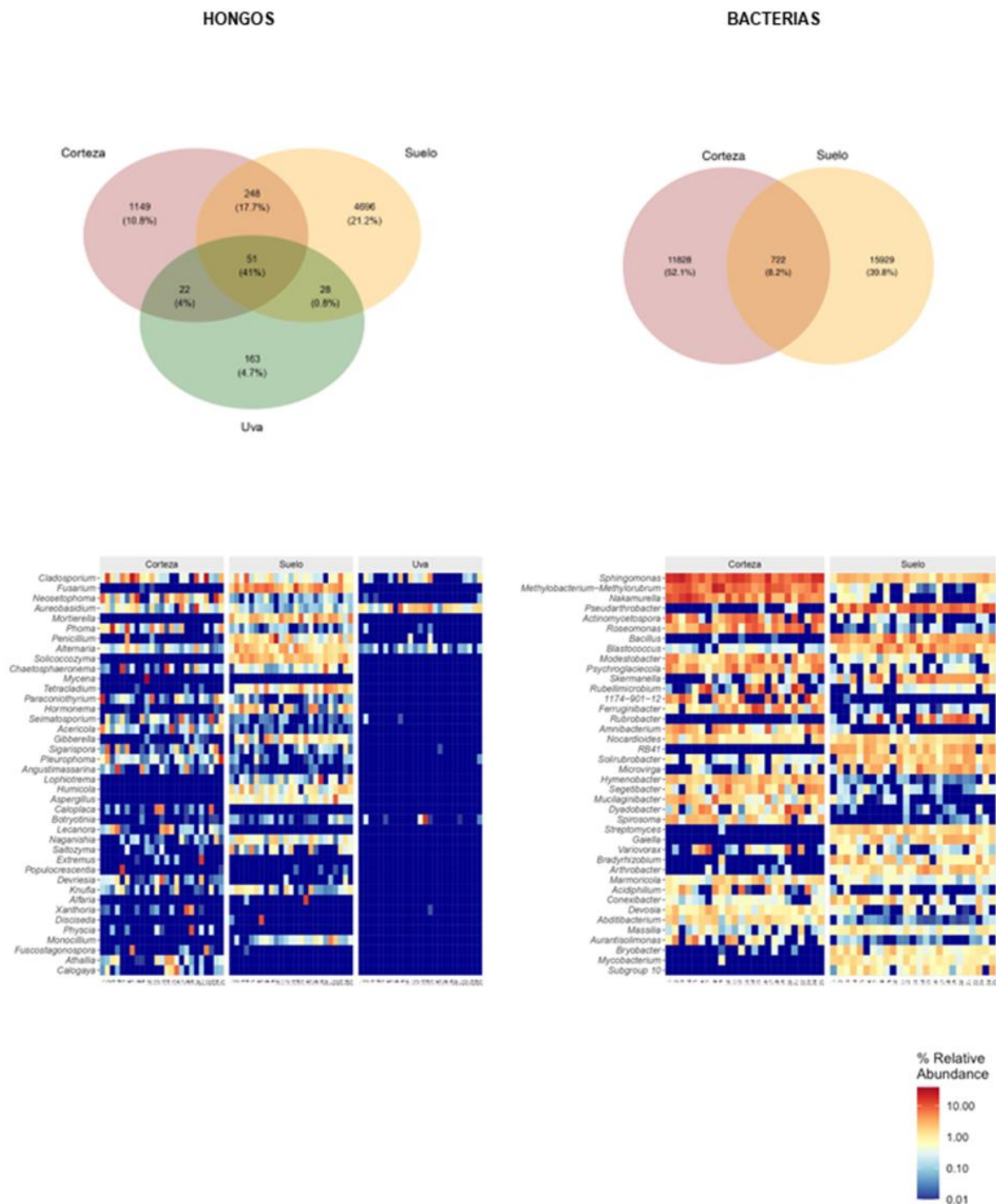
## MATERIAL SUPLEMENTARIO

Se realizó un análisis exploratorio de todos los puntos de muestreo para comprobar si la toma de muestras era correcta, ya que esta debía minimizar el resto de los factores que afectan al muestreo, pudiendo así comprobar la posible existencia de diferencias entre los distintos reservorios de la vid. Tal y como se muestra en la Figura 2.5 no se encontraron diferencias que fueran significativas en cuanto a las diferencias en los factores estandarizados, por lo tanto, podemos deducir que el factor de estudio no estaba siendo alterado por otro tipo de variables externas al paisaje. En la Figura 2.6, se muestra el estudio del microbioma, en el cual 722 taxones bacterianos (~8,2% de los taxones totales) se encontraban tanto en suelo como en corteza, mientras que 11828 taxones (~52,1%) eran únicos de corteza y 15929 taxones (~39,8%) eran únicos de suelo. En cuanto al micobioma, 1149 taxones (~10,8%) eran únicos de corteza, 4696 taxones (~21,2%) eran únicos de suelo y 163 taxones (~4,7%) eran únicos de uva. Los taxones compartidos entre los diferentes reservorios (corteza, suelo y uva) eran 51 (~41%), mientras que entre suelo y uva se compartían 26 taxones (0,8%), entre suelo y corteza 246 taxones (17,7%) y entre corteza y uva 22 taxones (4%).

Cabe resaltar que las metacomunidades bacterianas presentes en los tres reservorios (suelo, corteza, uva) estaban dominadas principalmente por Proteobacterias y Actinobacterias, aunque en proporciones variables para cada uno de ellos.



**Figura 2.5.** Variables bióticas y abióticas que pueden estar involucradas en cambios en la microbiota de los viñedos. Se comprobó que los cambios no eran significativos y por lo tanto, las diferencias encontradas en cuanto a las comunidades microbianas de los viñedos se debían al paisaje circundante.



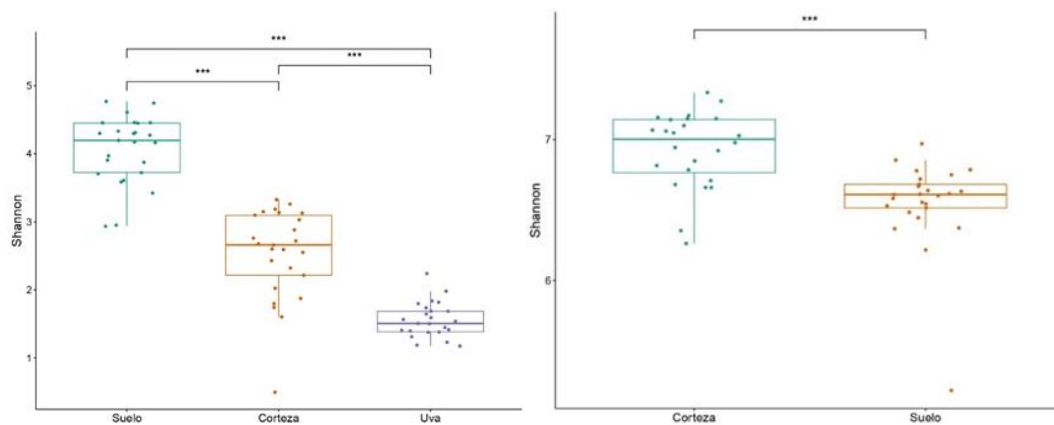
**Figura 2.6.** Análisis de Venn y evaluación del microbioma central de las muestras de corteza, suelo y uva del conjunto de viñedos de Castilla y León. Se puede apreciar el número de taxones compartidos y únicos en cada uno de los reservorios de la vid así como las especies con mayor abundancia relativa.

En muestras de corteza los taxones bacterianos con mayor abundancia relativa pertenecían a los géneros *Sphingomonas*, *Methylobacterium-Merhyolorubrum*, *Nakamurella*, *Actinomycetospora*, *Roseomonas*, *1171-901-12*, *Pshychroglaciecola*, *Annibacterium*, *Modestobacter*, *Ferruginibacter* e *Hymenobacter* mientras que, para

muestras de suelo, los predominantes eran *Pseudarthrobacter*, *Bacillus*, *Blastococcus*, *Skermanella*, *RB41* y *Rubrobacter*.

En cuanto a los taxones fúngicos, en muestras de corteza aquellos con mayor abundancia relativa pertenecían a los géneros *Neosetophoma*, *Phoma*, *Paraconiothyrium*, *Seimatosporium*, *Acericola* y *Angustimassarina*, en muestras de suelo predominan los géneros *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Solicoccozyma*, *Penicillium*, *Tetracladium*, *Alternaria*, *Hormonema*, *Chaetosphaeronema*, *Lophiotrema*, *Gibberella*, *Sigarispora* y *Humicola*, mientras que en muestras de uva el género con mayor abundancia relativa pertenecía a *Aureobasidium*.

El valor medio del índice de Shannon para muestras del microbioma bacteriano fue ligeramente superior para las muestras de corteza ( $H' = 7$ ) que para muestras de suelo ( $H' = 6,6$ ), lo cual corrobora la alta diversidad de especies presentes en dichos reservorios. Este valor varió para muestras del microbioma fúngico, donde fue superior para muestras de suelo ( $H' = 4,2$ ) que para muestras de corteza ( $H' = 2,6$ ) y de uva ( $H' = 1,4$ ), corroborando la menor diversidad de especies en estos reservorios (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** Valor obtenido a través del Índice de Shannon para hongos (izquierda) y bacterias (derecha) para cada uno de los reservorios de la vid.

## CAPÍTULO 3

### *Servicios ecosistémicos aportados por el microbioma vitivinícola de Castilla y León*

#### INTRODUCCIÓN

Los seres humanos dependemos totalmente de los ecosistemas ya que estos nos proporcionan una serie de servicios de los que nos beneficiamos de forma continua.

El concepto de servicios ecosistémicos (SE) se ha utilizado desde los años 90 para describir los beneficios que obtenemos de los ecosistemas, siendo descrito por varios autores ([Costanza et al., 1997](#); [Daily, 1997](#)). Los ecosistemas se pueden definir de diversas formas, la “Evaluación de los Ecosistemas del Milenio” (*Millennium Ecosystem Assessment*, MA) iniciada por las Naciones Unidas (ONU) y promovida en España por la Fundación Biodiversidad y el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino con la Universidad Autónoma de Madrid lo define como “*complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y comunidades microbianas y el entorno no vivo que interactúan como una unidad funcional*”. Además, los servicios ecosistémicos proporcionan una serie de beneficios directos e indirectos obtenidos de estos ecosistemas, los cuales incluyen “*servicios de aprovisionamiento como comida, agua, madera y fibras; servicios de regulación que afectan al clima, las inundaciones, las enfermedades, los residuos y la calidad del agua; servicios culturales que proporcionan beneficios recreativos, estéticos y espirituales; y servicios de apoyo como la formación del suelo, la fotosíntesis y el ciclo de los nutrientes*” ([Millennium Ecosystem Assessment](#), pp. 9).

El Sistema de Contabilidad Económica Ambiental (*System of Environmental Economic Accounting*, SEEA) integra datos económicos y ambientales con el objetivo de proporcionar una visión completa y polivalente de la interrelaciones entre la economía y el medio ambiente y las poblaciones y los cambios en las existencias de activos ambientales, ya que aportan beneficios a la humanidad. SEEA al contrario de la MA identifica únicamente tres grupos principales de SE: aprovisionamiento, regulación y cultura ([SEEA, 2021](#)). Conocer y valorar estos SE es de vital importancia ya que tener en cuenta los beneficios que proporcionan, permite que se reflejen en la toma de decisiones sobre el manejo y la conservación del medio y así poder avanzar hacia una gestión de la viticultura sostenible ([Palm et al., 2014](#); [Giffard et al., 2022](#))

La agricultura intensiva caracterizada por la homogeneización de los paisajes agrícolas y el uso de distintos agroquímicos tiene un impacto negativo acusado en el medio ambiente en general (pérdidas de nitrógeno a través de la lixiviación, etc.) y en la biodiversidad en particular, limitando la sostenibilidad del sistema agrícola y haciendo necesario el desarrollo de una agricultura más respetuosa con el medio ambiente ([Paiola et al., 2020](#); [Charbonnier et al., 2021](#)).

En los ecosistemas forestales, los principales nutrientes (N, P) se fijan en la capa orgánica o están contenidos en organismos vivos, recursos a los que los árboles solo tienen un acceso limitado. Los hongos ectomicorrízicos almacenan carbohidratos (como trehalosa

o manitol) y son capaces controlar el flujo de estos nutrientes hacia las plantas con las que establecen una relación simbiótica evitando además el parasitismo fúngico ([Nehls et al., 2010](#)). Las bacterias también son capaces de influir en las funciones del ecosistema vitivinícola a través del ciclo de nutrientes aumentando la movilización del N y contribuyendo a su mineralización, la cual es necesaria para el buen desarrollo de la planta ([Romdhane et al., 2022](#)). Esta función posee gran importancia ya que cualquier cambio puede comprometer los ciclos biogeoquímicos del suelo y la disponibilidad de nutrientes para la planta ([Giffard et al., 2022](#)). Por otro lado, algunos microorganismos (tanto bacterias como hongos), facilitan el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos (fijación de N, producción de hormonas vegetales como IAA, mayor absorción de nutrientes o competencia directa con otros microorganismos patógenos) mejorando la salud de la planta ([Fernández-San Millán et al., 2020](#)) y siendo posible su uso como biofertilizantes en agricultura ecológica.

El microbioma perteneciente a ambientes naturales se ha estudiado en los últimos años centrándose sobre todo en las similitudes (“*core*”) que los diferentes nichos microbianos poseen entre sí. El término “*core microbiano*” se utiliza en ecología microbiana para referirse al conjunto de taxones microbianos, o los atributos genómicos y funcionales asociados a esos taxones que son característicos de un entorno de interés. El estudio de este “*core microbiano*” es muy útil para poder identificar las poblaciones microbianas estables y permanentes de un determinado nicho de aquellas restringidas únicamente a unas condiciones ambientales específicas ([Berg et al., 2020](#); [Neu et al., 2021](#)). No obstante, el estudio del microbioma perteneciente a nichos diferenciadores posee gran importancia ya que es posible encontrar ciertas comunidades beneficiosas para el mantenimiento de la salud de las plantas, su adaptación al medio e incluso el funcionamiento del ecosistema ([Hargreaves et al., 2015](#); [Marian et al., 2022](#)).

Los viñedos y más concretamente, la microbiota asociada a los ambientes vitivinícolas, como ecosistema funcional, nos aporta una serie de beneficios apenas estudiados ([Paiola et al., 2020](#)). Por lo tanto, el **objetivo principal** fue identificar todos los SE aportados por el microbioma vitivinícola y, analizar la posible funcionalidad de las especies microbianas con el fin de que sirva como precedente para una posterior evaluación económica de los mismos.

## METODOLOGÍA

### 1. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en viñedos pertenecientes a 4 Denominaciones de Origen dentro de la región comprendida dentro del territorio de la Comunidad Autónoma de Castilla y León: Arribes, Ribera de Duero, Rueda, y Toro (ver metodología Capítulo 2).



**Figura 3.1.** Emplazamiento de los viñedos incluidos en el estudio

**Tabla 3.1.** Relación de muestras utilizadas para el estudio. Para cada muestra (ID) se detalla la bodega de procedencia, localización, D.O. y tipo de paisaje. Aquellas muestras que no poseen Bodega asociada, pertenecen a viticultores privados de la D.O. correspondiente.

ID	NOMBRE	BODEGA	LOCALIZACION	D.O.	PAISAJE
1	Martín Berdugo	Martín Berdugo	Aranda de Duero	Ribera	Homogéneo
2	Anta	Anta	Nava de Roa	Ribera	Heterogéneo
3	Protos	Protos	Peñañiel	Ribera	Homogéneo
4	Vermilion Matarromera	– Emina	San Bernardo	Ribera	Heterogéneo
5	Falda Quemada – Matarromera	– Emina	Olivares de Duero	Ribera	Homogéneo
6	Protos Ht	Protos	Padilla de Duero	Ribera	Heterogéneo
7	Siete Iglesias	Privado	Siete Iglesias	Rueda	Heterogéneo
8	Yllera bodega	Yllera	Rueda	Rueda	Homogéneo
9	Ramón Bilbao	Ramón Bilbao	Rueda	Rueda	Homogéneo
10	La Zarza – JP	Privado	La Zarza	Rueda	Heterogéneo
11	José Pariente	José Pariente	La Seca	Rueda	Homogéneo
12	Hornillos Eresma	Privado	Hornillos Eresma	de Rueda	Heterogéneo
13	Foncastín	Yllera	Foncastin	Rueda	Heterogéneo
14	Montelarreina	Monte La Reina	Los Villaesteres	Toro	Heterogéneo

15	Frutos Villar	Frutos Villar	Los Villaesteres	Toro	Homogéneo
16	Villaesteres – Mz	Mazas	Los Villaesteres	Toro	Heterogéneo
17	Mazas – Morales	Mazas	Morales de Toro	Toro	Heterogéneo
18	Fariña	Fariña	Sanzoles	Toro	Heterogéneo
19	Sobreño	Sobreño	Toro	Toro	Homogéneo
20	Villabuena	Privado	Villabuena del Puente	Toro	Homogéneo
21	Hacienda Zorita	Hacienda Zorita	Fermoselle	Arribes	Homogéneo
22	Villarino	Privado	Villarino de los Aires	Arribes	Heterogéneo
23	Fermoselle I	Privado	Fermoselle	Arribes	Homogéneo
24	Fermoselle II	Privado	Fermoselle	Arribes	Heterogéneo

## 2. BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Para poder identificar los servicios ecosistémicos aportados por la microbiota componente de los viñedos de nuestro estudio, realizamos una búsqueda sistemática de la literatura en la base de datos Web of Science ingresando la cadena de búsqueda:

“((VINEYARD OR VITICULTURE) AND (BIODIVERSITY OR DIVERSITY OR “SPECIES RICHNESS” OR “ECOSYSTEM SERVICES” OR RICHNESS OR FUNCTIONALITY))”

No se utilizaron limitaciones de año o país para la búsqueda. Esta exploración proporcionó 1935 resultados que se seleccionaron primero por título y resumen de acuerdo con los siguientes criterios de exclusión: a) estudios agronómicos puros (incluidos los de la diversidad genética de *Vitis vinífera* o de microorganismos de materia agronómica primaria); b) artículos que no estuvieran en inglés; c) documentos relativos únicamente a viñedos abandonados. Esta selección redujo la búsqueda a 286 artículos.

De cada artículo se recopiló la información necesaria (ubicación geográfica, grupos taxonómicos investigados, características del paisaje, manejo del viñedo, servicios ecosistémicos estudiados) para poder identificar la funcionalidad y efectos ejercidos por la microbiota identificada en el Capítulo 2, la cual clasificamos en las tres categorías de SE definidas por el SEEA, es decir, aprovisionamiento, regulación y culturales.

## RESULTADOS

En el estudio realizado en el Capítulo 2 observamos diferencias en cuanto a la composición microbiana presente en aquellos reservorios asociados a la vid (suelo, corteza, uva) situados en paisajes homogéneos respecto de aquellos que se encontraban en paisajes heterogéneos. Dicha microbiota representa un papel diferenciador en la función que desempeñan los microorganismos presentes en los viñedos y los servicios ecosistémicos aportados por estos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cuanto a diferencias/similitudes para cada tipo de paisaje y los servicios ecosistémicos asociados (**Figura 3.2**).

### A. Core microbiano

Identificamos diversos taxones compartidos entre los viñedos de ambos paisajes, los cuales aportaban distintos servicios ecosistémicos.

Se identificaron dos especies que ejercen **tanto SE de provisión como de regulación**. Se identificó, el género fúngico *Mortierella sp.*, capaz de solubilizar fósforo, aumentar los rendimientos de los cultivos y establecer simbiosis con las plantas ([Yan et al., 2022](#)) y, el género bacteriano *Bacillus sp.*, conocido por sus actividades antibacterianas, antifúngicas, antinematodos y promotoras del crecimiento de las plantas, siendo utilizado actualmente como agente de control biológico en cultivos ecológicos ([Huang et al., 2021](#); [de la Huerta-Bengoechea et al., 2022](#); [Palumbo et al., 2022](#)).

Identificamos tres especies ejecutoras de SE de **regulación** asociadas con la **calidad del suelo**. Por un lado, los géneros bacterianos pertenecientes a los géneros *Microvirga sp.* y *RB42*, capaces de reducir y asimilar nitratos del suelo ([Zhang et al., 2019](#); [Lin et al., 2022](#)) y, por otro lado, el género bacteriano *Marmoricola sp.*, el cual está compuesto por al menos 10 especies de bacterias capaces de producir hormonas vegetales como el ácido indol-3-acético (IAA), proporcionar sideróforos y antagonizar microbios patógenos al menos *in vitro* ([Jia et al., 2022](#)).

Se identificaron también tres géneros involucrados en el SE de **regulación** asociado a **control biológico**. El género *Phoma sp.*, posee especies productoras de metabolitos secundarios con potencial como biopesticida, eficiente frente a la *Botrytis* (producida por el hongo *Botrytis cinerea*) además de poseer potencial frente a más patógenos fúngicos de la vid ([Kernaghan et al., 2017](#); [Rai et al., 2021](#)); el género bacteriano *Streptomyces sp.*, agente de control biológico utilizado en viñedos ya que desempeña un papel importante en la comunidad microbiana del suelo a través de funciones vitales que incluyen el ciclo de nutrientes, la supresión de enfermedades gracias a la producción de compuestos bioactivos y la promoción del crecimiento de las plantas ([Elbendary et al., 2018](#); [Ashfield-Crook et al., 2020](#)); y, el hongo *Aureobasidium sp.*, utilizado en cultivos ecológicos actualmente puesto que ejerce control biológico frente a diversas especies patógenas de la vid como *Penicillium glabrum* entre otros ([Rathnayake et al., 2018](#); [Cabañas et al., 2020](#); [Yalage Don et al., 2021](#)).



Por último, identificamos dos géneros fúngicos que ejercen **funcionalidad negativa** en el ecosistema vitivinícola puesto que están involucrados en GTD, siendo *Fusarium sp.*, *Phoma sp.* y *Cladosporium sp.* dichos géneros ([Dissanayake et al., 2018](#); [Gobbi et al., 2022](#)). No obstante, algunas especies de *Phoma sp.* y *Fusarium* son capaces de ejercer control biológico frente a las enfermedades *Botrytis* y oídio ([Kernaghan et al., 2017](#); [Rai et al., 2021](#)).

## B. Tipicidad microbiana

### • Paisaje Heterogéneo

En cuanto a especies microbianas que aportan un **servicio de aprovisionamiento** de biomasa, encontramos tres especies bacterianas involucradas en la promoción del crecimiento vegetal: *Sphingomonas sp.*, *Bradyrhizobium sp.* ([Innerebner et al., 2011](#); [Gamalero et al., 2020](#); [Ares et al., 2021](#)) y el género *1174-901-12*, englobado dentro de los *Rhizobiales* ([Jo et al., 2022](#)).

En cuanto a especies microbianas relacionadas con el **servicio de regulación**, identificamos siete especies tanto de hongos como de bacterias asociadas con dos únicos SE de regulación: (i) calidad del suelo; (ii) control biológico.

- i) El género *Bradyrhizobium sp.* además de aportar SE de provisión, es capaz de fijar nitrógeno, por lo que contribuye a la calidad del suelo en el viñedo ([Gamalero et al., 2020](#)) y, el género *1174-901-12* también se encuentra involucrado en la producción de polisacáridos ([Jo et al., 2022](#)) beneficiosos para la salud del suelo. Por otro lado, encontramos el género bacteriano *Jatrophihabitans sp.*, el cual es capaz de degradar de carbohidratos en suelos forestales ([DeAngelis & Pold, 2020](#)) proporcionando una mayor fracción útil de carbono orgánico como fuente de energía para la planta y otras especies microbianas ([Yost & Hartemink, 2019](#)). También había presencia del género *Mucilaginibacter sp.*, el cual se ha descrito que posee capacidad para hidrolizar la materia orgánica (como xilano, pectina y laminarina) y, producir así grandes cantidades de polisacáridos extracelulares que contienen los azúcares glucosa, galactosa, manosa y ramnosa, proporcionando así una fuente de carbono para otros microorganismos como por ejemplo, *Saccharomyces sp.* ([Kowallik et al., 2015](#)).
- ii) Dentro de los géneros bacterianos que se han descrito que pueden ejercer control biológico, encontramos el género *Variovorax sp.*, capaz de degradar compuestos orgánicos complejos que son recalcitrantes para otras bacterias ([Satola et al., 2013](#)), convirtiéndose así en una buena opción de biorremediación; el género bacteriano *Crossiella sp.*, productor de compuestos bioactivos con actividad antifúngica y antibacteriana efectivos frente a diversos patógenos vitivinícolas como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* o *Aspergillus versicolor* ([González-Pimentel et al., 2022](#)); y, el género *Metarhizium sp.*, el cual está

compuesto por más de 70 especies, de las cuales la mayoría son entomopatógenas capaces de mantener relaciones simbióticas con las plantas al asociarse a las raíces, siendo utilizado como agente biológico en viñedos frente a la filoxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) ([Kirchmair et al., 2004](#); [Li et al., 2022](#)).

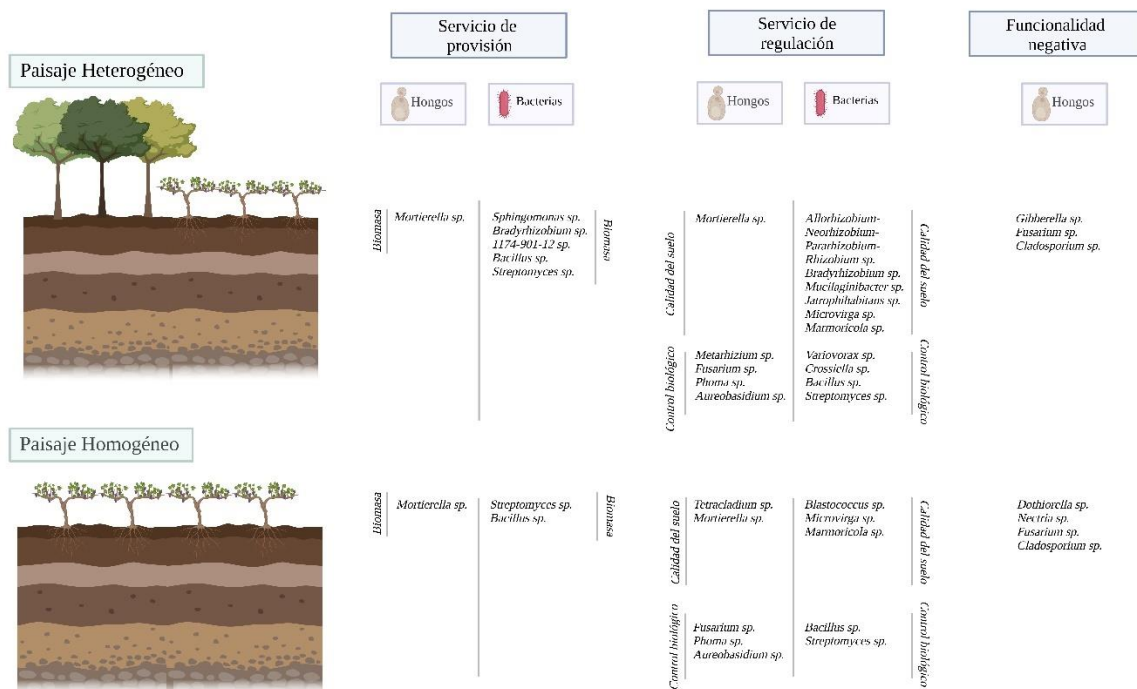
Además de estas especies beneficiosas, identificamos una especie fúngica que ejerce **funcionalidad negativa** en el ecosistema vitivinícola: el género *Gibberella sp.* (anamorfo de *Fusarium sp.*), conocido patógeno de plantas ([Castañeda & Barbosa, 2017](#); [Liang et al., 2019](#)) que aumenta el riesgo de enfermedad de la vid.

- **Paisaje Homogéneo**

En viñedos presentes en paisajes homogéneos únicamente identificamos una especie, perteneciente al género *Tetracladium sp.*, que pudiera ejercer un **servicio ecosistémico de provisión** de biomasa, la cual se ha demostrado que actúa como endófito de la raíz de las plantas, ejerciendo beneficios sobre la salud y el crecimiento de su huésped ([Lazar et al., 2022](#)).

En cuanto a especies involucradas en el **servicio ecosistémico de regulación**, tampoco pudimos identificar más de una especie con una abundancia relativa significativa. La especie identificada pertenecía al género bacteriano *Blastococcus sp.*, el cual juega un papel importante en el viñedo puesto que es capaz de: (i) fijar nitrógeno del suelo, utilizando carbono orgánico como fuente de carbono; (ii) reducir el lixiviado de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  y  $\text{NO}_3\text{-N}$  mejorando el aporte de nutrientes del suelo; y, (iii) limitar el crecimiento de microorganismos extraños actuando como agente de control biológico ([Franco Castro et al., 2018](#); [Li et al., 2022](#)).

En cuanto a microorganismos que ejercen una función negativa al ecosistema vitivinícola, detectamos los géneros fúngicos *Dothiorella sp.* y *Nectria sp.*, ambos involucrados en la muerte regresiva de *Botryosphaeria*, asociándose con enfermedades del tronco de la vid (GTD) ([Jayawardena et al., 2018](#); [Paolinelli et al., 2023](#); [Darriaut et al., 2023](#)).



**Figura 3.2.** Relación de servicios ecosistémicos y funcionalidad ejercida por los géneros con mayor porcentaje de abundancia relativa en las muestras de estudio, tanto en paisajes heterogéneos (arriba) como homogéneos (abajo). Imagen generada con [BioRender](#).

## DISCUSIÓN

Identificamos 6 géneros microbianos con posible uso como biofertilizantes en agricultura ecológica: *Mortierella sp.*, *Bacillus sp.*, *Tetracladium sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Bradyrhizobium sp.* y *1174-901-12*. La conciencia ambiental va creciendo significativamente, por lo que dichos biofertilizantes adquieren cada vez más interés en agricultura para producir un cambio hacia la sostenibilidad y rentabilidad agraria ([Purahong et al., 2022](#)).

Pero no solo se comienza a considerar dicha producción biológica, sino que, en los últimos años ha aumentado ampliamente el interés y uso de los agentes de control biológico como fitosanitarios. Las enfermedades del tronco de la vid (GTD, del inglés *Grapevine Trunk Disease*) son una de las patologías más devastadoras que amenazan la supervivencia y rentabilidad de los viñedos en todo el mundo, por lo que, conocer y controlar la microbiota patógena que desencadena dichas enfermedades es vital para el mantenimiento del ecosistema vitivinícola ([Rai et al., 2021](#); [Cobos et al., 2022](#)). En nuestras muestras pudimos identificar 8 géneros, que incluyen especies que pueden ejercer servicios de control biológico: *Variovorax sp.*, *Crossiella sp.*, *Metarhizium sp.*, *Blastococcus sp.*, *Phoma sp.*, *Streptomyces sp.*, *Aureobasidium sp.* y *Fusarium sp.* A pesar de esto, no se recomienda el uso de *Fusarium sp.* como fitosanitario puesto que produce micotoxinas capaces de permanecer en los vinos tras la fermentación, pudiendo afectar a la salud humana ([Kernaghan et al., 2017](#)). El control natural de plagas es un servicio ecosistémico crítico en los paisajes agrícolas puesto que se estima que la pérdida de

rendimiento mundial por plagas oscila y puede ascender hasta un 40% ([Charbonnier et al., 2021](#)). La reforma de la política agraria común (PAC) a nivel de la Unión Europea está dirigida hacia la conservación del medio ambiente y la lucha contra el cambio climático, suponiendo un cambio en el paradigma del uso indiscriminado de fitosanitarios de origen químico y haciendo necesaria la investigación y el uso de nuevos agentes de control biológico que complementen los ya existentes en el mercado.

El mayor número de taxones asociados con funcionalidad positiva en los viñedos se ha encontrado en viñedos de paisajes heterogéneos mientras que, el número de taxones asociados con especies fitopatógenas y, por tanto, asociados con una funcionalidad negativa en el ecosistema vitivinícola, se ha encontrado en mayor proporción en paisajes homogéneos. Algunos de los autores que han descrito la influencia del paisaje sobre las comunidades microbianas, ([Petrenko et al., 2020](#)) concluyeron que, en paisajes heterogéneos se beneficiaba la coexistencia de depredadores microbianos y sus presas a largo plazo. Por otro lado, se ha comprobado que los árboles y setos amortiguan el viento por lo que actúan como trampa de esporas, limitando así la difusión de hongos patógenos cuando aún no hay infección, aunque también pueden actuar como transmisores de algunas enfermedades si la vegetación está infectada ([Dentika et al., 2022](#)). También se ha descrito que la intensificación del uso de la tierra preponderante en cultivos de paisajes homogéneos es un impulsor de la pérdida de biodiversidad microbiana ([Gossner et al., 2016](#)). Por lo que nuestro resultado podría deberse a: (i) la presencia de bosques que reducen las esporas de especies fitopatógenas que llegan a las vides; (ii) menor intensificación de la tierra en viñedos ubicados en paisajes heterogéneos o; (iii) la alta presencia de taxones asociadas con especies de control biológico presentes con un alto porcentaje de abundancia relativa en paisajes heterogéneos, los cuales podrían estar influyendo, suprimiendo o disminuyendo la presencia de especies alterantes.

Un reto adicional, y ciertamente atractivo, a este planteamiento sería llevar a cabo la valoración de los servicios ecosistémicos mencionados, incluso su valoración económica. Con los datos disponibles este reto no puede acometerse por el momento, dado que no hay información acerca de la abundancia absoluta del microbioma identificado, ni tampoco de su productividad comparada con los productos agroquímicos a los que podría sustituir, lo que impide que se puedan aplicar actualmente técnicas de valoración económica adecuadas, como sería basarse en costes de reemplazo.

## REFERENCIAS

Ares, A.; Pereira, J.; Garcia, E.; Costa, J.; Tiago, I. The Leaf Bacterial Microbiota of Female and Male Kiwifruit Plants in Distinct Seasons: Assessing the Impact of *Pseudomonas syringae* pv. Actinidiae. *Phytobiomes J.* **2021** 5(3), 275-287 [DOI: 10.1094/PBIOMES-09-20-0070-R](https://doi.org/10.1094/PBIOMES-09-20-0070-R)

Ashfield-Crook, N.R.; Woodward, Z.; Soust, M., Kurtböke, D.I. Bioactive Streptomycetes from Isolation to Applications: A Tasmanian Potato Farm Example. *Methods Mol. Biol.* **2021** 2232, 219-249 [DOI: 10.1007/978-1-0716-1040-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4_18)

- Berg, G.; Rybakova, D.; Fischer, D.; Cernava, T.; Champomier Vergés, M.C.; Charles, T.; Chen, X.; Cocolin, L.; Eversole, K.; Herrero Corral, G.; Kazou, M.; Kinkel, L.; Lange, L.; Lima, N.; Loy, A.; Macklin, J.A.; Maguin, E.; Mauchline, T.; McClure, R.; Mitter, B.; Ryan, M.; Sarand, I.; Smidt, H.; Schelkle, B.; Roume, H.; Seghal Kiran, G.; Selvin, J.; Soares Correa de Souza, R.; van Overeek, L.; Singh, B.K.; Wagner, M.; Walsh, A.; Sessitsch, A.; Schloter, M. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* **2020** *8*(1), 10 [DOI:10.1186/s40168-020-00875-0](https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0)
- Cabañas, C.M.; Hernández, A.; Martínez, A.; Tejero, P.; Vázquez-Hernández, M.; Martín, A., Ruiz-Moyano, S. Control of *Penicillium glabrum* by indigenous antagonistic yeast from vineyard. *Foods*. **2020** *9*(12), 1864 [DOI: 10.3390/foods9121864](https://doi.org/10.3390/foods9121864)
- Castañeda, L.E.; Barbosa, O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forest. *PeerJ*. **2017** *5*, e3098 [DOI: 10.7717/peerj.3098](https://doi.org/10.7717/peerj.3098)
- Charbonnier, Y.; Papura, D.; Touzot, O.; Rhouy, N.; Sentenac, G.; Rusch, A. Pest control services provided by bats in vineyard landscapes. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2021** *306*, 107207 [DOI:10.1016/j.agee.2020.107207](https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107207)
- Cobos, R.; Ibañez, A.; Diez-Galán, A.; Calvo-Peña, C.; Ghoreshizadeh, S.; Coque, J.J.R. The Grapevine Microbiome to the Rescue: Implications for the Biocontrol of Trunk Diseases. *Plant (Basel)* **2022** *11*(7), 840 [DOI: 10.3390/plants11070840](https://doi.org/10.3390/plants11070840)
- Costanza, R.; d'Arge, R.; de Groot, R.; Farber, E.; Grasso, M.; Hannon, B.; Limburgo, K.; Naeem, S.; O'Neill, R.V.; Paruelo, J.; Raskin, R.G.; Sutton, P.; van den Belt, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **1997** *387*, 253-260 [DOI: 10.1038/387253a0](https://doi.org/10.1038/387253a0)
- Daily, G.C. Nature's services: societal dependence on natural ecosystems. *Island Press* **1997** Washington D.C. 392pp. [ISBN 1-55963-475-8](https://doi.org/10.1002/9781118111113)
- Darriaut, R.; Tran, J.; Martins, G.; Ollat, N.; Masneuf-Pomarède, I.M.; Lauvergeat, V. In grapevine decline, microbiomes are affected differently in symptomatic and asymptomatic soils. *App. Soil Ecol.* **2023** *183*, 104767 [DOI: 10.1016/j.apsoil.2022.104767](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104767)
- DeAngelis, K.; Pold, G. Genome sequences of *Frankineae* sp. Strain MT45 and *Jatrophihabitans* sp. Strain GAS493, two actinobacteria isolated from forest soil *Microbiol. Resour. Announc.* **2020** *9*(38), e00614-20 [DOI: 10.1128/MRA.00614-20](https://doi.org/10.1128/MRA.00614-20)
- Dentika, P.; Ozier-Lafontaine, H.; Penet, L. Dynamics of pathogenic fungi in field hedges: vegetation cover is differentially impacted by weather. *Microorganisms* **2022** *10*(2), 400 [DOI:10.3390/microorganisms10020400](https://doi.org/10.3390/microorganisms10020400)
- De la Huerta-Bengoechea, P.; Gil-Serna, J.; Melguizo, C.; Ramos, A.J.; Prim, M.; Vázquez, C.; Patiño, B. Biocontrol of Mycotoxigenic Fungi Using Bacteria Isolated from Ecological Vineyard Soils. *J. Fungi* **2022** *8*, 1136 [DOI: 10.3390/jof8111136](https://doi.org/10.3390/jof8111136)
- Dissanayake, A.J.; Purahong, W.; Wubet, T.; Hyde, K.D.; Zhang, W.; Xu, H.; Zhang, G.; Fu, C.; Liu, M.; Xing, Q.; Li, X.; Yan, J. Direct comparison of culture-dependent and culture-independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*) *Fungal Diversity* **2018** *90*, 85-107 [DOI: 10.1007/s13225-018-0399-3](https://doi.org/10.1007/s13225-018-0399-3)
- Elbendary, A.A.; Hessain, A.M.; El-Hariri, M.D.; Seida, A.A.; Moussa, I.M.; Mubarak, A.S.; Kabli, S.A.; Hemeg, H.A.; El Jakee, J.K. Isolation of antimicrobial producing *Actinobacteria* from soil samples. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018** *25*(1), 44-46 [DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.05.003](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.003)

- Fernández-San Millán, A.; Farran, I.; Larraya, L.; Ancin, M.; Arregui, L.M.; Veramendi, J. Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from Spanish vineyards: benefits for seedling development. *Microbiol. Res.* **2020** *237*, 126480 [DOI: 10.1016/j.micres.2020.126480](https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126480)
- Franco Castro, J.; Nouioui, I.; Sangal, V.; Choi, S.; Yang, S.J.; Kim, B.Y.; Trujillo, M.E.; Riesco, R.; Montero-Calasanz, M.C.; Rahmani, T.P.D.; Bull, A.T.; Sutcliffe, I.C.; Asenjo, J.A.; Andrews, B.; Goodfellow, M. *Blastococcus atacamensis* sp. Nov., a novel strain adapted to life in the Yungay core region of the Atacama Desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2018** *68*, 2712-2721 [DOI:10.1099/ijsem.0.002828](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002828)
- Gamalero, E.; Bona, E.; Novello, G.; Boatti, L.; Mignone, F.; Massa, N.; Cesaro, P.; Berta, G.; Lingua, G. Discovering the bacteriome of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir in a conventionally managed vineyard. *Sci. Rep.* **2020** *10*, 6453 [DOI: 10.1038/s41598-020-63154-w](https://doi.org/10.1038/s41598-020-63154-w)
- Giffard, B.; Winter, S.; Guidoni, S.; Nicolai, A.; Castaldini, M.; Cluzeau, D.; Coll, P.; Cortet, J.; Le Cadre, E.; d'Errico, G.; Forneck, A.; Gagnarli, E.; Griesser, M.; Guernion, M.; Lagomarsino, A.; Landi, S.; Le Bissonnais, Y.; Mania, E.; Mocali, S.; Preda, C.; Priori, S.; Reineke, A.; Rusch, A.; Schroers, H.J.; Simoni, S.; Steiner, M.; Temneanu, E.; Bacher, S.; Costantini, E.A.C.; Zaller, J.; Leyer, I. Vineyard Management and Its Impact on Soil Biodiversity, Functions, and Ecosystem Services. *Front. Ecol. Evol.* **2022** *10*, 850272 [DOI: 10.3389/fevo.2022.850272](https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850272)
- Gobbi, A.; Acedo, A.; Imam, N.; Santini, R.G.; Ortiz-Álvarez, R.; Ellegaard-Jensen, L.; Belda, I.; Hansen, L.H. A global microbiome survey of vineyard soils highlights the microbial dimension of viticultural terroirs. *Commun Biol.* **2022** *5*, 241 [DOI: 10.1038/s42003-022-03202-5](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03202-5)
- González-Pimentel, J.L.; Dominguez-Moñino, I.; Jurado, V.; Laiz, L.; Caldeira, A.T.; Saiz-Jimenez, C. The rare actinobacterium *Crosiella* sp. is a potential source of new bioactive compounds with activity against bacteria and fungi. *Microorganisms* **2022** *10*, 1575 [DOI:10.3390/microorganisms10081575](https://doi.org/10.3390/microorganisms10081575)
- Gossner, M.M.; Lewinsohn, T.M.; Kahl, T.; Grassein, F.; Boch, S.; Prati, D.; Birkhofer, K.; Renner, S.C.; Sikorski, J.; Wubet, T.; Arndt, H.; Baumgartner, V.; Blaser, S.; Blüthgen, N.; Börschig, C.; Buscot, F.; Diekötter, T.; Jorge, L.R.; Jung, K.; Keyel, A.C.; Klein, A.M.; Klemmer, S.; Krauss, J.; Lange, M.; Müller, J.; Overmann, J.; Pašalić, E.; Penone, C.; Perović, D.J.; Purschke, O.; Schall, P.; Socher, S.A.; Sonnemann, I.; Tschapka, M.; Tschardt, T.; Türke, M.; Venter, P.C.; Weiner, C.N.; Werner, M.; Wolters, V.; Wurst, S.; Westphal, C.; Fischer, M.; Weisser, W.W.; Allan, E. Land-use intensification causes multitrophic homogenization of grassland communities. *Nature* **2016** *8*, 540 [DOI: 10.1038/nature20575](https://doi.org/10.1038/nature20575)
- Hargreaves, S.K.; Williams, R.J.; Hofmockel, K.S. Environmental filtering of microbial communities in agricultural soil shifts with crop growth. *PLoS One* **2015** *10*(7), e0134345 [DOI:10.1371/journal.pone.0134345](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134345)
- Huang, Z.; Liu, B.; Yin, Y.; Liang, F.; Xie, D.; Han, T.; Liu, Y.; Yan, B.; Li, Q.; Huang, Y.; Liu, Q. Impact of biocontrol microbes on soil microbial diversity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Pest. Manag. Sci.* **2021** *77*(12), 5537-5546 [DOI: 10.1002/ps.6595](https://doi.org/10.1002/ps.6595)
- Innerebner, G.; Knief, C.; Vorholt, J.A. Protection of *Arabidopsis thaliana* against Leaf-Pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011** *77*, 3202-3210 [DOI: 10.1128/AEM.00133-11](https://doi.org/10.1128/AEM.00133-11)
- Jayawardena, R.S.; Purahong, W.; Zhang, W.; Wubet, T.; Li, X.; Liu, M.; Zhao, W.; Hyde, K.D.; Liu, J.; Yan, J. Biodiversity of fungi on *Vitis vinifera* L. revealed by traditional and high-resolution culture-independent approaches. *Fungal Divers.* **2018** *90*, 1-84 [DOI:10.1007/s13225-018-0398-4](https://doi.org/10.1007/s13225-018-0398-4)

- Jia, W.; Wang, S.; He, X.; Zhao, X. Different factors drive the assembly of pine and *Panax notoginseng*-associated microbiomes in *Panax notoginseng*-pine agroforestry systems. *Front. Microbiol.* **2022** *13*, 1018989 [DOI: 10.3389/fmicb.2022.1018989](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1018989)
- Jo, Y.; Jung, D.R.; Park, T.H.; Lee, D.; Park, M.K.; Lim, K.; Shin, J.H. Changes in microbial community structure in response to Gummosis in peach tree bark. *Plants* **2022** *11*, 2834 [DOI:10.3390/plants11212834](https://doi.org/10.3390/plants11212834)
- Kernaghan, G.; Mayerhofer, M.; Griffin, A. Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol. *Can. J. Microbiol.* **2017** *63*(7), 583-595 [DOI:10.1139/cjm-2016-0740](https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0740)
- Kirchmair, M.; Huber, L.; Porten, M.; Rainer, J.; Strasser, H. *Metarhizium anisopliae*, a potential agent for the control of grape phylloxera. *BioControl* **2004** *49*, 295-303 [DOI:10.1023/B:BICO.0000025387.13747.74](https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000025387.13747.74)
- Kowallik, V.; Miller, E.; Greig, D. The interaction of *Saccharomyces paradoxus* with its natural competitors on oak bark. *Mol. Ecol.* **2015** *24*, 1596-1610 [DOI: 10.1111/mec.13120](https://doi.org/10.1111/mec.13120)
- Lazar, A.; Mushinski, R.M.; Bending, G.D. Landscape scale ecology of *Tetracladium spp.* fungal root endophytes. *Environ. Microbiome.* **2022** *17*(1),40 [DOI: 10.1186/s40793-022-00431-3Pha](https://doi.org/10.1186/s40793-022-00431-3Pha)
- Li, R.; Yang, S.; Lin, M.; Guo, S.; Han, X.; Ren, M.; Du, L.; Song, Y.; You, Y.; Zhan, J.; Huang, W. The Biogeography of Fungal Communities Across Different Chinese Wine-Producing Regions Associated With Environmental Factors and Spontaneous Fermentation Performance. *Front. Microbiol.* **2022** *12*, 636639 [DOI: 10.3389/fmicb.2021.636639](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636639)
- Li, Z.; Zhang, K.; Qiu, L.; Ding, S.; Wang, H.; Liu, Z.; Zhang, M.; Wei, Z. Soil Microbial Co-Occurrence Patterns under Controlled-Release Urea and Fulvic Acid Applications. *Microorganisms* **2022** *10*, 1823 [DOI: 10.3390/microorganisms10091823](https://doi.org/10.3390/microorganisms10091823)
- Liang, H.; Wang, X.; Yan, J.; Luo, L. Characterizing the Intra-Vineyard Variation of Soil Bacterial and Fungal Communities. *Front. Microbiol.* **2019** *10*, 1239 [DOI: 10.3389/fmicb.2019.01239](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01239)
- Lin, Y.; Zhang, Y.; Liang, X.; Duan, R.; Yang, L.; Du, Y.; Wu, L.; Huang, J.; Xiang, G.; Bai, J.; Zhen, Y. Assessment of rhizosphere bacterial diversity and composition in a metal hyperaccumulator (*Boehmeria nivea*) and a nonaccumulator (*Artemisia annua*) in a antimony mine. *J. Appl. Microbiol.* **2022** *132*, 3432-3443 [DOI: 10.1111/jam.15486](https://doi.org/10.1111/jam.15486)
- Marian, M.; Licciardello, G.; Vicelli, B.; Pertot, I.; Perazzolli, M. Ecology and potential functions of plant-associated microbial communities in cold environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2022** *98*(1), fiab161 [DOI: 10.1093/femsec/fiab161](https://doi.org/10.1093/femsec/fiab161)
- Millennium Ecosystem Assessment (MA). Ecosystem and Human Well-being: Synthesis. *Island Press* **2005** Washington, D.C. [ISBN 1-59726-040-1](https://doi.org/10.1093/femsec/fiab161)
- Nehls, U.; Göhringer, F.; Wittulsky, S.; Dietz, S. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biol. (Stuttg)* **2010** *12*(2), 292-301 [DOI:10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2009.00312.x)
- Neu, A.T.; Allen, E.E.; Roy, K. Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. *PNAS* **2021** *118*(51), e2104429118 [DOI: 10.1073/pnas.2104429118](https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118)
- Paiola, A.; Assandri, G.; Brambilla, M.; Zottini, M.; Pedrini, P.; Nascimbene, J. Exploring the potential of vineyards for biodiversity conservation and delivery of biodiversity – mediated ecosystem services: a global-scale systematic review. *Sci. Tot. Environ.* **2020** *706*, 135839 [DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.135839](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135839)

- Palm, C.; Blanco-Canqui, H.; DeClerck, F.; Gatere, L.; Grace, P. Conservation agriculture and ecosystem services: An overview. *Agric. Ecosyst. Environ.* **2014** *187*, 87-105 [DOI: 10.1016/j.agee.2013.10.010](https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.010)
- Palumbo, J.D.; O’Keeffe, T.; Huynh, S.; Lee, B.; Parker, C.T. Complete Genome Sequences of Two *Bacillus velezensis* Strains Isolated from California Raisin Vineyard Soils. *Microbiol. Resour. Announc.* **2022** *11*(7), e0092321 [DOI: 10.1128/mra.00923-21](https://doi.org/10.1128/mra.00923-21)
- Paolinelli, M.; Martinez, L. E.; García-Lampasona, S.; Diaz-Quirós, C.; Belmonte, M.; Ahumada, G.; Pirrone, M.A.; Farber, M.D.; Escoriza, G.; Longone, V.; González, M.; Lerena, C.; Combina, M.; Mercado, L. A. Microbiome in soils of Mendoza: microbial resources for the development of agroecological management in viticulture. *OENO One* **2023** *57*(1), 191–205 [DOI: 10.20870/oenone.2023.57.1.5585](https://doi.org/10.20870/oenone.2023.57.1.5585)
- Petrenko, M.; Friedman, S.P.; Fluss, R.; Pasternak, Z.; Huppert, A.; Jurkevitch, E. Spatial heterogeneity stabilizes predator-prey interactions at the microscale while patch connectivity controls their outcome. *Environ. Microbiol.* **2020** *22*(2), 694-704 [DOI: 10.1111/1462-2920.14887](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14887)
- Purahong, W.; Tanunchai, B.; Muszynski, S.; Maurer, F.; Wahdan, Fareed, S.; Wahdan, M.; Malter, J.; Buscot, F.; Nolt, M. Cross-kingdom interactions and functional patterns of active microbiota matter in governing deadwood decay. *Proc. R. Soc. B* **2022** *289*, 20220130 [DOI:10.1098/rspb.2022.0130](https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0130)
- Rai, M.; Zimowska, B.; Shinde, S.; Tres, M.V. Bioherbicidal potential of different species of Phoma: opportunities and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021** *105*, 3009-3018 [DOI:10.1007/s00253-021-11234-w](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11234-w)
- Rathnayake, R.M.S.P.; Savocchia, S.; Schmidtke, L.M.; Steel, C.C. Characterisation of *Aureobasidium pullulans* isolates from *Vitis vinifera* and potential biocontrol activity for the management of bitter rot of grapes. *Eur. J. Plant Pathol.* **2018** *151*, 593-611 [DOI:10.1007/s10658-017-1397-0](https://doi.org/10.1007/s10658-017-1397-0)
- Romdhane, S.; Spor, A.; Banerjee, S.; Breuil, M.C.; Bru, D.; Chabbi, A.; Hallin, S.; van der Heijden, M.G.A.; Saghai, A.; Philippot, L. Land-use intensification differentially affects bacterial, fungal and protist communities and decreases microbiome network complexity. *Environ. Microbiome* **2022** *17*(1), 1 [DOI: 10.1186/s40793-021-00396-9](https://doi.org/10.1186/s40793-021-00396-9)
- Satola, B.; Wübbeler, J.H.; Steinbüchel, A. Metabolic characteristics of the species *Variovorax paradoxus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013** *97*, 541-560 [DOI: 10.1007/s00253-012-4585-z](https://doi.org/10.1007/s00253-012-4585-z)
- Yalage Don, S.M.; Schmidtke, L.M.; Gambetta, J.M.; Steel, C.C. Volatile organic compounds produced by *Aureobasidium pullulans* induce electrolyte loss and oxidative stress in *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. *Res. Microbiol.* **2021** *172*(1), 103788 [DOI:10.1016/j.resmic.2020.10.003](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.10.003)
- Yan, H.; Ge, C.; Zhou, J.; Li, J. Diversity of soil fungi in the vineyards of Changli region in China. *Can. J. Microbiol.* **2022** *68*, 341-352 [DOI: 10.1139/cjm-2021-0337](https://doi.org/10.1139/cjm-2021-0337)
- Yos, J.L.; Hartemink, A.E. Chapter 4 - Soil organic carbon in sandy soils: A review. *In: Advances in Agronomy* **2019** *158*, 217-310 [DOI: 10.1016/bs.agron.2019.07.004](https://doi.org/10.1016/bs.agron.2019.07.004)
- Zhang, X.; Zhan, J.; Qing, Y.; Feng, G.; Zhu, H.H. *Microvirga flavescens* sp. Nov., a novel bacterium isolated from forest soil and emended description of the genus *Microvirga*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2019** *69*, 667-671 [DOI: 10.1099/ijsem.0.003189](https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003189)



## CAPÍTULO 4

### *Análisis de la microbiota fúngica y aislamiento de levaduras de mostos de bodegas de Castilla y León*

#### INTRODUCCIÓN

El sector enológico es económicamente uno de los más importantes en Castilla y León. Tanto la calidad de sus vinos como las ventas internacionales han incrementado durante los últimos años. Se observa una tendencia a la Innovación y a la Diferenciación en el sector basada principalmente en (i) recuperar la biodiversidad de variedades autóctonas de uva, y (ii) emplear levaduras seleccionadas que logren imprimir alguna “huella” distintiva a nuevos vinos para su mejor posicionamiento en el mercado.

Los mayores desafíos en la industria del vino están relacionados con los efectos del cambio climático, que afecta a las uvas y a los vinos ([Xynas & Barnes, 2023](#); [Costa et al., 2023](#)). Los vitivinicultores han de afrontar el incremento de las temperaturas, la sequía, la pluviosidad errática, el retraso o la inmadurez fenólica de las uvas, la baja acidez y los altos niveles de azúcar en el momento de la vendimia, así como la demanda de los consumidores por vinos más diferenciados y bajo contenido alcohólico.

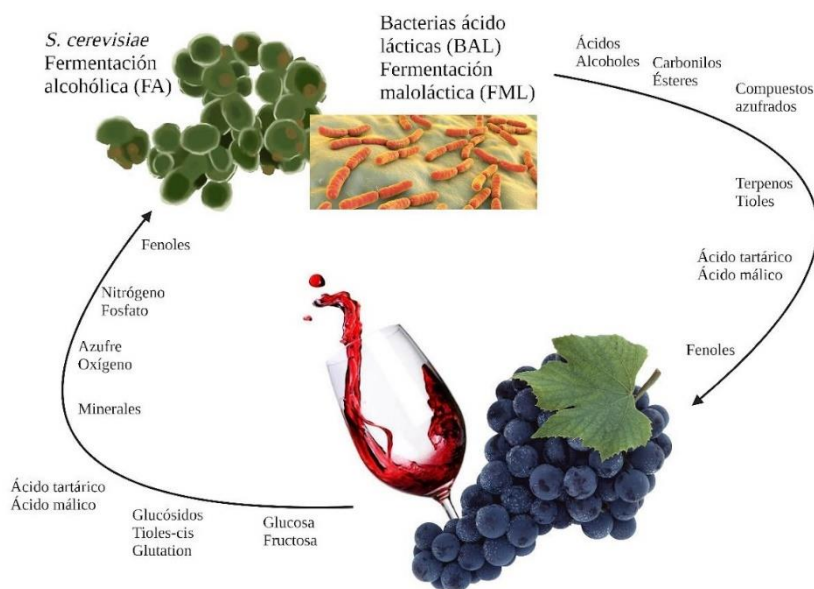
En las cualidades de cada vino influyen la geografía, la topografía y la edafología de los viñedos, la antigüedad de las viñas, las variedades de uva, las levaduras que realizan la fermentación alcohólica y las técnicas enológicas ([Liu et al., 2019](#)).

Hay dos tipos de procesos fermentativos en la obtención de los vinos:

La **fermentación alcohólica (FA)** es un proceso microbiológico que ocurre en ausencia de oxígeno y se produce cuando los microorganismos presentes en los mostos de uva transforman los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, en alcohol y anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>), que protege de la oxidación al vino. Además, ocurren gran cantidad de reacciones metabólicas de las levaduras que dan lugar a numerosos compuestos que aportan al vino muchas cualidades. Para las bodegas es fundamental controlar la temperatura de la FA mientras el mosto sufre su transformación en vino. Dependiendo del tipo de uva y del tipo de vino que se pretenda obtener es necesario trabajar con unos márgenes de temperatura u otros. La fermentación alcohólica dura de 10 a 15 días para vinos blancos y rosados y se realiza entre 14 y 18°C; para tintos jóvenes de 22 a 26°C; y para tintos con crianza en madera de 26 a 30°C. La tecnología actual permite regular automáticamente la FA en depósitos de acero inoxidable, madera u hormigón.

La **fermentación maloláctica (FML)** es un proceso microbiológico por el que el ácido málico se convierte en ácido láctico. Esta transformación bioquímica la efectúan bacterias ácido-lácticas presentes en las frutas y mostos que pueden crecer en un entorno ácido. La pulpa de la uva contiene ácido málico, como la manzana o las cerezas inmaduras y es lo que transmite ese sabor ácido, típico de las manzanas verdes, que se percibe en la punta de la lengua al catar los vinos. La fermentación maloláctica no es exclusiva del vino y también forma parte del proceso de fabricación de la sidra. A través de la FML se regula la acidez del vino ([Vicente et al., 2022](#)), por lo que se considera un proceso fundamental

en la creación de tintos y algunos blancos procedentes de uva excesivamente ácida, en zonas frías o en latitudes muy elevadas. En vinos con mucha acidez la FML es deseable, pues si se controla bien puede aumentar la calidad del vino proporcionándole un sabor característico que “llena la boca”. La FML es deseable e indispensable en la elaboración en vinos tintos de calidad, debido fundamentalmente a la mejora organoléptica que se produce y al aumento de la estabilidad biológica.



**Figura 4.1. De la uva al vino.** El mosto de uva se convierte en vino por la acción de levaduras y bacterias a través de las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Algunos componentes del vino los generan los microorganismos con su metabolismo, mientras que otros son sintetizados a partir de los compuestos de la uva. Así, la calidad y el estilo del vino están determinados por la calidad y cantidad de compuestos producidos o modificados por la microbiota del mosto/vino.

Esquema basado en la Figura 4 de [Cosme et al., \(2016\)](#) generado con el programa [BioRender](#).

### Biodiversidad de levaduras en los mostos de uva

Las levaduras que coexisten e interactúan en los mostos influyen en las propiedades y la tipicidad regional o particular del vino ([Zilelidou & Nisiotou, 2021](#); [Torres-Guardado et al., 2022](#)). La biodiversidad de especies microbianas de los mostos depende, entre otros factores, del clima, las variedades de uva, el grado de madurez de la cosecha, las prácticas agrícolas ([Varela & Borneman, 2017](#)) y los insectos del entorno circundante, que se han descrito como reservorios levaduras en la naturaleza que actúan como vectores hacia los viñedos ([Lamand Howell 2015](#); [Meriggi et al., 2020](#); [Di Paola et al., 2020](#); [Valentini et al., 2022](#)).

Los factores que determinan inicialmente la estructura de las poblaciones de levaduras en los mostos son, entre otros, la osmolaridad derivada de la alta concentración de azúcares (~200-250 g/L de glucosa y fructosa) y el bajo pH (entre 3,2-4). A medida que se desarrolla la FA, el aumento en la concentración de etanol liberado por las levaduras fermentativas determina la sucesión poblacional de las especies, la reducción progresiva de su biodiversidad y la dominancia e imposición de *S. cerevisiae* ([de Celis et al., 2022](#))

Durante las fermentaciones de los mostos se pueden distinguir varias etapas temporales con relación a la sucesión de levaduras (**Figura 4.2**).

1. En la etapa inicial o fase tumultuosa de la FA predominan especies de levaduras de géneros como *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* o *Lachancea* ([Carrau & Henschke, 2021](#); [Vicente et al., 2021](#); [Pedras et al., 2022](#); [Ruíz et al., 2018](#); [Rollero et al., 2018](#); [Vicente et al., 2021](#)). Se trata generalmente de levaduras apiculadas, con forma de limón, que tienen bajo poder fermentativo y soportan hasta 4-5 % de etanol. Esas levaduras aportan sustancias que afectan a las características sensoriales y organolépticas del vino, por lo que han adquirido importancia para incrementar su complejidad aromática ([Padilla et al., 2016](#); [Tufariello et al., 2021](#)). Suelen tener tasas de fermentación lentas y pueden producir ácidos volátiles o/y en algunos casos compuestos indeseables, como el sulfuro de hidrógeno (SH<sub>2</sub>).
2. En la segunda etapa predominan levaduras No todas así que mejor quitarlo de géneros que toleran concentraciones intermedias de etanol (en el rango del 4% al 5%), como *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces* que coexisten con *Saccharomyces* y también influyen en las cualidades del vino ([Albertin et al., 2014](#); [Solieri, 2021](#)).
3. La última etapa suele estar dominada por levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que tolera altas concentraciones de etanol (12%, llegando algunas cepas a tolerar el 13,5-14,5%) y condiciones de bajo pH (2.8-3.0). Esta especie ha desarrollado una estrategia altamente competitiva para eliminar nutrientes clave de los mostos, como aminoácidos y vitaminas en pocas horas ([Alonso-del-Real et al., 2019](#)). Además, *S. cerevisiae* utiliza activamente la vía glucolítica y la FA para excluir a la microflora nativa del mosto no solo produciendo etanol y CO<sub>2</sub>, sino también aumentando la temperatura y produciendo compuestos como ácidos grasos de cadena corta y media, isoácidos o ácidos grasos superiores y alcoholes que pueden inhibir a otras especies de levadura ([Goddard, 2008](#)) (**Figura 4.3**).



**Figura 4.2.** Sucesión de géneros de levaduras durante la fermentación alcohólica de los mostos de uva. Esta imagen se generó con el programa [BioRender](#).

Históricamente, los hongos y entre ellos las levaduras ascomicetas se han aislado como cultivos puros en medios con agar. Sin embargo, la mayoría de las especies son difíciles de aislar en medios de cultivo comunes, por lo que estas técnicas pueden llevar a subestimar la biodiversidad fúngica en las muestras. Los métodos moleculares ofrecen nuevas perspectivas sobre las comunidades microbianas, como la secuenciación de alto rendimiento (*High-Throughput Sequencing*, HTS), que permite realizar un análisis más exhaustivo de la microbiota de una muestra debido a los millones de secuencias que se generan, detectando el ADN de los hongos y levaduras independientemente de la posibilidad de cultivarlos y de su viabilidad. Utilizando las herramientas bioinformáticas adecuadas, esta tecnología permite identificar en muestras ambientales la presencia de cientos o miles de especies, denominadas OTUs (unidades taxonómicas operativas). El éxito del HTS basado en amplicones (metataxonómica) reside en emplear algunos marcadores filogenéticos universales, seleccionados por su presencia ubicua en todos los taxones y con suficiente variación de secuencia entre distintos taxones. La región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADNr 5,8S es el *código de barras* más utilizado para estudiar la biodiversidad fúngica. Los datos que se obtienen con estos procedimientos pueden permitir en algún caso establecer ciertos tipos de correlaciones entre las especies de levaduras (o de otros microorganismos) y las características organolépticas o sensoriales de los vinos de algunas regiones vitivinícolas particulares ([Bokulich et al., 2016](#); [Belda et al., 2020](#); [Pretorius, 2020](#)).

Sin embargo, para seleccionar a partir de mostos de uva cepas de levadura con potencial interés para el desarrollo de nuevos vinos, es siempre necesario recurrir a su aislamiento en medios de cultivo sólidos, con el fin de proceder a la identificación de especies y cepas, con técnicas moleculares y a su posterior caracterización fenotípica y biotecnológica.

## Tendencias en la selección de levaduras para producir vinos innovadores

A) Recientemente se ha observado cierta tendencia a explorar el potencial que pueden tener las fermentaciones espontáneas para elaborar vinos con una personalidad distintiva y una mayor complejidad de notas aromáticas, algunas de las cuales pueden ser aportadas por levaduras de diversas especies presentes en los mostos ([Chen et al., 2022](#)). No obstante, el reto de estas prácticas es lograr la reproducibilidad de los vinos de una añada a otra, por lo que suelen ceñirse solamente a producciones limitadas al vino de una añada, sin arriesgar la producción de grandes cantidades para grandes ventas.

B) Otra tendencia para elaborar vinos innovadores consiste en aislar y seleccionar nuevas y buenas cepas de levaduras fermentativas a partir de los mostos. La etapa final de la FA suele acelerarse con cultivos de levadura seca activa (LSA) del género *Saccharomyces*, que garantiza la reproducibilidad de los distintos lotes de un vino. Sin embargo, el empleo de las mismas levaduras comerciales o de cepas similares uniformiza en cierta medida las propiedades organolépticas y sensoriales de vinos elaborados en bodegas de una misma región, clima y variedad de uva, aspecto que juega en contra de la identidad de un vino.

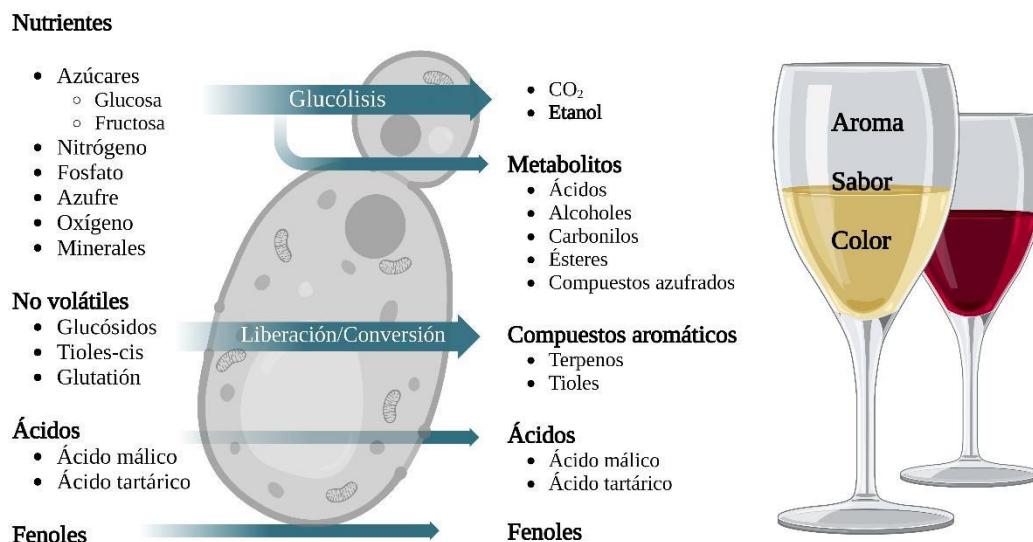
Para facilitar el aislamiento de nuevas cepas de levaduras fermentativas con potencial interés enológico es imprescindible cuidar la microbiota del viñedo ([Liu et al., 2019](#); [Alonso et al., 2019](#)). La viticultura ecológica garantiza mayor biodiversidad microbiana que puede tener impacto positivo en los vinos, pues las levaduras contribuyen a la huella de identidad de cada vino, participan en el efecto *añada* y en el efecto *terroir*. (El término *terroir* es la combinación de al menos cinco factores clave en la elaboración de vinos de calidad: suelo, clima, variedad de uva, microbiota y la acción humana).

Entre las levaduras fermentativas, el interés se centra principalmente en *S. cerevisiae* y otras especies del género *Saccharomyces* que pueden aportar al vino propiedades distintivas (como *S. bayanus*, *S. uvarum*, *S. kudriavzevii*), en el empleo de híbridos naturales o sintéticos prometedores para la innovación en enología y en procesos de evolución adaptativa de cepas ([González & Morales, 2022](#)). También se contemplan otras alternativas para obtener nuevas cepas de *S. cerevisiae* ([Eldarov & Mardanov, 2020](#)).

Para la selección de nuevas cepas de *S. cerevisiae* aptas para el desarrollo de determinados vinos se requieren aplicaciones novedosas ([Minebois et al., 2021](#); [Romano et al., 2022](#)). Esta especie se detecta en uvas dañadas por los insectos y en los equipos o instalaciones de las bodegas, por lo que pueden llegar a los depósitos de fermentación desde los viñedos, o desde la propia bodega y, además, pueden ser dispersadas en sentido inverso hacia el viñedo ([Varela & Bornemann, 2017](#); [Liu et al., 2019](#); [de Celis et al., 2019](#)).

El estudio de las cepas de levadura fermentativas autóctonas de un *terroir* requiere por tanto aislarlas en cultivo, identificar especies y cepas e investigar sus propiedades fisiológicas y tecnológicas. Existen varios criterios de selección, por ciertas propiedades positivas (como la capacidad de crecer en altas concentraciones de azúcares, buen rendimiento en producción de etanol y la tolerancia al mismo) y por no tener propiedades desfavorables (como la producción ácido sulfhídrico, de espuma o acidez volátil). Suelen considerarse como propiedades neutras la degradación del ácido málico ([Redzepovic et al., 2003](#)) o el fenotipo *killer* ([Mannazzu et al., 2019](#)).

En general, para su uso en la fermentación alcohólica es deseable que las cepas de *S. cerevisiae* tengan alta tasa de fermentación de azúcares, baja producción de acético y acetaldehído y una buena producción de glicerol y compuestos volátiles (**Figura 4.3**).

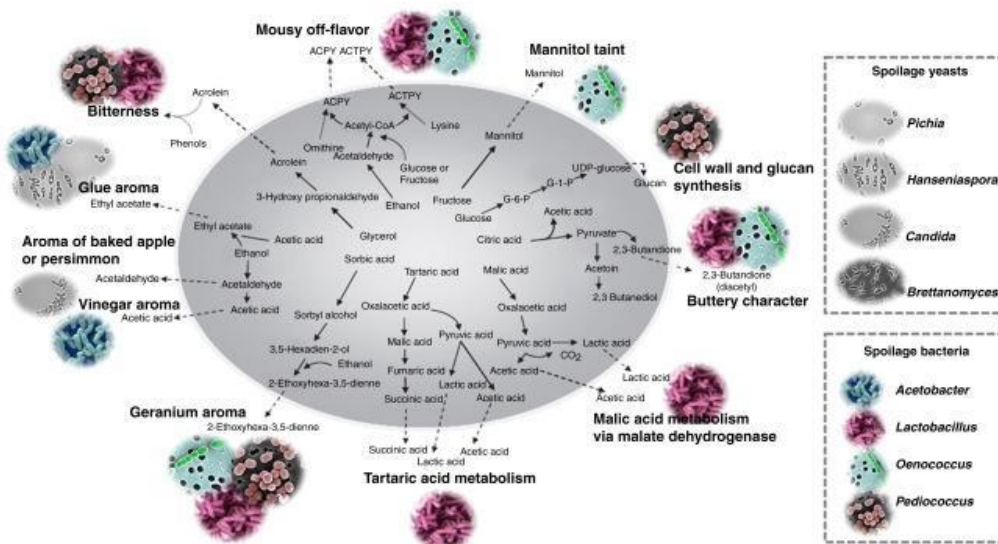


**Figura 4.3.** Producción de compuestos en la fermentación alcohólica y su impacto en el vino. La especie *S. cerevisiae* a través de la glucólisis, realiza la conversión de los azúcares del mosto en etanol y CO<sub>2</sub>, generando metabolitos que influyen en las características del vino. Además, libera o produce la conversión de sustancias no volátiles en más de 400 compuestos aromáticos de los ~1000 detectados en vinos. La naturaleza y concentración de estos productos secundarios viene determinado por las características genéticas y fisiológicas de las distintas cepas. La imagen se generó con el programa [BioRender](#) basada en una de [Defining Spoilage | Midwest Grape and Wine Industry Institute \(iastate.edu\)](#).

C) La percepción sobre las denominadas como levaduras *no Saccharomyces* (NS) ha cambiado en enología ([Drumonde-Neves et al., 2021](#)). Algunos enólogos y bodegueros reconocen el valor de explotar el potencial de las levaduras NS para elaborar vinos innovadores o también la posibilidad de emplear comunidades microbianas más complejas, si creen que esa comunidad o un cultivo mixto reflejan en el vino propiedades de su *terroir*. Entre las levaduras NS de mayor interés se encuentran las de los géneros *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* o *Lachancea* ([Jolly et al., 2014](#); [Padilla et al., 2016](#); [Drumonde-Neves et al., 2021](#)). El metabolismo de estas especies difiere del de *S. cerevisiae*, pueden producir enzimas (esterasas,  $\beta$ -glicosidasas, lipasas, proteasas) que liberan compuestos aromáticos a partir de precursores no aromáticos presentes en las uvas y facilitan las prácticas enológicas ([Jolly et al., 2006](#)). Junto a *Saccharomyces*, las levaduras NS son especies de interés para la innovación enológica ([Morata et al., 2022](#)). Además, el aislamiento y el análisis genético molecular de estas especies ha progresado mucho en los últimos años ([Nisiotou et al., 2022](#)).

D) Se considera a *S. cerevisiae* la principal levadura fermentativa del vino, mientras que levaduras de otras especies distintas juegan un papel menor ya que solo pueden modular el proceso de fermentación alcohólica y/o ciertas propiedades del vino (revisado por [Maicas & Mateo, 2023](#)). Actualmente, enólogos y bodegueros reconocen el valor de combinar algunas especies de levaduras NS con otras del género *Saccharomyces* en fermentaciones mixtas para obtener vinos innovadores. Por ejemplo, en fermentaciones mixtas se han empleado secuencialmente *Torulasporea delbrueckii* y *Saccharomyces* para la FA ([Bely et al., 2008](#); [Belda et al., 2021](#)), para reducir el contenido alcohólico del vino y aprovechar las notas aromáticas que aporta la primera levadura NS ([Renault et al., 2015](#); [González, R., et al., 2021](#); [Jolly et al., 2022](#)).

Tanto las levaduras NS como las bacterias que participan en la fermentación maloláctica pueden aportar cualidades organolépticas y sensoriales deseables en un vino, aunque determinadas especies también pueden causar su deterioro (**Figura 4.4**).



**Figura 4.4.** Rutas metabólicas bacterianas y de levaduras que conducen a la formación de compuestos orgánicos que aportan sabores o aromas al vino y/o las que pueden causar su deterioro. Imagen tomada de [Cosme et al., \(2018\)](#), adaptada de [Bartowsky, E.J., \(2009\)](#).

### Aislamiento e identificación de levaduras

Para aprovechar las capacidades de las levaduras que se encuentran en los mostos se requiere aislarlas en medios de cultivo, identificar las especies y las cepas para analizar después sus características fenotípicas y potencial tecnológico en vinificación.

Para la identificación de las especies y cepas se emplean técnicas de genética molecular sensibles, resolutivas y rápidas que se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR a tiempo final). (i) Para identificar especies se amplifica la región genómica ITS1-5,8S-ITS2 que codifica el ARNr 5,8S (en adelante, 5,8S-ITS), se analiza su tamaño, polimorfismos de restricción y/o se procede a su secuenciación. (ii) Para la discriminación de cepas se amplifica aleatoriamente ADN polimórfico (RAPD) empleando el cebador universal M13 (RAPD-M13); secuencias repetitivas

de microsatélites y minisatélites; y (iii) secuencias LTR (Delta) de retrotransposones *Ty* ([Fernández Espinar et al., 2011](#); [Hutzler et al., 2015](#)).

Las secuencias de ADN de los microsatélites más analizados tienen un tamaño inferior a 10 pb y las de minisatélites de 10-100 pb. Entre los microsatélites están las secuencias (GTG)<sub>5</sub>, (GACA)<sub>4</sub> y la secuencia del Fago de ADN M13 (GAGGGTGGCGGTTCT).

Las secuencias delta son elementos de 330 pb que flanquean a retrotransposones *Ty* de *S. cerevisiae* ([Garfinkel et al., 1989](#); [Legras & Karst, 2003](#)). Estas regiones repetidas directas recombinan entre sí con alta frecuencia, de modo que pueden encontrarse dispersas por el genoma, denominándose *elementos delta*. Su número y posición en el genoma son específicos de cepa y los *patrones interdelta* son estables al menos ~50 generaciones. En el genoma de *S. cerevisiae* hay 5 familias de *Ty* y contienen unos 50 sitios activos para la potencial translocación del transposón completo, y pueden dar lugar a unos a ~300 elementos delta independientes que corresponden marcas de eventos de inserción antiguos y a procesos de recombinación que escinden las secuencias internas del transposón. Los elementos delta están concentrados en regiones genómicas contiguas a genes de los ARN de transferencia (ARNt) ([Eigel & Feldmann, 1982](#)). La variabilidad intraespecífica debida al número y localización de dichos elementos permitió diseñar oligonucleótidos específicos ( $\delta 1$  y  $\delta 2$ ) para su amplificación por PCR que permite discriminar entre cepas de *S. cerevisiae* ([Legras & Karst, 2003](#)).

También se suelen emplear otras técnicas para caracterizar especies y distinguir algunas cepas de levaduras vínicas, como el análisis de cromosomas por electroforesis en campo pulsado ([Muñoz-Bernal et al., 2013](#)) y el análisis de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos restricción (RFLP) del genoma mitocondrial ([Castrejón et al., 2002](#)).

## OBJETIVOS

El **Objetivo General del Capítulo 4** fue investigar las especies de levaduras en mostos de 2021 proporcionados por bodegas representativas de cuatro Denominaciones de Origen de Castilla y León (Arribes, Ribera del Duero, Rueda y Toro).

Los **Objetivos Específicos** fueron dos:

1. Aislar en cultivo levaduras de los mostos nativos y de muestras fermentadas espontáneamente, para identificar las especies y tratar de seleccionar cepas nuevas que puedan aportar un Servicio de Aprovisionamiento Ecosistémico en la obtención de vinos.
2. Explorar la microbiota fúngica de los mostos y determinar si se aislaron en cultivo las especies de levadura de mayor interés enológico.



## METODOLOGÍA

### 1. Medios de cultivo

Se emplearon tres medios de cultivo para aislar o cultivar levaduras cuya composición se describe a continuación. Todos los medios se esterilizaron en autoclave y los azúcares se filtraron para añadirlos al resto de los componentes del medio.

a) Para aislar levaduras se usó ADC (Agar Dextrosa Sabouraud con Cloranfenicol, cas. 100918, Merck). Las peptonas y la glucosa del medio promueven el crecimiento de levaduras y el cloranfenicol, un antibiótico de amplio espectro estable al calor, inhibe el crecimiento de especies bacterianas. Las placas se incubaron a 30°C durante unas 48 horas.

b) Para el crecimiento de levaduras tras su aislamiento, se utilizó YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), medio rico no selectivo (1% extracto de levadura, 2% bactopectona (DIFCO), 2% glucosa), añadiendo agar al 2% en el caso del medio sólido. Los cultivos líquidos se incubaron hasta fase exponencial y las placas se incubaron a 30°C durante unas 48 horas.

c) El medio Agar-Lisina (AL) favorece el crecimiento de levaduras silvestres apiculadas, presentes en mostos sin fermentar o al inicio de la FA ([Beuchat, 1993](#)). El medio deshidratado comercial AL contiene todos los oligoelementos y vitaminas necesarias, y lleva 0,03 mg/L del aminoácido lisina como fuente de nitrógeno. Se disuelven 66 g del medio comercial en 1 litro de agua destilada con 10 ml de lactato potásico al 50%, y se lleva a ebullición, se deja enfriar a 50°C y se añade 1 ml de ácido láctico. Las levaduras apiculadas se cultivaron en placa a 22°C durante unos 3-5 días.

### 2. Aislamiento de levaduras de mostos sin fermentar y fermentados

Se aislaron levaduras a partir de muestras de mostos frescos de la añada 2021 procedentes de cuatro bodegas representativas de las cuatro Denominaciones de Origen (D.O.) objeto de estudio: Arribes (bodega Hacienda Zorita), Ribera del Duero (bodega Martín Berdugo), Rueda (Bodega Ramón Bilbao) y Toro (bodega Mazas). Los mostos procedían de tres viñedos homogéneos (D.O. Arribes, Ribera del Duero y Toro) y un viñedo heterogéneo (D.O. Toro), todos ellos parte del estudio llevado a cabo en el Capítulo 2. La toma de muestras se llevó a cabo inmediatamente después de la vendimia para evitar el comienzo de la fermentación espontánea de los mostos. Las muestras se recogieron en tubos estériles que se mantuvieron refrigerados hasta su procesamiento.

No sólo se realizó el aislamiento de levaduras a partir de mostos sin fermentar, sino que para emular la fase tumultuosa de la fermentación alcohólica se llevaron a cabo microfermentaciones espontáneas de los mostos en el laboratorio, a 28°C durante ~5 días, para analizar qué especies se iban seleccionando al aumentar el grado alcohólico. Las muestras de mosto fermentado se recogieron diariamente durante 5 días.

Para el aislamiento de levaduras de mostos antes y después de la microfermentación espontánea se utilizaron los medios ADC y AL, en los que se sembraron diluciones seriadas de cada muestra ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) para aislar colonias que, generalmente,

proviene de una sola célula. Se aislaron 10 colonias de levadura de cada tipo de medio y de cada una de las fases de la FA. Las células de cada colonia se observaron al microscopio y se seleccionaron solo aquellas con morfología celular levaduriforme. Las células se sembraron por *agotamiento en estría* en cada uno de los medios empleados para obtener colonias independientes. Las placas se incubaron a 28°C durante 2-5 días y las placas se mantuvieron refrigeradas a 4°C. Clones puros aislados de esas placas se cultivaron como un césped en placas independientes de medio YEPD que se incubaron a 28°C entre 24 y 48 horas. Las células se recogieron para conservarlas en glicerol al 25% en viales criogénicos a -80°C como stock permanente de células viables.

### 3. Identificación de las especies de levadura aisladas en cultivo

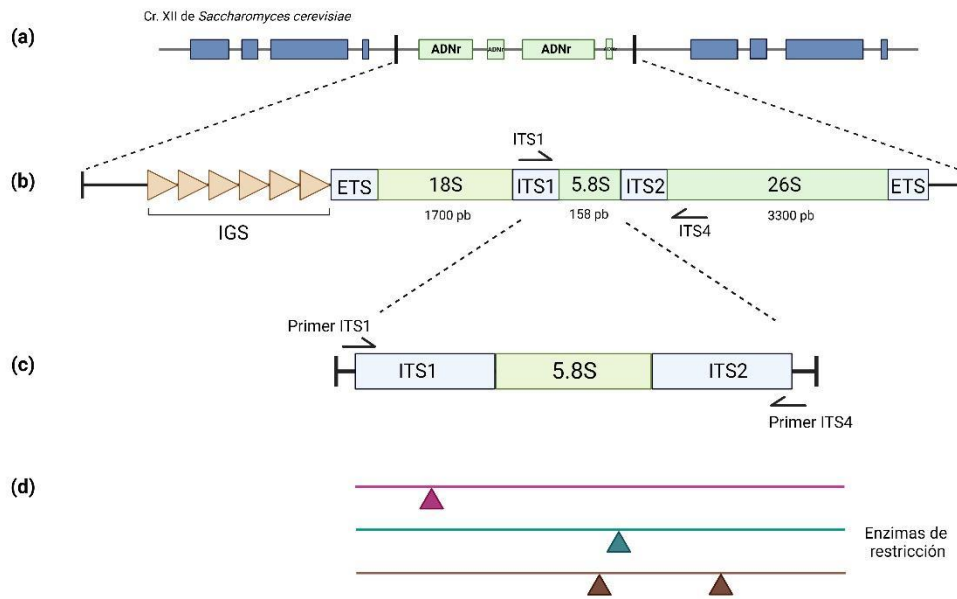
Para aprovechar el potencial de las levaduras autóctonas de un *terroir* a escala industrial se requiere aislarlas en cultivo, identificar las especies y cepas y para analizar posteriormente sus características fenotípicas y biotecnológicas. Las especies y cepas de levadura aisladas en medios de cultivo se identificaron con técnicas de genética molecular basadas en la amplificación por PCR y el análisis de secuencias específicas de ADN.

El ADN genómico de las levaduras aisladas se purificó siguiendo el protocolo de [Querol et al. \(1992\)](#) con ligeras modificaciones. A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento en medio YEPD líquido a 28°C, se centrifugaron las células de levadura 2 minutos a 10000 rpm y, se descartó el medio de cultivo. Las células se lavaron dos veces con agua destilada y se añadió al precipitado celular 500 µl del Tampón 1 (0.9M sorbitol, 0.1M EDTA, pH=7) y 200 unidades (en adelante, U) de la enzima zimoliasa (6000U) y se incubó la reacción 37°C ~20 minutos. Al precipitado de la segunda centrifugación se le añadieron 500 µl de solución Tampón 2 (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH=7.4) y 13 µl de detergente SDS. Los tubos se incubaron a 65°C durante 5 minutos, se añadieron 200 µl de acetato de potasio 5M a la reacción y se introdujeron los tubos en hielo. Tras una centrifugación en frío, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo para la precipitación del ADN con isopropanol. Finalmente, el ADN limpio y seco se resuspendió en 40 µl de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) y se almacenó a 4°C.

#### 3.1. Identificación de especies de levadura a través del 5,8S-ITS ribosómico

Esta técnica permite identificar las especies de levadura ([Esteve-Zarzoso et al., 1999](#)). Se amplifica por PCR y se analiza la región genómica **ITS1-5.8S-ITS2** que codifica el 5,8S ARNr en microorganismos eucariotas, levaduras y hongos (en adelante, **5,8S-ITS**), (**Figura 4.5**).

Para la amplificación de secuencias del 5,8S-ITS se emplearon como cebadores de PCR oligonucleótidos de cadena sencilla de una longitud de 20 desoxirribonucleótidos y complementarios en secuencia a los extremos de las regiones a amplificar ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') ([Guillamón et al., 1998](#); [Esteve-Zarzoso et al., 1999](#)).



**Figura 4.5.** (a) Esquema gráfico de la región genómica de 9,1 kilobases (Kb) que codifica los ARN ribosómicos (ARNr) en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta región poligénica está repetida en tándem de 150-200 veces en el brazo derecho del cromosoma XII de cepas de esa especie de levadura; (b) Esquema de una de esas regiones poligénicas que codifican los tres ARN, el 18S, el 5.8S y el 26S; (c) Región amplificada por PCR para identificar las especies de levadura aisladas en medios de cultivo: ITS1 (de 360 pb en *S. cerevisiae*) e ITS2 (de 231 pb en *S. cerevisiae*) son los espaciadores internos (*Internal Transcribed Spacer*) no transcritos, es decir, que no codifican ningún ARN, son altamente variables en su secuencia nucleotídica y flanquean al ARN 5,8S (las secuencias ETS son los *External Transcribed Spacer*); (d) Análisis de los polimorfismos en el tamaño de fragmentos (RFLP) que se generan con varias enzimas de restricción específicas al digerir la región genómica ITS1-5.8S-ITS2 amplificada por PCR, de las distintas especies de levadura. Esta imagen se generó con [BioRender](#).

Las secuencias del 5,8S-ITS se amplificaron por PCR a partir de 10 µl de ADN genómico de una concentración de ~50 ng/µl. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo 5 µl de tampón comercial 10x PCR, 2,5 µl de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), 200 µM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) 1 µM de cada uno de dos oligonucleótidos (ITS1 e ITS4) y 2.5 U de *Taq* ADN-polimerasa (ThermoScientific). Las reacciones de PCR a tiempo final se realizaron en un Termociclador (Applied Biosystems SimpliAmp A24811). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial del ADN genómico a 95°C durante 10 minutos, 25 ciclos de amplificación por la ADN polimerasa durante 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 2 minutos a 72°C, la extensión final se llevó a cabo durante 7 minutos a 72°C.

Los tamaños del 5,8S-ITS se analizaron por electroforesis horizontal a voltaje constante ~1 hora, en geles de agarosa al 1% en tampón de TAE con bromuro de etidio (0,5 µl/ml). Como marcador de tamaño molecular se utilizó GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder

(ThermoScientific), con un rango de fragmentos marcadores de 100 a 3000 pb y el gel se fotografió con un equipo Gel Doc 2000 (Bio Rad Systems).

**El tamaño en pares de bases del 5,8S-ITS** permite en algunos casos identificar la especie de levadura (<https://www.yeast-id.org/>). No obstante, para verificar la identidad de cada especie se utilizan otras dos aproximaciones:

### **3.1.1. Identificación por polimorfismos de restricción del 5,8S-ITS**

El ADN del 5,8S-ITS (~45 ng) se digirió con 5U de las enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* (Thermo Scientific) a 37°C ~2 horas. Los fragmentos de restricción generados varían entre las distintas especies de levadura, debido a la existencia de mutaciones que generan polimorfismos en las regiones transcritas y no codificantes ITS1 e ITS2 del 5,8S-ITS. Los fragmentos generados se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% y se compararon con los depositados en la base de datos pública [yeast-id](https://www.yeast-id.org/) para identificar especies cuando es posible en función de ese criterio. En caso de no ser posible, se procede a la secuenciación del ADN amplificado.

### **3.1.2. Identificación por secuenciación del 5.8S-ITS**

Cuando las especies de levadura no se lograron identificar por los polimorfismos que generan el ITS1 e ITS2, el producto de PCR del 5,8S-ITS completo se purificó mediante un kit PCR clean-up Gel extraction NucleoSpin (Macherey-Nagel). El ADN se cuantificó a 260 nm en un aparato NanoDrop. Se le añadieron a una cantidad de ~150 nanogramos de ADN purificado, 3 picomoles (pM) de los oligonucleótidos ITS1 e ITS4. La secuenciación se realizó en el servicio *Nucleus* de la Universidad de Salamanca. Las secuencias se alinearon y compararon con bases de datos mediante la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA).

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## **4. Discriminación intraespecífica de cepas de levadura**

Para la discriminación intraespecífica de cepas de levadura, se usan otras técnicas de tipificación molecular también basadas en la PCR.

### **4.1. Polimorfismo del ADN aleatoriamente amplificado (RAPD M13)**

Esta técnica consiste en amplificar al azar secuencias del ADN genómico empleando un único oligonucleótido corto M13 (5'-GAAACAGCTATGACCATG-3'). A una temperatura de hibridación baja (35-39°C), el cebador se une aleatoriamente a sitios distribuidos en diversas regiones del genoma, permitiendo amplificar fragmentos de ADN polimórficos de longitud variable. Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis. El RAPD permite obtener “huellas digitales” o diferencias en el número y el tamaño de los fragmentos del ADN amplificado, que son específicas de especies e incluso a veces de cepa ([Orbera-Ratón, 2004](#)).

Para los RAPD M13, la amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl que contenía 5 µl de ADN genómico de concentración ~50 ng/µl, 5 µl de tampón 10xPCR, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1

$\mu\text{M}$  del cebador específico M13 y 2.5U de *Taq* polimerasa (ThermoScientific). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos, 35 ciclos durante 1 minuto a  $95^{\circ}\text{C}$ , 1 minuto a  $37^{\circ}\text{C}$  y 2 minutos a  $72^{\circ}\text{C}$ , la extensión final fue a  $72^{\circ}\text{C}$  10 minutos.

#### 4.2. Análisis de microsatélites y minisatélites genómicos

Esta técnica consiste en amplificar por PCR secuencias simples repetitivas del genoma menores de 10 pb (microsatélites) y de entre 10 y 100 pb (minisatélites).

**4.2.1. Microsatélites M13.** La PCR se realizó como se describe en 4.1 para los RAPD M13, excepto que la temperatura de hibridación del cebador con el ADN fue de  $55^{\circ}\text{C}$ , por lo que se amplifican zonas del genoma más específicas que en el RAPD M13 a  $37^{\circ}\text{C}$  y la reproducibilidad de los polimorfismos es mayor (Orbera-Ratón, 2004).

**4.2.2. Otros microsatélites.** Se analizaron cuatro microsatélites para la discriminación entre cepas de *S. cerevisiae*, pues se verificó experimentalmente que eran los más resolutivos para levaduras vínicas (Tabla 4.1) (Legras et al., 2005).

La PCR se realizó en un volumen final 25  $\mu\text{l}$  empleando  $\sim 250$  ng de ADN genómico de las levaduras, 2,5  $\mu\text{l}$  de tampón 10x PCR, 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,5  $\mu\text{M}$  de los correspondientes oligonucleótidos (Tabla 4.1), 200  $\mu\text{M}$  de cada uno de los dNTPs y 1,25 U de *Taq* polimerasa (ThermoScientific). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  4 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a  $94^{\circ}\text{C}$ , 30 segundos a  $50^{\circ}\text{C}$  y 1 minuto a  $72^{\circ}\text{C}$ , la extensión final se llevó a cabo a  $72^{\circ}\text{C}$  10 minutos.

**Tabla 4.1.** Microsatélites y sus loci genómicos en *S. cerevisiae*

Microsatélite	Motivo	LOCI/ ORF	Oligonucleótidos para la PCR
SCAAT1	TTA	XIII-86902/87140	F: 5'-AAAGCGTAAGCAATGGTGTAGATACTT-3' R: 5'-CAAGCCTCTTCAAGCATGACCTTT-3'
SCYOR267c	TGT	YOR267c	F: 5'-TACTAACGTCAACACTGCTGCCAA-3' R: 5'-GGATCTACTTGCAGTATAACGGG-3'
C5	GT	VI-210250/210414	F: 5'-TGACACAATAGCAATGGCCTTCA-3' R: 5'-GCAAGCGACTAGAACACAATCACA-3'
YPL009c	CTT	YPL009c	F: 5'-AACCATTGACCTcGTTACTATCGT-3' R: 5'-TTCGATGGCTCTGATAACTccATTC-3'

Los oligonucleótidos denominados Forward (F) y Reverse (R) (F: sentido y R: antisentido), hibridan con cada una de las dos cadenas del ADN para la amplificación de secuencias específicas por la *Taq* polimerasa en el sentido 5'-3'.

**4.2.3. Minisatélites.** Se analizaron minisatélites ubicados en las regiones codificantes de los genes de *S. cerevisiae* *AGA1* y *SEDI* ([Marinangeli et al., 2004](#); [Boveri et al., 2012](#)). Algunas cepas de *S. cerevisiae* se caracterizan por su variación alélica en esos loci, dando lugar a polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción tras ser amplificados por PCR, generando huellas genéticas características.

Se emplearon como cebadores de PCR dos oligonucleótidos complementarios a cada una de las dos cadenas del ADN genómico para amplificar los minisatélites:

*SEDI*-F (5'-ATGAAATTATCAACTGTCCTATTATCTGCCGG-3')

*SEDI*-R (5'-TTATAAGAATAACATAGCAACAcCAGCCAAACC-3')

*AGA1*-F (5'-GTGACGATAACCAAGAcAAACGATGCAA-3')

*AGA1*-R (5'-CCGTTTCATGCATACTGgTTAATGTGCT-3')

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de ADN genómico a una concentración de ~250 ng, 2,5  $\mu$ l de Buffer 10xPCR, 1,25  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 1  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2.5U de *Taq* polimerasa (ThermoScientific). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C 3 minutos, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 64°C y 2 minutos a 72°C, la extensión final se llevó a cabo a 72°C 7 minutos y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% ~1 hora.

El producto de PCR del gen *AGA1* se digirió con la enzima de restricción *AluI* y el del gen *SEDI* con la enzima *HpaII*. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 25  $\mu$ l, con ~10  $\mu$ l del producto de PCR, 2,5  $\mu$ l de Buffer 10X y 0,5 U de enzima. La digestión se llevó a cabo a 37°C ~3h y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

## 5. Distinción de cepas *Saccharomyces* por secuencias interdelta

Las secuencias delta ( $\delta$ ) son elementos de ~330 pb que flanquean los retrotransposones *Ty* de *S. cerevisiae* ([Cameron et al., 1979](#); [Garfinkel et al., 1989](#); [Legras & Karst, 2003](#)). La variabilidad intraespecífica debida al número y localización de los elementos  $\delta$  permite discriminar entre cepas iguales y diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

La amplificación por PCR de secuencias  $\delta$  se realizó utilizando como cebadores los oligonucleótidos  $\delta$ 12 (5'-TCA ACA ATG GAA TCC CAA-3') y  $\delta$ 21 (5'-CAT CTT ACC GTA TAT GA-3') ([Legras & Karst, 2003](#)). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de ADN genómico a una concentración de ~250 ng, 5  $\mu$ l de tampón 10xPCR, 2,5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada cebador, 200  $\mu$ M de cada deoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) y 2.5U de la *Taq* ADN polimerasa (ThermoScientific). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C 4 minutos, 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 46°C 30 segundos y a 72°C 90 segundos, la extensión final se llevó a cabo a 72°C 10 minutos. A partir de este momento el producto de la reacción se mantuvo refrigerado a 4°C. Las regiones amplificadas se analizaron por electroforesis como ya se ha descrito en el apartado 3.1.

## 6. Análisis de la microbiota fúngica de mostos sin fermentar (micobioma)

Se enviaron muestras de los 4 mostos sin fermentar a Biome Makers (Valladolid, España) para analizar la microbiota fúngica de un mosto de uva blanca (de la bodega de la DO Rueda) y tres mostos de uva tinta (de las bodegas de las DO de Arribes, Ribera y Toro).

El protocolo utilizado se describe en [Belda et al. \(2017\)](#). La extracción de ADN genómico (ADNg) de las muestras de mostos se realizó con un kit Dneasy Powerlyzer powersoil kit (Qiagen) y las genotecas se prepararon amplificando un fragmento de la región ITS1 con cebadores de BiomeMakers (Patente WO2017096385). Se generó una media de 150.000 lecturas por muestra mediante ultrasecuenciación 2 x 301 pb de cada extremo apareado, con la plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Para validar el procedimiento se utiliza una muestra de agua Milli-Q esterilizada (en lugar de ADNg) como control negativo de la extracción de ADN y la amplificación en la PCR posterior. Además, se utiliza ADNg de una levadura como control positivo. Las reacciones de PCR posteriores no mostraron amplificación en los controles negativos, mientras que en el control positivo se obtuvo el amplicón de 360 pb para el ITS1 del control positivo. Ambos controles, positivo y negativo, se incluyeron en la mezcla de muestra y se secuenciaron en cada ejecución de Miseq.

Las secuencias en bruto se analizaron con Vsearch. Las secuencias FASTq se fusionaron, se filtraron con un error del 0.25 y se ordenan por tamaño. Se filtraron las secuencias restantes para identificar las OTU (*Operational Taxonomic Unit*, en español Unidad Taxonómica Operativa) con una identidad del 97% considerando en los análisis posteriores solo los grupos con al menos dos secuencias. Las secuencias combinadas de los OTU con al menos un 97% de identidad se recogieron en una tabla con las secuencias de OTU cuantificadas por cada muestra biológica. Las OTU se clasificaron empleando la base de datos SILVA 123 mediante el protocolo SILVA-NGS.

## RESULTADOS

### 1. Levaduras aisladas de mostos y mostos fermentados en laboratorio

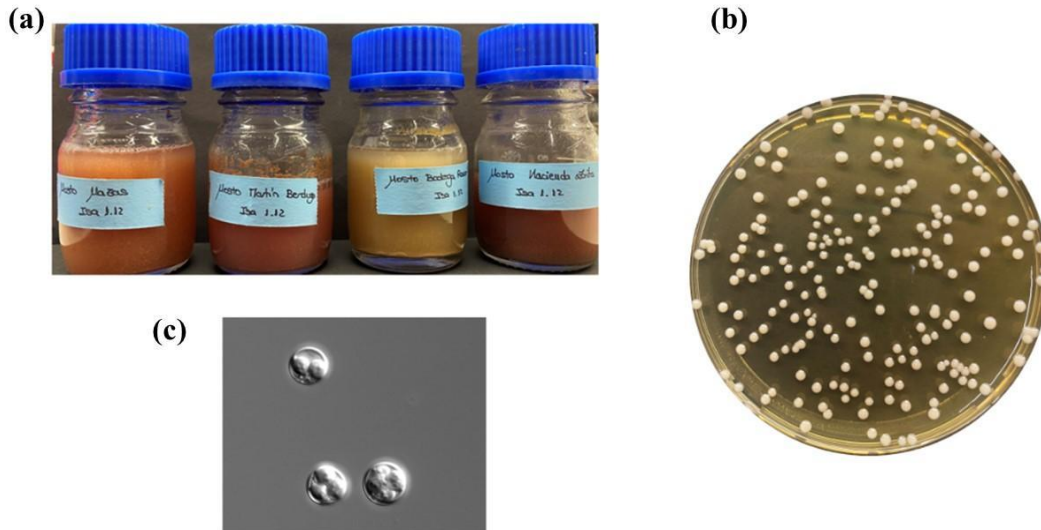
Para la toma de muestras y el aislamiento de levaduras, se utilizó como material de partida mosto recién cosechado, así como muestras obtenidas durante la fermentación espontánea de los mostos en el laboratorio (1-3 y 5 días). Se seleccionaron 46 colonias a partir de placas de ADC y AL sembradas con diluciones seriadas, correspondientes a colonias con diversos colores, apariencia y con una morfología celular levaduriforme observable al microscopio de contraste de fases.

Los aislados de levadura y sus códigos se indican en la **Tabla 4.2**.

**Tabla 4.2.** Aislados de levadura en medios de cultivo sólidos.

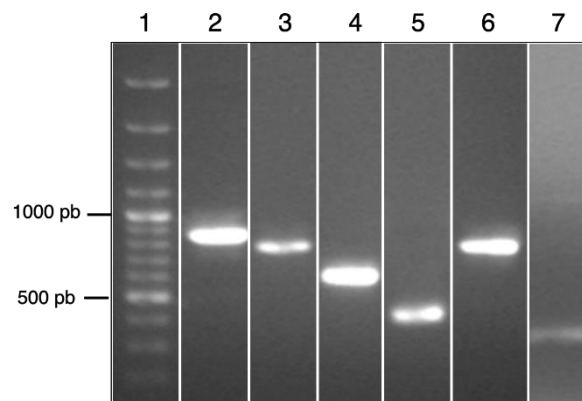
REFERENCIA AISLADO	PROCEDENCIA
<b>MOSTOS SIN FERMENTAR (SF)</b>	
SFA1000, SFA1004	Arribes
SFRi1001, SFRi1002; SFRi1005	Ribera del Duero
SFRu1003, SFRu1009	Rueda
SFTo1011	Toro
<b>FASE TUMULTUOSA (FT)</b>	
FTA2005, FTA2010, FTA2012, FTA2017, FTA2019, FTA2021, FTA2024, FTA2026; FTA2031	Arribes
FTRi2003, FTRi2006, FTRi2009, FTRi2011, FTRi2013, FTRi2018, FTRi2023, FTRi2027, FTRi2029, FTRi2030	Ribera del Duero
FTRu2000, FTRu2004, FTRu2008, FTRu2014, FTRu2020, FTRu2025	Rueda
FTTo2001, FTTo2002, FTTo2007, FTTo2015, FTTo2016, FTTo2022, FTTo2028	Toro
<b>FASE FINAL (FF)</b>	
FFA3001	Arribes
FFRi3002, FFRi3004	Ribera del Duero
FFRu3000, FFRu3003	Rueda
FFT03005	Toro





**Figura 4.6.** (a) Imagen de frascos con los cuatro mostos fermentados espontáneamente a 28°C durante 5 días en el laboratorio; (b) Aspecto de las colonias de una levadura de la especie *S. cerevisiae* cultivadas en una placa de ADC a 28°C durante ~48h; (c) Ascas meióticas conteniendo 4 ascosporas producidas por un aislado de la especie *S. cerevisiae* fotografiadas al microscopio de contraste de fase (Leica DMRXA 2) a 630 aumentos tras 3 días de crecimiento en placas de acetato de potasio (1%  $C_2H_3O_2K$ , 0,1% extracto de levadura, 0,05% glucosa, 2% agar) a 28°C, cuando se produce una deficiencia de nitrógeno que induce la esporulación meiótica ([Jakubowski & Goldman, 1988](#)).

Para identificar las especies de levadura correspondientes a cada aislado, se amplificó por PCR el 5,8S-ITS del ADN. Los espaciadores internos ITS1 e ITS2 que flanquean al gen del 5,8S ARN varían en secuencia y longitud entre distintas especies. Así, la electroforesis de los fragmentos amplificados del 5,8S-ITS completo permitió distinguir 6 tamaños: ~850pb, ~800pb, ~750pb, ~650pb, ~450pb y ~400pb (**Figura 4.7**).



**Figura 4.7.** Fragmentos de ADN del 5,8S-ITS (1: Marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 2-7: aislados de levaduras de las tres fases de fermentación)

Las levaduras cuyos 5,8S-ITS tienen un tamaño de ~650pb y ~450pb proceden de mostos sin fermentar (SF); las de ~750pb proceden tanto de mostos sin fermentar como de mostos en la posible fase tumultuosa de la fermentación alcohólica (FT) (1-3 días); las de ~400pb y ~800pb corresponden a aislados de esa misma fase (FT); y las de ~850pb a aislados de

mostos fermentados 5 días, posible fase final de la fermentación alcohólica (FF) (**Tabla 4.3**).

**Tabla 4.3.** Especies de levaduras identificadas por el tamaño en pares de bases del 5.8S-ITS

AISLADO	PATRÓN	TAMAÑO 5,8S-ITS	ESPECIE
FFA3001; FFRi3002; FFRi3004; FFRu3000; FFRU3003; FFTo3005	A	~850pb	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FTA2017; FTA2021; FTA2031; FTRi2003; FTRi2018; FTRi2029; FTRi2030; FTRu2014; FTTTo2015; FTTTo2016; FTTTo2022	B	~800pb	<i>Dekkera anomala</i>
SFA1000; SFRi1001; SFRu1009; FTA2005; FTA2019; FTA2024; FTRi2006; FTRi2011; FTRi2027; FTRu2000; FTRu2020; FTTTo2007; FTTTo2028	C	~750pb	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
SFA1004; SFRi1005; SFRu1003; SFTTo1011	D	~650pb	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
SFRi1002	E	~450pb	<i>Metschnikowia citriensis</i>
FTA2010; FTA2012; FTA2026; FTRi2009; FTRi2013; FTRi2023; FTRu2004; FTRu2008; FTRu2025; FTTTo2001; FTTTo2002	F	~400pb	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>

Con relación al tamaño del 5,8S-ITS, las 46 levaduras aisladas se pueden clasificar en 6 grupos:

Un grupo de **6 levaduras** aisladas de las microfermentaciones de los mostos a los 5 días (cepas FFA3001; FFRi3002; FFRi3004; FFRu3000; FFRU3003; FFTo3005) que tienen un ITS de ~850 pares de bases (**patrón A**), pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 4.7**, carril 2).

Un grupo de **13 levaduras** aisladas de mostos sin fermentar (cepas SFA1000; SFRi1001; SFRu1009) y de los de 1-3 días de fermentación (cepas FTA2005; FTA2019; FTA2024; FTRi2006; FTRi2011; FTRi2027; FTRu2000; FTRu2020; FTRu2025; FTTTo2007; FTTTo2028) que tienen un ITS de ~750 pb (**patrón B**), son de la especie *Hanseniaspora uvarum* (**Figura 4.7**, carril 3).

Un grupo de **4 levaduras** aisladas de mostos sin fermentar (cepas SFA1004; SFRi1005; SFRu1003; SFTTo1011) que tienen un ITS de ~650 pb (**patrón D**) son de la especie *Wickerhamomyces anomalus* (**Figura 4.7**, carril 4).

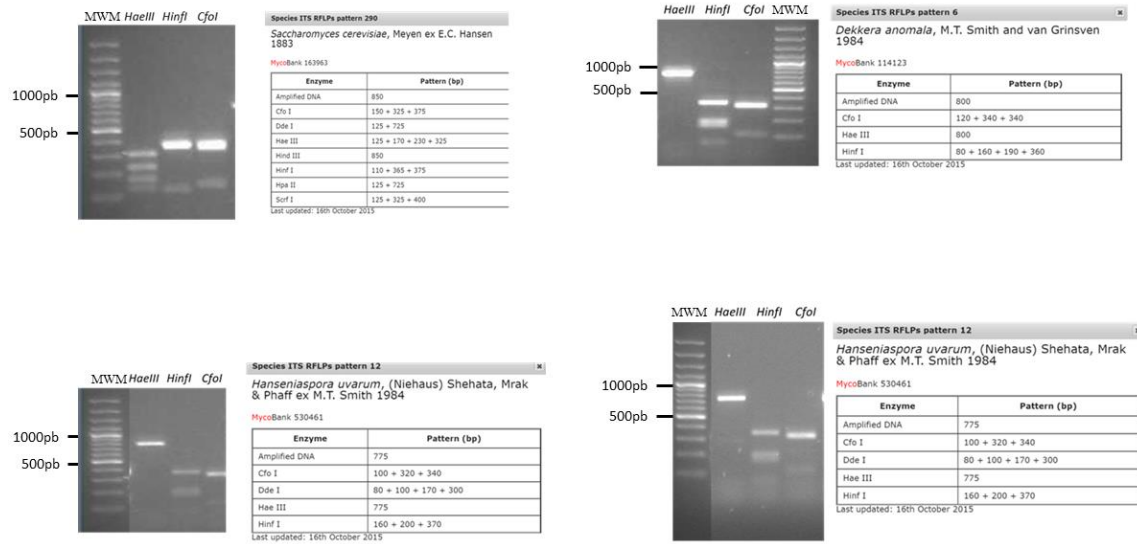
Una **única levadura** aislada de mosto sin fermentar de Ribera de Duero (SFRi1002) que tiene un ITS de ~450 pb (**patrón E**), es de la especie *Metschnikowia citriensis* (**Figura 4.7**, carril 5).

Un grupo de **11 levaduras** aisladas de microfermentaciones de mostos a los 1-3 días (cepas FTA2017; FTA2021; FTA2031; FTRi2003; FTRi2018; FTRi2029; FTRi2030;

FTRu2014; FTTto2015; FTTto2016; FTTto2022) que tienen un ITS de ~800 pb (**patrón B**), son de la especie *Dekkera anomala/Brettanomyces bruxellensis* (**Figura 4.7**, carril 6).

Otro grupo de **11 levaduras** aisladas también de las microfermentaciones de mostos a los 1-3 días (cepas FTA2010; FTA2012; FTA2026; FTRi2009; FTRi2013; FTRi2023; FTRu2004; FTRu2008; FTRu2025; FTTto2001; FTTto2002) que tienen un ITS de ~400 pb (**patrón F**), son de la especie *Metschnikowia pulcherrima* (**Figura 4.7**, carril 7).

Los tamaños de los fragmentos generados por la digestión del producto de PCR 5,8S-ITS con las enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI*, *CfoI* (apartado 3 de Metodología) se compararon con los datos depositados en la base de datos para levaduras [yeast-id](#) (**Figura 4.8**). Se secuenciaron los 5,8S-ITS de ~700pb y ~400pb porque el análisis de restricción no permitió identificar la especie de levadura.



**Figura 4.8.** Fragmentos de restricción generados por digestión con varias enzimas de restricción de los productos de PCR 5,8S-ITS, cuyos tamaños y patrones se indican en la Tabla 4.3 con relación a los depositados en la base de datos [yeast-id](#) (tablas a la derecha de las electroforesis en geles de agarosa)

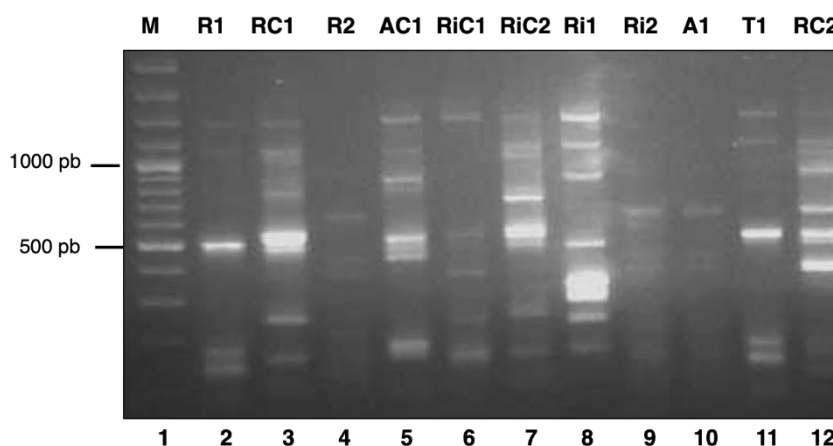
En este trabajo, se realizaron varios tipos de pruebas moleculares de 6 levaduras de la especie *S. cerevisiae* aisladas de cuatro mostos, en paralelo con el de 5 cepas vínicas comerciales que se usan en las cuatro bodegas cuyos mostos se analizaron (**Tabla 4.4**).

**Tabla 4.4.** Aislados de *S. cerevisiae* y cepas comerciales de cada bodega

<b>AISLADOS (Código)</b>	<b>Procedencia D.O.</b>	<b>Numeración Figuras 4.9 – 4.13</b>
FTRi2013 ( <b>Ri1</b> )	Ribera del Duero	8
FTRu2008 ( <b>R1</b> )	Rueda	2
FFA3010 ( <b>A1</b> )	Arribes	10
FFRi3002 ( <b>Ri2</b> )	Ribera del Duero	9
FFRu300 ( <b>R2</b> )	Rueda	4
FFTo3008 ( <b>T1</b> )	Toro	11
<b>COMERCIALES</b>		
F14 ( <b>AC1</b> )	Arribes	5
Vinicom ( <b>RiC1</b> )	Ribera del Duero	6
Oenocom ( <b>RiC2</b> )	Ribera del Duero	7
RBcom ( <b>RC1</b> )	Rueda	3
Shcom ( <b>RC2</b> )	Rueda	12

En primer lugar, se analizaron los polimorfismos que genera la amplificación por PCR de secuencias  $\delta$ , para discriminar si eran diferentes las levaduras *S. cerevisiae* aisladas de los mostos, entre ellas y de las cepas comerciales. Los resultados de la amplificación de secuencias  $\delta$  se muestran en la **Figura 4.9**.

### Secuencias $\delta$

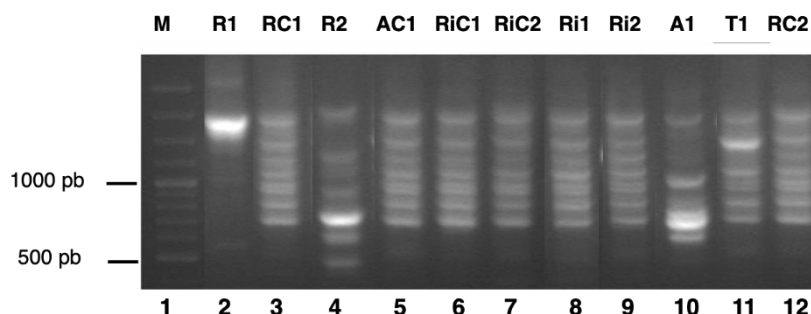


**Figura 4.9.** Análisis de secuencias  $\delta$  de levaduras *S. cerevisiae*. Marcador (M) de tamaño molecular (1); levaduras aisladas de mostos (2, 4, 8, 9, 10 y 11); cepas vónicas comerciales (3, 5, 6, 7 y 12), (ver Tabla 4.4).

Los resultados indican que algunas levaduras *S. cerevisiae* aisladas de los mostos serían distintas de las cepas comerciales que se utilizan en las bodegas. Este sería el caso de la cepas R1 (2) y R2 (4) aisladas de mosto de Rueda respecto a las cepas comerciales de bodega RC1(3) y RC2 (12); el de las levaduras aisladas de Ribera de Duero Ri1 (8) y Ri2 (9) respecto a las dos comerciales de esa bodega, RiC1 (6) 7 RiC2 (7); y el de A1 aislada de Arribes (10), respecto a la cepa comercial de la bodega AC1 (5). Sin embargo, los patrones  $\delta$  de las levaduras A1 de Arribes, Ri2 de Ribera de Duero y R2 de Rueda parecen muy similares entre sí o las diferencias son indistinguibles.

Otro criterio para distinguir entre cepas de *S. cerevisiae* es obtener los patrones de RAPD, amplificación aleatoria por PCR a 37°C empleando el oligonucleótido M13 (Materiales y Métodos 4.1), análisis que se muestra en la **Figura 4.10**.

### RAPD-M13



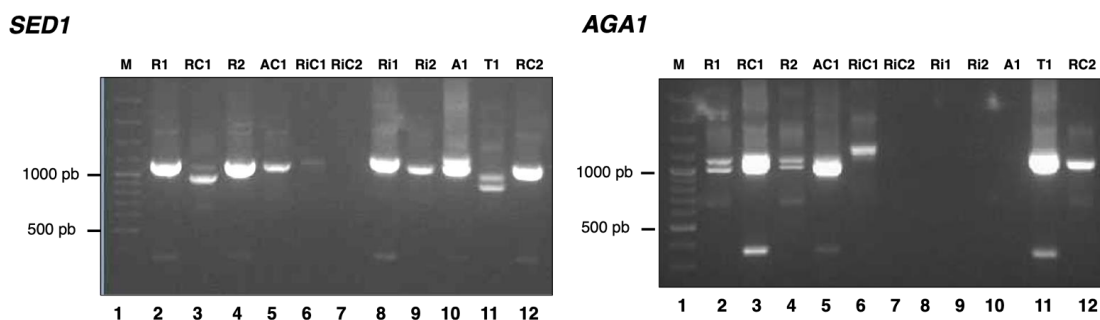
**Figura 4.10.** Análisis RAPD M13 de levaduras *S. cerevisiae*. Marcador (M) de tamaño molecular (1); levaduras aisladas de mostos (2, 4 8, 9, 10 y 11); cepas vónicas comerciales (3, 5, 6, 7 y 12), (ver Tabla 4.4 para la descripción y origen de cada levadura).

Los patrones de huella genética RAPD M13 a 37°C no fueron demasiado resolutivos para diferenciar entre las levaduras aisladas y las comerciales vónicas. Así, el perfil RAPD de las dos levaduras de Rueda, R1 (2) y R2 (4) indicaría que son distintas entre ellas. Las aisladas de Ribera Ri1 (8) y Ri2 (9) tienen el mismo patrón de bandas RAPD,

indistinguible de los de las otras levaduras aisladas, como AC1 (5) y las demás levaduras vínicas comerciales (3, 6, 7, 8, 9 y 12). Sin embargo, los patrones RAPD de las levaduras A1(10) de Arribes y T1 (11) de Toro son diferentes entre ellas y de todas las demás.

A continuación, se analizaron los minisatélites ubicados en los genes *SEDI* y *AGAI* de *S. cerevisiae* y los resultados se muestran en la **Figura 4.11**.

### Minisatélites

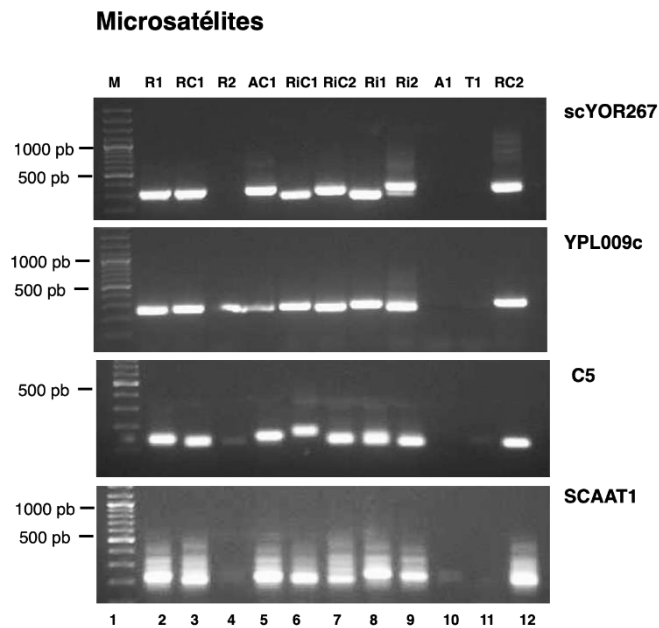


**Figura 4.11.** Análisis de los minisatélites de los genes *SEDI* y *AGAI* de levaduras *S. cerevisiae*. Marcador (M) de tamaño molecular (1); levaduras aisladas de mostos (2, 4, 8, 9, 10 y 11); cepas vínicas comerciales (3, 5, 6, 7 y 12), (ver Tabla 4.4).

Para los minisatélites de *SEDI*, los patrones de bandas de las levaduras R1(2) y R2 (4) aisladas de Rueda parecen iguales, pero distintos de los de la cepa vínica comercial RC1 (3), cuyo patrón es similar al de la RC2 (12). Los patrones de minisatélites *SEDI* de las levaduras Ri1(9) y Ri2 (10) aisladas de Ribera de Duero parecen algo diferentes, pero no se puede dirimir si son distintos de los patrones de las cepas comerciales RiC1 (6) o de RiC2 (7) al ser muy tenue la banda que se observa. La levadura A1 (10) de Arribes y la T1(11) de Toro tienen patrones *SEDI* que parecen ser diferentes de los de las demás levaduras y de las vínicas comerciales.

Para los mini satélites de *AGAI*, los patrones de bandas de las levaduras R1 (2) y R2 (4) aisladas de Rueda serían también iguales, distintos de los de la vínica RC1(2) y que también es distinto del de la comercial RC2 (12). Los mini satélites *AGAI* de las levaduras de Ribera y de una de las comerciales no se amplificaron bien, solo RiC1 (6) es visible y su patrón de banda es diferente de las demás levaduras en el gel. Los minisatélites de la levadura A1 (10) aislada de Arribes no se amplificaron y la levadura de Toro T1 (11) da un patrón que parece similar al de la comercial de Rueda RC1 (3).

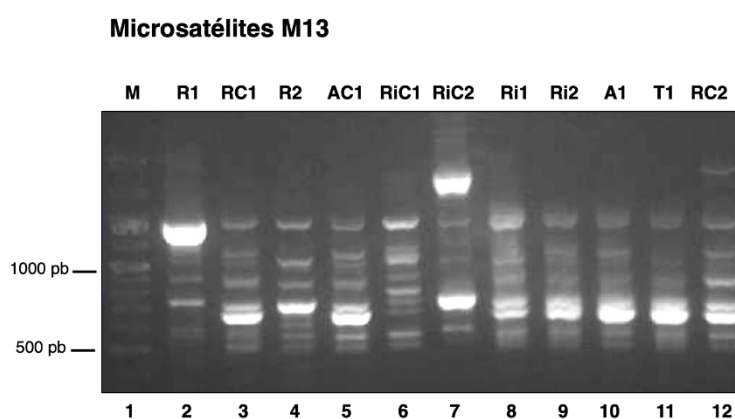
El análisis de 4 de los microsatélites que más se emplean en enología ([Legras et al., 2005](#)) se muestra en la **Figura 4.12**.



**Figura 4.12.** Amplificación por PCR de los microsatélites scYOR267, YPL009c, C5 y SCAAT1 de distintas levaduras *S. cerevisiae*. Marcador (M) de tamaño molecular (1); levaduras aisladas de mostos (2, 4, 8, 9, 10 y 11); cepas vónicas comerciales (3, 5, 6, 7 y 12), (ver Tabla 4.4).

El análisis de los 4 microsatélites scYOR267, YPL009c, C5 y SCAAT1 indica que las levaduras R1 (2), RC1 (3) y RC2 (12) dan bandas que parecen de igual tamaño. El patrón de Ri1 (8) parece similar a los de la cepa vónica comercial RiC1(6), excepto para el microsatélite C5 de RiC1. La levadura aislada de Ribera de Duero Ri2 (9) parece similar para los 4 microsatélites a la comercial RIC2 (7) y los de las levaduras A1(10) y T1 (11) no se lograron amplificar.

El análisis de microsatélites RAPD-M13 amplificados por PCR a 55°C se muestra en la **Figura 4.13**.



**Figura 4.13.** Análisis de microsatélites M13 (PCR a 55°C) de levaduras *S. cerevisiae*. Marcador (M) de tamaño molecular (1); levaduras aisladas de mostos (3, 8, 9, 10 y 11) y cepas comerciales (3, 5, 6, 7, 12). (Véase Tabla 4.4).

El análisis de microsatélites RAPD M13 a 55°C indica que la levadura aislada de Rueda R1(2) es distinta de la R2 (4) y parece que de las comerciales RC1 (3) y RC2 (12), las cuales parecen más similares entre ellas y, en parte, a R2. Los patrones RAPD de Ri1 (8) y Ri2(9) parecen iguales o muy similares, pero distintos de los de las vónicas comerciales RiC1 (6) y RiC2 (7). Sin embargo, los patrones de las levaduras comerciales AC1 (5) y RC1 (3), parecen casi idénticos y lo mismo ocurre con los de Ri1, Ri2, A1 y T1 para este tipo de marcador, por lo que se generan dudas sobre la resolución de este análisis para discriminar entre cepas diferentes.

En resumen, el análisis conjunto de los marcadores moleculares que fueron más resolutivos sugiere que al menos 4 levaduras aisladas de los mostos son distintas entre ellas y de las vónicas comerciales. Así, las levaduras aisladas de Rueda FTRu2008 (R1) y FFRu300 (R2), de Ribera de Duero FTRi2013 (Ri1) y probablemente la levadura de Toro FFTo3008 (T1) son distintas de las cepas comerciales suministradas por cada bodega y podrían ser cepas nuevas (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.5.** Semejanzas y diferencias entre aislados de levaduras y las cepas comerciales de bodegas basados en los marcadores moleculares que fueron más resolutivos. **D:** indica distintos patrones con respecto a todas las demás levaduras de una columna, aisladas o vónicas. **El sombreado gris:** indica patrón igual o similar entre esas cepas solo para ese marcador en la columna. **Sombreado en color:** marca dos cepas distintas entre ellas dos, pero iguales cada una a la cepa vónica del mismo color

Levaduras <i>S. cerevisiae</i>	D.O	Delta $\delta$	M13 55°C	SEDI	AGAI	scYOR267c	C5
<b>R1</b> FTRu2008	Rueda	D	D	D	D		D
<b>R2</b> FFRu300	Rueda	D	D	D	D	-	
<b>RC1</b> RBcom	Rueda	D			D		D
<b>RC2</b> Shcom	Rueda	D			D	--	--
<b>Ri1</b> FTRi2013	Ribera	D	D	(?)	--	D*	
<b>Ri2</b> FFRi3002	Ribera	D	D	(?)	--	D	
<b>RiC1</b> Vinicom	Ribera	D	D	--		D*	D
<b>RiC2</b> Oenocom	Ribera	D	D	--		D	
<b>A1</b> FA3010	Arribes	D		D	--	--	--
<b>AC1</b> F14	Arribes	D	D	D	--	--	--
<b>T1</b> FFTo3008	Toro	D		D		--	--



## 2. Análisis metataxonómico de la microbiota fúngica de los mostos

Se analizaron los mostos sin fermentar de las cuatro bodegas mediante una técnica independiente de cultivo basada en la amplificación y ultra secuenciación de alto rendimiento del ITS1 del 5,8S ARNr (Metodología, apartado 3). La abundancia relativa de especies de hongos y levaduras detectadas se recoge en la **Tabla 4.6**.

**Tabla 4.6.** Biodiversidad de especies microbianas identificadas en los micobiomas de mostos sin fermentar de las 4 bodegas objeto de estudio (\*presencia no significativa, <0,1%; \*\*ausencia de esa especie).

Especie	Arribes	Ribera	Rueda	Toro
<i>Alternaria chlamyospora</i>	*	0,29	*	0,11
<i>Alternaria eichhorniae</i>	1,89	5,23	2,52	9,80
<i>Alternaria infectoria</i>	0,13	0,38	0,40	0,55
<i>Alternaria sp.</i>	0,62	0,96	1,48	2,52
<i>Amanita phalloides</i>	*	0,15	*	*
<i>Arachnomyces pilosus</i>	0,10	1,12	0,19	0,44
<i>Aspergillus carbonarius</i>	**	**	0,10	**
<i>Aspergillus deflectus</i>	0,34	3,17	0,66	1,18
<i>Aspergillus flavus</i>	0,13	1,22	0,23	0,45
<i>Aspergillus fumigatus</i>	*	0,12	*	*
<i>Aspergillus melleus</i>	*	0,84	0,16	0,24
<i>Aspergillus niger</i>	*	0,44	0,53	0,13
<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>	*	0,23	*	*
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,55	5,26	1,00	1,74
<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	*	0,31	*	0,14
<i>Aspergillus ruber</i>	0,11	1,01	0,23	0,36
<i>Aspergillus rugulosus</i>	*	0,50	0,13	0,22
<i>Aspergillus sp.</i>	*	0,46	0,87	0,12
<i>Aspergillus terreus</i>	*	0,33	*	0,11
<i>Aureobasidium pullulans</i>	13,99	11,98	7,78	20,33
<i>Aureobasidium sp.</i>	0,63	0,57	0,31	0,90
<i>Beauveria bassiana</i>	*	0,12	*	*
<i>Botrytis cinerea</i>	25,35	0,95	0,69	13,28
<i>Botrytis sp.</i>	*	**	**	0,12
<i>Candida railenensis</i>	**	**	0,72	**

<i>Capnodium sp.</i>	*	0,11	**	*
<i>Chaetomium sp.</i>	*	0,14	*	*
<i>Chrysosporium lobatum</i>	*	0,72	0,18	0,25
<i>Chrysosporium pseudomerdarium</i>	*	0,37	*	0,24
<i>Cistella sp.</i>	*	0,10	*	*
<i>Cladophialophora chaetospora</i>	*	0,23	*	*
<i>Cladophialophora sp.</i>	*	0,14	*	**
<i>Cladosporium herbarum</i>	15,13	6,47	8,00	14,40
<i>Cladosporium sp.</i>	0,19	*	0,11	*
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	*	0,12	*	*
<i>Cortinarius belleri</i>	**	0,16	*	*
<i>Cortinarius trivialis</i>	0,42	7,50	0,93	2,40
<i>Curvibasidium cygneicollum</i>	0,26	**	**	*
<i>Curvibasidium sp.</i>	0,74	*	*	0,14
<i>Curvularia spicifera</i>	*	0,60	0,12	0,26
<i>Cystofilobasidium capitatum</i>	0,27	**	**	**
<i>Cystofilobasidium macerans</i>	*	0,31	0,18	0,19
<i>Debaryomyces hansenii</i>	**	**	0,70	*
<i>Didymella exigua</i>	0,43	1,50	0,81	1,15
<i>Didymella pinodes</i>	**	0,11	**	*
<i>Diplodia sp.</i>	0,10	*	**	1,15
<i>Erysiphe necator</i>	0,16	*	4,26	0,19
<i>Exophiala equina</i>	*	0,12	*	*
<i>Filobasidium chernovii</i>	0,38	0,13	0,48	0,20
<i>Filobasidium floriforme</i>	*	*	**	0,12
<i>Filobasidium magnum</i>	*	*	0,15	0,48
<i>Filobasidium oeirense</i>	*	**	0,12	*
<i>Filobasidium sp.</i>	0,18	*	**	0,38
<i>Filobasidium wieringae</i>	0,95	**	0,21	*
<i>Foliophoma fallens</i>	0,26	**	**	**
<i>Fusarium delphinoides</i>	*	0,90	0,17	0,36
<i>Fusarium equiseti</i>	*	0,23	*	0,11
<i>Fusarium proliferatum</i>	*	0,46	0,11	0,20
<i>Fusarium pseudensiforme</i>	0,26	2,96	0,48	0,96

<i>Fusarium sp.</i>	*	0,20	*	*
<i>Gibellulopsis sp.</i>	*	0,20	*	*
<i>Hannaella luteola</i>	*	0,11	*	*
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	0,42	**	27,53	**
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	1,28	0,10	0,12	*
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	**	0,81	**	**
<i>Hormonema viticola</i>	*	*	0,15	**
<i>Humicola nigrescens</i>	*	0,12	*	**
<i>Humicola olivacea</i>	*	0,13	*	*
<i>Hymenoscyphus varicosporoides</i>	*	0,20	*	*
<i>Knufia sp.</i>	**	0,12	*	*
<i>Lachancea thermotolerans</i>	0,27	**	**	**
<i>Lepiota sp.</i>	*	0,16	*	*
<i>Lysurus cruciatus</i>	**	**	0,11	**
<i>Mortierella alpina</i>	0,34	4,66	0,68	1,49
<i>Mortierella amoeboides</i>	**	*	**	0,10
<i>Mortierella capitata</i>	*	0,36	*	0,13
<i>Mortierella exigua</i>	*	0,12	*	*
<i>Mortierella fatshederae</i>	*	0,21	*	*
<i>Mortierella gamsii</i>	*	0,75	0,11	0,23
<i>Mortierella globulifera</i>	*	0,23	*	*
<i>Mortierella hyalina</i>	*	0,90	0,13	0,33
<i>Mortierella minutissima</i>	*	0,59	0,10	0,17
<i>Mortierella rishiksha</i>	*	0,22	*	0,24
<i>Mortierella saronyensis</i>	*	0,20	*	0,10
<i>Mortierella sclerotiella</i>	*	0,43	*	0,15
<i>Mortierella sp.</i>	0,38	5,08	0,76	1,65
<i>Mycosphaerella dianthi</i>	0,18	0,13	0,24	0,20
<i>Naganishia albida</i>	*	*	0,14	0,13
<i>Nakazawaea ishiwadae</i>	**	**	4,88	**
<i>Naumovozyma castellii</i>	**	0,13	**	*
<i>Neosetophoma lunariae</i>	*	*	0,19	1,10
<i>Oidiodendron maius</i>	*	0,33	*	*
<i>Oidiodendron setiferum</i>	*	0,24	*	*

<i>Oidiodendron sp.</i>	*	0,11	*	*
<i>Panaeolina foenicisii</i>	*	0,11	*	*
<i>Papiliotrema laurentii</i>	*	0,24	*	*
<i>Parasola lilatincta</i>	*	0,10	*	*
<i>Penicillium brevicompactum</i>	0,13	*	0,65	0,55
<i>Penicillium corylophilum</i>	**	*	0,17	*
<i>Penicillium echinulatum</i>	*	0,40	*	0,12
<i>Penicillium expansum</i>	0,42	*	0,68	*
<i>Penicillium glabrum</i>	*	0,58	0,25	5,74
<i>Penicillium herquei</i>	*	0,47	*	0,14
<i>Penicillium levitum</i>	*	0,69	0,11	0,20
<i>Penicillium melinii</i>	*	0,50	*	0,11
<i>Penicillium oxalicum</i>	*	0,10	*	*
<i>Penicillium parviverrucosum</i>	*	0,16	*	*
<i>Penicillium pimateouiense</i>	*	0,13	*	*
<i>Penicillium psychrosexualis</i>	*	**	0,73	**
<i>Penicillium roseopurpureum</i>	*	0,24	*	*
<i>Penicillium simplicissimum</i>	*	0,57	0,10	0,14
<i>Penicillium sp.</i>	*	0,64	*	0,19
<i>Penicillium spinulosum</i>	*	*	0,10	0,20
<i>Phallus impudicus</i>	*	0,36	*	0,23
<i>Phallus rugulosus</i>	*	0,21	*	0,11
<i>Phoma sp.</i>	*	0,20	*	0,61
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	**	**	0,13	0,17
<i>Plectosphaerella oratosquillae</i>	*	0,56	**	**
<i>Pseudeurotium sp.</i>	*	0,24	*	0,14
<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	*	0,66	0,11	0,21
<i>Pyrenochaetopsis decipiens</i>	*	0,12	*	*
<i>Pyrenochaetopsis leptospora</i>	*	0,42	0,14	0,18
<i>Rhizopus oryzae</i>	*	0,61	*	0,14
<i>Rhodsporidiobolus colostri</i>	0,12	**	*	**
<i>Russula chloroides</i>	*	0,10	*	*
<i>Russula sp.</i>	*	0,10	*	*
<i>Saccharomyces bayanus</i>	**	**	18,14	**

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3,46	**	0,15	**
<i>Saccharomyces sp.</i>	**	**	1,61	**
<i>Saitozyma podzolica</i>	*	0,51	0,10	0,25
<i>Solicoccozyma aerea</i>	0,10	1,24	0,22	0,45
<i>Solicoccozyma terrea</i>	0,10	1,26	0,21	0,55
<i>Solicoccozyma terricola</i>	*	0,33	*	0,10
<i>Sporobolomyces roseus</i>	0,16	0,22	*	0,42
<i>Stemphylium vesicarium</i>	0,40	0,38	0,41	0,64
<i>Talaromyces marneffeii</i>	*	0,23	*	*
<i>Tausonia pullulans</i>	*	0,17	*	*
<i>Tetracladium sp.</i>	0,10	1,26	0,26	0,42
<i>Thelephora castanea</i>	**	0,10	*	*
<i>Tomentella sp.</i>	*	0,13	*	*
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	21,63	**	0,22	**
<i>Trichoderma asperellum</i>	*	0,32	*	0,10
<i>Trichosporiella cerebriiformis</i>	*	0,22	*	*
<i>Umbelopsis sp.</i>	*	0,23	*	0,10
<i>Umbelopsis vinacea</i>	*	0,73	0,18	0,44
<i>Vishniacozyma taibaiensis</i>	*	0,12	*	*
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0,17	*	*	*
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2,67	**	0,18	**

Sombreadas en naranja, las especies de levadura relevantes en enología

Se detectó la presencia en los mostos de hongos y levaduras, principalmente la de algunas especies con una abundancia relativa mayor o igual del 0,1%, que corresponden a 193 especies de levaduras en el mosto de Arribes, 197 en el de Toro, 218 en el de Rueda y 267 en el de Ribera del Duero. De ellas, 23 especies de levaduras y hongos aparecen en los mostos de las cuatro bodegas con un porcentaje mayor del 0,1%.

Se detectó mediante este análisis la presencia de cuatro especies de levaduras beneficiosas en los mostos de las bodegas de Arribes y Rueda (*Saccharomyces sp.*, *Hanseniaspora sp.*, *Torulaspora delbrueckii*, *Nakazawaea ishiwadae*). Estas especies suelen detectarse en distintas fases la fermentación alcohólica y pueden aportar cualidades organolépticas diferenciadoras a los vinos ([Ruiz et al., 2019](#); [Vallejo et al., 2020](#); [González & Morales, 2022](#))

Además, se identificaron especies fúngicas que podrían promover el crecimiento vegetal o actuar potencialmente como agentes de control biológico (*Aureobasidium pullulans*, o *Mortierella sp.*), aunque también se detectaron especies fitopatógenas (como *Botrytis cinerea* o *Didymella*).

## DISCUSIÓN

### 1. Respecto al aislamiento de levaduras en medios de cultivo

La mayor biodiversidad de levaduras no-*Saccharomyces* se encuentra en mostos sin fermentar y en la fase tumultuosa, mientras que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se pudieron aislar tanto al final de la fase tumultuosa como tras 5 días de fermentación alcohólica. Estos resultados se parecen a los obtenidos por otros autores ([Jeyaram et al., 2008](#); [Filho et al., 2017](#); [Lin et al., 2020](#); [Corbu & Csutak, 2022](#)). Usando tres medios de cultivo, se pudieron aislar 6 especies de levaduras. Entre las descritas en la literatura que aparecen al comienzo de la fermentación de los mostos están *Cryptococcus* y *Rhodotorula*, especies que no se han detectado en nuestros mostos. Sin embargo, géneros como *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspota*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* o *Starmerella* entre otros, son capaces de sobrevivir más tiempo y dominar las primeras fases de la fermentación y sí se aislaron en cultivo ([González & Morales, 2022](#)). De hecho, pudimos aislar también cepas de *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia citriensis* y *Metschnikowia pulcherrima* (las dos últimas, no se detectaron en el análisis metataxonómico).

Solo una fracción de la microbiota asociada a un nicho ecológico es cultivable en medios de laboratorio rutinarios. Si se quiere aislar el mayor número de especies posibles de microorganismos de cualquier nicho ecológico es necesario emplear al menos un abanico amplio de medios de cultivo y condiciones de crecimiento, que no se ha realizado en este trabajo ([Martins et al., 2022](#)).

Un estudio de los fenotipos de interés tecnológico de las distintas levaduras aisladas puede ser útil para considerar su posible uso en enología, puesto que se conocen beneficios asociados a cepas de estas especies. *Metschnikowia pulcherrima* ha sido ampliamente utilizada para la producción de aromas distintivos en los vinos y como agente de control biológico en viñedos ([González & Morales, 2022](#)). *Hanseniaspora* al igual que *Metschnikowia*, suele producir mayores niveles de ésteres y otros componentes aromáticos ([Bisson & Karpel, 2010](#); [Tello et al., 2011](#); [Pretorius, 2020](#)). En cuanto a *Wickerhamomyces anomalus*, se ha descrito que puede producir glicosidasas como las  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\alpha$ -L-ramnosidasa y  $\beta$ -D-xilosidasa, las cuales están involucradas en la liberación de compuestos aromáticos ([Padilla et al., 2018](#)).

Numerosas bodegas utilizan levaduras vínicas comerciales que permiten iniciar o finalizar la fermentación alcohólica eficientemente asegurando la sostenibilidad y reproducibilidad de los vinos. Sin embargo, el uso extendido de las mismas cepas comerciales puede afectar a la diversidad genética de las poblaciones de levaduras autóctonas ([Pinto et al., 2015](#); [Eldarov & Mardanov, 2020](#); [Chalvantzi et al., 2020](#)).

En este estudio utilizamos un total de 8 parejas de oligonucleótidos de cadena sencilla de ADN para realizar pruebas moleculares que permitieron distinguir entre cepas de *S. cerevisiae* aisladas de las distintas Denominaciones de Origen. En total se identificaron 6 cepas distintas que se podrán caracterizar en un futuro para determinar si aportan caracteres diferenciadores (aroma, variación del nivel de glicerol y/o etanol, etc.) a vinos experimentales. También se deberá analizar la posibilidad para producirlas en la industria en función de su estabilidad genómica, la capacidad de producir biomasa, sus respuestas a estrés oxidativo ([Pérez-Torrado et al., 2009](#); [Matallana & Aranda, 2017](#)) y otros

biomarcadores de interés que pueden aconsejar su producción como levadura seca activa ([Gamero-Sandemetrio et al., 2014](#)).

## 2. Respecto al análisis del microbioma de los mostos

Dada la concienciación actual de los consumidores hacia los problemas que plantea el desarrollo sostenible y la demanda de vinos de *terroir*, los vinos naturales de viñedos ecológicos brindan oportunidades para el futuro desarrollo de la industria del vino. Los microbiomas son parte integral de la viticultura y la elaboración del vino, en los que diversos microorganismos pueden ejercer efectos positivos y negativos sobre la uva y la calidad del vino. Las comunidades de microorganismos asociados a cada viñedo juegan un papel importante en la productividad del suelo y la resistencia a enfermedades propias de la vid. El vino es un producto natural fermentado y el viñedo sirve como punto de entrada para la microbiota moduladora de su calidad, particularmente en fermentaciones que se llevan a cabo sin añadir levaduras exógenas. Por todo ello, las fuentes y la persistencia de la microbiota relevante para el vino en los viñedos tienen un impacto crítico en su calidad y pueden ser afectados por las prácticas de cultivo ([Grigs et al., 2021](#); [Wei et al., 2022](#); [Ding et al., 2023](#)).

No todas las levaduras identificadas en los cuatro mostos sin fermentar se aislaron en cultivo. De las 6 especies que se identificaron, únicamente *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora uvarum*, *S. cerevisiae* y *Nakazawaea ishiwadae* aparecen con una abundancia relativa superior al 0,1% en mostos de Arribes y Rueda, y, no se detectan en los mostos de Ribera y Toro. La presencia de *W. anomalus* sería beneficiosa puesto que puede tener dependiendo de la cepa, efectos positivos en el perfil aromático de los vinos además de ser capaz de inhibir algunas levaduras deterioradoras del vino como *Brettanomyces bruxellensis* ([Comitini et al., 2020](#); [Li et al., 2022](#)). Además, cabe resaltar la presencia de *N. ishiwadae* puesto que se trata de una levadura no convencional que se ha descrito que puede tolerar altas tasas de alcohol (15%) y es capaz de aumentar los compuestos aromáticos en vinos, por lo que se le considera un co-cultivo prometedor ([Ruiz et al., 2019](#); [van Wyk et al., 2020](#)).

En los cuatro mostos se detectó la presencia de hongos, que no se aislaron ni identificaron, ya que solo se seleccionaron colonias cuyas células tenían morfología levaduriforme. Entre ellos se encuentran *Aureobasidium pullulans* y *Mortierella*. *A. pullulans* se encuentra a veces en las primeras fases de la FA ([Kamilari et al., 2021](#)) y se ha utilizado en viticultura orgánica como agente de control biológico autorizado. En el caso de la levadura que si se ha aislado en cultivo, *Meyerozyma guilliermondii* algunas cepas son activas frente a distintas especies del género *Penicillium*, *Colletotrichum acutatum* o *Botrytis cinerea*, entre otros ([Wang et al., 2018](#); [Moura et al., 2021](#); [Iqbal et al., 2023](#)) mientras que algunas especies de *Mortierella* se ha comprobado que poseen eficacia para combatir a distintas especies de nematodos como *Meloidogyne chitwoodi* además de aportar beneficios a la vid al descomponer polisacáridos en el suelo ([DiLegge et al., 2019](#); [Yan et al., 2022](#)).

En mostos de Ribera y Toro cabe resaltar la presencia de *Phoma* sp., capaz de producir potentes metabolitos secundarios antimicrobianos que pueden tener potencial como nuevos biopesticidas contra otros patógenos fúngicos ([Kernaghan et al., 2017](#)).

En muestras de mostos procedentes de Arribes y Rueda destaca la presencia de la especie fermentativa *S. cerevisiae*. Además, en los mostos de Rueda aparece con alta abundancia relativa *Saccharomyces bayanus*, especie que tiene buenas prestaciones fermentativas, elevada resistencia al etanol y aporta algunas propiedades organolépticas relevantes, asegurando la fermentación alcohólica y convirtiéndose la cepa, en caso de aislarse, en una candidata interesante para ser utilizada como *starter* (Muñoz-Bernal *et al.*, 2012; Pérez-Través *et al.*, 2014)

Por otro lado, se detectaron especies alterantes del vino en los mostos de las distintas bodegas. Las especies con mayor abundancia relativa pertenecían a géneros que causan podredumbres (*Botrytis cinerea* y *Cladosporium herbarum*) que se detectaron en los mostos de Arribes y Toro con una mayor abundancia relativa y, por tanto, podrían causar pérdidas económicas en el sector (Briceño & Latorre, 2007; Chen *et al.*, 2023; Bi *et al.*, 2023). Además, encontramos *Alternaria infectoria*, endófito patógeno de la vid que produce una micotoxina peligrosa que puede llegar al vino, no obstante, su abundancia relativa en las cuatro bodegas no supera el 1% (Tronchoni *et al.*, 2022).

## REFERENCIAS

- Albertin, W.; Chasseriaud, L.; Comte, G.; Panfili, A.; Delcamp, A.; Salin, F.; Marullo, P.; Bely, M. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS One*. **2014** 9(4), e94246 DOI: [10.1371/journal.pone.0094246](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246)
- Alonso, A.; de Celis, M.; Ruiz, J.; Vicente, J.; Navascués, E.; Acedo, A.; Ortiz-Álvarez, R.; Belda, I.; Santos, A.; Gómez-Flechoso, M.A.; Marquina, D. Looking at the origin: Some insights into the general and fermentative microbiota of vineyard soils. *Fermentation* **2019** 5(3), 78 DOI: [10.3390/fermentation5030078](https://doi.org/10.3390/fermentation5030078)
- Alonso-del-Real, J.; Pérez-Torrado, R.; Querol, A.; Barrio, E. Dominance of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains over *S. kudriavzevii* in industrial fermentation competitions is related to an acceleration of nutrient uptake and utilization. *Environ. Microbiol.* **2019** 21(5), 1627-1644 DOI: [10.1111/1462-2920.14536](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14536)
- Anderson, I.C.; Cairney, J.W.G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* **2004** 6(8), 769-779 DOI: [10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00675.x)
- Andorrà, I.; Esteve-Zarzoso, B.; Guillamón, J.M.; Mas, A. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **2010** 144(2), 257-262 DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.003)
- Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **2012** 153(3), 243-259 DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.025)
- Baumann, P.; Moran, N.A. Non-cultivable microorganisms from symbiotic associations of insects and other hosts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1997** 72(1), 39-48 DOI: [10.1023/a:1000239108771](https://doi.org/10.1023/a:1000239108771)
- Belda, I.; Palacios, A.; Fresno, J.; Ortega, H.; Acedo, A. WineSeq®: A new tool for the study of the functional biodiversity of soils, and its use as a biomarker and guide for vitiviniculture practices. *BIO Web of Conferences* **2017** 9, 01012 DOI: [10.1051/bioconf/20170901012](https://doi.org/10.1051/bioconf/20170901012)
- Belda, I.; Ruiz, J.; Beisert, B.; Navascués, E.; Marquina, D.; Calderón, F.; Rauhut, D.; Benito, S.; Santos, A. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in varietal thiol (3-SH and 4-MSP) release in



- wine sequential fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2017** 257, 183-191 [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028)
- Belda, I.; Gobbi, A.; Ruiz, J.; de Celis, M., Ortiz-Álvarez, R.; Acedo, A.; Santos, A. Microbiomics to define wine terroir. In: *Comprehensive Foodomics*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, **2021** pp. 438-451 [ISBN: 978-0-12-816396-2](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.028)
- Bely, M.; Stoeckle, P.; Masneuf-Pomarède, I.; Dubourdieu, D. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2008** 122(3), 312-320 [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.023)
- Beuchat, L.R. Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **1993** 19(1), 1-14 [DOI: 10.1016/0168-1605\(93\)90119-2](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90119-2)
- Bi, K.; Liang, Y.; Mengiste, T.; Sharon, A. Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends Plant Sci.* **2023** 28(2), 211-222 [DOI: 10.1016/j.tplants.2022.08.024](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024)
- Bisson, L.F.; Karpel, J.E. Genetics of Yeast Impacting Wine Quality. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **2010** 1(1), 139-162 [DOI: 10.1146/annurev.food.080708.100734](https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100734)
- Blaalid, R.; Kumar, S.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Kirk, P.M.; Kausrud, H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol. Ecol. Resour.* **2014** 13(2), 218-224 [DOI: 10.1111/1755-0998.12065](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065)
- Bokulich, N.; Collins, T.; Masarweh, C.; Allen, G.; Heymann, H.; Ebeler, S.; Millsa, D. Associations among wine grape microbiome metabolome, and fermentation behavior suggest microbial contribution to regional wine characteristics. *mBio* **2016** 7(3) [DOI:10.1128/mBio.00631-16](https://doi.org/10.1128/mBio.00631-16)
- Borneman, A.R.; Pretorius, I.S. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics* **2015** 199(2), 281-291 [DOI: 10.1534/genetics.114.173633](https://doi.org/10.1534/genetics.114.173633)
- Boveri, S.; Rainieri, S.; Pulvirenti, A. Method for the validation of intraspecific crosses of *Saccharomyces cerevisiae* strains by minisatellite analysis. *Can. J. Microbiol.* **2012** 58(3), 350-358 [DOI: 10.1139/w11-142](https://doi.org/10.1139/w11-142)
- Briceño, E.X.; Latorre, B.A. Outbreaks of *Cladosporium* rot associated with delayed harvest wine grapes in Chile. *Plant Dis.* **2007** 91(8), 1060 [DOI: 10.1094/PDIS-91-8-1060C](https://doi.org/10.1094/PDIS-91-8-1060C)
- Cameron, J.R.; Loh, E.Y.; Davis, R.W. Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast. *Cell* **1979** 16, 739-751 [DOI: 10.1016/0092-8674\(79\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90090-4)
- Capece, A.; Salzano, G.; Romano, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. *Int. J. Food Microbiol.* **2003** 84(1), 33-39 [DOI:10.1016/S0168-1605\(02\)00392-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00392-6)
- Carrau, F.; Henschke, P. *Hanseniaspora vineae* and the concept of Friendly yeasts to increase autochthonous wine flavour diversity. *Front. Microbiol.* **2021** 12, 702093 [DOI:10.3389/fmicb.2021.702093](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.702093)
- Castrejón, F.; Codón, A.C.; Cubero, B.; Benítez, T. Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeast. *Syst. Appl. Microbiol.* **2002** 25(3), 462-467 [DOI: 10.1078/0723-2020-00127](https://doi.org/10.1078/0723-2020-00127)
- Chalvanti, I.; Banilas, G.; Tassou, C.; Nisiotou, A. Patterns of genetic diversity and the invasion of commercial starters in *Saccharomyces cerevisiae* vineyard populations of Santorini Island. *Foods* **2020** 9(5), 561 [DOI: 10.3390/foods9050561](https://doi.org/10.3390/foods9050561)
- Chen, Y.; Jiang, J.; Song, Y.; Zang, Z.; Wang, G.; Pei, Y.; Song, Y.; Qin, Y.; Liu, Y. Yeasts diversity during spontaneous fermentations and oenological characterization of indigenous

- Saccharomyces cerevisiae* for potential as wine starter cultures. *Microorganisms* **2022** 10(7), 1455 [DOI: 10.3390/microorganisms10071455](https://doi.org/10.3390/microorganisms10071455)
- Chen, T.; Zhang, Z.; Chen, Y.; Li, B.; Tian, S. *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **2023** 33(11), R460-R462 [DOI: 10.1016/j.cub.2023.01.058](https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.01.058)
- Cioch-Skoneczny, M.; Satora, P.; Skotniczny, M.; Skoneczny, S. Quantitative and qualitative composition of yeast microbiota in spontaneously fermented grape must obtained from cool climate grape varieties “Rondo” and “Regent”. *FEMS Yeast Res.* **2018** 18(8), foy089 [DOI:10.1093/femsyr/foy089](https://doi.org/10.1093/femsyr/foy089)
- Comitini, F.; Agarbati, A.; Canónico, L.; Galli, E.; Ciani, M. Purification and characterization of WA18, a new mycocin produced by *Wickerhamomyces anomalus* active in wine against *Brettanomyces bruxellensis* spoilage yeasts. *Microorganisms* **2020** 9(1), 56 [DOI: 10.3390/microorganisms9010056](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010056)
- Corbu, V.M.; Csutak, O. Molecular and Physiological Diversity of Indigenous Yeasts Isolated from Spontaneously Fermented Wine Wort from Ilfov County, Romania. *Microorganisms* **2022** 11(1), 37 [DOI: 10.3390/microorganisms11010037](https://doi.org/10.3390/microorganisms11010037)
- Cosme, F.; Gonçalves, B.; Inês, A.; Jordão, A.M.; Vilela, A. Biotechnological approaches to improve wine quality. **2016** Morata, A.; Loira, I. (eds) Grape and wine metabolites. *InTechOpen* [DOI: 10.5772/64822](https://doi.org/10.5772/64822)
- Cosme, F.; Vilela, A.; Filipe-Ribeiro, L.; Inês, A.; Nunes, F.M. Wine Microbial Spoilage: Advances in Defects Remediation. **2018** Holban AM, Grumezescu AM (eds) Microbial contamination and food degradation. Academic Press, London, pp. 271–314 [DOI: 10.1016/B978-0-12-811515-2.00009-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00009-3)
- Costa, J.M.; Egipto, R.; Aguiar, F.C.; Marques, P.; Nogales, A.; Madeira, M. The role of soil temperature in Mediterranean vineyards in a climate change context. *Front. Plant Sci.* **2023** 14, 1145137 [DOI: 10.3389/fpls.2023.1145137](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1145137)
- Curcio, M.J.; Lutz, S.; Lesage, P. The Ty1 LTR-Retrotransposon of Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Spectr.* **2015** 3(2), MDNA3-0053-2014 [DOI:0.1128/microbiolspec.MDNA3-0053-2014](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0053-2014)
- Czaja, W.; Bensasson, D.; Ahn, H.W.; Garfinkel, D.J.; Bergman, C.M. Evolution of Ty1 copy number control in yeast by horizontal transfer and recombination. *PLoS Genet.* **2020** 16(2), e1008632 [DOI: 10.1371/journal.pgen.1008632](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008632)
- de Celis, M.; Ruiz, J.; Martín-Santamaría, M.; Alonso, A.; Marquina, D.; Navascués, E.; Gómez-Flechoso, M.A.; Belda, I.; Santos, A. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Lett. Appl. Microbiol.* **2019** 68(6), 580-588 [DOI: 10.1111/lam.13155](https://doi.org/10.1111/lam.13155)
- de Celis, M.; Ruiz, J.; Martín-Santamaría, M.; Alonso, A.; Marquina, D.; Navascués, E.; Gómez-Flechoso, M.A.; Belda, I.; Santos, A. Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Appl. Microbiol.* **2019** 68(6), 580-588 [DOI: 10.1111/lam.13155](https://doi.org/10.1111/lam.13155)
- de Celis, M.; Ruiz, J.; Vicente, J.; Acedo, A.; Marquina, D.; Santos, A.; Belda, I. Expectable diversity patterns in wine yeast communities. *FEMS Yeast Res.* **2022** 22(1), foac034 [DOI:10.1093/femsyr/foac034](https://doi.org/10.1093/femsyr/foac034)
- Di Paola, M.; Meriggi, N.; Cavalieri, D. Applications of wild isolates of *Saccharomyces* yeasts for industrial fermentation: the gut of social insects as niche for yeast hybrids’ production. *Front Microbiol.* **2020** 11, 578425 [DOI: 10.3389/fmicb.2020.578425](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.578425)

- DiLegge, M.J.; Manter, D.K.; Vivanco, J.M. A novel approach to determine generalist nematophagous microbes reveals *Mortierella globalpina* as a new biocontrol agent against *Meloidogyne* spp. nematodes. *Sci. Rep.* **2019** *9*(1), 7521 [DOI: 10.1038/s41598-019-44010-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-44010-y)
- Ding, Y.; Wei, R.; Wang, L.; Wang, W.; Wang, H.; Li, H. Exploring the ecological characteristics of natural microbial communities along the continuum from grape berries to winemaking. *Food Res. Int.* **2023** *167*, 112718 [DOI: 10.1016/j.foodres.2023.112718](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112718)
- Drumonde-Neves, J.; Fernandez, T.; Lima, T.; País, C.; Franco-Duarte, R. Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking. *FEMS Yeast Res.* **2021** *21*(3), foab017 [DOI: 10.1093/femsyr/foab017](https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017)
- Eigel, A.; Feldmann, H. Ty1 and delta elements occur adjacent to several tRNA genes in yeast. *EMBO J.* **1982** *1*(10), 1245-1250 [DOI: 10.1002/j.1460-2075.1982.tb00020.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1982.tb00020.x)
- Eldarov, M.A.; Mardanov, A.V. Metabolic Engineering of Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)* **2020** *11*(9), 964 [DOI: 10.3390/genes11090964](https://doi.org/10.3390/genes11090964)
- Esteve-Zarzoso, B.; Belloch, C.; Uruburu, F.; Querol, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999** *49*, 329-337 [DOI: 10.1099/00207713-49-1-329](https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329)
- Fernández-Espinar, M.T.; Llopis, S.; Querol, A.; Barrio, E. Molecular identification and characterization of wine yeasts. **2011** In *Molecular wine microbiology*: San Diego. Academic. pp. 111-141 [DOI: 10.1016/B978-0-12-375021-1.10005-0](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375021-1.10005-0)
- Filho, M.C.; Bertéli, M.B.D.; Valle, J.S.; Paccola-Meirelles, L.D.; Linde, G.A.; Barcellos, F.G.; Colauto, N.B. Genetic diversity and pectinolytic activity of epiphytic yeasts from grape carposphere. *Genet. Mol. Res.* **2017** *16*(2), 1-13 [DOI: 10.4238/gmr16029698](https://doi.org/10.4238/gmr16029698)
- Gamero-Sandemetro, E.; Gómez-Pastor, R.; Matallana, E. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. *Biotechnol. J.* **2014** *9*(8), 1055-1064 [DOI: 10.1002/biot.201300448](https://doi.org/10.1002/biot.201300448)
- Garfinkel, D.J.; Curcio, M.J.; Youngren, S.D.; Sanders, N.J. The biology and exploitation of the retrotransposon *Ty* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome.* **1989** *31*(2), 909-919 [DOI:10.1139/g89-162](https://doi.org/10.1139/g89-162)
- Garofalo, C.; Tristezza, M.; Grieco, F.; Spano, G.; Capozzi, V. From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar. *World J Microbiol* **2016** *32*, 59 [DOI: 10.1007/s11274-016-2017-4](https://doi.org/10.1007/s11274-016-2017-4)
- Goddard, M.R. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* **2008** *89*(8), 2077-2082 [DOI: 10.1890/07-2060.1](https://doi.org/10.1890/07-2060.1)
- González, R.; Guindal, A.M.; Tronchoni, J.; Morales, P. Biotechnological Approaches to Lowering the Ethanol Yield during Wine Fermentation. *Biomolecules* **2021** *11*(11), 1569 [DOI:10.3390/biom11111569](https://doi.org/10.3390/biom11111569)
- González, R.; Morales, P. Truth in wine yeast. *Microb. Biotechnol.* **2022** *15*(5), 1339-1356 [DOI:10.1111/1751-7915.1384](https://doi.org/10.1111/1751-7915.1384)
- Grigs, R.G.; Steenwerth, K.L.; Mills, D.A.; Cantu, D.; Bokulich, N.A. Sources and assembly of microbial communities in vineyards as a functional component of winegrowing. *Front. Microbiol.* **2021** *12*, 673810 [DOI: 10.3389/fmicb.2021.673810](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673810)
- Guillamón, J.M.; Sabaté, J.; Barrio, E.; Cano, J.; Querol, A. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* **1998** *169*(5), 387-392 [DOI: 10.1007/s002030050587](https://doi.org/10.1007/s002030050587)

- Hranilovic, A.; Gambetta, J.M.; Schmidtke, L.; Boss, P.K.; Grbin, P.R.; Masneuf-Pomarede, I.; Bely, M.; Albertin, W.; Jiranek, V. Oenological Traits of *Lachancea thermotolerans* Show Signs of Domestication and Allopatric Differentiation. *Sci. Rep.* **2018** *8*, 14812 [DOI: 10.1038/s41598-018-33105-7](https://doi.org/10.1038/s41598-018-33105-7)
- Hutzler, M.; Koob, J.; Riedl, R.; Schneiderbanger, H.; Mueller-Auffermann, K., Jacob, F. Yeast identification and characterization. **2015** In: *Brewing Microbiology*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, (pp. 65-104) [DOI: 10.1016/B978-1-78242-331-7.00005-8](https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00005-8)
- Iqbal, M.; Broberg, A.; Andreasson, E.; Stenberg, J.A. Biocontrol potential of beneficial fungus *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* **2023** [DOI: 10.1094/PHYTO-02-23-0067-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-23-0067-R)
- Jakubowski, H.; Goldman, E. Evidence for cooperation between cells during sporulation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1988** *8*(12), 5166-5178 [DOI:10.1128/mcb.8.12.5166-5178.1988](https://doi.org/10.1128/mcb.8.12.5166-5178.1988)
- Jeyaram, K.; Singh, W.M.; Capece, A.; Romano, P. Molecular identification of yeast species associated with “Hamei” – a traditional starter used for rice wine production in Manipur, India. *Int. J. Food Microbiol.* **2008** *124*(2), 115-125 [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.029](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.029)
- Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius, I.S. The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2006** *27*(1), 15-39 [DOI: 10.21548/27-1-1475](https://doi.org/10.21548/27-1-1475)
- Jolly, N.P.; Mehlomakulu, N.N.; Nortje, S.; Beukes, L.; Hoff, J.; Booyse, M.; Erten, H. Non-*Saccharomyces* yeast for lowering wine alcohol levels: partial aeration versus standard conditions. *FEMS Yeast Res.* **2022** *22*(1), foac002 [DOI: 10.1093/femsyr/foac002](https://doi.org/10.1093/femsyr/foac002)
- Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014** *14*(2), 215-237 [DOI: 10.1111/1567-1364.12111](https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111).
- Kamilari, E.; Mina, M.; Karallis, C.; Tsaltas, D. Metataxonomic analysis of grape microbiota during wine fermentation reveals the distinction of Cyprus regional terroirs. *Front. Microbiol.* **2021** *12* [DOI: 10.3389/fmicb.2021.726483](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.726483)
- Kernaghan, G.; Mayerhofer, M.; Griffin, A. Fungal endophytes of wild and hybrid *Vitis* leaves and their potential for vineyard biocontrol. *Canadian J. of Microbiol.* **2017** *63*(7), 583-8595 [DOI:10.1139/cjm-2016-0740](https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0740)
- Legras, J.L.; Ruh, O.; Merdinoglu, D.; Karst, F. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **2005** *102*, 73-83 [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.007](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.007)
- Legras, J.L.; Karst, F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003** *221*(2), 249-255 [DOI:10.1016/s0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00205-2)
- Li, Y.; Long, H.; Jiang, G.; Yu, Z.; Huang, M.; Zou, S.; Guan, T.; Zhao, Y.; Liu, X. Protective effects of thiamine on *Wickerhamomyces anomalus* against ethanol stress. *Front. Microbiol.* **2022** *13*, 1057284 [DOI: 10.3389/fmicb.2022.1057284](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1057284)
- Lin, M.M.; Boss, P.K.; Walker, M.E.; Sumby, K.M.; Grbin, P.R.; Jiranek, V. Evaluation of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts isolated from a South Australian vineyard for their potential as wine starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **2020** *312*, 108373 [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108373)
- Liu, D.; Zhang, P.; Chen, D.; Howell, K. From the vineyard to the winery: How microbial ecology drives regional distinctiveness of wine. *Front. Microbiol.* **2019** *10*, 2679 [DOI:10.3389/fmicb.2019.02679](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02679)

- Maicas, S.; Mateo, J.J. The life of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* yeast in drinking wine. *Microorganisms* **2023** *11*(5), 1178 [DOI: 10.3390/microorganisms11051178](https://doi.org/10.3390/microorganisms11051178)
- Mannazzu, I.; Domizio, P.; Carboni, G.; Zara, S.; Zara, G.; Comitini, F.; Budroni, M.; Ciani, M. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2019** *39*(5), 603-617 [DOI: 10.1080/07388551.2019.1601679](https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679)
- Marinangeli, P.; Clementi, F.; Ciani, M.; Mannazzu, I. SED1 polymorphism within the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Research* **2004** *5*(1), 73-79 [DOI: 10.1016/j.femsyr.2004.07.001](https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.07.001)
- Martins, V.; Costa, L.; Soares, R.; Ayogu, P.; Teixeira, A.; Gerós, H. A catalogue of cultivable yeasts from the microbiota of grape berries cv. Vinhão and Loureiro. *OENO One* **2022** *56*(3), 257-270 [DOI: 10.20870/oeno-one.2022.56.3.5462](https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5462)
- Matallana, E.; Aranda, A. Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* **2017** *64*(2), 103-110 [DOI: 10.1111/lam.12677](https://doi.org/10.1111/lam.12677)
- Meriggi, N.; Di Paola, M.; Cavalieri, D.; Stefanini, I. *Saccharomyces cerevisiae* – Insects association: impacts, biogeography, and extent. *Front. Microbiol.* **2020** *11*, 1629 [DOI:10.3389/fmicb.2020.01629](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01629)
- Minebois, R.; Lairón-Peris, M.; Barrio, E.; Pérez-Torrado, R.; Querol, A. Metabolic differences between a wild and a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation unveiled by multi-omics analysis. *Environ. Microbiol.* **2021** *23*(6), 3059-3076 [DOI: 10.1111/1462-2920.15523](https://doi.org/10.1111/1462-2920.15523)
- Morata, A.; Arroyo, T.; Bañuelos, M.A.; Blanco, P.; Briones, A.; Cantoral, J.M.; Castrillo, D.; Cordero-Bueso, G.; Del Fresno, J.M.; Escott, C.; Escribano-Viana, R.; Fernández-González, M.; Ferrer, S.; García, M.; González, C.; Gutiérrez, A.R.; Loira, I.; Malfeito-Ferreira, M.; Martínez, A.; Pardo, I.; Ramírez, M.; Ruiz-Muñoz, M.; Santamaría, P.; Suárez-Lepe, J.A.; Vilela, A.; Capozzi, V. Wine yeast selection in the Iberian Peninsula: *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* as drivers of innovation in Spanish and Portuguese wine industries. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022** *10*, 1-29 [DOI: 10.1080/10408398.2022.2083574](https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2083574)
- Moura, V.S.; Pollettini, F.L.; Ferraz, L.P.; Mazzi, M.V.; Kupper, K.C. Purification of a killer toxin from *Aureobasidium pullulans* for the biocontrol of phytopathogens. *J. Basic Microbiol.* **2021** *61*(2), 77-87 [DOI: 10.1002/jobm.202000164](https://doi.org/10.1002/jobm.202000164)
- Muñoz-Bernal, E.; Fernández-Acero, F.J.; Rodríguez, M.E.; Cantoral, J.M. Análisis diferencial del proteoma de *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* inducido por la temperatura. Implicación en la calidad de los tintos D.O. Ribera del Duero. *Proteómica* **2012** *8*, 123
- Muñoz-Bernal, E.; Rodríguez, M.E.; Benítez, P.; Fernández-Acero, F.J.; Rebordinos, L.; Cantoral, J.M. Molecular analysis of red wine yeast diversity in the Ribera del Duero D.O. (Spain) area. *Arch. Microbiol.* **2013** *195*, 297-302 [DOI: 10.1007/s00203-013-0872-z](https://doi.org/10.1007/s00203-013-0872-z)
- Nisiotou, A.; Gyftogianni, E.; Banilas, G. Evaluation of Different Molecular Markers for Genotyping Non-*Saccharomyces* Wine Yeast Species. *Microbiol. Res.* **2022** *13*(3), 643-654 [DOI: 10.3390/microbiolres13030046](https://doi.org/10.3390/microbiolres13030046)
- Orbera-Ratón, T. Molecular identification methods of yeasts of biotechnological interest. *Rev. Iberoam. Micol.* **2004** *21*(1), 15-19 [PMID: 15458357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15458357/)
- Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Past and future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* **2016** *7*, 411 [DOI: 10.3389/fmicb.2016.00411](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411)
- Padilla, B.; Gil, J.V.; Manzanares, P. Challenges of the Non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking. *Fermentation* **2018** *4*(3), 68 [DOI:10.3390/fermentation4030068](https://doi.org/10.3390/fermentation4030068)

- Pedras, B.M.; Gonçalves, C.; Figueira, D.R.; Simões, P.; Gonçalves, P.; Paiva, A.; Barreiros, S.; Salema-Oom, M. White wine grape pomace as a suitable carbon source for lipid and carotenoid production by fructophilic *Rhodotorula babjevae*. *J. Appl. Microbiol.* **2022** *133*(2), 656-664 [DOI:10.1111/jam.15587](https://doi.org/10.1111/jam.15587)
- Pérez-Torrado, R.; Gómez-Pastor, R.; Larsson, C.; Matallana, E. Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009** *81*, 951-960 [DOI: 10.1007/s00253-008-1722-9](https://doi.org/10.1007/s00253-008-1722-9)
- Pérez-Través, L.; Lopes, C.A.; Querol, A.; Barrio, E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation. *PLoS One* **2014** *9*(4), e93729 [DOI:10.1371/journal.pone.0093729](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093729)
- Pinto, C.; Pinho, D.; Cardoso, R.; Custódio, V.; Fernandes, J.; Sousa, S.; Pinheiro, M.; Egas, C.; Gomes, A.C. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* **2015** *6*, 905 [DOI: 10.3389/fmicb.2015.00905](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00905)
- Pretorius, I.S. Tasting the *terroir* of wine yeast innovation. *FEMS Yeast Research* **2020** *20*(1), foz084 [DOI: 10.1093/femsyr/foz084](https://doi.org/10.1093/femsyr/foz084)
- Querol, A.; Barrio, E.; Ramón, D. A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strains Characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* **1992** *15*(3), 439-446 [DOI:10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Querol, A.; Pérez-Torrado, R.; Alonso-Del-Real, J.; Minebois, R.; Stribny, J.; Oliveira, B.M.; Barrio, E. New Trends in the Uses of Yeasts in Oenology. *Ad. Food. Nutr. Res.* **2018** *85*, 177-210 [DOI: 10.1016/bs.afnr.2018.03.002](https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.03.002)
- Redzepovic, S.; Orlic, S.; Majdak, A.; Kozina, B.; Volschenk, H.; Viljoen-Bloom, M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2003** *83*(1), 49-61 [DOI: 10.1016/S0168-1605\(02\)00320-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00320-3)
- Renault, P.; Coulon, J.; de Revel, G.; Barbe, J.C.; Bely, M. Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement. *Int. J. Food Microbiol.* **2015** *207*, 40-48 [DOI: 10.1016/j.jfoodmicro.2015.04.037](https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2015.04.037)
- Rollero, S.; Zietsman, A.J.J.; Buffetto, F.; Schückel, J.; Ortiz-Julien, A.; Divol, B. *Kluyveromyces marxianus* secretes a pectinase in Shiraz grape must that impacts technological properties and aroma profile of wine. *J. Agric. Food Chem.* **2018** *66*(44), 11739-11747 [DOI:10.1021/acs.jafc.8b03977](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03977)
- Romano, P.; Siesto, G.; Capece, A.; Pietrafesa, R.; Lanciotti, R.; Patrignani, F.; Granchi, L.; Galli, V.; Bevilacqua, A.; Campaniello, D.; Spano, G.; Caridi, A.; Poiana, M.; Foschino, R.; Vigentini, I.; Blaiotta, G.; Corich, V.; Giacomini, A.; Cardinali, G.; Corte, L.; Toffanin, A.; Agnolucci, M.; Comitini, F.; Ciani, M.; Mannazzu, I.; Budroni, M.; Englezos, V.; Rantsiou, K.; Iacumin, L.; Comi, G.; Capozzi, V.; Grieco, F.; Tufariello, M. Validation of a Standard Protocol to Assess the Fermentative and Chemical Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Strains. *Front. Microbiol.* **2022** *13*, 830277 [DOI: 10.3389/fmicb.2022.830277](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.830277)
- Roncoroni, M.; Santiago, M.; Hooks, D.O.; Moroney, S.; Harsch, M.J.; Lee, S.A.; Richards, K.D.; Nicolau, L.; Gardner, R.C. The yeast IRC7 gene encodes a  $\beta$ -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* **2011** *28*(5), 926-935 [DOI: 10.1016/j.fm.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.01.002)
- Ruiz, J.; Belda, I.; Beisert, B.; Navascués, E.; Marquina, D.; Calderón, F.; Rauhut, D.; Santos, A.; Benito, S. Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo White wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018** *102*(19), 8501-8509 [DOI: 10.1007/s00253-018-9255-3](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3)

- Ruiz, J.; Ortega, N.; Martín-Santamaría, M.; Acedo, A.; Marquina, D.; Pascual, O.; Rozès, N.; Zamora, F.; Santos, A.; Belda, I. Occurrence and enological properties of two new non-conventional yeasts (*Nakazawaea ishiwadae* and *Lodderomyces elongisporus*) in wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* **2019** 305, 108255 [DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108255](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108255)
- Solieri, L. The revenge of *Zygosaccharomyces* yeasts in food biotechnology and applied microbiology. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2021** 37(6), 96 [DOI:10.1007/s11274-021-03066-7](https://doi.org/10.1007/s11274-021-03066-7)
- Tello, J.; Cordero-Bueso, G.; Aporta, I.; Cabellos, J.M.; Arroyo, T. Genetic diversity in commercial wineries: effects of the farming system and vinification management on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **2011** 112, 302-315 [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05202.x)
- Torres-Guardado, R.; Esteve-Zarzoso, B.; Reguant, C.; Bordons, A. Microbial interactions in alcoholic beverages. *Int. Microbiol.* **2022** 25(1), 1-15 [DOI: 10.1007/s10123-021-00200-1](https://doi.org/10.1007/s10123-021-00200-1)
- Tristezza, M.; Tufariello, M.; Capozzi, V.; Spano, G.; Mita, G.; Grieco, F. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front. Microbiol.* **2016** 7, 670 [DOI:10.3389/fmicb.2016.00670](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00670)
- Tronchoni, J.; Setati, M.E.; Fracassetti, D.; Valdetara, F.; Maghradze, D.; Foschino, R.; Curiel, J.A.; Morales, P.; Gonzalez, R.; Vigentini, I.; Bauer, F.F. Identifying the main drivers in microbial diversity for cabernet sauvignon cultivars from Europe to South Africa: Evidence for a cultivar-specific microbial fingerprint. *J. Fungi (Basel)* **2022** 8(10), 1034 [DOI: 10.3390/jof8101034](https://doi.org/10.3390/jof8101034)
- Tufariello, M.; Fragasso, M.; Pico, J.; Panighel, A.; Castellarin, S.D.; Flamini, R.; Grieco, F. Influence of Non-*Saccharomyces* on Wine Chemistry: A Focus on Aroma-Related Compounds. *Molecules* **2021** 26(3), 644 [DOI: 0.3390/molecules26030644](https://doi.org/10.3390/molecules26030644)
- Valentini, B.; Barbero, F.; Casacci, L.P.; Luganini, A.; Stefanini, I. Forest influence yeast populations vectored by insects into vineyard. *Front. Microbiol.* **2022** 13, 1039939 [DOI:10.3389/fmicb.2022.1039939](https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1039939)
- Vallejo, B.; Peltier, E.; Garrigós, V.; Matallana, E.; Marullo, P.; Aranda, A. Role of *Saccharomyces cerevisiae* Nutrient Signaling Pathways During Winemaking: A Phenomics Approach. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020** 8, 853 [DOI: 10.3389/fbioe.2020.00853](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00853)
- Van Wyk, N.; Pretorius, I.S.; von Wallbrunn, C. Assessing the Oenological Potential of *Nakazawaea ishiwadae*, *Candida railenensis* and *Debaryomyces hansenii* strains in mixed-culture grape must fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation* **2020** 6(2), 40 [DOI: 10.3390/fermentation6020049](https://doi.org/10.3390/fermentation6020049)
- Varela, C.; Borneman, A.R. Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeasts* **2017** 34(3), 111-128 [DOI: 10.1002/yea.3219](https://doi.org/10.1002/yea.3219)
- Vicente, J.; Calderón, F.; Santos, A.; Marquina, D.; Benito, S. High potential of *Pichia kluyveri* and other *Pichia* species in wine technology. *Int. J. Mol. Sci.* **2021** 22(3), 1196 [DOI:10.3390/ijms22031196](https://doi.org/10.3390/ijms22031196)
- Vicente, J.; Navascués, E.; Calderón, F.; Santos, A.; Marquina, D.; Benito, S. An integrative view of the role of *Lachancea thermotolerans* in wine technology. *Foods* **2021** 10(11), 2878 [DOI:10.3390/foods10112878](https://doi.org/10.3390/foods10112878)
- Vicente, J.; Baran, Y.; Navascués, E.; Santos, A.; Calderón, F.; Marquina, D.; Rauhut, D.; Benito, S. Biological management of acidity in wine industry: A review. *Int. J. Food Microbiol.* **2022** 375, 109726 [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726)

Wang, X.; Glawe, D.A.; Kramer, E.; Weller, D.; Okubara, P.A. Biological Control of *Botrytis cinerea*: Interactions with Native Vineyard Yeasts from Washington State. *Phytopathology*. **2018** *108*(6), 691-701 [DOI: 10.1094/PHYTO-09-17-0306-R](https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-17-0306-R).

Wei, R.; Wang, L.; Ding, Y.; Zhang, L.; Gao, F.; Chen, N.; Song, Y.; Li, H.; Wang, H. Natural and sustainable wine: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022** 1-12 [DOI:10.1080/10408398.2022.2055528](https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2055528)

Xynas, B.; Barnes, C. Yeast or water: producing wine with lower alcohol levels in a warming climate: a review. *J. Sci. Food Agric.* **2023** *103*(7), 3249-3260 [DOI: 10.1002/jsfa.12421](https://doi.org/10.1002/jsfa.12421)

Yan, H.; Ge, C.; Zhou, J.; Li, J. Diversity of soil fungi in the vineyards of Changli region in China. *Can. J. Microbiol.* **2022** *68*(5), 341-352 [DOI: 10.1139/cjm-2021-0337](https://doi.org/10.1139/cjm-2021-0337)

Zilelidou, E.A.; Nisiotou, A. Understanding wine through yeast interactions. *Microorganisms* **2021** *9*(8), 1620 [DOI: 10.3390/microorganisms9081620](https://doi.org/10.3390/microorganisms9081620)



## CONCLUSIONES

1. El análisis de muestras de 24 viñedos de Castilla y León pertenecientes a las D.O. de Arribes, Rueda, Ribera del Duero y Toro (en sus suelos, cortezas y uvas) y de mostos de cuatro de las bodegas, constituye el primer estudio detallado para valorar los Servicios Ecosistémicos (de aprovisionamiento, regulación y culturales) que puede aportar la microbiota a las características peculiares de los viñedos y de vinos de la Comunidad Autónoma. Los resultados de este trabajo arrojan datos singulares que indican varias diferencias y algunas similitudes en las especies componentes de los microbiomas de viñedos situados en paisajes homogéneos y aquellos que están rodeados de paisajes heterogéneos. Se detecta mayor biodiversidad de especies microbianas en los viñedos situados en paisajes heterogéneos y mayor abundancia relativa de algunas especies bacterianas y fúngicas, incluyendo determinadas especies catalogadas entre las que aportan beneficios tanto a la planta como a la salud de los viñedos y, por ende, a la calidad de los vinos. Además, se han identificado especies microbianas en muestras de suelos y cortezas de viñedos situados en paisajes heterogéneos propias de sistemas forestales, un nuevo hallazgo que pone de manifiesto la influencia que el paisaje circundante ejerce sobre los cultivos.

2. Se han investigado y catalogado los Servicios Ecosistémicos que puede aportar la microbiota al valor de los viñedos y de los vinos. Es la primera vez, hasta donde llega nuestro conocimiento, que se presenta una revisión sistemática de los servicios ecosistémicos que presta la microbiota del vino. En este caso, además, se ha realizado una primera identificación de estos servicios en la región de Castilla y León, paso previo necesario a su valoración económica. Esto es especialmente significativo para los servicios de regulación y culturales, que no son valorados ni retribuidos en los mercados. Los numerosos datos recabados en este trabajo abren un innovador marco de estudio hacia su posible valoración económica y, con ello, a nuevas líneas de investigación que están en sintonía con estudios similares en otros países Europeos y en concordancia con las actuales líneas de los grupos participantes en este trabajo. Ello puede ayudar a una mejor toma de decisiones, tanto en el ámbito privado como en el público.

3. El análisis la microbiota fúngica de cuatro mostos sin fermentar de las D.O. Arribes (bodega Hacienda Zorita), Rueda (Ramón Bilbao), Ribera del Duero (Martín Berdugo) y Toro (Mazas) revela la presencia con abundancia significativa de especies de levadura de interés enológico que pueden representar cepas autóctonas de cada viñedo, como *Saccharomyces bayanus* en mosto de Ribera de Duero, *Nakazawaea ishiwadae* en mosto de Rueda o *Torulaspora delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* en mosto de Arribes. Se han identificado 6 especies de levadura entre los 46 aislados en 3 medios de cultivo durante 5 días de fermentación espontánea de los mostos: *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera anomala*, *Hanseniaspora uvarum*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia citriensis* y *Metschnikowia pulcherrima*. Además, se han caracterizado con pruebas moleculares 6 aislados de la especie *S. cerevisiae* para

determinar si podrían corresponder a cepas nuevas. Los resultados indican que las levaduras aisladas de Rueda FTRu2008 (R1) y FFRu300 (R2), de Ribera de Duero FTRi2013 (Ri1) y probablemente la de Toro FFTo3008 (T1) son distintas, en base a varios patrones de huella genética, de las cepas vínicas comerciales suministradas por cada bodega. Esas cuatro cepas podrían tener características fermentativas deseables y quizá aportar algunas propiedades organolépticas y sensoriales distintivas a nuevos vinos experimentales, por lo que una posterior caracterización fenotípica y tecnológica detallada de las mismas proporcionará información valiosa para su posible uso en vinificación.