



---

**Universidad de Valladolid**  
**Campus de Palencia**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

**Titulación**  
**Grado en Enología**

Aportaciones de las Nuevas Técnicas Moleculares  
Metagenómica y qPCR a la Vitivinicultura

Alumno: David Barbero Abad

Tutora: Elena Hidalgo Rodríguez

Julio de 2017

ÍNDICE	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	1
3. JUSTIFICACIÓN	6
4. OBJETIVOS	8
5. MATERIAL Y MÉTODOS	8
6. APORTACIONES DE LAS NUEVAS TÉCNICAS MOLECULARES METAGENÓMICA Y QPCR A LA VITIVINICULTURA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
6.1. APLICACIONES EN VITICULTURA	9
6.1.1. DESCRIPCIÓN DEL MICROBIOMA DEL VIÑEDO	9
6.1.2. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA	11
6.1.3. INTERACCIÓN DEL MICROBIOMA CON LA PLANTA	15
6.1.4. APLICACIONES EMERGENTES A PARTIR DEL CONOCIMIENTO DEL MICROBIOMA	18
6.2. USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS	19
6.3. APLICACIONES EN ENOLOGÍA	21
7. CONCLUSIÓN	30
8. BIBLIOGRAFÍA	31

## 1. RESUMEN

El uso de las técnicas moleculares metagenómica y qPCR ha demostrado la enorme influencia de los microorganismos del suelo asociados a la vid, desde la raíz hasta las uvas. Los microorganismos interactúan con la planta e inciden en la producción, la calidad y la sanidad del cultivo. Además, se establecen en la uva y mosto y participan en la fermentación con un impacto notable en las cualidades sensoriales del vino. Las especies y la distribución de las comunidades microbianas dependen de las características climáticas, edáficas y culturales de cada viñedo. Por lo tanto, algunos autores han propuesto ampliar el concepto de *terroir* con el componente microbiano. Por otro lado, estas técnicas sirven para detectar de forma precoz la presencia de microorganismos perjudiciales, como *Brettanomyces* y bacterias ácido lácticas productoras de aminas biógenas. Esta revisión recopila aplicaciones de estas técnicas en la vitivinicultura y los avances logrados sobre el estudio de los microorganismos.

Palabras clave: metagenómica, qPCR, microbioma, suelo, viticultura, enología.

## ABSTRACT

Use of molecular techniques metagenomics and qPCR has demonstrated the huge influence microorganisms associated soil with grapevine, from root to grapes. Microorganisms interact with plant and affect on the crop production, quality and health. Moreover, they are able to set up in grape and must and participate in fermentation with a notable impact on the sensory qualities of wine. Species and distribution of microbial communities depend on climatic, edaphic and cultural characteristics of each vineyard. Therefore, some authors have proposed extending the *terroir* concept with the microbial component. On the other hand, these techniques enable to detect the presence of harmful microorganisms at an early stage such as *Brettanomyces* and biogenic amine-producing bacteria. This review collect applications of these techniques in winemaking and the progress made on the microorganisms study.

Keywords: metagenomics, qPCR, microbiome, soil, viticulture, enology

## 2. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera*) es un cultivo considerado de gran importancia a nivel global, tanto social como económicamente, debido al alto valor que tiene la uva y a su capacidad de producir zumos, vinos y licores. La superficie mundial dedicada al viñedo para la elaboración de vino es de 7,6 millones de hectáreas, tiene una producción mundial de 267 millones de hectolitros y un valor de 28.900 millones de euros en el mercado internacional (OIV, 2017). Es destacable indicar que, pese a que en los últimos años se haya perdido ligeramente superficie de viñedo y a que el volumen de producción se haya mantenido prácticamente constante, el valor en el mercado internacional ha aumentado considerablemente (Figura 1). Debido a esta importancia económica y social, todos los aspectos relacionados con el cultivo de la vid y con cada uno de los parámetros y etapas de la elaboración de vino se han estudiado abundantemente, con las herramientas y tecnologías disponibles que se han desarrollado progresivamente. Otros hechos que demuestran la importancia del sector enológico en la investigación, son el hecho de que el genoma del primer organismo eucariota que fue secuenciado fue *Saccharomyces cerevisiae* en 1996 (Dujon, 2010) y que el genoma de *Vitis vinifera* fue el cuarto secuenciado de una especie vegetal de flor, segundo de especies leñosas y el primero dentro de los cultivos frutales (The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007).



Fig. 1. Evolución de la superficie de viñedo, la producción y el valor en el mercado internacional. (Tomado de Aspectos de la Coyuntura Mundial. OIV, 2017)

El vino es una bebida fermentada a base de mosto de uva que originariamente surgió a partir de reacciones químicas y biológicas inesperadas (Barata *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2017). A lo largo de la historia, los elaboradores de vino han ido cambiando sus prácticas a medida que se adquirían los conocimientos científicos que permitían mejorar la comprensión de estas reacciones. Las cualidades organolépticas del vino vienen definidas por los compuestos químicos que contiene, muchos derivados de las propias uvas (aromas varietales o primarios) y otros muchos derivados y/o modificados por los microorganismos en las distintas fases fermentativas (aromas fermentativos o secundarios), además, de los añadidos y/o modificados durante la fase de crianza (aromas de crianza o terciarios) (Rapp *et al.*, 1986). Se percibe que los vinos de diferentes variedades poseen considerables diferencias sensoriales, sin embargo, esta variabilidad no se distingue en fases previas a la fermentación. Por lo tanto, la mayoría de los componentes aromáticos, incluyendo los varietales, son generados y/o transformados y liberados durante las etapas fermentativas por la actividad de los microorganismos (Belda *et al.*, 2017a). Miles de los microorganismos que originariamente están presentes en el viñedo se establecen en la superficie de la uva. Además, durante las etapas de fermentación se producen interacciones entre los microorganismos, lo que explica que algunas especies desaparezcan y otras se impongan y que en las fases finales de la fermentación aún permanezcan miles de microorganismos de distintas especies (Barata *et al.*, 2012, Drumonde-Neves *et al.*, 2017). De esta manera, se demuestra la importancia del factor microbiano en toda la elaboración del vino. Debido a esta gran importancia, surge la necesidad de conocer y controlar las propiedades genéticas y metabólicas de las distintas cepas que participan en la elaboración, mediante el desarrollo de métodos analíticos aptos para diferenciar los distintos microorganismos a nivel de cepa (Palacios *et al.*, 2009).

Gracias a la invención de la técnica PCR por Kary Mullis en el año 1986, investigación por la que logró el Premio Nobel de Química en 1993, el estudio microbiológico ha experimentado un cambio significativo en las últimas tres décadas y ha permitido obtener una mayor visión sobre los ecosistemas microbianos (Cocolin *et al.*, 2013). No obstante, los trabajos realizados indican que el análisis de las respuestas y las adaptaciones de los microorganismos es complejo y requiere de un estudio de secuenciación gen a gen. Por lo tanto, desde el desarrollo de los primeros métodos de secuenciación genómica a mediados de los años 70 del siglo pasado, inicialmente desarrollados por Frederick Sanger, con su método de secuenciación enzimático, por el que ganó el Premio Nobel de Química en 1980, la tecnología de secuenciación ha evolucionado notablemente (Petrosino *et al.*, 2009). Actualmente, la aplicación de nuevas técnicas moleculares de secuenciación masiva posibilita una visión mucho más completa de las capacidades de respuesta y adaptación de los microorganismos en distintas condiciones y momentos (Rossouw *et al.*, 2008).

La utilización de técnicas moleculares, como la **metagenómica** y la **qPCR** permiten detectar, identificar y cuantificar microorganismos de forma muy fiable mediante métodos que son sensibles, específicos, reproducibles y rápidos. La **metagenómica**, permite el estudio de material genético de muestras tomadas directamente sin necesidad de enriquecimiento o cultivo previo. Se podría decir que esta tecnología abre una era importante en el campo de la microbiología (Mardis, 2007). Por ello, en esta revisión se propone el uso de técnicas moleculares no dependientes de cultivo, basadas en la técnica de la PCR, como la PCR Cuantitativa o en Tiempo Real (qPCR o *real time* PCR), los métodos basadas en Secuenciación Masiva o de Nueva Generación (NGS) (tecnología de secuenciación de ADN que permite establecer el orden de los nucleótidos en un fragmento de ADN y es capaz de realizar múltiples secuencias de forma paralela (Shendure, 2008)) y las ciencias Ómicas (Genómica, Transcriptómica, Metabolómica, Proteómica, etc.), (Tabla 1) en detrimento de métodos dependientes de cultivo.

Tabla 1. Descripción de las principales ciencias Ómicas (Elaboración propia)

Ciencias	Definición y Objetivo
Genómica	Estudio del conjunto completo de genes y genomas de los seres vivos.
	Comprender el contenido genético y la capacidad de codificación de un organismo determinado.
Transcriptómica	Estudio del conjunto completo de moléculas de mRNA presentes en células, tejido u órgano.
	Comprender cuáles son los genes que se expresan y/o se requieren para el crecimiento o la supervivencia en una condición dada.
Metabolómica	Estudio del conjunto de metabolitos en células, tejidos u órganos.
	Comprender la presencia y distribución de los genes funcionales.
Proteómica	Estudio de las moléculas proteicas totales presentes en células, tejidos u órganos.
	Obtener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo unas condiciones concretas

Entre las aplicaciones de estas tecnologías al mundo de la vitivinicultura destacan: i) El estudio del microbioma del viñedo; ii) la detección de microorganismos patógenos de la vid; iii) la identificación de cepas de levaduras fermentativas y iv) la detección de levaduras y bacterias cuya actividad es considerada causante de deterioro en el vino, entre otras.

La qPCR es una técnica muy adecuada, frente a los métodos de cultivo, para detectar determinados microorganismos. Esta técnica es una herramienta de diagnóstico rápido y eficaz para detectar, identificar y cuantificar la presencia de microorganismos particulares. Sin embargo, cuando el objetivo no es analizar una especie en concreto y se quiere analizar toda la comunidad microbiana, se han utilizado otras técnicas basadas en PCR, como PCR-DGGE (PCR seguida de Electroforesis en Gel con Gradiente de Desnaturalización). Esta técnica tiene sus limitaciones debido a la observación e interpretación de las bandas resultado, que dificulta la estimación de riqueza de especies y la baja sensibilidad con especies de presencia escasa (David *et al.*, 2014). Por lo tanto, se ha optado por la utilización, en estos casos, de la tecnología de secuenciación masiva, que se ha mostrado más adecuada para comprender las comunidades microbianas de una muestra compleja (David *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). Por consiguiente, el uso de NGS es el método de elección para la detección simultánea de múltiples especies presentes en los distintos órganos de la vid y en el mosto y el vino (Bokulich *et al.*, 2012, David *et al.*, 2014, Pinto *et al.*, 2014). Mediante NGS se consigue obtener una mejor representación de las comunidades microbianas

presentes en viñedo y de las que intervienen en las etapas de elaboración de vino, tanto en la fermentación alcohólica (FA), llevada a cabo principalmente por levaduras, como en la fermentación maloláctica (FML) realizada por bacterias ácido lácticas (BAL).

Las ciencias Ómicas permiten representaciones estáticas o dinámicas de cómo una sola célula reacciona en una comunidad microbiana y cómo las distintas especies interactúan con el medio y entre sí. La metabolómica permite el análisis de la composición química del vino y su relación con determinadas propiedades organolépticas atribuidas previamente por los enólogos. Skogerson (2008) introdujo el término *wine-omics* para referirse a esta subdisciplina de la metabolómica. Para describir el conjunto de metabolitos del vino, una de las técnicas más utilizadas es la resonancia magnética nuclear, además, de las técnicas cromatográficas, como la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos. En menor medida, también se pueden aplicar técnicas basadas en la transformada de Fourier y la espectrofotometría de radiación infrarroja y métodos de electroforesis capilar (Alañón *et al.*, 2015).

Gracias a la combinación de todas estas técnicas, se podrán desarrollar modelos predictivos de la dinámica poblacional y de las actividades metabólicas de los microorganismos y obtener información de las cualidades organolépticas del vino durante todas las fases de elaboración. De esta forma, el enólogo podrá conocer cuál es la actividad microbiana en cada etapa fermentativa y controlar las especies, cepas o genotipos de levaduras y/o bacterias, así como, los tamaños de sus poblaciones para poder conseguir el producto final deseado (Liu *et al.*, 2017). Asimismo, permitirá determinar la influencia del clima, las propiedades edáficas, la variedad, las prácticas de cultivo y las formas de elaboración y poder evidenciar el concepto de *terroir* en el vino.

En cualquier caso, será necesario recurrir a la metatranscriptómica como herramienta necesaria para la caracterización funcional de las comunidades microbianas, ya que además de mostrar su composición taxonómica, permite identificar sus funciones metabólicas y bioquímicas. Así, se podrán discriminar las células vivas de los microorganismos de las células muertas y los organismos metabólicamente activos de los inactivos, complementando a la secuenciación masiva de nueva generación, que analiza indiscriminadamente todo fragmento de ADN presente en la muestra (Belda *et al.*, 2017b).

La vid tiene asociadas comunidades de microorganismos que tienen relación directa e indirecta con su huésped e influyen en la productividad y sanidad de la planta (Gilbert *et al.*, 2014a). Se han realizado numerosos estudios sobre estas comunidades. Prácticamente los primeros trabajos en estudiar el microbioma del viñedo fueron los de Valero *et al.*, en 2007 y Setati *et al.*, en 2012. Hasta el momento, entre los ensayos que se han centrado en el estudio de las poblaciones microbianas en la uva y el vino, pocos han utilizado secuenciación masiva. Esta tecnología ofrece una imagen más fiel y profunda de estas comunidades que la que se obtiene utilizando métodos de cultivo o microscópicos, lo que ha permitido desvelar una biodiversidad que no había sido descrita anteriormente (Turner *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2015) y cuyas contribuciones a las características sensoriales son aún desconocidas (Bokulich *et al.*, 2016). Es bien sabido, que el vino, bebida fermentada a base de mosto de uva, es resultado de la actividad metabólica secuenciada de diversos microorganismos, responsables de las características organolépticas y sanitarias del producto y, de hecho, la producción de determinados metabolitos puede variar debido a la presencia o ausencia de otros microorganismos por sus efectos sinérgicos o antagónicos (Liu *et al.*, 2017). Por lo tanto, la identificación de los microorganismos presentes en el viñedo y en los productos vínicos, así como la comprensión de la naturaleza de sus interacciones, son uno de los principales objetos de estudio de mayor interés dentro de la investigación vitivinícola. El vino es una matriz compleja en la que puede haber distintos interferentes que dificultan

una correcta extracción de ADN. Sin embargo, todo ello se ha ido solucionando y actualmente existen métodos y kits de extracción cuya eficacia ha sido demostrada para distintas situaciones (Belda *et al.*, 2017b)

Los estudios realizados con NGS carecen de resultados obtenidos mediante tecnologías Ómicas que complementen los datos de las dinámicas de población microbiana para poder evaluar cómo y cuáles microorganismos tienen mayor incidencia sobre las características sensoriales del producto final, puesto que, se desconocen muchas de las relaciones entre los patrones regionales microbianos y los perfiles de metabolitos del vino. La evidencia de estas interacciones microbianas en el impacto de las características finales del vino, serían importantes para definir la identidad del producto (Bokulich *et al.*, 2016). Por lo tanto, sería muy conveniente la realización de estudios cruzados de análisis microbiano en uva y vino, junto con técnicas de análisis de los metabolitos generados y el desarrollo de modelos que relacionen el microbioma y el metaboloma y cuyos datos sean interpretados mediante bioinformática. Para ello, la creación de bases de datos de suficiente calidad y que abarquen la gran amplitud de genomas de especies vinculadas a la agricultura es un objetivo importante para la investigación de la industria agroalimentaria. Actualmente, las bases de datos, solamente suelen incluir microorganismos asociados a humanos para estudios de medicina, por lo que muchos organismos no están registrados en ellos o su identificación resulta errónea (Belda *et al.*, 2017b).

Comprender el microbioma del viñedo y las interacciones microbioma-planta abre un camino para desarrollar nuevos enfoques que permitan mejorar la productividad de la viticultura de forma más sostenible e identificar microorganismos con propiedades beneficiosas, y/o sus genes y enzimas, que tengan incidencia sobre la planta y/o sobre otros microorganismos para ser utilizados como estrategias de control y protección de cultivos (Pinto *et al.*, 2016). Por otra parte, gracias a estas herramientas, se pretende obtener una mayor visión del microbioma y de su impacto en el perfil organoléptico del vino, puesto que, existen microorganismos aún poco estudiados, que pueden variar indirectamente la calidad del vino, al actuar sobre otros microorganismos, por ejemplo, inhibiendo la fermentación. Todo ello, permitirá al enólogo tener herramientas de diagnóstico, control y trazabilidad en cada momento y una previsión de las características finales del vino según los microorganismos presentes y, de esta manera, guiar estas poblaciones presentes o inocular las levaduras o bacterias adecuadas para conseguir el producto final deseado (Belda *et al.*, 2017b). Además de estudiar el microbioma del suelo y del vino, Belda *et al.*, 2017a, considera la microbiota de la cavidad bucal humana como un parámetro importante para la percepción de las cualidades sensoriales del vino durante su consumo, debido a la actividad enzimática que podría modificar o liberar determinados sabores y aromas. Por lo tanto, este factor debería ser tenido en cuenta en la realización de posteriores trabajos.

Los indicios actuales sobre las características biogeográficas de los microorganismos asociados al cultivo de la vid son aún parciales, pero ya se puede indicar que los trabajos futuros se basarán en el estudio del microbioma de los suelos, lo que cambiará la concepción de agricultura, así como, el estudio del microbioma humano está cambiando la concepción de medicina (Gilbert *et al.*, 2014a). Para ello, aún, es necesario mejorar ciertos aspectos técnicos en las fases de laboratorio, como los protocolos de extracción de ADN y ARN, o perfeccionar los métodos de secuenciación para aumentar la resolución y la cuantificación del microbioma, así como, desarrollar bases de datos amplias y de calidad (Belda *et al.*, 2017b). Por lo tanto, la realización de un mayor número de trabajos permitirá interpretar con mayor precisión los resultados y, de esta forma, obtener una visión holística de los sistemas microbiológicos y, por consiguiente, explotar el enorme potencial del microbioma en los distintos procesos del cultivo de la vid y la elaboración del vino.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Desde los inicios del estudio de la taxonomía microbiana, con las primeras observaciones detalladas de microorganismos vistas por Leeuwenhoek gracias a su microscopio en la segunda mitad del siglo XVII, se ha evolucionado permitiendo el paso de analizar mediante la morfología comparativa, la fisiología y la genética convencional, a los análisis por medio de la morfología a nivel ultramicroscópico, la aplicación de criterios bioquímicos y a la introducción de la biología molecular (Kurtzman *et al.*, 1994).

Los métodos tradicionales dependientes de cultivo se han utilizado para la detección e identificación de microorganismos que intervienen de manera directa e indirecta con el cultivo de la vid y la elaboración de productos vnicos. También, estos métodos se usan para el estudio *in vitro* de la actividad metabólica de los microorganismos durante la elaboración de vino (Belda *et al.*, 2016). Sin embargo, los métodos convencionales dependientes de cultivo tienen importantes limitaciones: 1) La identificación en base a las características morfológicas y fisiológicas requiere la realización de numerosas pruebas y puede resultar laborioso, complejo y lento. Además, el tiempo necesario de incubación para obtener resultados puede ser de entre unas horas y varios días; 2) Las pruebas utilizadas no son siempre estables y reproducibles debido a que las características morfológicas y fisiológicas están influenciadas por las condiciones de cultivo y los resultados suelen ser ambiguos e incorrectos (Boekhout *et al.*, 1996, Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999); 3) Se obtiene una representación bastante reducida de las comunidades microbianas estudiadas, ya que, se obvia la fracción microbiana más grande, puesto que se estima que solamente el 1% de los microorganismos que forman estas comunidades puede ser aislado por métodos tradicionales de cultivo (Zarraonaindia *et al.* 2015b; Belda *et al.*, 2017b) y 4) El vino es un ambiente estresante para algunas bacterias y levaduras que entran en estado viable pero no cultivable (VBNC), debido a la adición de anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) como preservante, a la alta concentración de etanol, a la presencia de compuestos polifenólicos, etc., (Willenburg *et al.*, 2012). Las células en estado VBNC son incapaces de reproducirse y crecer en medios de cultivo, aunque, pueden recuperar su viabilidad y desarrollar actividad metabólica al encontrarse de nuevo en condiciones más favorables, por ejemplo, al reducirse la concentración de SO<sub>2</sub> libre con el paso del tiempo. Este hecho supone una alta probabilidad de falsos negativos tanto mediante métodos de cultivo como bioquímicos, ya que en estado VBNC, su metabolismo no está activo. Algunos microorganismos asociados en el vino y que frecuentemente pueden causar alteraciones en el vino, como *Candida stellata*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, etc., pueden entrar en estado VBNC (Salinas *et al.*, 2009)

Debido a que, uno de los parámetros utilizados para la identificación taxonómica es la observación del estado sexual de reproducción de las levaduras, se ha generado una dualidad en la nomenclatura, que hace que un mismo género puede tener dos nombres, según se encuentre en estado vegetativo (anamorfo) o sexual (teleomorfo). *Cryptococcus/Filobasidiella*, *Brettanomyces/Dekkera* y *Kloeckera/Hanseniaspora* son claros ejemplos. Aunque la dualidad está aceptada por el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, esclarecer estas relaciones en base a los estudios genéticos de las especies en estado asexual está siendo un detonante para la reelaboración de la nomenclatura de levaduras (Ratón, 2004).

Inicialmente, los trabajos de microbiología de los organismos asociados a la vid estaban centrados mayoritariamente en el estudio de hongos y bacterias causantes de deterioro en los vinos. Principalmente, dichos estudios fueron dirigidos a identificar a los microorganismos patógenos de la vid (*Agrobacterium vitis*, *Erysiphe necator*, *Phomopsis viticola*, *Xylella fastidiosa*, etc.) y los de interés enológico presentes en las fases



fermentativas (Levaduras y bacterias ácido lácticas), especialmente, sobre el género *Saccharomyces* en uvas y mosto (Barata *et al.*, 2012). La actividad de la especie *Saccharomyces cerevisiae* es predominante en la fermentación alcohólica del mosto y es utilizada de forma común como inóculo. Por lo tanto, se han realizado ensayos de aislamiento y cultivo de distintas cepas de *S. cerevisiae* para buscar la tipicidad regional y conseguir productos con un determinado y diferenciable carácter. Muchos de estos estudios sobre *S. cerevisiae* se han realizado en condiciones y medios de laboratorio. Sin embargo, el metabolismo de los microorganismos depende de la adaptación a las diferentes condiciones del medio y el vino es una compleja matriz de diversos componentes en la cual se producen importantes cambios en las propiedades fisicoquímicas durante los procesos fermentativos, por lo tanto, los resultados obtenidos en los medios artificiales no eran representativos (Rossouw *et al.*, 2009). Además, está demostrado que en las etapas de fermentación intervienen otras especies de levaduras y bacterias, y probablemente sea el efecto de levaduras No-*Saccharomyces* el que aporte mayor complejidad y tipicidad diferenciable en el perfil sensorial del vino elaborado (Drumonde-Neves *et al.*, 2017).

Desde la implantación y la generalización del uso de técnicas moleculares para el estudio del microbioma, el interés por describir la complejidad de las comunidades microbianas ha aumentado. Así, han surgido grupos de investigación para el estudio del microbioma de distintos entornos, como el microbioma del cuerpo humano “*The Human Microbiome Project*” (*The Human Microbiome Project Consortium*, 2012), por su impacto sobre la salud humana, o el microbioma de la biosfera terrestre “*Earth Microbiome Project*” (Gilbert *et al.*, 2014b; Blaser *et al.*, 2016). Gracias a la investigación de estas comunidades, será posible una mayor comprensión de las interacciones entre ellas y el medio al que están ligadas, así como, desarrollar modelos predictivos que anticipen su influencia (Larsen *et al.*, 2012). Todos estos conocimientos pueden ser aplicados para mejorar distintos parámetros en suelos y plantas de alto valor agrícola.

Más recientemente, se han desarrollado interesantes aplicaciones que utilizan de forma frecuente y eficaz la secuenciación masiva junto a los datos interpretados por la bioinformática (resolución de problemas biológicos mediante metodologías procedentes de la ciencia de la computación y la ingeniería informática (Backofen *et al.*, 2001). Entre las más conocidos, podemos citar las que analizan las interacciones entre el microbioma intestinal y su huésped (Rosenthal *et al.*, 2011), la relación entre las plantas y los microbiomas del suelo y de otras matrices de su entorno (agua, aire, herramientas y otros aspectos antrópicos) (Charles, 2010), o las interacciones entre bacterias y hongos en diversos procesos fermentativos de cultivos mixtos, como ejemplos de su utilidad en diferentes campos de investigación (Sieuwerts *et al.*, 2008). Dado el gran interés suscitado por el estudio del microbioma, se prevé un aumento del uso, el desarrollo y la evolución de estas técnicas en los próximos años y, a su vez, su disponibilidad será cada vez más asequible. Se presume que, debido al alto valor económico y social de los productos vitivinícolas, sean numerosos los trabajos que estén dirigidos hacia el estudio de los microorganismos presentes en el viñedo y en la bodega. En consecuencia, se podrán realizar estudios amplios y completos para poder comprender la distribución espacial de las comunidades microbianas y la forma en que los microorganismos inciden sobre el suelo, la planta y el vino elaborado (Burns *et al.*, 2015).

Actualmente, la mayoría de viticultores se basan en la suposición de que el suelo influye sobre la uva dando al vino una serie de cualidades únicas (Zarraonaindia *et al.*, 2015a). Esta tipicidad regional de los rasgos característicos organolépticos y de calidad del vino, es definida mediante el concepto de *terroir*, utilizado en la enología durante muchos años. El concepto de *terroir* engloba numerosos factores como la localización, el tipo de suelo, la variedad, el método de elaboración, etc. (Deloire *et al.*, 2003). Los rasgos

regionales sensoriales y la composición química del vino son detectables e identificables, pero, es difícil conocer cuáles son los factores con mayor impacto en las características y la calidad final del vino al no haberse establecido vínculos concluyentes entre las características organolépticas del vino y los factores regionales en estudios previos (Bokulich *et al.*, 2016). Los consumidores dan mucha importancia a la identidad y apreciación del *terroir* y, por lo tanto, al valor del vino. Cuantificar los factores que determinan el *terroir* es crucial para la preservación de la diversidad y la valoración de cada región vitivinícola y sus productos. Así como, la importancia de los microorganismos en las fases de elaboración en bodega ha sido ampliamente investigada, los microorganismos asociados al suelo no han recibido la misma atención, a pesar de que la diversidad de los microorganismos ligados al viñedo es mayor que los que intervienen en la elaboración del vino y tienen una notable influencia en el desarrollo, la producción y la sanidad de la planta y sus frutos, además, de una gran incidencia en las características sensoriales y en la tipicidad regional del vino (Belda *et al.*, 2017b). Por lo tanto, la mayoría de los autores de los trabajos consultados, con Bokulich *et al.*, (2013) como principales introductores, sugieren aplicar el término de **terroir microbiano** para ampliar el concepto de *terroir* con la microbiota asociada al viñedo.

Actualmente se conoce que el suelo es el medio natural con mayor riqueza y diversidad de los que existen en la Tierra y se estima que 1 gramo de tierra puede albergar más de 10 billones de microorganismos y miles de especies microbianas distintas (Delmont *et al.*, 2011). Desde que se le ha dado gran importancia a la biodiversidad, la mayoría de trabajos se han realizado en suelos de praderas y los pocos estudios realizados sobre los suelos de cultivos leñosos, como viñedos, no han tenido en cuenta el impacto sobre la biodiversidad en las distintas regiones, climatologías, añadas y prácticas de manejo (Corneo *et al.*, 2013). Por lo tanto, la realización de estudios sobre el microbioma y la biodiversidad del viñedo puede proveer de una estimable información para la vitivinicultura.

#### 4. OBJETIVOS

- Determinar el impacto de la utilización de estas nuevas técnicas moleculares en la descripción detallada de los microorganismos presentes en viñedo y bodega.
- Estudiar las comunidades microbianas y así obtener una mejor comprensión de las comunidades microbianas cuya influencia es tan importante en la viticultura y la enología.
- Resaltar y preservar el concepto de *terroir* ampliándolo con el término de *terroir* microbiano.
- Fomentar la conservación de la biodiversidad, dada su importancia, mediante prácticas más sostenibles conseguidas gracias a una mayor comprensión de los microorganismos y sus interacciones entre distintas especies.
- Describir la utilización de estas técnicas para identificar y cuantificar determinados microorganismos causantes de deterioro y de esta manera poder evitarlo.

#### 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de esta revisión se han utilizado distintos buscadores de información académica como Web of Knowledge, Dialnet y Springer Link, entre otros. Seleccionando esta información según el factor de impacto, la antigüedad y por último bajo criterio propio.

## 6. APORTACIONES DE LAS NUEVAS TÉCNICAS MOLECULARES METAGENÓMICA Y QPCR A LA VITICULTURA: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 6.1. APLICACIONES EN VITICULTURA

#### 6.1.1. DESCRIPCIÓN DEL MICROBIOMA DEL VIÑEDO

El componente microbiológico del suelo es de especial importancia dentro del ecosistema del viñedo. Los microorganismos son fundamentales para la existencia y la conservación de la vida en la Tierra (Turner *et al.*, 2013). Por lo tanto, comprender las interacciones que ocurren entre el suelo y la planta de los procesos biológicos adquiere gran importancia y resulta crucial para un correcto manejo del suelo y para conservar la calidad y tipicidad propia de cada región (Corneo *et al.*, 2013). De hecho, y aunque se trata de tecnologías muy recientes, ya se han llevado a cabo numerosos estudios utilizando tecnologías moleculares en distintas regiones vitivinícolas del Mundo: California (USA) (Burns *et al.*, 2015), Islas Azores (Drumonde-Neves *et al.*, 2017), Minho, Douro, Dão, Bairrada, Estremadura y Alentejo (Portugal) (Pinto *et al.*, 2015), Cabo Occidental (Sudáfrica) (Setati *et al.*, 2012), Chile Central (Jara *et al.*, 2016, Castañeda *et al.*, 2017), San Juan y Mendoza (Argentina) (Vega-Ávila *et al.*, 2014), Región de Trentino (Italia) (Corneo *et al.*, 2013), Priorat (Cataluña) (Wang *et al.*, 2015).

En estos estudios se demuestra que las comunidades microbianas no están asociadas al viñedo, la planta y la uva, de manera aleatoria respecto a los factores regional, varietal y climático ya que existen diferencias entre los géneros predominantes y las cualidades regionales y varietales. En consecuencia, existe una asociación entre la microbiota y los factores que engloban el concepto de *terroir*, por lo que algunos autores proponen ampliar este término e introducir el componente microbiológico bajo el término de *terroir* microbiano (Bokulich *et al.*, 2014, Gilbert *et al.*, 2014a, Burns *et al.*, 2015). De hecho, se ha demostrado que las condiciones ambientales y edáficas, junto con las prácticas culturales de cada zona son las responsables de dirigir la diversidad de las comunidades microbianas que se establecen en el viñedo (Bokulich *et al.*, 2014). Ya anteriormente, algunos autores habían observado patrones regionales de biodiversidad microbiana en la uva y el vino, mientras que otros autores, identificaron patrones regionales microbianos asociados al suelo y a las raíces (Pinto *et al.*, 2016).

Estos microorganismos presentes en el suelo determinan la salud y la producción de la planta y, en consecuencia, inciden sustancialmente sobre la composición y cualidades de la uva y el vino. Además, está bien documentado que algunos microorganismos presentes en el suelo se establecen en la superficie de la uva durante las etapas de maduración y en la vendimia y, por consiguiente, la superficie de la uva se convierte en reservorio de los microorganismos que se introducen en la bodega y que pueden tener influencia en las distintas etapas de elaboración (Setati *et al.*, 2012, Jara *et al.*, 2016). Así, de esta manera, la microbiota que llega a la bodega y acaba participando en los procesos fermentativos depende no sólo de la microbiota presente en la bodega, sino también de la microbiota del suelo (Belda *et al.*, 2017b). De esta forma, en las prácticas de elaboración tradicionales, con fermentaciones espontáneas, sin inoculación de levaduras ni bacterias, se considera que la síntesis de determinados metabolitos por parte de la microbiota autóctona define y potencia la tipicidad regional del producto (Bokulich *et al.*, 2014). En este contexto, el estudio de los microorganismos podría ser utilizado para definir patrones regionales en las características organolépticas del vino, así como mejorar el entendimiento del impacto del microbioma del viñedo en la producción vitícola y en las cualidades de la uva, más allá de las etapas de la fermentación, donde la actividad de los microorganismos es bien conocida. Por lo tanto,

la comunidad microbiana puede ser el factor más influyente que pueda distinguir un viñedo de otro y, en consecuencia, el vino producido y, de esta manera poder diferenciar el producto en el mercado internacional, en donde, actualmente, existe una competencia por el altísimo número de tipos y marcas de vino (Belda *et al.*, 2017b). Sin embargo, la influencia de los microorganismos en las características regionales aún requiere de un mayor número de estudios para la comprensión de estas interacciones y de su efecto sobre los productos finales (Bokulich *et al.*, 2016).

El microbioma de la planta se compone de distintos microorganismos que colonizan los diferentes órganos de la planta y que se encuentran en continua interacción con ella (Pinto *et al.*, 2016) y que son distintas dependiendo de la zona del viñedo u órgano de la vid en donde se realiza el estudio (suelo, raíz, tronco, hojas, frutos) (Figura 2). Cada órgano de la vid alberga una comunidad identificable y con una capacidad funcional diferenciable, derivadas del medio fisicoquímico, de las restricciones fisiológicas de cada órgano y de la competencia con otros microorganismos (Zarraonaindia *et al.*, 2015a). Las comunidades de microorganismos asociadas a la parte aérea de la planta están más expuestas a factores de estrés externos y a una menor disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, existen diferencias significativas en la estructura del microbioma entre la parte aérea y la subterránea de la planta (Pinto *et al.*, 2016). Sin embargo, todas estas comunidades están relacionadas entre sí, puesto que existen medios de transmisión de los microorganismos que colonizan los diferentes órganos de la vid, tanto por el interior, a través de la planta, como por el exterior. Incluso, existen grandes similitudes entre las comunidades microbianas del viñedo con las encontradas en plantas de zonas cercanas. Recientemente, Castañeda *et al.* (2017) demostraron que los microbiomas de viñedos en Chile y los bosques nativos que los rodean poseen patrones microbianos similares, de lo cual infieren que estos hábitats naturales cercanos a los viñedos puedan ser reservorios de microorganismos y podrían ayudar a proteger la tipicidad de la zona vitivinícola en el tiempo.

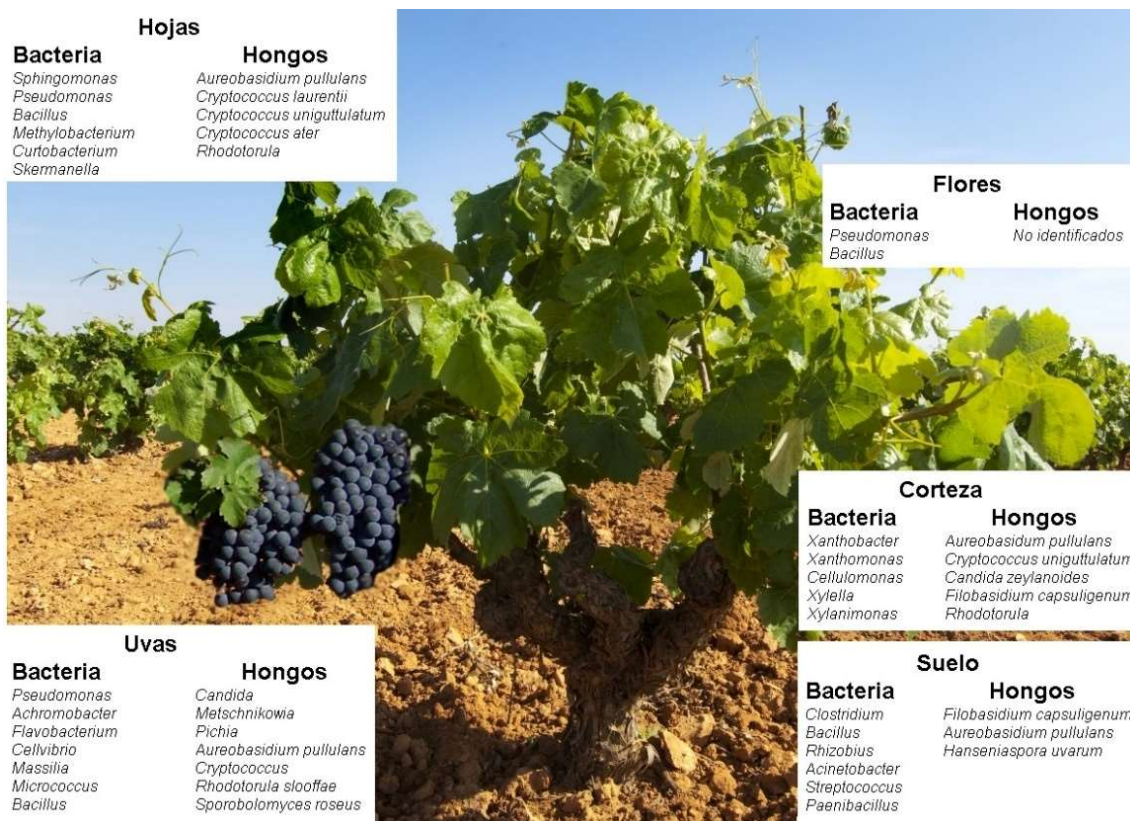


Fig. 2. Representación de bacterias y hongos características según su asociación en las diferentes partes de la planta. Modificado de Gilbert *et al.*, 2014a.

En cada región vitivinícola, existe un nexo relativamente estable entre los microorganismos presentes en mosto, bayas, planta y suelo. En hojas, flores y bayas existe menor diversidad que en el suelo y la zona de la raíz presenta menor diversidad que el suelo periférico (Zarraonaindia *et al.*, 2015a) (Figura 3). Todo esto indica, documentándose por primera vez, que el suelo es reservorio de la microbiota que coloniza las estructuras vegetativas de la vid y de la uva (Burns *et al.*, 2015) y, de hecho, las raíces pueden ser el origen primario de colonización y de transmisión de la microbiota a través de la planta (Gilbert *et al.*, 2014a).

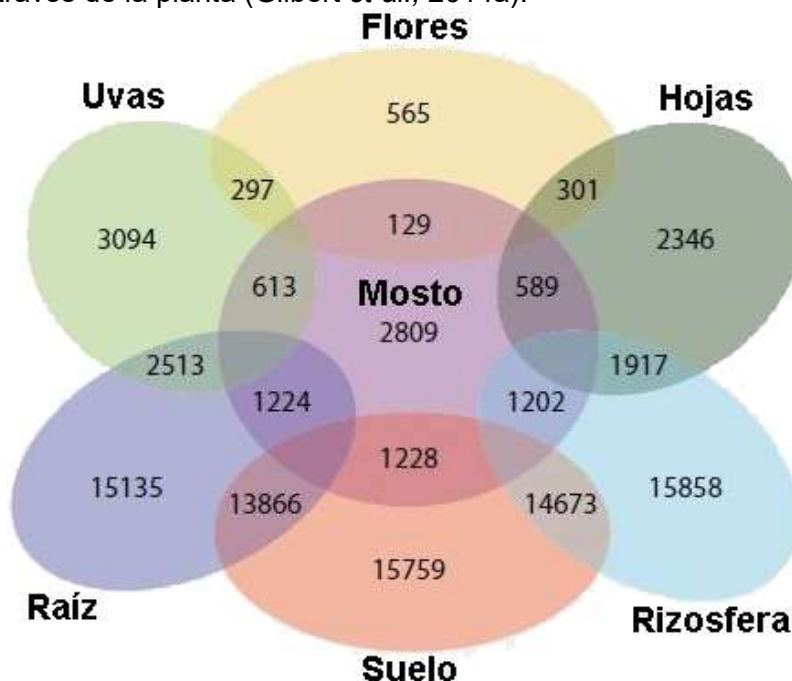


Fig. 3. Unidades taxonómicas operacionales (OTU) compartidas entre las distintas zonas del suelo y los órganos de la vid. (Tomado de Zarraonaindia *et al.*, 2015a)

### 6.1.2. FACTORES DE DIFERENCIACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MICROBIOMA

Las comunidades microbianas del suelo son dinámicas, como lo es la distribución del microbioma de la vid, que varía por diferentes factores biológicos, principalmente, genotipo, variedad, patrón, edad, profundidad de raíz, estado fenológico y estado de salud de la planta y por factores abióticos, como los geográficos, ambientales, edáficos, prácticas de manejo del suelo (Setati *et al.*, 2013, Vega-Ávila *et al.*, 2014, Zarraonaindia *et al.*, 2015a, Burns *et al.*, 2015, Bokulich *et al.*, 2016, Pinto *et al.*, 2016, Castañeda *et al.*, 2017). Estudios efectuados a gran escala, entre viñedos de una misma región, no demuestran gran variabilidad entre la biodiversidad y las condiciones climáticas (Liu *et al.*, 2017), lo que sugiere que los factores climáticos, edáficos y culturales seleccionan durante años un núcleo de comunidades microbianas relativamente constante, por lo que el viñedo es un nicho ecológico estable. Sin embargo, los cambios abióticos estacionales provocan ligeras variaciones en la composición del microbioma del viñedo en las distintas añadas (Corneo *et al.*, 2013).

La microbiota encontrada es diferente en los distintos años debido a las condiciones climatológicas de cada año, lo cual indica que existe relación entre las precipitaciones y la diversidad microbiana. La composición de la microbiota de las hojas es la que se ve más afectada por la temperatura y la humedad del suelo (Zarraonaindia *et al.*, 2015a). Resultados obtenidos en Chile, sugieren que la humedad relativa y las precipitaciones pueden afectar a la biodiversidad microbiana. De esta manera, se observa un incremento de levaduras no convencionales como *Metschnikowia* y *Hanseniaspora* y un

descenso en los géneros *Torulaspora*, *Saccharomyces* y *Meyerozyma* en uva en años lluviosos (Jara *et al.*, 2016). Sin embargo, el efecto de la lluvia sobre la estructura de las comunidades microbianas es controvertido: hay autores que han documentado mayor biodiversidad en años lluviosos por proliferación fúngica. No obstante, otros ensayos indican que es menor, si bien, esta disminución puede deberse al uso más intenso de pesticidas que reduce la biodiversidad. Estudios realizados sobre las comunidades microbianas en viñedos abandonados sugieren que la variabilidad de la biodiversidad respecto las precipitaciones tiene mayor relación con las condiciones climáticas que con el uso de pesticidas (Drumonde-Neves *et al.*, 2017), lo que sugiere que el uso de pesticidas podría no ser tan agresivo como se presume. Para documentar el efecto del uso continuado de pesticidas sobre el nicho microbiano en distintas añadas deben realizarse estudios sucesivos. Las variaciones estacionales de temperatura y humedad dependen del tipo de clima y aunque los microorganismos se adaptan a los cambios estacionales de temperatura, sin embargo, son más sensibles a las variaciones permanentes y estables de parámetros fisicoquímicos (Corneo *et al.*, 2013).

Los factores edáficos tienen una importante influencia sobre las comunidades microbianas, a través de distintos parámetros como la textura del suelo, el contenido de agua, el pH, la concentración de carbono y nitrógeno y la relación C:N, que afectan de manera significativa a la microbiota del suelo (Zarraonaindia *et al.*, 2015a). La altitud hace variar la composición microbiana, ya que la humedad del suelo, la concentración de Al, Mg, Mn y la cantidad de arcilla tienen relación directa con la altitud y estos parámetros tienen gran impacto sobre la supervivencia y adaptación de las distintas especies microbianas (Corneo *et al.*, 2013). Los factores edáficos y de localización geográfica que provocan variaciones significativas en la composición del microbioma del viñedo (Burns *et al.*, 2015).

Las comunidades microbianas de suelos no perturbados son más estables a lo largo de los cambios estacionales, lo que indica que los hábitats naturales son menos sensibles a los factores ambientales y a las perturbaciones humanas. Por lo tanto, las áreas próximas al viñedo también influyen en la composición del microbioma, puesto que ambos hábitats comparten un amplio número de microorganismos con más coincidencias en bacterias que en hongos (Castañeda *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha visto que la relación entre las estructuras microbianas de los suelos cultivados y los bosques puede depender del grado de perturbación. Por lo tanto, la información del microbioma de los hábitats naturales puede ser útil en la elección de un nuevo emplazamiento del viñedo o como reservorio natural para preservar la estructura y función de los ecosistemas originales que pueden perderse a lo largo del tiempo por el establecimiento del cultivo y las prácticas de manejo. (Castañeda *et al.*, 2017).

El microbioma de viñedos cercanos con características edáficas y condiciones climáticas similares puede ser distinto, ya que no solo le afectan las condiciones edáficas y climáticas, sino también distintos aspectos del manejo del viñedo. La variabilidad en la biodiversidad se produce por las distintas prácticas de manejo del suelo que tienen impacto sobre la composición diferencial de los sustratos del suelo que determinan el establecimiento de diferentes microorganismos y la diferente estructura del microbioma. En consecuencia, comprender su influencia puede ayudar a elegir adecuadamente el sistema de manejo del viñedo, no solo en lo referido al suelo, sino también al tipo de poda y al sistema de conducción de las plantas, que alteran el microclima, principalmente, de la hoja y el fruto. Por ejemplo, la intensidad de la radiación en ciertas zonas del viñedo aumenta la presencia de especies de levaduras pigmentadas como los géneros *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* y *Rhodosporidium* (Setati *et al.*, 2012). A su vez, el microclima afecta a la composición de las comunidades microbianas (Bokulich *et al.*, 2014, Setati *et al.*, 2012, Vega-Ávila *et al.*, 2014, Zarraonaindia *et al.*, 2015a).



El tipo de portainjerto incide sobre las comunidades microbianas de la zona de la raíz, debido a la resistencia demostrada de ciertos patrones sobre determinados microorganismos patógenos. De esta manera, el portainjerto selecciona los microorganismos de la zona del suelo cercana a la raíz (Zarraonaindia *et al.*, 2015a).

La variedad de uva también está relacionada con la diversidad microbiana presente en la superficie de la baya, probablemente debido a factores varietales como la composición de la uva o el grosor del hollejo, pero también a factores no varietales como el grado de madurez o la condición sanitaria de la planta. Por ejemplo, hay estudios sobre la variedad Zinfandel, cuya piel es fina y fácil de romper, en los que se muestra la gran abundancia de bacterias de los géneros *Gluconobacter*, *Lactobacillus* y de levaduras fermentativas como la especie *Candida zemplinina* en la superficie de la baya (Drumonde-Neves *et al.*, 2017). Estos autores asocian esta abundancia al enriquecimiento facilitado por la presencia de las uvas rotas, mostrando que la condición sanitaria influye en la composición de las comunidades microbianas de la superficie de la uva. También se ha demostrado que, por ejemplo, la presencia del hongo *Botrytis cinerea*, responsable de la podredumbre gris, penetra en el hollejo de la baya y libera nutrientes, lo que favorece el desarrollo de otros microorganismos como el género *Metschnikowia*. La proliferación de este género podría inhibir la presencia de otros microorganismos, ya que se ha observado que dicho género posee un mecanismo de secuestro de hierro necesario para su supervivencia (Liu *et al.*, 2017).

Por otra parte, muchos estudios han puesto en evidencia que la estructura de las comunidades microbianas es también muy sensible al tipo, número e intensidad de los distintos tratamientos y que los viñedos con menos tratamientos muestran mayor diversidad de sus microorganismos asociados (Tabla 2). Los suelos con prácticas de manejo biodinámicos, que cada vez tienen mayor interés para los viticultores, son los que muestran mayor biodiversidad, seguida de las prácticas ecológicas y, por último, las prácticas convencionales (Setati *et al.*, 2012, Vega-Ávila *et al.*, 2014).

Tabla 2. Índices de diversidad ecológica de las levaduras presentes en viñedo bajo prácticas convencionales (CONV), integradas (INT) y biodinámicas (BD). (Tomado de Setati *et al.*, 2012)

Viñedo	Índice de Shannon-Wiener
CONV	1.20
INT	1.45
BD	2.15

El índice Shannon-Wiener se utiliza en ecología para medir la biodiversidad específica.

El estudio de Setati *et al.*, en 2012 realizado en viñedos de Sudáfrica, utilizando la técnica de huella genética ARISA-PCR (*Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* - PCR), demostró que los suelos bajo prácticas biodinámicas tenían una biodiversidad única no observada anteriormente en viñedos bajo prácticas convencionales e integradas (Tabla 3). Se detectaron miembros de géneros como *Sporisodium*, *Meira* y *Exophiala* no asociados al cultivo vitícola con anterioridad. Además, se observaron microorganismos con potencial de biocontrol como *Rhodosporidium diobovatum*, *Meira gulakoningii* y *Cryptococcus laurentii*. La levadura *Meira gulakoningii* actúa eficazmente contra diferentes especies de ácaros como *Tetranychus cinnabarinus* y *Phyllocoptruta oleivora*. Además, las levaduras *Rhodosporidium diobovatum* y *Cryptococcus laurentii* tienen potencial contrastado como agentes de biocontrol (BCAs) contra el hongo *Botrytis cinerea*. En la actualidad, existen de forma comercial aislados de microorganismos que pueden inocularse para incrementar el desarrollo de las plantas o como agentes de biocontrol. Estos inóculos microbianos incluyen géneros de bacterias *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Streptomyces* y hongos *Candida*, *Trichoderma* y *Gliocladium* (Pinto *et al.*, 2016).

Tabla 3. Presencia y distribución porcentual de las levaduras asociadas a las uvas en prácticas convencionales (CONV), integradas (INT) y biodinámicas (BD). (Tomado de Setati *et al.*, 2012)

Nombre de especie	Porcentaje de distribución de levaduras		
	CONV	INT	BD
<i>Aureobasidium pullulans</i>	70.4	63.2	52.5
<i>Cryptococcus magnus</i>	9.2	7.9	6.6
<i>Cryptococcus carnescens</i>	2.0	2.6	3.3
<i>Cryptococcus oeirensis</i>	1.0	2.6	1.6
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	2.6	2.5
<i>Cryptococcus flavescens</i>	-	-	3.3
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	4.1	-	4.1
<i>Sporobolomyces roseus</i>	6.1	3.9	3.3
<i>Cryptococcus saitoi</i>	-	-	0.8
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	-	-	5.7
<i>Kazachstania</i> sp.	-	-	4.9
<i>Pichia caribbica</i>	-	-	1.6
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	1.6
<i>Meira geulakonigii</i>	-	-	1.6
<i>Exophiala</i> sp.	-	-	1.6
<i>Sporisorium</i> sp.	-	-	2.5
<i>Ustilago</i> sp.	-	-	2.5
<i>Candida</i> sp.	1.0	-	-
<i>Saccharomycete</i> sp.	1.0	-	-
<i>Bullera dendrophila</i>	3.1	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	7.9	-
<i>Cryptococcus randhawii</i>	-	2.6	-
<i>Issatchenkia terricola</i>	1.0	6.6	-
<i>Rhodotorula nothofagi</i>	1.0	-	-

Entre los factores que puedan explicar este incremento de la diversidad microbiana podríamos citar los siguientes: i) La adición de compost orgánico altera el microbioma del suelo. El compost, contiene una alta concentración de microorganismos implicados en la descomposición de la materia orgánica, lo cual incrementa directamente la microbiota del suelo al favorecer el establecimiento de nuevas especies de origen exógeno. También se ha apuntado la posibilidad de que dichas especies introducidas con el compost sirvan de reemplazo de las comunidades perdidas a lo largo del tiempo que llevase establecido el monocultivo de la vid (Vega-Ávila *et al.*, 2014). ii) La restricción de plaguicidas favorece la supervivencia de especies sensibles a dichos tratamientos, por lo cual se puede variar la composición del microbioma (Liu *et al.*, 2017). Concretamente el uso de fitosanitarios con base de cobre aumenta la presencia de microorganismos tolerantes al cobre como *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* (Corneo *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2016). A pesar de la importancia de estos trabajos tan recientes, el impacto real sobre el microbioma del viñedo y su efecto sobre su estado sanitario, así como sobre la calidad del final del vino producido está aún poco documentado. Por lo tanto, se siguen necesitando más trabajos de identificación de microorganismos con tecnologías moleculares en suelos ecológicos y biodinámicos, lo cual permitirá un mayor entendimiento sobre la incidencia del microbioma del viñedo, ya que hasta el momento se han realizado pocos estudios de este tipo (Setati *et al.*, 2012). Asimismo, sería muy conveniente llevar a cabo el análisis metagenómico del compost y los distintos preparados biodinámicos para comprobar si albergan algún tipo de microbiota diferenciable y significativa o de si sus componentes pueden modificar el microbioma del viñedo.

En consecuencia, comprender los mecanismos de dispersión y selección de la estructura de las comunidades microbianas y las interacciones de los microorganismos, tanto entre ellos como con la planta es de especial interés para el correcto



establecimiento y control del viñedo para mejorar el rendimiento y la sanidad de la planta (Bokulich *et al.*, 2014, Gilbert *et al.*, 2014a). Por otro lado, serviría para esclarecer cuáles de los factores indicados anteriormente tienen repercusión sobre los patrones microbianos. La manipulación de ciertos factores permite controlar las comunidades microbianas para aumentar las poblaciones beneficiosas para las plantas y/o para reducir las patógenas (Bokulich *et al.*, 2016).

### 6.1.3. INTERACCIÓN DEL MICROBIOMA CON LA PLANTA

La calidad y especificidad del suelo son determinadas por factores químicos y físicos (conocidos como factores abióticos) y por factores biológicos (o bióticos), constituidos por las comunidades microbianas que habitan en el viñedo. Dichas comunidades tienen un rol principal dentro de la movilización de los nutrientes del suelo a la planta y desempeñan un papel clave en la cadena alimentaria y conserva el equilibrio del ecosistema de la planta (Wardle, 2004, Pritchard, 2011).

El desarrollo y el rendimiento de la planta depende en enorme medida de las interacciones de la microbiota asociada al suelo y sobre todo de las comunidades microbianas asociadas a la raíz (Vega-Ávila *et al.*, 2014). El microbioma del viñedo tiene relación directa e indirecta con la planta y a su vez, la planta tiene relación directa con la composición de las comunidades microbianas a través de los exudados de las raíces que atraen a microorganismos y modulan la composición de las comunidades microbianas. Las raíces seleccionan microorganismos con funciones específicas y beneficiosas para la planta, como son favorecer la transmisión y atracción de bacterias hacia los exudados de la raíz, o activar genes relacionados con el metabolismo de los nutrientes y la tolerancia al estrés de las plantas, ya que existe una mayor abundancia de estos microorganismos en la rizosfera que en el suelo circundante (Zarraonaindia *et al.*, 2015a, Pinto *et al.*, 2016). Inclusive, las comunidades microbianas pueden contribuir en la estabilización y mineralización de la materia orgánica en el suelo (Burns *et al.*, 2015). El microbioma interactúa con la planta desde la transformación y disponibilidad de materia orgánica y los nutrientes esenciales presentes en el suelo, al expresar un conjunto de enzimas y metabolitos que son capaces de degradar los nutrientes que la planta tomará para su desarrollo (Wardle *et al.*, 2014, Pinto *et al.*, 2016, Castañeda *et al.*, 2017) (Figura 4). Además, interviene en procesos como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas y reduce el impacto de factores de estrés del medio, tanto bióticos como abióticos (sequías, presencia de contaminantes fitotóxicos, patógenos, etc.) (Setati *et al.*, 2012, Vega-Ávila *et al.*, 2014, Zarraonaindia *et al.*, 2015b, Pinto *et al.*, 2016). Mantener un microbioma equilibrado previene el desarrollo y actividad de microorganismos patógenos al entrar en competencia directa por el espacio y los nutrientes, como enemigos naturales, con fenómenos de antibiosis contra fitopatógenos, la producción de enzimas hidrolíticas, la inhibición de enzimas y/o toxinas y por la inducción de mecanismos de defensa sistémicos producidos por la propia planta (Pinto *et al.*, 2014, Gilbert *et al.*, 2014a, Zarraonaindia *et al.*, 2015a).

Aunque el uso de hongos micorrízicos rebasa el objetivo de esta revisión, numerosos estudios detallan las grandes ventajas de la asociación de estos hongos con la raíz de la planta, como el incremento de la absorción de nutrientes, por lo que se reduce la necesidad de fertilizantes, el aumento de la tolerancia a suelos calcáreos, a la salinidad y a los metales pesados, la protección contra factores de estrés bióticos y abióticos, el incremento de la estabilidad del suelo, etc. (Trouvelot *et al.*, 2015). Por consiguiente, identificar y cuantificar estos hongos de forma rápida y precisa también adquiere gran importancia, para estudiar las formas de su establecimiento según las propiedades fisicoquímicas del suelo y la microbiota existente (Holland *et al.*, 2014) o la aplicación de prácticas, como el caso del uso de riego deficitario que fomenta la colonización de hongos micorrízicos (Schreiner *et al.*, 2007).

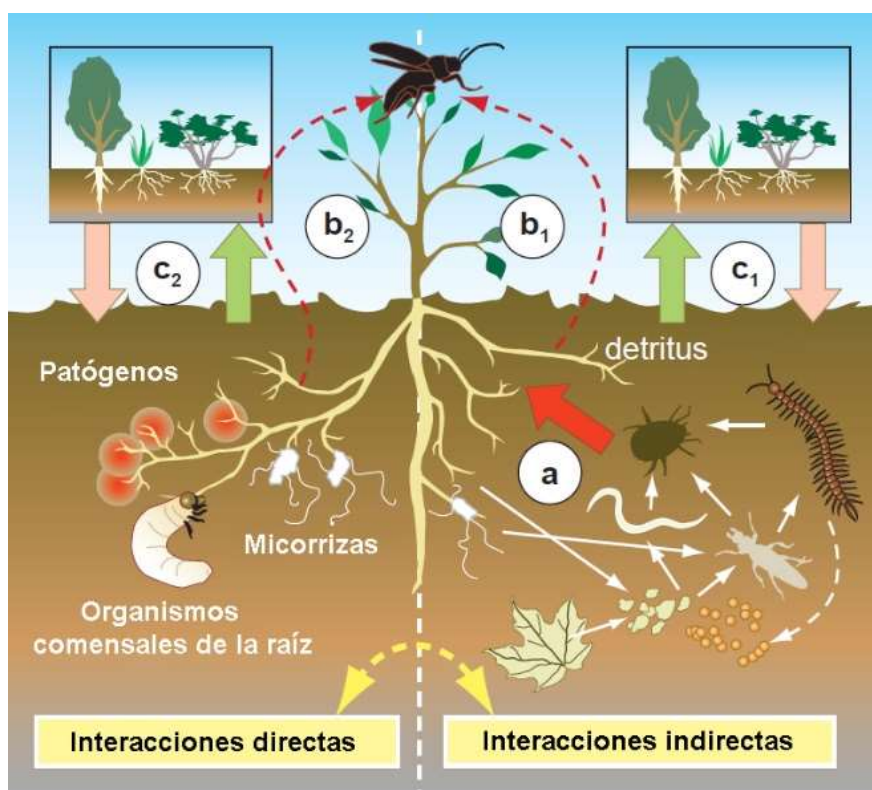


Fig. 4. Interacciones entre comunidades y planta en la rizosfera. (Derecha) Las actividades de los organismos estimula la adquisición de nutrientes (a) y el desarrollo de la planta. (Izquierda) La biota del suelo incide de forma directa sobre las raíces y en las interacciones antagonistas o mutualistas con la planta huésped. Estas relaciones influyen en el rendimiento de la propia planta y en los organismos (b1 y b2). Además, el suelo puede controlar el desarrollo de las comunidades vegetales directa (c2) y/o indirectamente (c1). Todos estos cambios en la comunidad vegetal influyen a su vez en los organismos del suelo. (Modificado de Wardle *et al.*, 2004)

Estos microorganismos asociados a la planta pueden ser beneficiosos, neutros o patógenos, lo que ha llevado a describir tres tipos de interacciones entre ellos: i) Patogenicidad: los microorganismos provocan enfermedad y debilitamiento, puesto que la planta se desvía de su fisiología normal. ii) Simbiosis: los microorganismos resultan beneficiosos o neutros, se produce una estimulación en el desarrollo de la planta al aumentar la disponibilidad de nutrientes, por ejemplo, a través de la síntesis de sideróforos que facilita la absorción de hierro, la solubilización de fósforo, la fijación de nitrógeno atmosférico, la inducción de hormonas, la mejora de la estructura del suelo al formar agregados, el fomento de mecanismos de resistencia sistémicos y la protección frente a factores abióticos estresantes. Por último, iii) Competencia entre microorganismos beneficiosos y patógenos, por efecto antagonista mediante competencia directa por el espacio y los nutrientes, inhibición del crecimiento y desarrollo de los patógenos, producción de metabolitos antibióticos, enzimas líticas y sideróforos (aerobactina, enterobactina y pioverdina). Algunos de estos microorganismos pueden ser utilizados por sus funciones antibióticas y fitoprotectoras como agentes de biocontrol (BCAs), promotores de desarrollo de la planta o biofertilizantes. Incluso, el desarrollo de fármacos contra enfermedades no solamente de especies vegetales (Zarraonaindia *et al.*, 2015b, Pinto *et al.*, 2016).

Además de tener un alto impacto sobre el desarrollo y salud de la planta, muchos microorganismos presentes en el suelo y en los distintos órganos y tejidos de la vid llegan a establecerse en la uva de diversas maneras, ya sea por la acción del viento, por las salpicaduras de las gotas de lluvia, los insectos y otros animales o por la actividad humana durante la vendimia (contacto de las cajas de vendimia con el suelo,

levantamiento de polvo del suelo por el paso de maquinaria, etc.). De esta manera, parte de la microbiota del suelo estaría presente en el mosto ya dentro de la bodega y podría actuar en las primeras fases de fermentación incidiendo de forma importante en las características sensoriales del producto (Zarraonaindia *et al.*, 2015b).

Para conocer mejor el papel que desempeñan los distintos microorganismos sobre la planta y comprender mejor las distintas formas de transmisión de los microorganismos a través de la planta y su establecimiento en los distintos órganos de la vid, es conveniente distinguir entre colonización por endófitos (presentes en los tejidos internos de la planta) y por epífitos (si se encuentran en la superficie de la planta). Los géneros *Rhizobium*, *Staphylococcus* y *Agrobacterium* spp., se observan en uvas y hojas, aunque, no se encuentran en la superficie de los mismos órganos, lo que sugiere que se movilizan desde la raíz a las partes aéreas a través de los vasos del xilema o por los espacios intercelulares de la planta. Por otro lado, hay especies presentes en el suelo y en las partes aéreas de las plantas, pero no en el interior de estos órganos (microorganismos epífitos). Por lo tanto, se sugiere que la proximidad entre el suelo y las partes aéreas de la vid puede facilitar la movilización microbiana gracias a la lluvia, el viento, los insectos, etc. Por último, es importante resaltar que algunas especies, a *priori* consideradas endófitas pueden colonizar tejidos superficiales, así como especies epífitas pueden penetrar los tejidos de la planta a través de heridas y aperturas naturales de la planta y actuar como endófitas (Zarraonaindia *et al.*, 2015a).

No se comprende del todo cómo los microorganismos influyen en la salud y en el desarrollo de la planta. De hecho, el pensamiento general supone erróneamente que todos los endófitos son patógenos de las plantas, ya que algunos estudios indican que pueden tener acción benéfica o neutra (Pinto *et al.*, 2016). Sin embargo, aún es desconocida la función y los efectos de numerosos microorganismos sobre el resto de comunidades microbianas y sobre la planta, porque eran desconocidos o simplemente no se han estudiado. Por lo tanto, es necesario profundizar en la investigación (Vega-Ávila *et al.*, 2014) e identificar y cuantificar los microorganismos asociados a la vid y correlacionar sus influencias sobre la planta y determinar su causa-efecto, lo que ayudará a eliminar ideas preconcebidas sobre la incidencia negativa de los microorganismos. Mediante las técnicas de qPCR y secuenciación masiva es posible una mejor detección de la presencia y concentración de los géneros, las especies y las cepas de los distintos microorganismos. Así, se ha sabido que algunos microorganismos del suelo pueden ser redundantes, ya que muchos microorganismos pueden realizar la misma función y que ciertos otros pueden tener funciones diferentes según el hábitat en el que se encuentren (Castañeda *et al.*, 2017). Para documentarlo sería necesaria la secuenciación genómica de cada microorganismo, lo cual permitiría aprovechar su potencial biotecnológico e identificar los genes con funciones beneficiosas y específicas (Pinto *et al.*, 2016). No obstante, para establecer la relación causa-efecto entre la presencia/ausencia o cantidades relativas críticas de los distintos microorganismos sobre los distintos aspectos de calidad, producción o sanidad del viñedo, se requerirá el uso de ciencias complementarias aún muy poco utilizadas en viticultura y enología como la genómica comparada, la transcriptómica, la proteómica o la metabolómica.

Para aprovechar mejor el microbioma del viñedo, es necesario trabajar en los siguientes puntos: i) Comprensión de las características asociadas entre la microbiota y el viñedo. ii) Entendimiento de las funciones de las comunidades microbianas. Y, por último, iii) Analizar los genomas y elementos reguladores asociados a cada microorganismo en el contexto de sus interacciones con la planta y en las fases fermentativas de elaboración de vino (Gilbert *et al.*, 2014a). La utilización de tecnologías moleculares de secuenciación masiva para evaluar el microbioma junto con el análisis de los datos obtenidos mediante herramientas bioinformáticas, puede permitir comprender las características del microbioma y explotar su potencial.

#### 6.1.4. APLICACIONES EMERGENTES A PARTIR DEL CONOCIMIENTO DEL MICROBIOMA

Como se ha recogido en párrafos anteriores, los microorganismos del viñedo con conocidas interacciones beneficiosas para la planta podrían utilizarse para incrementar o modificar el rendimiento de la planta, la calidad de los frutos y el vino producido. Del mismo modo, los microorganismos que afectan negativamente de alguna forma a la planta o a la calidad de uva y vino, podrían ser controlados por factores bióticos o mediante prácticas de manejo y conseguir estrategias de cultivo más sostenibles que permitieran preservar la tierra para el cultivo de la vid y todo ello en un ecosistema microbiológico equilibrado (Burns *et al.*, 2015, Pinto *et al.*, 2016).

Existen determinadas especies de conocida influencia positiva en distintas interacciones que nos pueden servir de ejemplo. Algunas especies de los géneros *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, que colonizan la parte aérea de la vid pueden influir en la supresión de determinadas enfermedades y en la protección contra el estrés hídrico, *Methylobacterium*, en hojas y bayas, estimulan el desarrollo de la planta ya que induce a la producción de fitohormonas. El género *Steirobacter*, presente con mayor abundancia en la zona de la raíz que en el suelo circundante, sintetiza brassinosteroides con influencia importante puesto que controlan la germinación de las semillas, el desarrollo de la raíz y el tallo, la diferenciación vascular e induce a mecanismos de protección contra estrés. Y el género *Bradyrhizobium*, en la zona de la raíz, puede fomentar la fijación de nitrógeno atmosférico y la producción de antibióticos, para un incremento en el crecimiento de la planta y el control de enfermedades (Zarraonaindia *et al.*, 2015a).

La viticultura ha sido el sector agrícola en el que el uso de plaguicidas y fungicidas ha sido más intensivo. Para reducir los riesgos y efectos del uso de plaguicidas en la salud humana y en el medio ambiente, se han creado una serie de normativas, como la Directiva 2009/128/CE para el fomento de la gestión integrada de plagas (GIP) y diversos planteamientos o técnicas alternativas, como el uso de sustancias no químicas de síntesis en los plaguicidas. Una alternativa válida puede ser el uso de microorganismos fitoprotectores como agentes de control biológico (BCAs) o sus compuestos bioactivos, con menor riesgo para la salud de los seres humanos (Pinto *et al.*, 2016). Como ejemplo de microorganismos fitoprotectores, *Pantoea agglomerans* presente en el xilema de la vid, puede utilizarse como BCA contra *Erwinia amylovora* que provoca manchas en manzanas (Pinto *et al.*, 2016). Determinadas cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum*, que son detectadas y cuantificadas mediante qPCR de manera fácil, rápida y eficaz, ha demostrado su utilidad para el control de hongos patógenos, como *Botrytis cinerea*, entre otros (Rotolo *et al.*, 2016).

El uso de BCAs está autorizado para el control de plagas convencional e integrado en Europa (Berg *et al.*, 2006). Aunque, existen barreras significativas para la entrada de BCAs en el mercado, debido a las evaluaciones de riesgo, que es un procedimiento largo y costoso. Por ello, se pueden describir dichos riesgos de patogenicidad y la regulación de estos BCAs fácilmente con NGS (Pinto *et al.*, 2016).

Otro factor a tener en cuenta, es la reticencia de la industria vitivinícola sobre la utilización de organismos genéticamente modificados (OGM) o directamente su prohibición en algunos países, reduciendo o evitando la necesidad de mejora genética de la vid y las posibilidades de desarrollar viñas transgénicas. Por lo tanto, es un factor interesante el aprovechamiento del componente microbiológico asociado al suelo y/o a la planta para mejorar las propiedades de los cultivos y las características organolépticas del vino, ante la negativa al uso de la modificación genética (Zarraonaindia *et al.*, 2015b).

Se acepta que la vitalidad de las plantas depende en gran medida del equilibrio del ecosistema microbiano (Pinto *et al.*, 2014). Preservar la diversidad microbiana del suelo es vital para mantener un ecosistema agroecológico equilibrado, especialmente por la intensificación agrícola actual. Por lo tanto, la protección y conservación de la biodiversidad del suelo es importante tanto económicamente como ecológicamente (Corneo *et al.*, 2013). Son necesarias nuevas estrategias de control y manejo agroecológicas y sostenibles para recuperar la biodiversidad perdida por la explotación masiva de los recursos agrícolas y forestales y mantener las funciones de los ecosistemas asociados con los hábitats naturales cercanos (Castañeda *et al.*, 2017). Desentrañar el potencial del microbioma y sus interacciones con los cultivos es un reto actual que puede permitir el desarrollo de nuevas aplicaciones tecnológicas para el incremento de la productividad agrícola de forma sostenible (Pinto *et al.*, 2016). El *terroir* microbiano es un elemento diferenciador regional de las cualidades de los productos elaborados. El valor económico proporcionado por esa identidad regional puede ser un incentivo para la preservación de la biodiversidad de los suelos (Bokulich *et al.*, 2016).

Mediante la enorme cantidad de datos que se pueden obtener utilizando las técnicas de secuenciación masiva y su interpretación mediante la bioinformática, se podrían estudiar las relaciones entre el microbioma y las propiedades del *terroir*.

Una de las primeras aplicaciones para la detección e identificación de los microorganismos presentes en el viñedo es la desarrollada por la empresa BiomeMakers ®. Para la puesta en desarrollo y la puesta a punto de la aplicación, se utilizó la secuenciación masiva sobre más de 1.500 muestras de 40 bodegas pertenecientes a 14 países distintos. Con herramientas bioinformáticas se crearon algoritmos para implementar, comparar e interpretar los datos obtenidos. Con todo ello, surge el proyecto WineSeq ®, que permite conocer la composición del microbioma de cada viñedo y comparar los resultados en una creciente base de datos para conocer el estado de salud de un viñedo y su tipicidad respecto a otros viñedos de su entorno (Belda *et al.*, 2016). Con aplicaciones de este tipo se pueden manejar los cultivos con gran efectividad y permite al viticultor controlar y predecir una serie de inconvenientes provocados por factores abióticos que pueden derivar en malas cosechas (Zarraonaindia *et al.*, 2015b). Conocer la composición microbiana del viñedo y sus características funcionales nos permite aprovechar las ventajas enumeradas en esta revisión.

## 6.2. USO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS

La detección temprana de microorganismos perjudiciales para la salud de la planta o que puedan entrar en bodega y provocar alteraciones en el vino es de gran importancia. La aplicación de tecnologías moleculares para la detección e identificación de microorganismos patógenos tiene gran interés para los viticultores por la aparición de enfermedades en distintos cultivos que pueden ser inesperadas y que producen graves daños sobre la planta. Determinados microorganismos merman notablemente el rendimiento de la planta e incluso pueden provocar su muerte. Estas afecciones son conocidas como Enfermedades Infecciosas Emergentes (DIE) por sus siglas en inglés. Definir y comprender los factores que componen el triángulo de la enfermedad pueden ayudar en los posibles tratamientos o a evitar que se propague. Estos factores son: i) Susceptibilidad de la planta, ii) virulencia del patógeno y iii) ambiente favorable (Pinto *et al.*, 2016). La propagación de dichas enfermedades depende de la existencia de vectores eficaces de diseminación y está condicionada por factores climáticos y ambientales. Esos factores climáticos y ambientales, las prácticas de manejo del suelo intensivas y la introducción de material vegetal tienen influencia en la estabilidad del microbioma (Pinto *et al.*, 2014), pudiendo aumentar la presencia de patógenos e incluso

provocar la aparición de patógenos resistentes a nuevos hábitats (Morse, 1995). A la propagación de enfermedades por distintos medios, hay que incluir la aparición de modificaciones del genoma de los microorganismos patógenos (mutaciones) que pueden cambiar el fenotipo aumentando la virulencia del patógeno o dando lugar a nuevos fenotipos patógenos (Pinto *et al.*, 2016).

La enfermedad de Pierce es causada por la bacteria *Xylella fastidiosa*. Este microorganismo es uno de los patógenos emergentes de mayor preocupación a nivel mundial y en un amplio número de cultivos. Esta enfermedad provoca el secado de hojas y frutos e incluso conduce a la muerte de la planta debido a que se obstruyen los vasos del xilema. Es originaria del continente americano y se propaga por el insecto *Philaenus spumarius* frecuente en olivos y que actúa como vector (Hopkins *et al.*, 2002). Se encuentra en Europa, habiéndose documentado por primera vez en la región de Puglia (Italia) e incluyendo una subespecie que se detectó en plantas ornamentales al sur de Francia. En este caso en concreto, no se dispone de control o tratamiento. Sin embargo, se puede detectar mediante técnicas moleculares basadas en PCR (Minsavage *et al.*, 1994) y más recientemente, por PCR en tiempo real (Schaad *et al.*, 2002), lo cual permite evitar su diseminación, así como conocer y comprender el microbioma de la planta y sus interacciones para un mejor conocimiento de la incidencia del patógeno sobre la planta. Estos conocimientos pueden ser utilizados para el desarrollo de pruebas de diagnóstico rápidas y para el control y tratamiento de enfermedades (Pinto *et al.*, 2016) y constituyen un buen ejemplo de la importancia de detectar y controlar a estos microorganismos patógenos.

El análisis de microorganismos en los tejidos leñosos de la vid puede ser útil para el control de enfermedades de la madera creciente incidencia y que causan preocupación para los viticultores. Enfermedades de la madera como la eutipiosis, la yesca, la enfermedad de Petri, el *Black dead arm*, la *Diplodia cane dieback*, el pie negro y la excoriosis, entre otras están causados por diversos microorganismos patógenos (Martín *et al.*, 2005), cuyo diagnóstico es difícil y en ocasiones no concluyente, debido a la complejidad de sus signos. Actualmente, no existen tratamientos efectivos para controlar estas enfermedades (Pinto *et al.*, 2016). Por lo tanto, es importante entender la estructura de las comunidades microbianas asociadas a estas enfermedades, así como la influencia de determinadas condiciones climáticas sobre ellas, para diseñar estrategias preventivas o acciones para controlar las enfermedades, sobre todo en sus momentos más críticos (Belda *et al.*, 2017b).

La identificación y cuantificación de microorganismos causantes de enfermedades permite crear modelos predictivos mediante el estudio de sus interacciones con la planta y la respuesta a determinados factores climáticos o de prácticas de manejo. Son frecuentes las enfermedades provocadas por los hongos *Erysiphe necator* (oidio), *Botrytis cinerea* (podredumbre gris) y la protista *Plasmopara viticola* (mildiu). En el caso de *Botrytis cinerea*, el uso de qPCR permite la detección y cuantificación de sus esporas de forma rápida y precisa (Diguta *et al.*, 2010).

Otros ejemplos de identificación de microorganismos patógenos mediante técnicas moleculares, como el desarrollado para detectar la bacteria *Xylophilus ampelinus* causante de la enfermedad Necrosis bacteriana de la vid con qPCR, en detrimento de métodos tradicionales de cultivo, ya que, crece muy lentamente en medios de cultivo (forma colonias visibles entre 6-10 días), no existe un medio selectivo disponible y su aislamiento en medios de cultivo solamente es posible con concentraciones donde ya se muestran signos de la enfermedad en el material vegetal. Por lo tanto, el uso de qPCR es más adecuado por su rapidez y eficacia (Dreo *et al.*, 2006).

La técnica qPCR es aplicada para la detección y cuantificación de microorganismos resistentes a determinados fungicidas (Bäumler *et al.*, 2003, Luo *et al.*, 2007, Schwarz *et al.*, 2004, Baudoin *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2008). Se aplica qPCR para la cuantificación del alelo resistente a triazoles (Qol) en *Blumeria graminis* (Mildiu del trigo) (Fraaije *et al.*, 2002), en *Plasmopara viticola* (Mildiu) (Toffolatti *et al.*, 2007) y *Erysiphe necator* (Oídio) (Baudoin *et al.*, 2008). Además, se utiliza qPCR para cuantificar poblaciones de *Blumeria graminis* resistentes a fungicidas DMI (Yan *et al.*, 2009). En el caso de *Erysiphe necator* se observan dos grupos genéticos distintos, A y B. El grupo A es más agresivo en términos de periodo de latencia, diámetro de la lesión y número de esporas. El grupo B tiene mayor radio de germinación y eficiencia en la infección. Además, cada grupo puede albergar poblaciones resistentes a determinados fungicidas. El método por qPCR resulta rápido y sensitivo para identificar y cuantificar cada grupo genético de *Erysiphe necator* (Dufour *et al.*, 2011). La identificación detallada de ciertos microorganismos perjudiciales permitiría un uso más eficaz de las estrategias de control para evitar la proliferación de los microorganismos resistentes a los fungicidas utilizados o medir la eficacia para el desarrollo de nuevos métodos de control.

También, se ha demostrado la utilidad de la identificación de diferentes virus patógenos gracias al uso de secuenciación masiva en tejidos de diferentes órganos de la vid en las regiones productoras de vino de Bohemia y Moravia en la República Checa (Eichmeier *et al.*, 2016). Así como, la detección y cuantificación del Virus del entrenudo corto mediante RT-qPCR (*Reverse Transcription* qPCR) de manera más rápida y precisa en comparación con el test ELISA (Čepin *et al.*, 2010).

### 6. 3. APLICACIONES EN ENOLOGÍA

En el apartado anterior se ha descrito la importancia del microbioma y de sus interacciones con la planta. Sin embargo, el mosto de uva y el vino forman un ecosistema microbiano complejo formado por diferentes especies y cepas de microorganismos que interactúan entre ellos y que poseen diversas funciones (Barata *et al.*, 2012). Por consiguiente, el vino, además de por su valor económico y social, resulta un modelo interesante para el estudio dinámico de las interacciones microbianas (Liu *et al.*, 2017).

Tradicionalmente, se comprende que el vino es producido por la fermentación espontánea de los azúcares de la uva por parte de las levaduras presentes en el mosto, cuyo origen se encuentra en la superficie de la uva y/o en las instalaciones o equipamiento de la bodega. La fermentación alcohólica ocurre de forma secuencial por la actividad de distintas especies de levaduras y el proceso de fermentación maloláctica por efecto de las bacterias ácido lácticas. La especie *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura cuya actividad es mayoritaria en la fermentación alcohólica. Sin embargo, otras especies de levaduras de tipo no-*Saccharomyces* intervienen activamente en las fases iniciales de la fermentación: especies como *Hanseniaspora uvarum* (y su forma anamorfa *Kloeckera apiculata*), así como levaduras de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* y *Torulaspota*, han sido identificadas en las fases iniciales de la fermentación (Salinas *et al.*, 2009, Drumonde-Neves *et al.*, 2017), entre otras especies.

Algunas de estas especies de levaduras no-*Saccharomyces* están disponibles comercialmente en la actualidad para su inoculación o coinoculación con *S. cerevisiae* (Bokulich *et al.*, 2014). Cepas de *Torulaspota delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* y preparados mixtos junto a *Saccharomyces cerevisiae* se pueden encontrar en distintas casas comerciales. Como ejemplo, *T. delbrueckii* genera aromas de fruta pasificada y caramelos cuando domina la fermentación y aromas de fruta fresca exótica en asociación con *S. cerevisiae* (Velázquez *et al.*, 2015).

El origen exacto de *Saccharomyces cerevisiae* es controvertido, ya que algunos autores consideran que proviene de las comunidades presentes en la bodega, aunque, en estudios más recientes se observan cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en suelos y en la superficie de la uva, pero, de manera minoritaria con respecto a otras especies de levaduras (Valero *et al.*, 2007, Setati *et al.*, 2012). La mayoría de bodegas utilizan preparados secos activos de cepas seleccionadas de *S. cerevisiae* como iniciadores de fermentación, para dirigir las fermentaciones y asegurar que sean rápidas, además, de evitar el riesgo de fermentaciones lentas o paradas fermentativas y que ciertos microorganismos indeseados intervengan. Se ha realizado un gran trabajo en la selección de cepas de *S. cerevisiae* cuyas fermentaciones aseguraban una serie de características organolépticas. Últimamente, existe un creciente interés en las fermentaciones espontáneas con cepas autóctonas de *S. cerevisiae* junto con especies no-*Saccharomyces*, para preservar la biodiversidad y tipicidad regional del vino. De esta manera, se obtienen unas claras características diferenciadoras dentro del mercado (Valero *et al.*, 2007). Por el gran interés que despierta el uso de cepas autóctonas, pueden existir dudas del origen exacto de la cepa de *S. cerevisiae* que se impone en la fermentación, por lo que determinar si la cepa dominante es realmente autóctona o procede de preparados comerciales utilizados en años anteriores (este supuesto es válido de forma contraria, que sea una cepa autóctona la que prevalece en lugar de la cepa comercial inoculada). Por consiguiente, identificar a nivel de cepa para conocer la levadura que domina la fermentación tiene un gran interés para de la industria enológica. Aunque, tradicionalmente la caracterización de las distintas cepas de levaduras, a lo largo de la fermentación se ha llevado a cabo mediante RFLPs (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción) sobre el ADN mitocondrial de las levaduras (Querol *et al.*, 1992) o sobre la región ITS del ADN ribosomal (Guillamón *et al.*, 1998). Las distintas técnicas basadas en PCR y en qPCR, si es necesaria también la cuantificación, permiten diferenciar microorganismos a nivel de cepa de forma rápida, específica y sensible (Palacios *et al.*, 2009).

Las diversas interacciones positivas o negativas entre los diferentes microorganismos, se pueden clasificar en i) interacciones directas, en las que existe contacto físico entre los microorganismos, como en los fenómenos de depredación, parasitismo, simbiosis o inhibición, y ii) interacciones indirectas, que se producen como consecuencia de la presencia de metabolitos extracelulares y que incluyen el neutralismo, el mutualismo, el comensalismo, el amensalismo y la competencia (Liu *et al.*, 2017) (Tabla 4).

Tabla 4. Representación esquemática de las interacciones indirectas entre microorganismos (Tomado y modificado de Liu *et al.*, 2017)

<b>Interacciones indirectas</b> (No existe contacto físico entre microorganismos)	
<b>Las interacciones afectan a ambos microorganismos</b>	<b>Las interacciones afectan solamente a uno de los dos microorganismos</b>
<b>(+) Mutualismo:</b> La coexistencia es rentable para ambos microorganismos	<b>(+) Comensalismo:</b> Una de los microorganismos ve potenciado su desarrollo por la presencia de otro
<b>(-) Competición:</b> Ambos microorganismos ven afectado su desarrollo por la coexistencia	<b>(-) Amensalismo:</b> La coexistencia restringe el desarrollo de uno de los microorganismos

El ejemplo más claro de interacción negativa por amensalismo es el efecto *killer*, por el que algunas especies de levaduras sintetizan compuestos antimicrobianos proteicos que inhiben el desarrollo de otras levaduras. Identificar cepas de levaduras que tengan estos efectos sobre otras levaduras puede resultar útil tanto para su aprovechamiento, cuando los metabolitos resultan beneficiosos para el proceso fermentativo, como para su prevención, en el caso de que resulten indeseables (Bokulich *et al.*, 2016). Por



ejemplo, cepas de *Metschnikowia pulcherrima* tiene acción antibiótica contra algunas levaduras no-*Saccharomyces* (Oro *et al.*, 2014) y se han encontrado cepas de las especies *Kluyveromyces wickerhamii*, *Pichia anomala*, *Candida pyralidae* que tienen efecto *killer* sobre *Brettanomyces/Dekkera* (Mehlomakulu *et al.*, 2014). Mediante qPCR se pueden detectar e identificar levaduras con efecto *killer* e incluso cuantificarlas en poblaciones mixtas de levaduras. Igualmente, se puede determinar la presencia y/o frecuencia del gen ligado al efecto *killer* que sintetiza las proteínas antimicrobianas (Quintero *et al.*, 2016).

Además, pueden darse distintas interacciones positivas, como fenómenos de comensalismo que se producen entre *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces* al disponer la primera de nutrientes para su desarrollo provenientes de la muerte temprana de las levaduras no-*Saccharomyces* en las primeras etapas de la fermentación. Se conoce que la presencia de levaduras no-*Saccharomyces* junto a *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación puede dar lugar a menores concentraciones de etanol y aumentar la síntesis de terpenos, ésteres, tioles, alcoholes superiores, glicerol, acetaldehído, ácido acético y ácido succínico. Por otro lado, las levaduras no-*Saccharomyces* son capaces de producir enzimas con acción glicosidasa para la liberación de compuestos aromáticos (Liu *et al.*, 2017, Jara *et al.*, 2016).

Las propiedades químicas y sensoriales del vino dependen de la síntesis de diversos metabolitos que se encuentran en el producto final en distintas concentraciones (Bokulich *et al.*, 2016). En fermentaciones espontáneas, los metabolitos se liberan durante la actividad fermentativa de las especies no-*Saccharomyces* junto a *Saccharomyces cerevisiae* que aparecen en el vino de forma secuencial. Así, la complejidad de las cualidades organolépticas del vino deriva de la actividad metabólica tanto de las levaduras (Setati *et al.*, 2012, Belda *et al.*, 2016, Drumonde-Neves *et al.*, 2017), como de bacterias ácido lácticas (BAL) durante la fermentación maloláctica (FML) (Mesas *et al.*, 2010, Sebastian *et al.*, 2011).

El enólogo debe decidir en función de la complejidad sensorial que se desee, eligiendo fermentaciones espontáneas o a la seguridad que implica el uso de microorganismos seleccionados en fermentaciones dirigidas. Para el enólogo es importante un control exhaustivo de los microorganismos presentes y los metabolitos que pueden generarse. De esta forma, se logra la seguridad de una fermentación dirigida con los beneficios de la complejidad aromática de una fermentación espontánea (Belda *et al.*, 2016). Anteriormente, dichos controles se realizaban mediante métodos convencionales de cultivo, pero requieren de varios días para obtener resultados interpretables, por consiguiente, la toma de decisiones por parte del enólogo se retrasaba considerablemente (Hierro *et al.*, 2006). La técnica qPCR posibilita la obtención de resultados rápidos, específicos y sensibles, que permitan al enólogo conocer el estado del vino en cada momento y decidir en consecuencia de una forma rápida las acciones a realizar para evitar riesgos y que se produzcan deterioros.

A lo largo del tiempo, el papel enológico que desarrollan las distintas especies de levaduras y bacterias implicadas en la elaboración del vino han sido objeto de numerosos estudios fisiológicos. Sin embargo, la utilización de la secuenciación masiva junto a la metabolómica permitirá un mejor entendimiento de las capacidades metabólicas de las comunidades microbianas (Belda *et al.*, 2017a).

Uno de los más importantes trabajos en los que se han utilizado las nuevas tecnologías para conocer mejor el microbioma del vino fue el desarrollado por Bokulich *et al.*, (2016). Se trata de un estudio multidisciplinar en el que se analizó el microbioma participante en las distintas etapas de elaboración de un vino mediante secuenciación masiva y la comparación posterior con el metaboloma del vino elaborado (Figura 5). Con ello,

pretendía: i) evaluar si la microbiota de la uva y los metabolomas del vino tienen patrones de distribución diferenciables a pequeña escala, entre viñedos próximos, ii) la correlación entre microbiomas y metabolomas regionales y iii) las asociaciones entre el microbioma, las características del mosto y el comportamiento de la fermentación. Mediante los resultados obtenidos, demostró que el microbioma y los metabolitos de la uva y el vino son diferenciables regionalmente, que el microbioma del mosto y el vino se correlacionan con el metaboloma del vino y que la estructura del microbioma del mosto predice la composición del metaboloma del vino elaborado. Por lo tanto, consigue revelar la gran influencia del microbioma en las características regionales del vino y la importancia del concepto de *terroir microbiano*, así como la utilización del conocimiento de la composición del microbioma como biomarcador para predecir la composición de los metabolitos y finalmente, poder conocer de antemano, cuáles pueden ser las características sensoriales del vino final. Incluso, permitiría conocer la zona de origen mediante la operación inversa.

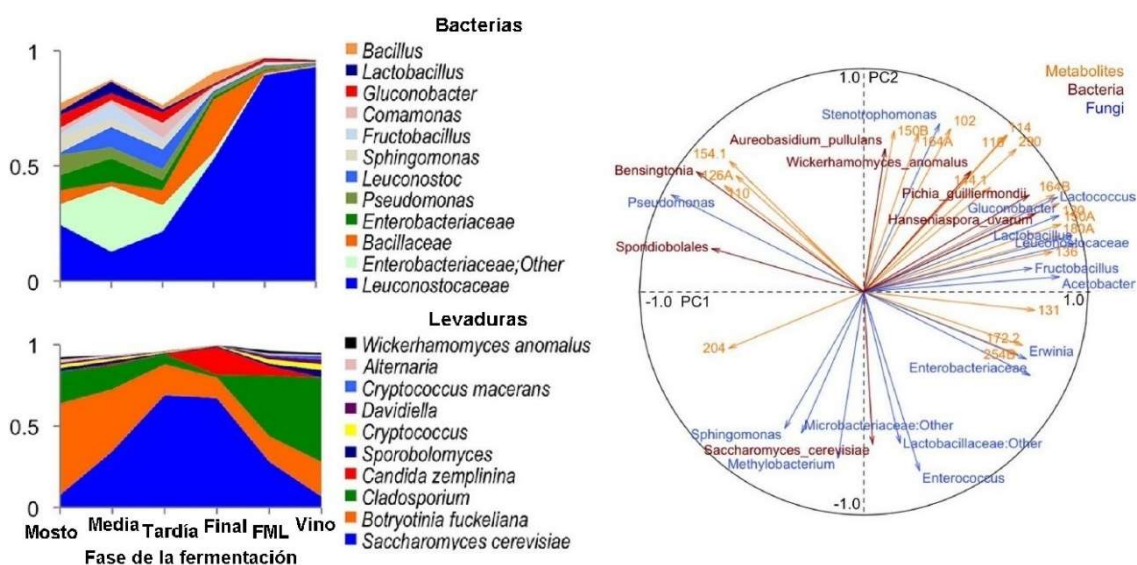


Fig. 5. Resultados del análisis multifactorial del microbioma del mosto y de los perfiles metabólicos del vino. Izquierda. Especies identificadas y abundancia relativa de bacterias (arriba) y levaduras (abajo) en las distintas fases de elaboración. Derecha. Círculo de correlación de análisis factorial múltiple que representa las correlaciones en la abundancia normalizada entre todos los taxones bacterianos (azul), los taxones de levaduras (rojo) y los metabolitos del vino (naranja). (Tomado de Bokulich *et al.*, 2016)

Sin embargo, aún se desconoce la aportación específica de muchas especies a la composición final del vino, así como los metabolitos generados por dichas especies en fermentaciones espontáneas, o sus rutas metabólicas (Liu *et al.*, 2017). Además, la aromaticidad del vino se define por cientos de compuestos químicos de diferente naturaleza (ésteres, tioles, terpenos, alcoholes superiores) y con un amplio espectro de umbrales sensoriales. Asimismo, estos compuestos pueden potenciarse o anularse sensorialmente entre ellos, lo que puede conducir descriptores aromáticos diversos y con distintos umbrales de percepción (Belda *et al.*, 2017a). Determinar la aromaticidad del vino, debido a la gran diversidad de sustancias químicas que posee, es muy complejo. El estudio de todas las sustancias aromáticas del metaboloma sería difícil y muy costoso. Por lo tanto, se sugiere el uso de técnicas multidisciplinares junto con la interpretación de resultados mediante la bioinformática para encontrar las razones por las que determinados microorganismos producen ciertos metabolitos y, de esta forma, tener un control más exhaustivo sobre los procesos fermentativos y de elaboración (Liu *et al.*, 2017).

La investigación de los metabolitos del vino por medio de metabolómica demuestran que cada vino posee una huella característica e identificativa de los metabolitos contenidos. De manera que, el análisis metabolómico puede utilizarse para identificar dicha huella para diversas aplicaciones, tales como, el seguimiento de la trazabilidad de un vino o la determinación de su origen. Asimismo, es posible cuantificar el efecto de los factores que se engloban en el concepto de *terroir*, así como, el efecto de los procesos de fermentación y envejecimiento. Además, permite obtener información de distintos metabolitos de la uva para un seguimiento de la maduración y, también, la evaluación de calidad del vino y la detección de posibles fraudes por adulteración del vino (Alañón *et al.*, 2015).

A medida que se realicen numerosas analíticas sobre el microbioma, se irán complementando las bases de datos y la predicción de la influencia de la capacidad metabólica de cada microorganismo será más efectiva. Gracias a ello, estos modelos podrán definir, en un futuro próximo, los microorganismos que actuaron en la elaboración de cada vino y cómo los metabolitos generados originan el aroma y sabor del vino.

En la actualidad, existen plataformas que permiten el análisis del microbioma del viñedo y del vino y del metaboloma del vino, como son WineSeq® de la empresa BiomeMakers, que permite la caracterización del microbioma del viñedo y del vino mediante la técnica NGS y la plataforma Wine Screener® de la empresa Bruker, que analiza el metaboloma del vino mediante resonancia magnética nuclear. Estas aplicaciones se basan en la creación y uso de bases de datos amplias y de buena calidad que permiten a los elaboradores determinar los perfiles sensoriales de los vinos comprender mejor las propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de sus viñedos y su influencia en el producto final, así como, a los Consejos Reguladores de las Denominaciones de Origen determinar los perfiles típicos para sus vinos y la base microbiana de su *terroir* característico (Belda *et al.*, 2017b). En este artículo, Belda *et al.*, (2017b) propone implementar el análisis sensorial para correlacionar microbioma, metaboloma y la percepción aromática real. Esta iniciativa ha sido desarrollada por la empresa BiomeMakers® que realizó recientemente en la feria Fenavin 2017 en Ciudad Real, la primera Cata del Microbioma como experiencia práctica de interpretación de la “influencia de los microorganismos de un viñedo en la percepción sensorial de los vinos a partir de un sistema de trazabilidad inversa desde la valoración organoléptica y los procesos de elaboración y fermentación en la bodega hasta el potencial microbiológico del suelo” (Wineseq.com, 2017). Posteriormente, este tipo de catas se han realizado en otras regiones vitivinícolas y están teniendo un gran impacto.

Así, la información detallada del microbioma puede ser utilizada para prevenir la contaminación microbiana, que deriva en problemas de fermentación, un aumento de la acidez volátil, la aparición de sabores y aromas desagradables y la producción de aminas biógenas, entre otros. Una mayor comprensión del microbioma del viñedo puede permitir al viticultor estrategias de control más sostenibles, al reducir el uso de tratamientos químicos y realizarlos de manera más adecuada. Además, permitiría al enólogo reducir la concentración de sulfuroso y la adición de enzimas y nutrientes, incluso decidir si es necesario el tipo de levadura o bacterias a inocular (Belda *et al.*, 2017b). Todo esto resulta interesante para las nuevas tendencias enológicas de elaboración ecológica y biodinámica.

Una aplicación práctica puede ser la determinación de la estabilidad de las comunidades microbianas presentes en el vino, mediante secuenciación masiva, como método de elección del vino más adecuado para llevar a envejecer en barricas de madera, como alternativa o complemento a la medición de parámetros fisicoquímicos o sensoriales.

La actividad alterante de determinados microorganismos ha sido bien descrita por la industria enológica y el interés por las especies de levaduras causantes de deterioro ha crecido en los últimos años (Thomas, 1993). Sin embargo, tradicionalmente, se entiende que las enfermedades del vino son debidas a la actividad de bacterias lácticas y acéticas (Loureiro *et al.*, 2003). Por lo tanto, la detección, identificación y cuantificación, así como la comprensión de los procesos biológicos y las interacciones microbianas son importantes para prevenir las alteraciones y evitar las consiguientes pérdidas de calidad y económicas.

Algunos de los microorganismos establecidos en la superficie de la uva pueden desarrollarse y sobrevivir durante la fermentación y pueden provocar deterioros en el vino. Géneros como el bacteriano *Acetobacteraceae* y los géneros de levaduras *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces* son algunos de los principales microorganismos causantes de deterioro (aumento de la acidez volátil, refermentaciones o generación de aromas desagradables, etc.). Estos géneros alterantes suelen tener mayor presencia en uvas dañadas por enfermedades o plagas. También, determinados microorganismos pueden tener efectos inhibitorios y antimicrobianos provocando dificultades tanto en fermentación alcohólica como en fermentación maloláctica (Liu *et al.*, 2017). No obstante, algunas otras especies pueden dar al vino de una mayor complejidad sensorial o evitar que otras especies perjudiciales actúen causando deterioros (Bokulich *et al.*, 2014). En consecuencia, detectar, identificar y cuantificar los microorganismos presentes en el vino y especialmente comprender sus capacidades metabólicas es crucial para la enología, de esta manera, pueden evitarse deterioros o aprovecharse sus ventajas.

A continuación, se enumeran algunos casos prácticos de detección y cuantificación de determinadas levaduras y bacterias, así como las diferentes razones por las cuales, las aplicaciones de las técnicas moleculares resultan apropiadas.

La levadura *Zygosaccharomyces bailii* es una de las principales causantes de refermentaciones, debido a su alta resistencia en medios adversos (tolera altas concentraciones de etanol y pH inferior a 2) a preservantes (resiste más de 30mg/L de SO<sub>2</sub>, 800mg/L de ácido sórbico). Se trata de una especie muy importante pues su actividad provoca aromas y sabores desagradables y además, se requieren pocas células para provocar deterioros (5 UFC/mL). Mediante métodos de cultivo son necesarios entre 4 y 5 días para su crecimiento, por lo que resulta muy interesante utilizar técnicas moleculares. La técnica de la qPCR ha demostrado ser adecuada por su rapidez y por que presenta la capacidad de identificar dicha levadura con límites inferiores a 10 UFC/mL (Rawsthorne *et al.*, 2006).

La levadura del género *Brettanomyces/Dekkera* es una de las principales causantes de alteraciones graves en los vinos. Su presencia puede pasar desapercibida durante las etapas de elaboración, debido a que es capaz de sobrevivir en los ambientes de la fermentación alcohólica, con oxígeno reducido, pH bajo y alta concentración de etanol y desarrollarse posteriormente al no existir competencia con levaduras de otros géneros y gracias a su alta resistencia a los preservantes, sobre todo durante la crianza en barricas de madera y en botella (Ibeas *et al.*, 1996). Además, las poblaciones necesarias para causar el deterioro en el vino son bajas, empezándose a percibir sensorialmente los aromas característicos generados de su actividad a partir de 10<sup>3</sup> UFC/mL, generalmente tarde para solucionar y reducir los defectos generados (Portugal *et al.*, 2013).

La levadura *Brettanomyces bruxellensis* es considerada endémica, ya que se ha aislado en prácticamente todos los países vitivinícolas del Mundo (Argentina, Australia, Canadá, Chile, España, Estados Unidos, Francia, Italia, Nueva Zelanda, Sudáfrica) (Tofalo *et al.*,

2012). El origen de esta especie no está claro y existe discordancia entre los grupos de investigación sobre si procede del viñedo o de las propias bodegas. Sin embargo, algunos hechos indican que es probable que se haya extendido a través de los vinos, los equipamientos, sobre todo, en las barricas, ya que, los huecos y poros de la madera constituyen un nicho adecuado para su desarrollo, puesto que es capaz de asimilar la celobiosa de la madera (Steensels *et al.*, 2015). Otros investigadores consideran que ha podido encontrarse en las bodegas desde hace siglos y no haberse percibido tan notablemente hasta ahora, puesto que en la actualidad y debido a los cambios en la composición del mosto (mayor pH y concentración de azúcares) y de las tendencias actuales de la elaboración de vino (vinos con mayor concentración de azúcares residuales, menores concentraciones de conservantes, crianzas sobre lías, vinos sin filtrar, etc.) la frecuencia y la intensidad de los deterioros sea mayor, al ser estas condiciones más favorables para el desarrollo de *B. bruxellensis* (Tofalo *et al.*, 2012).

La actividad de *B. bruxellensis* genera la síntesis de componentes aromáticos diversos, principalmente fenoles volátiles como el 4-vinilfenol, el 4-vinilguaiacol, el 4-etilfenol y el 4-etilguaiacol a partir de los ácidos cinámicos, debido por la actividad de las enzimas cinamato-d Descarboxilasa y la vinilfenol-reductasa (Figura 6). Estos componentes volátiles se describen como olores característicos a “sudor de caballo”, “establo”, “plástico quemado”, “cuero mojado”, “ratón”, etc., y su conjunto es conocido como el “Carácter Brett”. A la actividad de *B. bruxellensis* también se le atribuyen otros defectos como la síntesis de hidroxipiridinas que dan “olor a ratón”, el aumento de la acidez volátil, la alteración del color del vino e, incluso, la producción de aminas biógenas, con efectos negativos en la salud del consumidor, al ser una de las especies de levaduras conocidas con mayor capacidad para generar estas sustancias (Vendrame *et al.*, 2014).

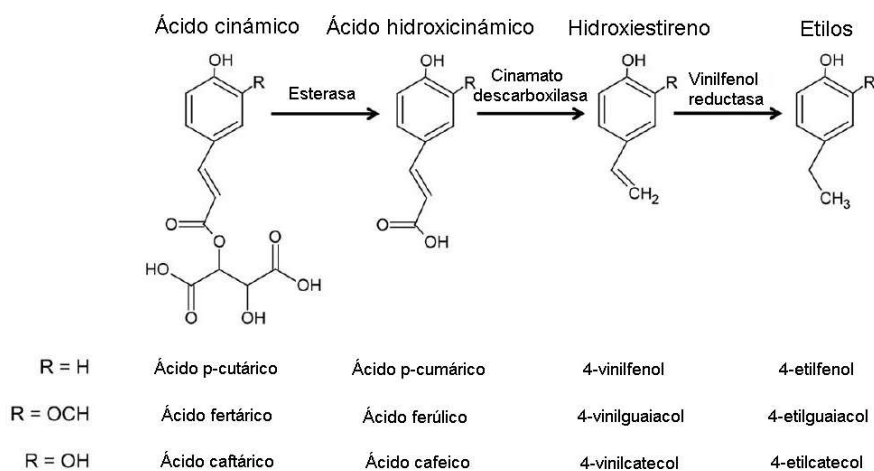


Fig. 6. Síntesis de fenoles volátiles descriptores del “Carácter Brett” por la actividad enzimática de *Brettanomyces bruxellensis*. (Modificado de Steensels *et al.*, 2015).

Sin embargo, el “Carácter Brett”, en ocasiones y en determinadas cantidades, puede ser un atributo favorable, al contribuir en la complejidad aromática de algunos vinos y otras bebidas fermentadas, como ciertas cervezas especiales (Tofalo *et al.*, 2012). Incluso, debido a la tolerancia a pH bajo, al metabolismo de nutrientes altamente eficaz y a la alta capacidad de generación de etanol atrae la atención para la producción de bioetanol (Steensels *et al.*, 2015). Por lo tanto, realizar estudios para comprender mejor su genoma, su fenotipo y su actividad metabólica adquiere un gran interés también para otros sectores ajenos a la enología.

La eliminación de *Brettanomyces bruxellensis* por medio de la filtración y la desinfección ha demostrado tener una eficacia limitada y, además, no protege de las posibles contaminaciones posteriores. Por otro lado, las concentraciones permitidas de preservantes químicos como el ácido benzoico, el ácido sórbico y el dimetil dicarbonato

(DMDC) no son capaces de inhibir el desarrollo de *B. bruxellensis* en el vino y serían necesarias concentraciones más altas no autorizadas (Tofalo *et al.*, 2012). Actualmente, como métodos para evitar su desarrollo y actividad han resultado eficaces el uso de quitosano (o quitosano), un polisacárido de origen fúngico (Taillandier *et al.*, 2014) y el uso de plata coloidal (López *et al.*, 2012), además, del uso de levaduras con efecto *killer* sobre *B. bruxellensis* (Mehlomakulu *et al.*, 2014).

Debido a toda la problemática que esta levadura genera, su detección correcta y temprana y su cuantificación se hacen imprescindible para los elaboradores, de forma que sea posible realizar las acciones preventivas más adecuadas y así evitar su desarrollo, sobre todo en las primeras etapas de la vinificación y anterior al momento de su mayor actividad y de mayor probabilidad de deterioro. Las técnicas moleculares resultan más apropiadas que las técnicas convencionales de cultivo, por su bajo ritmo de desarrollo, ya que requiere de entre 1 a 2 semanas para crecer en placa y por el hecho de que sea una levadura que puede entrar en estado viable pero no cultivable. Por consiguiente, la técnica qPCR resulta ser adecuada, además no requiere un enriquecimiento previo de la muestra y permite una detección rápida, específica y sensible, con unos límites de detección de 10 UFC/mL. (Tofalo *et al.*, 2012, Willenburg *et al.*, 2012).

Sin embargo, este método no es capaz de diferenciar células muertas de vivas, puesto que esta técnica se basa en la replicación de ADN de cualquier célula presente. Como solución a estos inconvenientes se sugiere el uso de el bromuro de etidio monoácido y el bromuro de propidio monoácido que penetran en el interior de las células muertas, al poseer una pared celular más débil y se intercala en el ADN de su interior, lo cual, impide su replicación. Otro método alternativo de solución para este inconveniente es la aplicación de la RT-qPCR. Esta técnica está dirigida a la replicación del ARN mensajero (ARNm), moléculas mucho más inestables que el ADN o que incluso el ARN ribosómico (ARNr). Se basa en el calentamiento durante 20 minutos de las muestras, lo cual degrada completamente el ARNm presente en las muestras. A partir de ese momento, solamente las células vivas producen nuevas moléculas de ARNm, que se identifican mediante qPCR después de ser sometidas a transcripción inversa para sintetizar su ADN complementario. Ambos métodos descritos son cuantitativos (Hierro *et al.*, 2006, Vendrame *et al.*, 2014) y de esta manera, permiten realizar ensayos para medir la susceptibilidad de *B. bruxellensis* a distintos tratamientos antimicrobianos comparando las células vivas con las células muertas (Willenburg *et al.*, 2012).

Así como, para hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* que influyen en las características de sanidad o sensoriales del vino y producen micotoxinas como aflatoxinas y ocratoxina A o sabores desagradables (Liu *et al.*, 2017). La ocratoxina A es una micotoxina perjudicial para la salud humana. Tiene efectos nefrotóxicos, hepatotóxicos, embriotóxicos, teratogénicos, neurotóxicos, inmunotóxicos y carcinogénicos (Abouziéd *et al.*, 2002). Su presencia está limitada por normativa europea en mostos y vinos a 2mg/L propuesta por la OIV (Reglamento (CE) N° 123/2005). La detección temprana de estos géneros fúngicos antes de su desarrollo es crucial para prevenir la producción de ocratoxina A en las etapas de maduración o en vendimia, debido a que no existen métodos industriales para eliminar dicha toxina en vino contaminado. Métodos de identificación y cuantificación de mohos productores de ocratoxina A basados en qPCR resultan rápidos y eficaces (Rodríguez *et al.*, 2012).

Por último, es importante remarcar la rapidez de la técnica de la qPCR, desde 2008, está documentado que es posible analizar una muestra de vino en menos de 2 horas y, además, la sensibilidad de estas técnicas, que cumplen con las condiciones que impone la OIV, según las cuales, un vino es estable microbiológicamente si la concentración de microorganismos es inferior a 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> UFC/mL (Salinas *et al.*, 2009). Por lo tanto, la

identificación de *Zygosaccharomyces bailii* y *Brettanomyces bruxellensis* mediante qPCR es válida, al estar sus límites por debajo de las recomendaciones de la OIV y, prácticamente iguales a la población mínima con la capacidad de causar los deterioros, indicadas anteriormente (5 UFC/mL para *Z. bailii* y 10 UFC/mL para *B. bruxellensis*).

La actividad de las BAL en la FML es interesante por la transformación de la acidez “verde” más agresiva del ácido málico a la acidez “suave” del ácido láctico y por la modificación del sabor y aroma producidos por las BAL que liberan precursores aromáticos varietales y aumentan la aromaticidad frutal. Y, además, aportan una mejor textura y una mayor estabilidad microbiológica del producto (Petri *et al.*, 2013, González-Arenzana *et al.*, 2017, Bergsveinson *et al.*, 2017). En algunos estudios se han observado cepas de BAL de origen enológico con potencial probiótico. Los probióticos son microorganismos que al ser consumidos otorgan propiedades beneficiosas para la salud, tales como, mantener el equilibrio del microbioma intestinal y producir efectos antimutagénicos, anticancerígenos, antihipertensivos, etc. (García-Ruíz *et al.*, 2014). Por consiguiente, investigar este tipo de bacterias puede resultar muy atractivo para la comunidad científica.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo importante dentro de los microorganismos de uso enológico para el desarrollo de la fermentación maloláctica (FML). La actividad de descarboxilación de ácido málico a ácido láctico es un proceso que se conoce como fermentación maloláctica y suele ser posterior al proceso de fermentación alcohólico. Es un proceso frecuente en la elaboración de la mayoría de los vinos tintos y en algunos vinos blancos. Mediante este proceso, se consiguen vinos con una acidez menos agresiva y aumenta la complejidad aromática. Además, aumenta la estabilidad microbiana (Davis *et al.*, 1985).

Las especies BAL mayoritarias en FML espontáneas son especies del género *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus* y especialmente las especies *Oenococcus oeni* y *Lactobacillus plantarum*. La presencia de estas especies depende en gran medida del pH del vino (*O. oeni* en vinos con pH inferiores a 3,5 y *Lactobacillus* y *Pediococcus* en vinos con pH superiores) (Neeley *et al.*, 2005). Estas especies son adecuadas para este proceso por su capacidad de síntesis de metabolitos que aumentan la complejidad aromática, por lo que se usan frecuentemente cepas comerciales de estas especies, generalmente, de *O. oeni* por su mayor tolerancia al etanol y a la acidez y porque producen menos componentes indeseables y perjudiciales que los otros géneros (Sebastian *et al.*, 2011, Petri *et al.*, 2013, Kantor *et al.*, 2015). Los métodos basados en qPCR permiten identificar y cuantificar BAL presentes en el vino (Neeley *et al.*, 2005, Petri *et al.*, 2013) y resultan aptos para el seguimiento de las cepas inoculadas de *O. oeni* en la FML (Solieri *et al.*, 2010).

El estudio genético sobre especies de BAL aún es escaso. En consecuencia, identificar cepas de estas bacterias que estén más adaptadas a las condiciones de los vinos y que generen ciertos metabolitos que mejoren las características sensoriales, gana interés dentro de la industria enológica (Belda *et al.*, 2017a). Por el contrario, algunas especies de BAL pueden producir deterioros en el vino, por lo cual, es necesaria la identificación a nivel de especie y/o incluso a nivel de cepa, para diferenciar las especies perjudiciales de las beneficiosas. Actualmente, la secuenciación masiva no permite aún identificar a esos niveles de resolución en todos los taxones. Por lo tanto, la combinación con otras técnicas como qPCR podría ayudar a superar estas limitaciones (Belda *et al.*, 2017b).

Diferentes cepas de especies como *Pediococcus damnosus*, *P. parvulus* o *Leuconostoc mesenteroides* pueden formar exopolisacáridos provocando ahilado en los vinos. Determinadas especies de BAL pueden aumentar la acidez volátil y generar defectos en la aromaticidad. Asimismo, algunas especies de BAL son productoras de aminas

biógenas (Sebastian *et al.*, 2011, Petri *et al.*, 2013), compuestos nitrogenados generados por la descarboxilación de determinados aminoácidos. Se han encontrado más de 25 aminas biógenas distintas en vinos, entre las que la putrescina es la más abundante. Estas sustancias son perjudiciales para la salud cuando se consumen en concentraciones altas, ya que provocan dolores de cabeza, influye sobre la presión arterial, palpitaciones, vómitos, poseen efectos carcinógenos, etc. (Lonvaud-Funel, 2001, Landete *et al.*, 2011). Aunque, la legislación no haya determinado aún la concentración máxima permitida de las aminas biógenas en el vino, los graves daños ocasionados a la salud son una preocupación creciente para la industria vinícola (Sciancalopore *et al.*, 2013).

La detección de cepas de especies BAL productoras de aminas biógenas permiten evitar el riesgo de su actividad, realizando distintas prácticas, y reducir la acumulación de estos compuestos en el vino finalizado. Los métodos basados en PCR resultan específicos para la detección de estas bacterias en el vino o para la identificación de las cepas con actividad descarboxilasa, como la PCR múltiple (Sciancalopore *et al.*, 2013) y la técnica qPCR (Nannelli *et al.*, 2008, Landete *et al.*, 2011), que, además, posibilita la cuantificación.

Por otra parte, Cueva *et al.*, (2012) demostraron la capacidad de determinadas cepas de hongos filamentosos de segregar enzimas amina oxidasa que degradan las aminas biógenas, como *Aspergillus niger* y *Penicillium citrinum*. Incluso, se ha observado la expresión genética sintetizadora de estas enzimas en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. El estudio y análisis genético de dichos hongos para su aprovechamiento biotecnológico es ventajoso, debido a que la reducción de la concentración de las aminas biógenas en el vino no siempre es posible y pueden alterarse sus cualidades organolépticas.

Las actividades perjudiciales provocadas por las bacterias ácido acéticas (BAA) son conocidas y se han descrito en numerosos artículos. Estas bacterias son causantes de distintos tipos de problemas, como el aumento elevado de la acidez volátil y la formación de exopolisacáridos, entre otros, principalmente durante la elaboración del vino o en su vida útil una vez embotellado y sobre todo en vinos que sufren condiciones de alta oxigenación, debidos a una mala conservación de los vinos o durante el envejecimiento en barricas (Bartowsky *et al.*, 2003). Las técnicas moleculares posibilitan la identificación de bacterias ácido acéticas (BAA) de forma rápida y específica, de forma que se puede evitar que se produzcan estos deterioros. Sin embargo, la identificación de estas bacterias es interesante para mejorar los procesos de elaboración de vinagre (Yetiman *et al.*, 2015, Trček *et al.*, 2016).

## 7. CONCLUSIÓN

A medida que se realizan nuevos estudios mediante estas nuevas técnicas moleculares se avanza hacia una mayor visión de la tremenda importancia que tienen los microorganismos que pueblan los viñedos para la vitivinicultura.

Gracias a esta visión más completa se abre un camino hacia nuevas formas de control para fomentar el desarrollo y la calidad de la uva y el vino, así como nuevos métodos contra las enfermedades de la vid, sobre todo de la madera, las cuales están provocando gran preocupación dentro del sector.

Por último, entender la actividad de las comunidades microbianas ligadas al mosto en la fermentación y posteriormente en el vino puede brindar nuevas formas de controlar la elaboración para potenciar las cualidades sensoriales características de cada región vitivinícola y para evitar que se produzcan alteraciones microbianas.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abouzied MM, Horvath AD, Podlesny PM, Regina NP, Metodiev VD, Kamenova-Tozeva RM, et al. Ochratoxin A concentrations in food and feed from a region with Balkan Endemic Nephropathy. *Food Additives and Contaminants*. 2002;19,755-764.

Alañón ME, Pérez-coello MS, Marina ML. Wine science in the metabolomics era. *Trends Trends in Analytical Chemistry*. 2015;74:1–20.

Backofen R, Gilbert D. Bioinformatics and Constraints. *Constraints*. 2001:141-156.

Barata A, Loureiro V. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology* 2012;153(3):243–59.

Bartowsky EJ, Xia D, Gibson RL, Fleet GH, Henschke PA. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;36:307–314.

Baudoin A, Olaya AG, Delmontte F, Colcol F and Sierotski H. QoI resistance of *Plasmopara viticola* and *Erysiphe necator* in the Mid-Atlantic United States. *PlantManag Network, Plant Health Prog*. 2008; DOI: 10.1094/PHP-2008,p.0211-02

Bäumler S, Sierotski H, Gisi U, Mohler V, Felsentein FG and Schwarz G. Evaluation of *Erysiphegraminis* f. sp. *tritici* field isolates for resistance to strobilurin fungicides with different SNP detection systems. *Pest Manag Sci*. 2003;59:310–314.

Belda I. La huella microbiológica del terroir. *SeVi*. 2016;3483(November).

Belda I, Ruiz J, Esteban-fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A, et al. Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules*. 2017;22,189.

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 [Internet]*. 2017;8(May):821.

Bergsveinson J, Kajala I, Ziola B. Next-generation sequencing approaches for improvement of lactic acid bacteria-fermented plant-based beverages. 2017;3(November 2016):8–24.

Berg G, Hallmann J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. *Soil bio Microbial root endophytes*. 2006; 9:53-69

Blaser MJ, Cardon ZG, Cho MK, Dangl JL, Donohue TJ, Green JL, et al. Toward a Predictive Understanding of Earth ' s Microbiomes to Address 21st Century Challenges. *Am Soc Microbiol*. 2016;7(3):1–16.

Boekhout T, Kutzman C. Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. En: Wolf K (Eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook*. Berling, Germany. 1996;1-81.

Bokulich NA, Joseph CML, Allen G, Benson AK, Mills DA. Next-Generation Sequencing Reveals Significant Bacterial Diversity of Botrytized Wine. 2012;7(5):3–12.

Bokulich NA, Thorngate JH, Richardson PM, Mills DA. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *PNAS Plus: From the Cover*. 2014;111(1):E139–48.

Bokulich NA, Collins T, Masarweh C, Allen G, Heymann H, Ebeler S. Fermentation Behavior Suggest Microbial Contribution to Regional. *MD*. 2016;7(3):1–12.

Burns KN, Kluepfel DA, Strauss SL, Bokulich NA, Cantu D, Steenwerth KL. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: Differentiation by geographic features. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2015;91:232–47.

Castañeda LE, Barbosa O. Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ* [Internet]. 2017;5:e3098.

Čepin U, Gutiérrez-aguirre I, Balažic L, Pompe-Novak M, Gruden K, Ravnikar M. A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of Grapevine fanleaf virus. *Journal of Virological Methods*. 2010;170:47–56.

Charles, T. The potential for investigation of plant-microbe interactions using metagenomics methods. In: *Metagenomics: Theory, Methods and Applications*, Diana, M., Ed., Caister Academic Press, Norfolk. 2010;107–118.

Chen C, Zhao W, Lu Y, Wang J, Chen Y, Li H, et al. High-throughput detection of highly benzimidazole-resistant allele E189A with mismatch primers in allele-specific real-time polymerase chain reaction. *PestManag Sci*. 2008;65:413–419.

Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, Cocolin L, Alessandria V, Dolci P, et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation during food fermentation. *Int Journal Food Microbiol*. 2013;167(1):29–43.

Corneo PE, Pellegrini A, Cappellin L, Roncador M, Chierici M, Gessler C, et al. Microbial community structure in vineyard soils across altitudinal gradients and in different seasons. *FEMS Microbiol Ecol*. 2013;84(3):588–602.

Cueva C, García-Ruiz A, González-Rompinelli E, Bartolome B, Martín-Álvarez PJ, et al. Degradation of biogenic amines by vineyard ecosystem fungi. Potential use in winemaking. *Journal of Applied Microbiology*. 2012;112:672–82.

David V, Terrat S, Herzine K, Claisse O, Masneuf I, Lionel P, et al. High - throughput sequencing of amplicons for monitoring yeast biodiversity in must and during alcoholic fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2014;41:811–821.

Davis CR, Wibowo D, Eschenbruch R, Lee TH, Fleet GH. Practical Implications of Malolactic Fermentation: A review. *Am J Enol Vitic*. 1985;36:290-301

Delmont TO, Prestat E, Keegan KP, Faubladiet M, Robe P, Clark IM, Pelletier E, Hirsch PR, Meyer F, Gilbert JA, Le Paslier D, Simonet P, Vogel TM. 2011. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *ISME Journal* 6(9):1677–1687

Deloire A, Ferrer M, Carbonneau A. Respuestas de la viña al terroir. Elementos para un método de estudio. *Agrociencia*. 2003;7(1):105-113.

Diguta CF, Rousseaux S, Weidmann S, Bretin N, Vincent B, Guilloux-Benatier M, Asexandre H. Development of a qPCR assay for specific quantification of *Botrytis cinerea* on grapes. FEMS Microbiol Lett. 2010;313:81-87.

Dreo T, Gruden K, Manceau C, Janse JD, Ravnikar M. Development of a real-time PCR-based method for detection of *Xylophilus ampelinus*. Plant Pathology. 2007;56:9–16.

Drumonde-Neves J, Franco-Duarte R, Lima T, Schuller D, Pais C. Association between grape yeast communities and the vineyard ecosystems. PLoS One. 2017;12(1):1–17.

Dufour MC, Fontaine S, Montarry J, Corio-Costet MF. Assessment of fungicide resistance and pathogen diversity in *Erysiphe necator* using quantitative real-time PCR assays. Pest Manag Sci. 2011;67:60–69.

Dujon B. Yeast evolutionary genomics. Nat Rev Genet. 2010;11:512–24

Eichmeier A, Komínková M, Komínek P, Baránek M. Generation Sequencing in Grapevine Vascular Tissues of Plants Obtained from the Wine Regions of Bohemia and Moravia ( Czech Republic ). PLOS ONE. 2016 (December 13).

Esteve-Zarzoso, B., C. Belloch, F. Uruburu, and A. Querol. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Int. J. Syst. Bacteriol. 49:329–337.

Fraaije BA, Butter JA, Coehlo JM, Jones DR and Hollomon DW, Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. tritici using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR Green I. Plant Pathol. 2002;51:45–54.

García-Ruiz A, González de Llano D, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiology. 2014;44:220–225.

Gilbert JA, van der Lelie D, Zarraonaindia I. Microbial terroir for wine grapes. Proc Natl Acad Sci [Internet]. 2014;111(1):5–6.

Gilbert JA, Jansson JK, Knight R. The Earth Microbiome project: successes and aspirations. BMC Biology. 2014;12:69.

González L, Santamaría P, Gutiérrez AR, López R, López-Alfaro I. Lactic acid bacteria communities in must, alcoholic and malolactic Tempranillo wine fermentations, by culture - dependent and culture - independent methods. Eur Food Res Technol. 2017;243(1):41–48.

Guillamon, J. M., J. Sabate, E. Barrio, J. Cano, and A. Querol. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Arch. Microbiol. 169:387–92.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á., Mas, A., and Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. Appl. Environ. Microb. 72, 7148–7155. doi: 10.1128/AEM.00388-06

Holland TC, Bowen P, Bogdanoff C, Hart MM. How distinct are arbuscular mycorrhizal fungal communities associating with grape- vines? Biol Fertil Soils. 2014;50:667–674

Hopkins DL, Purcell AH. *Xylella fastidiosa*: Cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. *PLANT Dis.* 2002;86(10):1056–1066.

Ibeas, J. I., I. Lozano, F. Perdignes, and J. Jimenez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:998–1003.

Jara C, Laurie VF, Mas A, Romero J. Microbial terroir in Chilean valleys: Diversity of non-conventional yeast. *Front Microbiol.* 2016;7:1–10.

Kántor A, Kluz M, Puchalski C, Terentjeva M. Identification of lactic acid bacteria isolated from wine using real-time PCR. *J Environ Sci Heal Part B [Internet].* 2016;51(1):52–6.

Kurtzman C. Molecular Taxonomy of the Yeasts. *Yeast.* 1994;10:1727-1740

Landete JM, Rivas B, Marcobal A, Muñoz R. PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Ann Microbiol.* 2011;61:159–166.

Larsen P, Hamada Y, Gilbert J. Modeling microbial communities: Current, developing, and future technologies for predicting microbial community interaction. *Journal of Biotechnology.* 2012;160:17–24.

Liu Y, Rousseaux S, Tourdot-Maréchal R, Sadoudi M, Gougeon R, Schmitt-Kopplin P, et al. Wine microbiome: A dynamic world of microbial interactions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57(4):856–73.

Lonvaud-funel A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 2001;199:9–13.

Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology.* 2003;86:23–50.

Luo Y, Ma Z and Michailides TJ. Quantification of allele E198A in *betatubulin* conferring benzimidazole resistance in *Monilia fructicola* using real-time PCR. *Pest Manag Sci.* 2007;63:1178-1184.

Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics.* 2008;24(3):133–141.

Martín MT, De la Iglesia E, Carrillo N, Rodríguez L, Fernández M, Velasco M, Vega MV, Cobos R. Apuntes sobre los decaimientos de la vid. *ITACYL.* 2005.

Mehlomakulu NN, Setati ME, Divol B. International Journal of Food Microbiology Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int J Food Microbiol [Internet].* 2014;188:83–91.

Minsavage GV, Thompson CM, Hopkins DL, Leite R, Stall RE. Development of a Polymerase Chain Reaction Protocol for Detection of *Xylella fastidiosa* in Plant Tissue. *Phytopathology.* 1994;84(5):456–461.

Morse SS, Ph D. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases.* 1995;1(1):7–15.

Nannelli F, Claisse O, Gindreau E, Revel G De, Lucas PM. Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;47:594–599.

Neeley ET, Phister TG, Mills DA. Differential Real-Time PCR Assay for Enumeration of Lactic Acid Bacteria in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(12):8954–8957.

OIV. Aspectos de la coyuntura mundial. 2017 (abril).

Oro, L., Ciani, M. and Comitini, F. Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol*. 2014;116:1209–1217.

Palacios A, Carrillo D, Iruzubieta J, Boutou S, Fleury A, Labadie D, Chatonnet P. Las Efices Técnicas Moleculares de Identificación y Cuantificación de las Levaduras Enológicas. *Enólogos*. 2009;60:1–11.

Petri A, Pfannebecker J, Fröhlich J, König H. Fast identification of wine related lactic acid bacteria by multiplex PCR. *Food Microbiol* [Internet]. 2013;33(1):48–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.011>

Petrosino, J. F., Highlander, S., Luna, R. A., Gibbs, R. A. & Versalovic, J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem*. 2009;55,56–866.

Pinto C, Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, et al. Unravelling the Diversity of Grapevine Microbiome. *PLOS ONE*. 2014;9(1): e85622.

Pinto C, Pinho D, Cardoso R, Custódio V, Fernandes J, Sousa S, et al. Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Front Microbiol*. 2015;6:1–13.

Pinto C, Gomes AC. *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. *BioControl*. 2016;61(3):243–56.

Portugal C, Ruiz-Larrea F. Comparison of Specific Real-Time PCR and Conventional Culture for Detection and Enumeration of *Brettanomyces* in Red Wines. *Am. J. Enol. Vitic*. 2013;64(1):139–145.

Pritchard SG. Soil organisms and global climate change. *PlantPathology*. 2011;60:82-99.

Querol A, Barrio E, Huerta T, Ramon D, Microbiologia D De, Genetica D De, et al. Molecular Monitoring of Wine Fermentations Conducted by Active Dry Yeast Strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992;58(9):2948–2953.

Rapp A, Mandery H. Wine Aroma. *Experientia* (1986) 42: 873.

Ratón TO. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Rev Iberoam Micol*. 2004;21:15–19.

Rawsthorne H, Phister TG. A real-time PCR assay for the enumeration and detection of *Zygosaccharomyces bailii* from wine and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*. 2006;112:1–7.

Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF, Córdoba JJ. A comparative study of DNA extraction methods to be used in real-time PCR based quantification of ochratoxin A-producing molds in food products. *Food Control* [Internet]. 2012;25(2):666–672.

Rossouw D, Næs T, Bauer FF. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*. 2008;9:530. doi:10.1186/1471-2164-9-530

Rossouw D, Bauer FF. Comparing the transcriptomes of wine yeast strains: toward understanding the interaction between environment and transcriptome during fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;84:937–954.

Rotolo C, Milvia R, Angelini DM, Pollastro S. A TaqMan-based qPCR assay for quantitative detection of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* strain QST713 and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp . *plantarum* strain D747. *BioControl*. 2016;61(1):91–101.

Rosenthal, A. Z., Matson, E. G., Eldar, A. and Leadbetter, J. R. (2011). RNA-seq reveals cooperative metabolic interactions between two ter- mite-gut spirochete species in co-culture. *ISME J*. 5:1133–1142.

Salinas F, Garrido D, Ganga A, Veliz G, Martínez C. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiology*. 2009;26:328–332.

Schaad NW, Frederick RD. Emerging technologies / Technologies naissantes Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol*. 2002;24:250-258.

Sciancalepore AG, Mele E, Arcadio V, Reddavid F, Grieco F, Spano G, Lucas P, Mita G, Pisignano D. Microdroplet-based multiplex PCR on chip to detect foodborne bacteria producing biogenic amines. *Food Microbiology*. 2013; 35:10-14.

Schreiner, RP, Tarara, JM, Smithyman, RP. Deficit irrigation promotes arbuscular colonization of fine roots by mycorrhizal fungi in grapevines (*Vitis vinifera* L.) in an arid climate. *Mycorrhiza*. 2007;17(7):551-562.

Schwarz G, Baumler S, Block A, Felsenstein FG and Wenzel G. Determination of detection and quantification limits for SNP allele frequency estimation in DNA pools using real time PCR – art. no. e24. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: E24-E24.

Sebastian P, Herr P, Fischer U. Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Occurring in Must and Wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 2011;32(2):300–309.

Setati ME, Jacobson D, Andong UC, Bauer F. The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *PLoS One*. 2012;7(12).

Sieuwerts, S., de Bok, F. A. M., Hugenholtz, J. and van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2008). Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. *Appl. Environ. Microbiol*. 74:4997–5007.

Shendure J. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*. 2008;26(10):1135-1145

Skogerson K. Metabolomics: Wine-omics. *Nature*. 2008;455(7213):699

Solieri L, Giudici P. Development of SCAR marker-targeted quantitative PCR assay for strain-specific detection of *Oenococcus oeni* during wine malolactic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010.

Steensels J, Daenen L, Malcorps P, Derdelinckx G, Verachtert H, Verstrepen KJ. International Journal of Food Microbiology Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol [Internet]*. 2015;206:24–38.

Taillandier P, Jentzer J, Gautier S, Sieczkowski N, Granes D. Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*. 2014;118:123–131.

The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. 2007;449(September):463–468.

The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature [Internet]*. 2012;486(7402):207–14.

Thomas DS. Yeasts as spoilage organisms in beverages. 2nd ed. In: Rose, A.H., Harrison, J.S. (Eds.). *The Yeasts*. Academic Press, London. 1993;5:517–561.

Tofalo R, Schirone M, Corsetti A, Suzzi G. Detection of *Brettanomyces* spp. in Red Wines Using Real-Time PCR. *Journal of Food Science*. 2012;77(9):545–549.

Trcek J, Mahnic A, Rupnik M. Diversity of the microbiota involved in wine and organic apple cider submerged vinegar production as revealed by DHPLC analysis and next-generation sequencing. *International Journal of Food Microbiology*. 2016;223:57–62.

Toffolatti SL, Serrati L, Sierotzki H, Gisi U and Vercesi A. Assessment of QoI resistance in *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Manag Sci*. 2007;63:194–201.

Trouvelot S, Bonneau L, Redecker D, Tuinen D Van, Adrian M, Wipf D. Arbuscular mycorrhiza symbiosis in viticulture: a review. *Agron. Sustain. Dev*. 2015;35:1449–1167.

Turner TR, James EK, Poole PS. The plant microbiome. *Genome Biology*. 2013;14:209.

UE (Unión Europea): Reglamento (CE) N° 123/2005 de la comisión de 26 de enero de 2005 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 466/2001 respecto a la ocratoxina A. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 25/3-5.

Valero E, Cambon B, Schuller D, Casal M, Dequin S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2007;7:317–329.

Vendrame M, Manzano M, Comi G, Bertrand J, Iacumin L. Use of propidium monoazide for the enumeration of viable *Brettanomyces bruxellensis* in wine and beer by quantitative PCR. *Food Microbiol [Internet]*. 2014;42:196–204.

Vega-Avila AD, Gumiere T, Andrade PAM, Lima-Perim JE, Durrer A, Baigori M, et al. Bacterial communities in the rhizosphere of *Vitis vinifera* L. cultivated under distinct agricultural practices in Argentina. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015;107(2):575–588.

Velázquez R, Zamora E, Álvarez ML, Hernández LM, Ramírez M. Effects of new *Torulaspota delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Frontiers of Microbiology*. 2015;6:1–11.

Wang C, García-Fernández D, Mas A, Esteve-Zarzoso B. Fungal diversity in grape must and wine fermentation assessed by massive sequencing , quantitative PCR and DGGE. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:1–8.

Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Seta H. Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*. 2004;304:1629–1633.

Willenburg E, Divol B. Quantitative PCR: An appropriate tool to detect viable but not culturable *Brettanomyces bruxellensis* in wine. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2012;160(2):131–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.012>

WineSeq.com. Fenavin acoge la primera Cata del Microbioma del mundo. 2017; 11 de mayo. <https://wineseq.com/fenavin-acoge-la-primera-cata-del-microbioma-del-mundo/>

Yan L, Yang Q, Zhou Y, Duan X and Ma Z. A real-PCR assay for quantification of the Y136F allele in the CYP51 gene associated with *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitors. *Crop Prot*. 2009;28:376–280.

Yetiman AE, Kesmen Z. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *Int J Food Microbiol* [Internet]. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;204:9–16.

Zarraonaindia I, Gilbert J. Understanding grapevine-microbiome interactions: implications for viticulture industry. *Microb Cell*. 2015;2(5):171–3.

Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, et al. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *MBio*. 2015;6(2):1–10.