



NATHASHA DE AZEVEDO LIRA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA MICROBIOTA
TERROIR EM VINHEDOS DO SUL DE MINAS GERAIS**

**LAVRAS – MG
2017**

NATHASHA DE AZEVEDO LIRA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA MICROBIOTA
TERROIR EM VINHEDOS DO SUL DE MINAS GERAIS**

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

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Orientador

Profa. Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani

Coorientadora

**LAVRAS – MG
2017**

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

Lira, Nathasha de Azevedo.

Estudo da diversidade de fungos filamentosos da microbiota
terroir em vinhedos do sul de Minas Gerais / Nathasha de
Azevedo Lira. - 2017.

114 p.

Orientador(a): Luís Roberto Batista.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Uva. 2. Solo. 3. Diversidade de fungos. I. Batista, Luís
Roberto. II. Título.

NATHASHA DE AZEVEDO LIRA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA MICROBIOTA
TERROIR EM VINHEDOS DO SUL DE MINAS GERAIS**

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

APROVADA em 27 de abril de 2017.

Dra. Sara Maria Chalfoun de Souza EPAMIG

Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista UFLA

Dra. Caroline Lima Angélico UFLA

Orientador

Prof. Dr. Luís Roberto Batista

Coorientadora

Profa. Dra. Fabiana Reinis Franca Passamani

**LAVRAS – MG
2017**

A Deus, por tanto me ouvir e me guiar.

Aos meus queridos pais, Jandira, por me incentivar mesmo a distância, pelo exemplo e imenso amor e Geraldo que, mesmo não estando mais aqui, sei que está me apoiando.

Aos meus irmãos, Patricia e Geraldo, por admirarem o que faço.

Ao meu amor, Fábio, pelo amor e apoio incondicional.

Minha vida não existe sem vocês.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Luís Roberto Batista, pela orientação, amizade e confiança e também por ter me concedido tantas oportunidades, durante a execução deste trabalho, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada.

Ao pesquisador Frederico Novelli, pesquisador da EPAMIG, por ter feito a ponte entre os vitivinicultores e ter proporcionado a realização deste trabalho.

À doutora e amiga Fabiana Passamani, pela orientação e pelas infinitas ajudas no laboratório. Sem seu apoio e ajuda em compartilhar seus conhecimentos, por estar sempre disponível desde as primeiras análises, não seria possível a realização deste trabalho.

À professora doutora Cristina Ferreira Silva Batista, pela paciência, atenção, disponibilidade, por todo o conhecimento que adquiri no trabalho com leveduras e por proporcionar o aprendizado na técnica de Maldi Toff e realizar as atividades em seu laboratório.

Ao técnico Edinho, do Laboratório de Fitopatologia, por toda a disponibilidade, atenção, ajuda e los conhecimentos transmitidos.

A Sirlei, pelo auxílio e ajuda na extração do DNA total das amostras. Seu apoio foi fundamental para que fosse enviado o material para o sequenciamento.

Às minhas ajudantes, Fábria e Daniele, por todo apoio. Vocês foram muito importantes para a obtenção dos resultados.

À pós-doutoranda Beatriz, do Departamento de Microbiologia Agrícola, pela atenção, paciência nos ensinamentos adquiridos da técnica de Maldi Toff.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização deste projeto de pesquisa.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos vitivinicultores que permitiram a coleta nas suas propriedades.

Às amigas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas em Alimentos, em especial Abiah, Gislaine, Lorena, Luisa, Michele Aragão, Priscilla, Thaiana, Sirlei e Daiani, por todo o apoio, não só na realização das análises, mas também nos momentos mais difíceis. Em especial, agradeço às minhas amigas Fabiana Passamani e Michelle Terra, pela força, incentivo e apoio sempre, pelas risadas e momentos de alegria e pelo companheirismo. Vocês são especiais.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado e, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO GERAL

O estudo da microbiota *terroir* visa obter o conhecimento do ecossistema microbiano presente na uva, que apresenta grande diversidade de microrganismos, como leveduras, bactérias e fungos. Esses microrganismos modulam substancialmente a saúde da videira, seu desenvolvimento, assim como a uva e, conseqüentemente, a qualidade do vinho. A microbiota das uvas viníferas é composta por alguns gêneros, como *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, assim como no solo essas espécies também estão presentes. Algumas espécies são responsáveis por causarem doenças nas plantas, como a fusariose e a podridão do cacho e outras espécies podem ser responsáveis pela produção de ocratoxina A. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com os objetivos de avaliar a diversidade de fungos filamentosos presentes em uvas da variedade Syrah e no solo dos vinhedos, por meio de diluição seriada em meio DRBC e DG18, a fim de auxiliar no conhecimento da microbiota da região e correlacionar com as características físico-químicas do solo através de componentes principais (PCA), assim como identificar a microbiota *terroir* nas uvas pela técnica de metagenômica. Os resultados obtidos mostram que, nas uvas, houve predominância dos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, representando 43,75%, 30,89% e 10,53% respectivamente. Já nas amostras de solo os principais gêneros encontrados foram *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, representando 18,60%, 17,13% e 16,97% respectivamente. Já na técnica de metagenômica, perfis taxonômicos foram obtidos em Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, tendo sido possível obter maior predominância do filo Ascomycota, seguido de Basidiomycota, em que as 20 principais espécies foram agrupadas e, então, construída uma árvore filogenética representada por gêneros como *Cercospora*, *Uwebraunia*, *Aureobasidium*, *Leptospora*, *Pseudopithomyces*, *Periconia*, *Acrocalyma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Hansfordia*, *Meyerozyma*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Acremonium*, *Sarocladium*, *Giberella* e *Colletotrichum*. A caracterização da diversidade microbiana das uvas foi obtida com sucesso, no entanto, pôde-se observar um grande número de indivíduos que não foram classificados, levando a crer que estudos futuros nessa área precisam ter continuidade para que, cada vez mais, possamos ter conhecimento dessas espécies e entender como funcionam esses sistemas.

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

GENERAL ABSTRACT

The microbiota terroir study aims to obtain the knowledge of the microbial ecosystem present in the grape, which presents great diversity of microorganisms such as yeasts, bacteria and fungi. The grapes microbiota is composed of some genera, such as *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizopus*, as well as in the soil these species are also present. Some species are responsible for causing diseases in plants, such as fusariosis and bunch rot and other species may be responsible for the production of ochratoxin A. In this sense, the present study was carried out with the objectives of evaluating the fungi filamentous diversity present in grapes of the Syrah variety and in the vineyards soil, by serial dilutions in DRBC and DG18 means. In order to assist in the region microbiota knowledge and to correlate with the physical-chemical characteristics of the soil through principal components analysis (PCA), as well as to identify the terroir microbiota in the grapes by the technique of metagenomics. The results obtained show that, in grapes, there was predominance of genera *Cladosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus*, representing 43.75%, 30.89% and 10.53% respectively. In the soil samples, the main found genera were *Penicillium*, *Cladosporium* and *Aspergillus*, representing 18,60%, 17,13% e 16,97% respectively. In the metagenomic technique, taxonomic profiles were obtained in Domain, Phylum, Class, Order, Family, Genera and Species, and it was possible to obtain a greater predominance of Ascomycota phylum, followed by Basidiomycota, in which the top 20 species were grouped and then constructed a phylogenetic tree represented by genera as *Cercospora*, *Uwebraunia*, *Aureobasidium*, *Leptospora*, *Pseudopithomyces*, *Periconia*, *Acrocalyma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Hansfordia*, *Meyerozyma*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Acremonium*, *Sarocladium*, *Giberella* e *Colletotrichum*. The microbial diversity characterization of the grapes was successfully obtained, however, it was possible to observe a large number of individuals that were not classified, leading to the belief that future studies in this area need to be continued so that, more and more, we can have knowledge of these species and understand how these systems work.

Keywords: Grape. Soil. Fungi diversity. Yeasts. Metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Variedade Syrah.....	19
Figura 2 - Variedade Chardonay.....	20
Figura 3 - Variedade Cabernet Sauvignon.....	20
Figura 4 - Variedade Sauvignon Blanc.....	21
Figura 5 - Regiões produtoras de vinho no Sul de Minas Gerais.....	22
Figura 6 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA).....	25

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas e solo.....	41
Figura 2 - Amostragem do solo em cada ponto de coleta.....	42
Figura 3 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade fúngica de uva variedade Syrah e sua comparação entre a Vinícola 1 (V1), a Vinícola 2 (V2) e a Vinícola 3 (V3). (1) <i>Cladosporium cladosporioides</i> Complexo, (2) <i>Penicillium brevicompactum</i> , (3) morfotipo.....	55
Figura 4 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos isolados de uva variedade Syrah, safra de 2015, da Vinícola 2 (V2T1) e, da safra de 2016, da Vinícola 2 (V2T2). (1) <i>Cladosporium cladosporioides</i> Complexo, (3) morfotipo, (6) <i>Aspergillus niger</i> Agregado, (8) <i>Aspergillus ochraceus</i>	56
Figura 5 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química do solo da Vinícola 1 (V1), da Vinícola 2 (V2) e da Vinícola 3 (V3). A. PCA da diversidade de fungos filamentosos. (22) complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i> , (25) <i>Eupenicillium</i> sp., (29) <i>Fusarium lateritium</i> , (34) <i>Fusarium</i> sp., (36) morfotipo, (56) <i>Penicillium brevicompactum</i> . B. Composição físico-química. (2) Potássio, (3) Fósforo, (16) Ferro, (17) Magnésio, (20) Enxofre.....	59
Figura 6 - Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química do solo, entre as safras de 2015, da Vinícola 2 (V2T1) e da safra de 2016, da Vinícola 2 (V2T2). A. Diversidade de fungos filamentosos. (1) <i>Aspergillus aculeatus</i> , (10) complexo <i>Cladosporium cladosporioides</i> , (12) <i>Aspergillus aculleatus</i> , (14) <i>Fusarium lateritium</i> , (19) morfotipo, (24) <i>Penicillium brevicompactum</i> , (29) <i>Pencillium paxilli</i> , (36) <i>Thricoderma</i> sp. B. Composição físico-química. (2) Potássio, (3) Fósforo, (17) Magnésio, (20) Enxofre.....	61
Figura 7 - Avaliação da produção de ocratoxina e aflatoxina por cromatografia de camada delgada (CCD).....	65
Figura 8 - Avaliação da produção de citrinina pelo método coconut agar.....	66

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uva.....	76
Figura 2 - Esquema das etapas do sequenciamento das amostras.....	78

Figura 3 – Esquema das etapas de tratamento dos dados (bioinformática).....	80
Figura 4 – Árvore filogenética das 20 principais espécies encontradas na uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.	98

LISTA DE GRÁFICOS

CAPÍTULO 2

Gráfico 1 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 1.	46
Gráfico 2 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 2, safra 2015 e 2016.....	47
Gráfico 3 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 3.	47
Gráfico 4 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 1.....	50
Gráfico 5 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 2, safra 2015 e 2016.....	51
Gráfico 6 –	Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 3.....	52

CAPÍTULO 3

Gráfico 1 –	Abundância relativa, em nível de filo dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.....	84
Gráfico 2 –	Abundância relativa, em nível de classe dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.....	85
Gráfico 3 –	Abundância relativa em nível de ordem dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.....	86
Gráfico 4 –	Abundância relativa, em nível de família, dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.....	87
Gráfico 5 –	Abundância relativa, em nível de gênero, dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.....	88
Gráfico 6 –	Quantidade de fungos, em nível de espécie, da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2, representados como uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU).....	89
Gráfico 7 –	Curva de rarefação com quantidade de espécies representadas da Vinícola 1 (Grape1) e Vinícola 2 (Grape 2).....	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 -	Produção de uvas no Brasil, em toneladas, 2010 a 2014.....	17
Tabela 2 -	Produção de uvas para processamento e para consumo <i>in natura</i> , no Brasil, em toneladas, de 2010 a 2014.....	17

CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de uva da variedade Syrah e de solo nos vinhedos localizados em três municípios do sul de Minas Gerais e sua área de produção.....	40
Tabela 2 –	Composição físico-química do solo da Vinícola 1 (V1), da Vinícola 2 (V2) e da Vinícola 3 (V3).	57
Tabela 3 –	Espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> isoladas de uva vinífera e solo potencialmente toxigênicos.....	64

CAPÍTULO 3

Tabela 1 -	Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de uva da variedade Syrah nos vinhedos localizados em dois municípios do sul de Minas Gerais e sua área de produção.....	75
Tabela 2 –	Diversidade de fungos basidiomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 1.....	90
Tabela 3 –	Diversidade de fungos ascomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 1..	92
Tabela 4 –	Diversidade de fungos basidiomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 2.....	93
Tabela 5 –	Diversidade de fungos Ascomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 2.....	95

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Vitivinicultura brasileira	16
2.2	Uvas viníferas cultivadas em Minas Gerais	18
2.2.1	Syrah	18
2.2.2	Chardonnay	19
2.2.3	Cabernet Sauvignon	20
2.2.4	Sauvignon Blanc	21
2.3	Produção de vinhos na região de Minas Gerais	21
3	VINHOS COM <i>TERROIR</i>	23
3.1	Microrganismos e a qualidade do vinho	23
3.2	Microrganismos e a segurança do vinho	24
3.2.1	Fungos e o risco da presença de micotoxinas	24
3.3	Indicação Geográfica	26
3.4	Microbiota <i>terroir</i>	27
3.4.1	Uva	27
3.4.2	Solo	28
4	METAGENÔMICA	30
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 2 Diversidade de fungos filamentosos isolados de uva da variedade Syrah e solo de vinhedos do Sul de Minas Gerais	36
1	INTRODUÇÃO	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Amostragem	41
3.1.1	Coleta das uvas	41
3.1.2	Coleta do Solo	41
3.2	Isolamento de Fungos Filamentosos	42
3.3	Identificação de Fungos Filamentosos	43
3.4	Análise físico-química do solo	43
3.5	Preservação de fungos filamentosos	43
3.6	<i>Screening</i> para avaliação do potencial toxigênico	44
3.7	Análise estatística	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	Diversidade de fungos filamentosos em uvas	45
4.2	Diversidade de fungos filamentosos do solo	49
4.3	Análise de componentes principais da uva Syrah	54
4.4	Análise de componentes principais do solo	56
5	AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES PRODUTORAS DE OCRATOXINA A, aflatoxinas B1, B2, G1 E G2 e citrinina	64
6	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 3 Determinação da microbiota <i>terroir</i> de vinhedos do sul de Minas Gerais por meio da metagenômica	71

1	INTRODUÇÃO	72
2	OBJETIVOS	73
2.1	Objetivo Geral.....	73
2.2	Objetivos específicos.....	73
3	MATERIAIS E MÉTODOS	74
3.1	Amostragem.....	76
3.1.1	Coleta das uvas.....	76
4	ANÁLISE DE METAGENÔMICA	77
4.1	Extração do DNA total.....	77
4.2	Sequenciamento e bioinformática.....	78
4.2.1	Bioinformática.....	80
4.2.1.1	Emparelhamento: montagem e controle de qualidade.....	80
4.2.1.2	OTU cluster e anotação das espécies.....	81
5	RESULTADOS	83
6	DISCUSSÃO	100
7	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXOS	109

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A viticultura e a vitivinicultura têm elevada importância econômica e cultural em muitos países. No Brasil, essas atividades vêm crescendo consideravelmente, principalmente a cultura de uvas viníferas para a elaboração de vinhos finos. No estado de Minas Gerais, a produção vitivinícola segue três segmentos, o segmento tradicional com a produção de uvas híbridas e americanas para a elaboração de vinho de mesa e suco de uva, o segmento de produção de uvas de mesa para consumo e o terceiro segmento que está focado na produção de uvas viníferas para a elaboração de vinhos finos (PROTAS; CAMARGO, 2011).

Sabe-se que a videira é colonizada por uma variedade de microrganismos e que apresentam múltiplas atividades metabólicas, ocasionando um efeito importante na saúde da planta, na qualidade das uvas e, conseqüentemente, na qualidade dos vinhos produzidos (BOKULICH et al., 2014). Dentre estes microrganismos destacam-se os fungos filamentosos capazes de contaminar as uvas com micotoxinas, especialmente a ocratoxina A.

O crescente avanço do setor vitivinícola no Brasil tem também despertado o interesse sobre a contaminação das uvas por estes fungos produtores de micotoxinas, pois a presença desses microrganismos pode levar a perdas econômicas significativas, reduzindo a qualidade do produto final. A presença desses fungos pode modificar a composição química das uvas, alterando-lhes o sabor, o odor e a cor dos vinhos. Os principais fungos responsáveis pela deterioração das uvas na época de colheita pertencem aos gêneros *Botrytis*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, sendo os *Aspergillus* da Seção *Nigri* considerados os principais produtores de micotoxinas nas uvas (EINLOFT, 2012).

A microbiota *terroir* é formada por componentes como o solo, os microrganismos, o clima, a altitude, o regime de chuvas e o relevo, e todos esses fatores são considerados importantes e desempenham papel fundamental na elaboração dos vinhos, pois propiciam o cultivo e o desenvolvimento da uva com qualidade e tipicidade que influenciam a identidade do vinho produzido em determinada região. Os estudos sobre diversidade de fungos filamentosos e leveduras em uvas, solos e folhas são importantes para se obter informações sobre a influência desses microrganismos nas características organolépticas do produto final, ou seja, dos vinhos.

O conhecimento da diversidade microbiana nas regiões produtoras poderá atuar na melhoria do *terroir* desses vinhos, permitindo, assim, a sua reprodutibilidade em locais que não apresentam essas características. Estudos avançados são necessários para conhecer e explicar a potencial funcionalidade destas comunidades, já que diferentes espécies de microrganismos, como, por exemplo, as bactérias, quando associadas em diferentes tecidos da videira, podem influenciar o *flavor*, estando relacionadas diretamente com as características organolépticas do vinho (GILBERT; LELIE; ZARRAONAINDIA, 2014). Além disso, a bioprospecção da microbiota associada às uvas viníferas permitiu descobertas de algumas espécies de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces* com propriedades enológicas e que já estão sendo comercializadas como uma cultura iniciadora no processo de vinificação. Isso mostra que um número crescente de microrganismos está sendo reconhecido como participante ativo no processo de fermentação de vinhos, trazendo importantes contribuições para a qualidade sensorial e a segurança dos vinhos elaborados (BOKULICH et al., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar quantitativa e qualitativamente a população de fungos filamentosos presentes nas uvas e no solo de vinhedos, para caracterizar a microbiota *terroir* da região. Os resultados estão apresentados em dois capítulos. No primeiro, apresenta-se a diversidade microbiana de fungos filamentosos isolados de uvas da variedade Syrah e dos solos de vinhedos localizados em Minas Gerais e, no segundo capítulo, aborda-se a diversidade de fungos e leveduras pela técnica de metagenômica, para caracterizar a microbiota *terroir* da região de estudo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Vitivinicultura brasileira

As primeiras variedades de uvas (*Vitis vinifera*) foram introduzidas no Brasil pelos portugueses, porém, a atividade se consolidou com a introdução da variedade Isabel (*Vitis labrusca*), no século XIX. Mas, somente no século XX as variedades finas voltaram a ganhar expressão na produção de vinhos no país (CAMARGO; TONIETTO; HOFFMANN, 2011).

A vitivinicultura e a vitivinicultura brasileira ocupam uma área de, aproximadamente, 80.576 hectares de vinhedos. O Rio Grande do Sul se destaca, com média de 777 milhões de kg de uva por ano, gerando 330 milhões de litros de vinhos e mostos (sumos de uvas frescas que ainda não passaram pelo processo de fermentação). Das uvas cultivadas no sul do país apenas uma porcentagem é destinada ao consumo *in natura*; a maior parte das frutas é utilizada na fabricação de vinhos, o que corresponde a 90% da produção nacional (BRASIL, 2015; INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014).

Embora a vitivinicultura não ocupe posição de destaque na agroindústria nacional, essa cultura tem agregado valor em outras atividades da economia, como o turismo e a gastronomia. Além disso, a implantação das indicações geográficas, nos últimos anos, também tem contribuído para o desenvolvimento das regiões envolvidas, agregando valor aos produtos e a valorização dos fatores culturais e naturais (MELLO, 2014).

De acordo com os dados estatísticos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), houve um aumento na produção de uvas de 1,64%, nas safras de 2014 em relação à de 2013. A maior produção ocorreu no estado da Bahia, com aumento de 46,77% na produção, seguido de Santa Catarina, com 24,37%. Verificou-se um aumento também na produção dos estados de Pernambuco, Paraná e Rio Grande do Sul, na proporção de 3,52%, 2,35%, e 0,53%, respectivamente. Minas Gerais e São Paulo apresentaram queda de produção de 9,24% e 15,09%, respectivamente, em 2014, como se observa nos dados da Tabela 1. No entanto, em comparação com as safras de 2013, houve um aumento de 1,74% na produção de uvas no Brasil.

Na Tabela 1 observa-se que houve redução na produção de uvas, nas safras de 2012 e 2013, no Brasil, relacionada, especialmente, às condições climáticas, pelo próprio ciclo da videira e ao fato de que em algumas regiões os vinhedos estão sendo reconvertidos (IBGE, 2013).

Tabela 1 - Produção de uvas no Brasil, em toneladas, 2010 a 2014.

Estado\Ano	2010	2011	2012	2013	2014
Rio Grande do Sul	692.692	829.589	840.251	808.267	812.537
Pernambuco	168.225	208.660	224.758	228.727	236.767
São Paulo	177.538	177.227	176.902	172.868	146.790
Paraná	101.900	105.000	70.909	79.052	80.910
Bahia	78.283	65.434	62.292	52.508	77.504
Santa Catarina	66.214	67.767	71.019	53.153	66.106
Minas Gerais	10.590	9.804	10.107	12.734	11.557
Brasil	1295.442	1463.481	1.456.238	1.407.309	1.432.171

Fonte: IBGE (2014)

Em 2014, a produção de uvas destinadas ao processamento (vinho, suco e derivados) foi de 673,422 milhões de kg de uvas, representando 46,89% da produção nacional, sendo o restante da produção (53,11%) destinado ao consumo *in natura* (Tabela 2).

Tabela 2 - Produção de uvas para processamento e para consumo *in natura*, no Brasil, em toneladas, de 2010 a 2014.

Discriminação/Ano	2010	2011	2012	2013	2014
Processamento	557.058	836.058	830.915	679.793	673.422
Consumo <i>in natura</i>	737.554	627.423	624.894	733.061	762.652
Total	1.295.442	1.463.481	1.455.809	1.412.854	1.436.074

Fonte: IBGE (2014)

Elaboração: Loiva Maria Ribeiro de Mello - Embrapa Uva e Vinho

A vitivinicultura brasileira vem crescendo devido à expansão da área de cultivo e ao emprego de tecnologias mais modernas na produção de uvas e fabricação de vinhos. As regiões do Brasil que merecem destaque na produção de uvas são as do sul, nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina; na região sudeste, os estados de Minas Gerais e São Paulo; no centro-oeste, os estados do Mato Grosso do Sul e Góias, e, na região nordeste, os estados de Pernambuco e Bahia, no Vale do Submédio São Francisco, onde a variabilidade de

clima e solo permite a obtenção de produtos com características diferenciadas (GUERRA et al., 2009).

No sul de Minas Gerais o plantio das variedades viníferas encontrou dificuldades iniciais para o estabelecimento dessa cultura, principalmente devido à decorrência do ciclo normal de brotamento, amadurecimento e colheita das uvas. No hemisfério sul, a poda ocorre no inverno, durante o repouso da videira (abril-julho) e a colheita ocorre no verão (janeiro-março). No entanto, neste período, no Brasil ocorre a estação de chuvas, o que atrapalha o amadurecimento das uvas utilizadas na fabricação de vinhos. Devido a essas circunstâncias foi necessário alterar o ciclo da videira, ou seja, a uva foi induzida a mudar suas etapas de crescimento, amadurecimento e colheita, por meio da realização de duas podas, uma em agosto e a outra em janeiro. Essa poda dupla permite a formação de ramos produtivos e a eliminação de alguns cachos. Com isso, a planta muda seu ciclo, começando a brotar em fevereiro, a florescer em março e inicia a formação dos cachos em abril, sendo a colheita realizada no inverno. Essa mudança na inversão do ciclo da videira faz com que os frutos sejam colhidos no inverno, o que traz benefícios para o fruto.

Nessa região os dias são secos e quentes e as noites são frias, ou seja, observa-se uma grande amplitude térmica diária, o que favorece o lento amadurecimento da uva, a fixação de aromas e o acúmulo de polifenóis que são essenciais para a estrutura e a longevidade do vinho. Como, no período de colheita, não ocorrem chuvas, isso faz com que se consiga uma excelente concentração de açúcar em decorrência de um completo amadurecimento fenólico (MOTA et al., 2010).

2.2 Uvas viníferas cultivadas em Minas Gerais

2.2.1 Syrah

A uva Syrah é uma das variedades mais cultivadas e seus vinhos são característicos por seu aroma e buquê. Sua origem é relatada como sendo de Schiraz, na Pérsia, no entanto, outras referências citam que pode ser nativa de Vila Siracusa, na Sicília. Independente de sua origem, a variedade Syrah é cultivada na França há muito tempo e de lá se expandiu para outros países, sendo hoje a variedade de uva vinífera mais plantada no mundo. Chegou ao Rio Grande do Sul em 1921, oriunda de vinhedos da Vila Cordélia, em São Paulo, mas não foi adiante por não ter êxito nos vinhedos daquele estado. Posteriormente, começou a ser plantada comercialmente em Santana do Livramento, na Serra Gaúcha, entretanto, as condições

ambientais da região não foram propícias ao seu cultivo. Nas áreas semiáridas do nordeste, em especial na região do Vale do Submédio São Francisco, tem mostrado ótimos resultados (GUERRA et al., 2009), assim como na região Sul de Minas, sendo a variedade que mais bem se adaptou às características climáticas da região.

Figura 1 - Variedade Syrah.



Fonte: Foto feita pela autora (2016).

2.2.2 Chardonay

A uva Chardonay é uma variedade que tem origem, possivelmente, na Borgonha, tendo sido primeiramente introduzida, em 1930, em São Roque, SP e, em 1948, no Rio Grande do Sul. Somente em 1970 essa variedade foi difundida na Serra Gaúcha, em decorrência de não ter tido uma difusão comercial e ter ficado retida nas estações experimentais de São Roque e Bento Gonçalves. É uma variedade que tem ótima adaptação na Serra Gaúcha, apresentando vigor e produtividade relevante. Dependendo do ano de colheita, atinge boa graduação de açúcar, no entanto, apresenta brotação precoce, podendo causar prejuízos em geadas tardias.

Esta variedade tem renome internacional pelo fato de produzir espumantes famosos elaborados na região de Champagne, juntamente com a Pinot Noir, especialmente pela qualidade dos vinhos produzidos na Borgonha. No Brasil tem destaque com a produção de vinho fino varietal e de espumantes (GUERRA et al., 2009).

Figura 2 - Variedade Chardonay.



Fonte: Vinhos Maria Maria (2016a).

2.2.3 Cabernet Sauvignon

A uva Cabernet Sauvignon é originária de Bordeaux, França, e é cultivada no Brasil. As primeiras tentativas de sua difusão comercial no Rio Grande do Sul ocorreram nas décadas de 1930 e 1940. Entretanto, foi a partir do final da década de 1980, com o incremento da produção de vinhos varietais, que ganhou expressão no estado. Tem cachos pequenos e cilíndricos, frutos pequenos, esféricos e de sabor meio amargo. Os aromas da Cabernet Sauvignon são diretos, marcantes e de fácil reconhecimento. São intensas e ricas em aromas e sabores, como frutas vermelhas (cereja, amora, morango), frutas pretas (ameixa, mirtilo), especiarias (pimentas em pó, cravo) e também marcadas por aromas vegetais, de oliva, menta, tabaco, madeira, cedro e anis.

A videira adapta-se bem a qualquer clima, desde que a temperatura não atinja extremos de frio e de calor. O frio intenso a congela, enquanto o calor deve ser equilibrado para que o amadurecimento aconteça no tempo certo. Por ser de ciclo tardio, sua vindima (colheita) acontece depois da maioria das outras uvas, o que confere um sabor mais concentrado aos seus frutos (GUERRA et al., 2009).

Figura 3 - Variedade Cabernet Sauvignon.



Fonte: Foto feita pela autora (2016).

2.2.4 Sauvignon Blanc

A Sauvignon Blanc é originária de Bordeaux, onde se elaboram alguns dos mais conhecidos vinhos secos e doces, e onde é, em geral, cortada com boa porcentagem de Sémillon. Atualmente, os melhores exemplares franceses de Sauvignon Blanc vêm do Loire, vale a noroeste da França, onde essa uva alcançou fama mundial. Há grandes diferenças entre os Sauvignon Blanc de Bordeaux e os do vale do Loire. Em Bordeaux, os vinhos secos são pouco encorpados e menos aromáticos e intensos que os do Loire. A alta acidez dos vinhos do Loire representa uma vantagem na harmonização com comidas em que têm característica ácida (REVISTA ADEGA, 2006).

Figura 4 - Variedade Sauvignon Blanc.



Fonte: Vinhos Maria Maria (2016b).

2.3 Produção de vinhos na região de Minas Gerais

A viticultura mineira data do século XIX e iniciou-se com a matriz das videiras americanas cultivadas nas regiões de altitude do sul de Minas Gerais, mais especificamente em Andradas, Caldas e Baependi (SILVA, 1998; SOUZA, 1996).

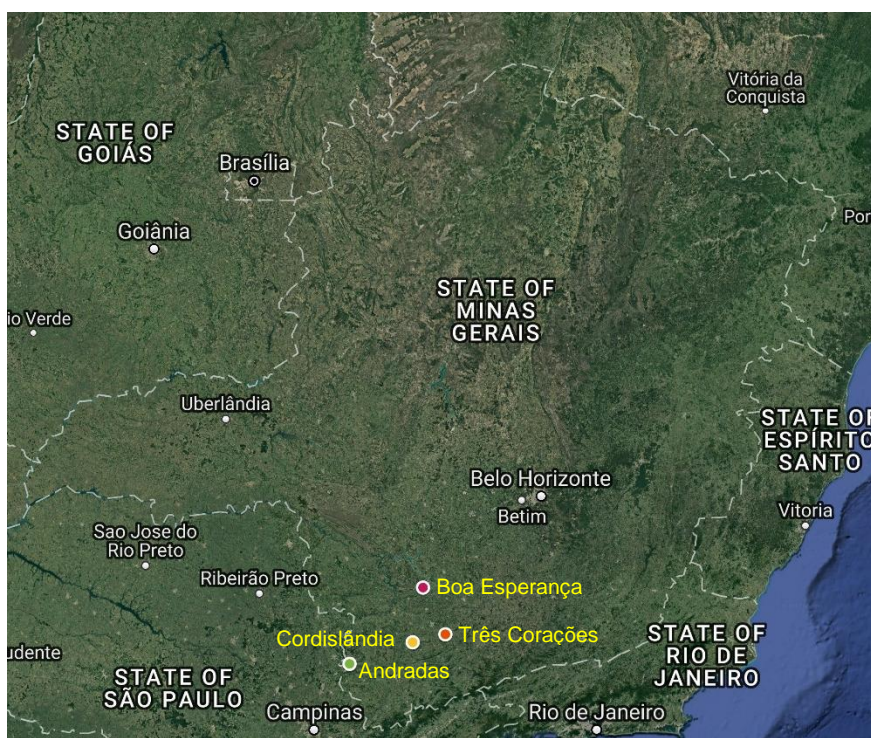
Na Europa, a colheita ocorre no primeiro trimestre do ano, mas isso não seria possível em Minas Gerais, em decorrência das chuvas e das altas temperaturas do verão, o que, além de diluir o açúcar e os componentes de cor e aroma, pode ocasionar podridão nos cachos. Por isso foi implementada a nova técnica de dupla poda, tornando possível passar a colheita das videiras para o inverno e as variedades Syrah e Sauvignon Blanc se adaptaram bem ao solo mineiro. Esta técnica implica a inversão do ciclo produtivo, alterando para o inverno o período de colheita das uvas destinadas à produção. O método consiste na realização de podas em janeiro, com colheita em agosto, época em que o dia é ensolarado, a noite é fria e o solo seco. Essas condições são indispensáveis para que a uva concentre açúcar e dê qualidade ao

vinho. Em Minas, vem sendo cultivada, principalmente, no sul do estado, em cidades como Três Corações, Três Pontas, Cordislândia, Varginha, Andradas, Santo Antônio do Amparo, Diamantina e Santana dos Montes (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS - EPAMIG, 2006).

Minas Gerais começa a despontar como estado produtor de uvas destinadas ao desenvolvimento de vinhos de fina qualidade, inclusive voltadas para a produção de espumantes. O estado já conta com cerca de 150 hectares de videiras plantadas, sendo responsável pela produção anual de 750 mil garrafas.

As cidades que se destacam na produção de vinhos finos são Andradas, com a Casa Geraldo; Cordislândia, na Fazenda Porto, com o vinho Luiz Porto; Boa Esperança, na Fazenda Capetinga, com o vinho Maria Maria e Três Pontas, na Fazenda da Fé, com o Primeira Estrada, que é o primeiro vinho fino produzido em Minas Gerais.

Figura 5 – Regiões produtoras de vinho no Sul de Minas Gerais.



Fonte: Google Maps (2016).

3 VINHOS COM *TERROIR*

Terroir é uma palavra de origem francesa que não tem tradução em nenhum outro idioma e está relacionada diretamente ao solo e ao microclima particular de uma região, o qual irá influenciar no surgimento de características peculiares da uva que, conseqüentemente, determinarão a qualidade, a tipicidade e a identidade de um vinho (REVISTA ADEGA, 2010), além da cultivar e das práticas humanas que irão interagir na região. É o ambiente natural de uma região produtora de vinhos, onde todos os fatores humanos e ambientais, estão relacionados e irão contribuir para a especificidade do vinho. Diante disso, um enólogo usará de todo seu conhecimento para aproveitar as características de uma determinada região e desenvolver um produto típico.

A produção de vinhos finos está ligada à noção de *terroir*, expressão que considera uma determinada região geográfica como uma característica distintiva que diferencia o produto das demais regiões produtoras, ou seja, um vinho produzido em uma determinada região apresenta características únicas, não podendo ser reproduzidas em outros lugares, mesmo utilizando-se as mesmas técnicas de vinificação (ANESI et al., 2005).

Os principais fatores que afetam a tipicidade dos vinhos são, em grande maioria, as castas, a região de origem e os traços culturais, no entanto, condições climáticas são determinantes no período de crescimento da videira, assim como para o desenvolvimento do broto até o momento da colheita. São fatores que estão intimamente ligados à qualidade do fruto, assim como do vinho (SANTOS et al., 2011).

O solo tem propriedades químicas e físicas que estão diretamente relacionadas com a nutrição da videira e, conseqüentemente, com as características do fruto, que são fundamentais para o produto final, o vinho (ANDRÉS-DE-PRADO et al., 2007). Essas propriedades do solo irão influenciar os elementos minerais, os ácidos orgânicos, os compostos fenólicos e os aromas, que são fatores intimamente ligados às características das uvas de cada região, acarretando mudanças nas suas propriedades sensoriais e químicas (GUERRA et al., 2003).

3.1 Microrganismos e a qualidade do vinho

A qualidade dos vinhos está relacionada com a escolha adequada da cepa utilizada no processo de vinificação, pois irá influenciar na evolução da microbiota presente no mosto de fermentação e, conseqüentemente, na qualidade do vinho. O processo de fermentação

depende da ação combinada das cepas que se desenvolvem durante o processo, em decorrência da carga microbiana inicial presente na uva. As leveduras presentes no mosto, em conjunto com as leveduras iniciadoras, desempenham papel fundamental na caracterização do produto final, devido às suas enzimas e metabólitos (BARRAJÓN et al., 2009; FLEET, 2003).

A principal levedura utilizada no processo fermentativo e em estudos é a *Saccharomyces* sp. Este gênero, normalmente, é encontrado naturalmente na própria uva, o que lhe confere características especiais. Segundo Fleet (2003), são necessários estudos que investiguem a microbiota presente nesses nichos ecológicos, em decorrência do grande número de enzimas produzidas por esses microrganismos.

O gênero *Saccharomyces* tem grande importância na indústria, mas são as leveduras não *Saccharomyces*, presentes no processo inicial da fermentação, as responsáveis pelas propriedades organolépticas dos vinhos, recebendo destaque os gêneros *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Debaromyces*, *Issatchenkia* e *Rhodotorula*. Sendo boas produtoras de β -glicosidase, assim como outras enzimas, podem estar relacionadas com as características organolépticas do produto final, aumentando o aroma e as substâncias voláteis (BEZERRA, 2012).

O enriquecimento do vinho pode ser realizado por meio da hidrólise dos glicosídeos, que são precursores que se encontram nas uvas como açúcares na forma de dissacarídeos ou monossacarídeos, onde atuarão como substrato para uma β -glicosidase, dessa forma aumentando o aroma dos vinhos. Uma β -glicosidase ideal deve ser estável em pH baixo, a concentrações elevadas de glicose e na presença de etanol (10%-15%) (BEZERRA, 2012).

Os glicosídeos são formados por uma aglicona (volátil quando livre) e açúcar. A β -glicosidase irá atuar na hidrólise da ligação do açúcar e da aglicona, liberando a parte aglicona que contribuirá para o aroma do vinho (BEZERRA, 2012).

3.2 Microrganismos e a segurança do vinho

3.2.1 Fungos e o risco da presença de micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos sintetizados, sob condições específicas, por determinadas espécies de fungos filamentosos. Algumas dessas toxinas permanecem restritas ao micélio fúngico, enquanto a maior parte é secretada no substrato (COPETTI et al., 2013).

Os principais fungos responsáveis pela produção de ocratoxina A (OTA) em uvas são os *Aspergillus carbonarius* e, em menor proporção, *Aspergillus niger* e *Penicillium verrucosum*. De acordo com estudos realizados, as espécies produtoras de OTA que aparecem com maior frequência são os fungos da secção *Nigri*, em destaque para os agregados do *Aspergillus niger* e *Aspergillus carbonarius* (WELKE; HOELTZ; NOLL, 2009).

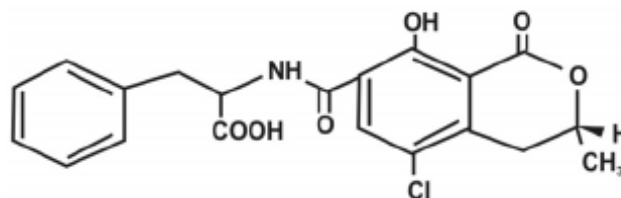
A OTA apresenta propriedades nefrotóxicas, imunossupressoras e carcinogênicas para animais, sendo classificada como grupo 2B, pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, considerada possivelmente carcinogênica para o homem e a aflatoxina classificada como carcinogênica e pertencente ao grupo 1A (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC, 1993).

A ocratoxina A foi apontada como sendo possível causadora da nefropatia endêmica dos balcãs e de anemia por deficiência de ferro.

No Brasil, vigora a Resolução da Diretoria Colegiada nº7/2011, que estipula limites máximos de OTA em alimentos, que são de 2 µg/kg, para vinhos e seus derivados, como sucos, polpa de uva e de 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas (BRASIL, 2011).

A ocratoxina A (OTA) é um metabólito secundário produzido por algumas espécies de fungos e é considerado o composto mais tóxico da família das ocratoxinas e, por isso, é mais estudada. É altamente solúvel em solventes orgânicos polares e apresenta baixa solubilidade em água. Com isso é rapidamente absorvida pelo estômago e intestino. Sua toxicidade está relacionada à presença do átomo de cloro localizado na posição C5 adicionado de um grupo OH fenólico (Figura 2).

Figura 6 - Estrutura química da ocratoxina A (OTA).



Fonte: Anli e Alkis (2010), modificado.

A presença dessa toxina nos alimentos está relacionada com a incidência de fungos ocratoxigênicos. Vários fatores estão ligados à ocorrência e ao crescimento desses microrganismos nos frutos, incluindo as condições climáticas, as variedades da uva, o ataque de pássaros e insetos e a ação de agrotóxicos (PITT; HOCKING, 1997). Segundo Battilani et

al. (2004), a microbiota presente nas bagas está correlacionada com a variedade das uvas, sendo as uvas tintas as que apresentaram maior presença de fungos ocratoxigênicos.

3.3 Indicação Geográfica

Vinhos produzidos em diferentes regiões, mas empregando-se a mesma tecnologia, apresentam características organolépticas diferentes que evidenciarão cada região. Isto se deve à expressão dos fatores naturais e humanos que decorrem do processo de produção da uva e da elaboração e do envelhecimento do vinho. Em decorrência de todos esses fatores, que agregam valor não só ao produto como à região produtora, a indicação geográfica (IG) é de suma importância, pois permite utilizar as referências geográficas das áreas de produção de uvas e vinhos para se diferenciar no mercado e agregar valor ao produto final (GOLLO, 2006).

A indicação geográfica é uma importante ferramenta utilizada na proteção de áreas vinculadas a produtos com características diferenciadas. Seu registro viabiliza o produto no mercado, agregando valor à região, proporcionando melhoria na qualidade dos produtos e serviços e garantindo uma identidade que irá diferenciar o produto no mercado consumidor, em decorrência de suas características geográficas, históricas e socioculturais (GIESBRECHT; SCHWANKE; MÜSSNICH, 2011).

A indicação geográfica é uma das formas mais importantes de valorização e proteção dos produtos tradicionais vinculados a determinado território e que apresentem uma qualidade única, ou seja, onde as características geográficas, como solo, vegetação, características meteorológicas, como mesoclima e características humanas, como capacitação, zelo, capricho, conhecimento aplicado ao cultivo e tratamento culturais, indicam de onde são provenientes, apresentando um certificado de qualidade que atesta a sua origem e garante um controle rígido de qualidade (GOLLO, 2006).

No Brasil, o registro das indicações geográficas está previsto na Lei de Propriedade Industrial (Lei nº 9.279/96), que atribui competência ao Instituto Nacional da Propriedade Intelectual (INPI) para estabelecer as condições de registro de IG, que se apresentam em duas categorias: denominação de origem ou indicação de procedência. O número de registros de IGs no INPI cresce ano a ano, tendo chegado a 46 registros em junho de 2014, sendo 38 deles nacionais (GIESBRECHT et al., 2014).

A denominação de origem indica o nome geográfico do país, cidade, região ou localidade de território cujas qualidades ou características se devem, exclusivamente, ao meio

geográfico, incluindo fatores ambientais e humanos, ou seja, faz-se necessário o preenchimento de requisitos de qualidade que caracterizam o produto (LAGES; LAGARES; BRAGA, 2005).

A indicação de procedência indica o nome geográfico do país, cidade, região ou localidade onde determinado produto ou prestação de serviço tenha se tornado conhecido como centro de extração, produção ou fabricação, ou seja, não está vinculada a fatores locais relacionados a especificidades geológicas, fisiológicas, endoclimáticas ou humanas (LAGES; LAGARES; BRAGA, 2005).

Os países que têm maior prestígio no panorama vitivinícola mundial são França, Itália, Espanha, Portugal e Estados Unidos, onde os vinhos são produzidos regionalmente e com melhor qualidade, e consolidados com indicações geográficas amparadas por legislações específicas (LLOPIS, 1997).

3.4 Microbiota *terroir*

Diversos estudos têm sido realizados utilizando diversas formas de identificação por meio de isolamento, caracterização, identificação, seleção, conservação e disponibilização destes microrganismos para usos futuros. São práticas imprescindíveis para o desenvolvimento de processos e a obtenção de produtos de interesse econômico (ABREU; TUTUNJI, 2004), a fim de se obter regiões com viníferas com características diferenciadas. A preservação correta dos microrganismos e a disponibilização deles para a comunidade científica são fatores primordiais para futuras aplicações do seu potencial biotecnológico.

3.4.1 Uva

A uva é empregada na alimentação humana de várias maneiras, podendo ser consumida como uva passa ou ser utilizada na fabricação de vinhos destilados, sucos e diversos doces. A colheita da uva vai depender de onde ela será empregada. Quando consumida *in natura*, deve ser colhida quando o teor de açúcar e a acidez atingirem determinado teor; já a uva destinada à fabricação de vinhos será colhida em função da região produtora, do tipo de vinho a ser elaborado e das condições naturais da safra (MATSUOKA, 2006).

No momento da vinificação, os microrganismos presentes na uva desempenham papel importante, já que podem influenciar a produção e o tempo de armazenamento do vinho

(BOKULICH et al., 2014; NISIOTOU et al., 2011; RENOUF; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2005). As uvas apresentam diversidade microbiológica natural, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, e apenas alguns destes microrganismos podem influenciar de forma positiva ou negativa a produção de vinho (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012). Todavia, a diversidade microbiana depende do estado de maturação e da disponibilidade de nutrientes.

Segundo o trabalho realizado por Bokulich et al. (2014), a avaliação de mostos de uvas colhidas na Califórnia permitiu a deterioração do perfil das comunidades ali presentes, tendo uma incidência de fungos filamentosos, principalmente de *Cladosporium* sp. (28%), *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinera*) (15,2%), *Penicillium* spp. (9,5%), *Davidiella tassiana* (9,2%) e *Aureobasidium pullulans* (7,3%), significativa população de leveduras, como *S. cerevisiae* (4%), *Hanseniaspora uvarum* (5%) e *Candida zemplinina* (1,3%). Entre as bactérias predominaram *Lactobacillales* (29,7%), *Pseudomonadales* (14,2%), *Enterobacteriales* (13,5%), *Bacillales* (12,6%) e *Rhodospirillales* (5,1%).

As condições climáticas da região produtora, algumas doenças, a presença de pragas e as práticas agrícolas adotadas são fatores que também podem influenciar a diversidade microbiana da uva (SETATI et al., 2012).

Alguns dos microrganismos encontrados na superfície das uvas estão envolvidos na elaboração de vinhos, participando da fermentação alcoólica e malolática, outros podem ter um impacto negativo na qualidade das uvas, como algumas espécies de fungos filamentosos fitopatogênicos, que podem causar doenças na videira, como o míldio e a podridão-negra, levando a defeitos sensoriais, como aroma de mofo e terrosos, além da produção de micotoxinas (LIKAR et al., 2015).

3.4.2 Solo

A população microbiana no solo é responsável por inúmeras funções, principalmente em processos no sistema solo-planta. O solo constitui um dos principais habitats para o desenvolvimento de microrganismos envolvidos na decomposição da matéria orgânica, na ciclagem de nutrientes (ANDERSON; CAIRNEY, 2004), no crescimento de plantas e contribuem para a fertilidade e a estrutura do solo (KIRK et al., 2004). Por ser considerado um reservatório natural, essa diversidade do solo é influenciada por condições climáticas, pela flora existente no ambiente e por suas características naturais.

As leveduras podem ser encontradas em concentrações que variam de 10^1 a 10^6 UFC/g de solo em área com plantas frutíferas, sendo encontradas, em maior quantidade, leveduras pertencentes aos gêneros *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*, em relação aos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Torulaspota*. Dentre os gêneros mencionados é possível encontrar, no solo, algumas leveduras responsáveis pela produção e alteração do vinho, como *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora uvarum* e *Pichia guilliermondii* (BOTHÁ, 2006; YURKOV; KEMLER; BEGEROW, 2012).

Borges et al. (2011) avaliaram a diversidade de fungos filamentosos em solo de erva-mate e obtiveram o maior número de isolados do gênero *Aspergillus*, seguido por *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Gliocladium* e *Lacanicillium*. Segundo Stamford et al. (2005), todos os gêneros encontrados são comuns em solo de florestas, campos, solos arenosos ou áreas cultivadas.

O solo é um dos fatores mais importantes do *terroir*, pois participa da composição mineral da videira. Esta composição reflete o ambiente onde as videiras são cultivadas e, como resultado, os produtos da videira, como sumo, uvas e vinho, serão influenciados por essa composição. O pH e o teor de cálcio presentes no solo são as características que mais afetam a composição das videiras e podem ter efeitos significativos no processo de disponibilidade e absorção de minerais pela planta (LIKAR et al., 2015).

4 METAGENÔMICA

A técnica da metagenômica tem sido utilizada para explorar as amostras ambientais no intuito de facilitar o entendimento da comunidade microbiana presente no ambiente. Estima-se que a maior parte dos microrganismos que habitam estes ambientes não seja cultivável, devido às diversas condições naturais desconhecidas, impossibilitando a reprodução do habitat em laboratório. Assim, a abordagem metagenômica é a mais indicada para esse estudo (MERING et al., 2007).

Uma razão muito básica para as grandes lacunas em nosso conhecimento de fungos é que a maioria deles passa a maior parte de seu ciclo de vida no solo ou dentro de outros substratos em sua fase microbiana, invisível a olho nu. As novas tecnologias têm impulsionado a descoberta da diversidade fúngica não descrita (JONES et al., 2011; SPRIBILLE et al., 2016) e será possível progredir rapidamente de 135.000 espécies descritas (HIBBETT et al., 2016) para a estimativa mais amplamente aceita de 3 milhões (HAWKSWORTH, 2012). Além disso, a combinação de abordagens ITS com o sequenciamento de RNA permite não apenas monitorar quais fungos estão presentes, mas também investigar o que estão fazendo.

O solo representa a maior fonte microbiana em todo o planeta, sendo essa biodiversidade oculta, sendo apenas de 0,1% a 1% da microbiota do solo cultiváveis por meios de métodos tradicionais (TORSVIK; OVREAS; THINGSTAD, 2002). Esses microrganismos são carregados através do vento, da chuva e de equipamentos agrícolas para todos os ambientes, como parte aérea das plantas, frutos, folhas. Diante disso, a metagenômica é considerada uma ferramenta poderosa para explorar o ambiente microbiano em suas potencialidades genéticas e metabólicas (SIMON; DANIEL, 2010).

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília, DF, v. 2, n. 2, p. 236-251, jul./dez. 2004.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, London, v. 6, n. 8, p. 769-779, Aug. 2004.
- ANDRÉS-DE-PRADO, R. et al. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. Cv. Grenache in commercial vineyards. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 3, p. 779-786, 2007.
- ANESI, A. et al. Towards a scientific interpretation of the terroir concept: plasticity of the grape berry metabolome. **BMC Plant Biology**, London, v. 15, p. 191-197, Aug. 2005.
- ANLI, E.; ALKIS, I. M. Ochratoxin A and brewing technology: a review. **Journal of Institute Brewing**, London, v. 116, n. 1, p. 23-32, Jan. 2010.
- ASPASIA, A. et al. Bacterial species associated with sound and *Botrytis*-infected grapes from a Greek vineyard. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 2/3, p. 432-436, Feb. 2011.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 243-259, Feb. 2012.
- BARRAJÓN, N. et al. Ecological study of wine yeast in inoculated vats from La Mancha region. **Food Control**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 778-783, 2009.
- BATTILANI, P. et al. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* on some grape varieties grown in Italy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 13, p. 1736-1740, 2004.
- BEZERRA, C. S. **Seleção de leveduras isoladas de uvas e mostos com atividade enzimática para melhoramento de vinhos**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Alimentos)-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2012.
- BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 1, p. E139-148, 2014.
- BORGES, L. R. et al. Diversidade de fungos filamentosos em solo de monocultivo de erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 185-194, abr./jun. 2011.
- BOTHA, A. Yeasts in soil. In: _____. **Biodiversity and ecophysiology of yeasts**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2005. chap. 11, p. 221-240. (The Yeast Handbook).

BRASIL. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html>. Acesso em: 10 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Uva**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/uva>>. Acesso em: 10 out. 2016.

CAMARGO, U. A.; TONIETTO, J.; HOFFMANN, A. Processos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, p. 144-149, out. 2011. Volume especial.

COPETTI, M. V. et al. Occurrence of ochratoxin A in cocoa by-products and determination of its reduction during chocolate manufacture. **Food Chemistry**, Oxon, v. 136, p. 100-104, 2013.

EINLOFT, T. C. **Caracterização micotoxicológica de uvas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. Vinhos finos: rumo à qualidade. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 27, n. 234, p. 1-132, set./out. 2006.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavor. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 11-22, 2003.

GIESBRECHT, H. O. et al. **Indicações geográficas brasileiras**. Brasília, DF: SEBRAE; INPI, 2014. 264 p.

GIESBRECHT, H. O.; SCHWANKE, F. H.; MÜSSNICH, A. G. **Indicações geográficas brasileiras: Brazilian geographical indications: indicaciones geográficas brasileñas**. Brasília, DF: SEBRAE; INPI, 2011. 164 p.

GILBERT, J. A.; LELIE, D. van der; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, n. 1, p. 5-6, 2014.

GOLLO, S. S. **O processo de inovação e de estratégia de cooperação competitiva para a obtenção da indicação de procedência vale dos vinhedos: o caso da vinícola Cordelier, Serra Gaucha**. 2006. 359 p. Tese (Doutorado em Administração)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOOGLE MAPS. Disponível em: <<https://www.google.com.br/maps/@-18.5779703,-45.4514505,6z>>. Acesso em: 10 out. 2016.

GUERRA, C. C. et al. **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2009. 69 p. (Documento, 48).

GUERRA, C. C. et al. **Uva para processamento pós colheita**. Brasília, DF: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2003. 67 p.

- HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity and Conservation**, Amsterdam, v. 21, n. 9, p. 2425-2433, Aug. 2012.
- HIBBETT, D. et al. Sequence-based classification and identification of fungi. **Mycologia**, Washington, v. 108, n. 6, p. 1049-1068, Sept. 2016.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2013. 84 p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, 2014.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins: volume 56**. Lyon: World Health Organization, 1993. 599 p.
- JONES, M. D. et al. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. **Nature**, London, v. 474, p. 200-203, June 2011.
- KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, 2004.
- LAGES, V.; LAGARES, L.; BRAGA, C. (Org.). **Valorização de produtos com diferencial de qualidade e identidade: indicações geográficas e certificações para competitividade nos negócios**. Brasília, DF: SEBRAE, 2005. 232 p.
- LIKAR, M. et al. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, p. 724-731, Feb. 2015.
- LLOPIS, G. Y. **Denominações de origem e indicações geográficas de produtos vitivinícolas**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 1997. 20 p.
- MATSUOKA, M. **Atributos biológicos de solos cultivados com videiras na região da Serra Gaúcha**. 2006. 173 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- MELLO, L. M. R. **Vitivinicultura brasileira: panorama 2014**. 2014. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1025934>>. Acesso em: 10 out. 2016.
- MERING, C. et al. Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments. **Science**, Washington, v. 315, p. 1126-1130, 2007.
- MOTA, R. V. et al. Composição físico-química de uvas para vinho em ciclos de verão e inverno. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 4, p. 1127-1137, 2010.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PROTAS, J. F. S.; CAMARGO, U. A. **Vitivinicultura brasileira: panorama setorial em 2010**. Bento Gonçalves: IBRAVIN; EMBRAPA Uva e Vinho, 2011. 110 p.

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 3, p. 316-327, Oct. 2005.

REVISTA ADEGA. **Levar o próprio vinho ao restaurante**. São Paulo, n. 14, dez. 2006. Disponível em: <<http://revistaadega.uol.com.br/revista/14#ixzz4k6TgsB9R>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

REVISTA ADEGA. **Onze vinhos e um segredo**. São Paulo, n. 59, set. 2010. Disponível em: <http://revistaadega.uol.com.br/artigo/o-verdadeiro-gosto-do-terroir_2491.html#ixzz4k6Ug04io>. Acesso em: 10 mar. 2016.

SANTOS, A. O. et al. Parâmetros fitotécnicos e condições microclimáticas para videira vinífera conduzida solução dupla poda sequencial. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 15, n. 12, p. 1251-1256, 2011.

SETATI, M. E. et al. The vineyard yeast microbiome, a mixed model microbial map. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-10, Dec. 2012.

SILVA, T. das G. **Diagnóstico vitivinícola do Sul de Minas Gerais**. 1998. 196 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SIMON, C.; DANIEL, R. Construction of small-insert and large-insert metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 668, p. 39-50, Aug. 2010.

SOUZA, J. S. I. de. **Uvas para o Brasil**. 2. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1996. 449 p.

SPRIBILLE, T. et al. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. **Science**, New York, v. 353, p. 488-492, July 2016.

STAMFORD, N. P. et al. Microbiota dos solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Ed. UFRPE, 2005. p. 61-92.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity: magnitude, dynamics and controlling factors. **Science**, New York, v. 296, n. 5570, p. 1064-1066, 2002.

VINHOS MARIA MARIA. Disponível em: <<https://www.facebook.com/vinhosmariamaria/photos/pcb.806528199506343/806527279506435/?type=3&theater>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

VINHOS MARIA MARIA. Disponível em: <<https://www.facebook.com/vinhosmariamaria/photos/pcb.657422081083623/657421754416989/?type=3&theater>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

WELKE, J. E.; HOELTZ, M.; NOLL, I. B. Aspectos relacionados à presença de fungos toxigênicos em uvas e ocratoxina A em vinhos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2567-2575, Nov. 2009.

YURKOV, A. M.; KEMLER, M.; BEGEROW, D. Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. **Fungal Ecology**, Oxon, v. 5, n. 1, p. 24-35, Feb. 2012.

CAPÍTULO 2

Diversidade de fungos filamentosos isolados de uva da variedade Syrah e solo de vinhedos do Sul de Minas Gerais

RESUMO

É de grande importância o estudo da microbiota, a fim de caracterizar de forma mais abrangente os microrganismos associados às vinhas, além de se ter uma visão do comportamento que esses nichos acabam transferindo para o produto final, por meio da sua interação com a videira, com a baga e, conseqüentemente, o produto final, o vinho. Dessa maneira, este estudo poderá ser utilizado para melhorar o *terroir* vinícola ou, até mesmo, tentar reproduzir *terroirs* em locais considerados como não adequados para gerar um vinho com determinadas características. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade de fungos filamentosos presentes em uvas da variedade Syrah e no solo de três vinhedos, a fim de auxiliar no conhecimento da microbiota da região e correlacionar com as características físico-químicas do solo. Os vinhedos estudados pertencem aos municípios de Campos Gerais, Boa Esperança e Três Corações, localizados no sul de Minas Gerais. Para isso foram coletadas 12 amostras de uva vinífera da variedade Syrah e 12 amostras compostas de solo, em 2015 e em 2016. Para avaliar a diversidade de fungos filamentosos foi realizada a técnica de diluição seriada em meio DRBC e DG18. A composição físico-química do solo também foi avaliada para correlacionar com a incidência de espécies. Os resultados obtidos mostraram que nas amostras de uvas houve predominância dos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, representando 43,75%, 30,89% e 10,53%, respectivamente, com as espécies *A. niger*, *P. brevicompactum* e *C. cladosporioides* complexo. Nas amostras de solo, os principais gêneros encontrados foram *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, representando 18,60%, 17,13% e 16,97%, respectivamente, como *P. paxilli*, *C. cladosporioides* complexo e *A. aculeatus*. No entanto, pôde-se observar a presença de algumas espécies, como *P. multicolor*, *P. crustosum* só observadas na vinícola 1; *A. ustus*, *Bisoclames* sp. e *Myrothecium* sp., na vinícola 2, assim como *A. fumigatus*, *A. niveus* e *P. griseofulvum*, na vinícola 3.

Palavras-chave: Diversidade microbiana. Fungos filamentosos. Uva. Solo.

1 INTRODUÇÃO

O estudo da biodiversidade microbiana tem o intuito de obter o conhecimento do ecossistema microbiano presente na uva, que apresenta grande diversidade de microrganismos, como leveduras, bactérias e fungos, que podem ser saprofíticos, toxigênicos e fitopatogênicos. Esses microrganismos modulam substancialmente a saúde da videira e seu desenvolvimento, assim como a uva e, conseqüentemente, a qualidade do vinho. A microbiota das uvas viníferas é composta por alguns gêneros, como *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Botrytis*, que podem contribuir para a deterioração das uvas antes do período da colheita, merecendo destaque os fungos *Aspergillus*, pertencentes à seção *Nigri*, pelo fato de ser um grupo frequentemente encontrado em uvas e devido à sua capacidade de produzir ocratoxina A (DIGUTA et al., 2011; EINLOFT, 2012).

A presença desses microrganismos acarreta redução generalizada da qualidade, tanto da uva como do vinho, pois, além de eles modificarem a composição química das uvas, eles produzem enzimas que alteram as características sensoriais e o processo de fermentação (FLEET, 2001).

A descrição da diversidade de microrganismos presentes nas amostras de uva Syrah e no solo poderá trazer informações que podem ser utilizadas no melhoramento da qualidade sensorial e organoléptica, e indicações que ajudarão a reduzir as perdas econômicas na cadeia produtiva, melhorando a qualidade de vinhos produzidos nessa região, assim como garantir a qualidade e a segurança dos sucos e vinhos provenientes das uvas analisadas, aumentando o interesse por esses produtos.

Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade de fungos filamentosos presentes nas amostras de uva da variedade Syrah e de solo de vinhedos localizados no sul de Minas Gerais, a fim de auxiliar na caracterização do *terroir* da região.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral, neste estudo, é identificar as espécies de fungos filamentosos que compõem a microbiota de uvas e de solo de vinhedos cultivados em vinícolas localizadas no sul de Minas Gerais, para auxiliar na caracterização do seu *terroir* microbiano.

2.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar morfológicamente, por técnicas convencionais, as espécies de fungos filamentosos presentes nas uvas e no solo de cultivo de três vinícolas do Sul de Minas Gerais.
- b) Comparar a diversidade de fungos filamentosos entre as regiões produtoras de uvas viníferas do sul de Minas Gerais.
- c) Caracterizar a microbiota *terroir* das regiões produtoras, auxiliando no processo de indicação geográfica dos vinhos produzidos nessas regiões.
- d) Avaliar a influência dos componentes físico-químicos do solo na contaminação por fungos filamentosos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de uva da variedade Syrah e de solo foram coletadas em três vinícolas localizadas nos municípios de Campos Gerais (Vinícola 1), Boa Esperança (Vinícola 2) e Três Corações (Vinícola 3), localizadas na região sul de Minas Gerais. Na tabela 1 apresentam-se as coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras em cada vinhedo.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de uva da variedade Syrah e de solo nos vinhedos localizados em três municípios do sul de Minas Gerais e sua área de produção.

Variedade	Vinícola	Local	Ponto	Local de coleta	Coordenadas geográficas			Área de produção
					Latitude	Longitude	Altitude	Hectare (ha)
Syrah	Vinícola 1	Campos Gerais, MG	1	R6P30	21°14'06"	45°45'31"	819	1 ha
			2	R14P60	21°14'06"	45°45'31"	819	
			3	R22P87	21°14'06"	45°45'31"	819	
Syrah	Vinícola 2	Boa Esperança, MG	1	R30P25	21°12'43 "	44°24'59"	889	6 ha
			2	R60P50	21°12'45 "	45°34'58"	886	
			3	R90P56	21°12'45 "	45°34'54 "	883	
Syrah	Vinícola 3	Três Corações, MG	1	R8P20	21°36'49"	45°07'42"	989	10 ha
			2	R16P40	21°36'47"	45°07'41"	988	
			3	R26P60	21°36'50"	45°07'40"	985	

R: rua; P: planta

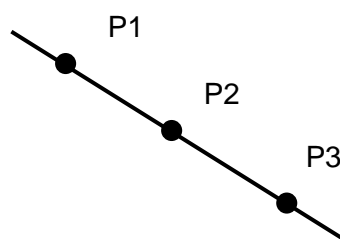
Fonte: Dados obtidos pela autora (2015, 2016).

3.1 Amostragem

3.1.1 Coleta das uvas

Foram coletados, aproximadamente, 900 g de amostras de uvas tintas das safras de junho/julho da variedade Syrah no estágio final de maturação (época da colheita), nos anos de 2015 e 2016. Para isso, foi traçado um transecto diagonal ao longo do vinhedo, coletando-se três cachos de uvas em cada ponto, em três videiras equidistantes (P1, P2 e P3), desprezando-se as extremidades (FIGURA 1). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos estéreis e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram analisadas.

Figura 1 - Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uvas e solo.

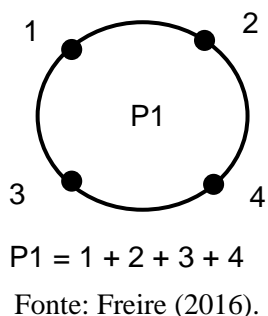


Fonte: Freire (2016)

3.1.2 Coleta do Solo

As amostras de solo foram coletadas nos mesmos pontos em que foram coletadas as uvas (P1, P2 e P3) (Figura 2). Retiraram-se quatro subamostras (p1, p2, p3, p4) na profundidade de 10 cm, em um raio de 20 cm no entorno da planta. As subamostras foram homogeneizadas em sacos plásticos estéreis, formando uma amostra composta de cada ponto. As amostras foram transportadas para o laboratório em caixas térmicas. Em seguida, foram transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras, onde foram analisadas.

Figura 2 - Amostragem do solo em cada ponto de coleta



3.2 Isolamento de Fungos Filamentosos

Para o isolamento de fungos das amostras de uvas foi utilizada a técnica de diluição seriada com espalhamento em superfície nos meios de cultura ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) (10,0 g de glicose; 5,0 g de peptona bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 mL de solução 5% de rosa de bengala; 1,0 mL de dicloran; 1.000 mL de água destilada; 15,0 g de ágar; 1 mg de cloranfenicol) e ágar dicloran glicerol medium base - DG18 (1,0 mL de dicloran; 5,0 g de peptona bacteriológica; 1,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 220 g de glicerol; 15,0g de ágar; 1 mg de cloranfenicol; 1.000 mL de água destilada).

Para a obtenção do mosto das uvas foram utilizados 25 g de bagas de uvas, obtidas aleatoriamente, adicionadas a 225 mL de água peptonada a 0,1%. As bagas foram, então, maceradas e mantidas sob agitação em Stomacher (METROTERM), 490 batidas por 2 minutos. Em seguida, alíquotas de 0,1 mL das diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) foram espalhadas na superfície dos meios de cultura DRBC e DG18, até total esgotamento (*spread plate*) e as placas incubadas em BOD, a 25 °C, por 5 a 7 dias, para análise de fungos filamentosos. O procedimento foi igualmente repetido para solo.

Após o período de incubação foram realizadas a contagem de colônias (UFC/g) e a caracterização por morfotipos. Posteriormente, foi empregada a técnica de raiz quadrada para determinar quantos fungos filamentosos seriam isolados de cada morfotipo. Em seguida, os isolados foram transferidos para o meio de purificação ágar extrato de malte (MA) e incubados em BOD, 25 °C, por 7 dias. Após o período de incubação, as colônias puras foram transferidas para os meios de identificação, de acordo com cada gênero.

As amostras de uva foram analisadas no Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.3 Identificação de Fungos Filamentosos

Os meios de identificação utilizados foram específicos para cada gênero de fungos filamentosos encontrados, sendo utilizado, para as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus*, o Manual de Klich (2002); para o gênero *Penicillium*, o Manual de Pitt (2000) e para os demais gêneros, o Manual de Samson et al. (2000). Os isolados pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium* foram incubados em meios de cultura ágar czapek levedura (CYA) (SYNTH) (K_2HPO_4 : 1,0 g; concentrado czapec: 10,0 mL; extrato de levedura: 5,0 g, ágar: 15,0 g, água destilada: 1 L; (concentrado czapec: $NaNO_3$: 30,0 g, KCl: 5,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 5,0 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,05 g, água destilada: 100 mL), a 25 °C e a 37 °C e ágar extrato de malte (MEA) (ACUMEDIA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona: 1,0 g, glucose: 30,0 g, ágar: 20 g, água destilada: 1 L), a 25 °C. Após sete dias de incubação foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos.

Os demais gêneros foram inoculados em MEA (ACUMEDIA) (extrato de malte: 20,0 g, peptona: 1,0 g, glucose: 30,0 g, ágar: 20 g, água destilada: 1 L), a 25 °C. Após sete dias de incubação, foram observadas as características macroscópicas e microscópicas dos fungos filamentosos.

3.4 Análise físico-química do solo

A análise físico-química do solo foi realizada no Laboratório de Análises de Fertilidade do Solo, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, sendo realizadas as análises de granulometria, pH, fertilidade, matéria orgânica, enxofre, boro, zinco, cobre, manganês, ferro, sódio e potássio, segundo metodologia proposta pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 1999).

3.5 Preservação de fungos filamentosos

Os isolados identificados foram preservados em duplicata em duas temperaturas, -18 °C e -80 °C. Para isso, discos de papel filtro estéreis foram espalhados na colônia pura dos

isolados e, em seguida, colocados em eppendorfs estéreis. Os discos de papel filtro de, aproximadamente, 5 mm são cortados e transferidos para microtubos, autoclavados a 121 °C, sob 1 atm, por 15 minutos.

Os isolados foram depositados na Coleção de Cultura de Microrganismos, no Departamento de Ciência dos Alimentos (CCDCA) da Universidade Federal de Lavras.

3.6 Screening para avaliação do potencial toxigênico

Todos os isolados potencialmente toxigênicos foram testados pelo método de Plug Agar, conforme descrito por Filtenborg e Frisvad (1980). Foi avaliada a produção de ocratoxina A, aflatoxina B1, B2, G1 e G2 e citrinina. Para a detecção da produção de ocratoxina A, os fungos foram inoculados em meio CYA e, para aflatoxina B1, B2, G1 e G2, os fungos foram inoculados em meio *yeast extract sucrose agar* (YES), sendo incubados durante 7 dias, a 25 °C. Foram utilizadas placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (Merk-Sílica Gel 60, 20x20), solução padrão de ocratoxina A e aflatoxina (Sigma-Aldrich) e a fase móvel composta por tolueno, acetato de etila e ácido fórmico 90%, na proporção 50:40:10. A confirmação quanto à produção de OTA e AFLA foi efetuada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de λ 366 nm em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de toxina apresentam fator de retenção (RF) e spot de fluorescência semelhantes aos do padrão da micotoxina, ou seja, roxo para ocratoxina A, verde para aflatoxina G1 e G2 e azul violeta para B1 e B2.

Para a avaliação da produção de citrinina, os isolados foram inoculados em meio de cultura ágar coco (400 g de creme de leite de coco, 12 g de ágar, 400 mL de água destilada), durante 10 dias, a 25 °C, como descrito por Mohamed et al. (2013). A confirmação quanto à produção da toxina foi realizada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de λ 366 nm, em cromatovisor CAMAG (UF-BETRACHTER). Os isolados considerados produtores de citrinina apresentaram intensa fluorescência verde-amarelo em torno da colônia.

3.7 Análise estatística

A análise estatística da diversidade de fungos filamentosos em uva e solo e sua incidência de acordo com a análise físico-química do solo foi realizada por meio da análise de componente principal (PCA), usando o software Chemoface.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

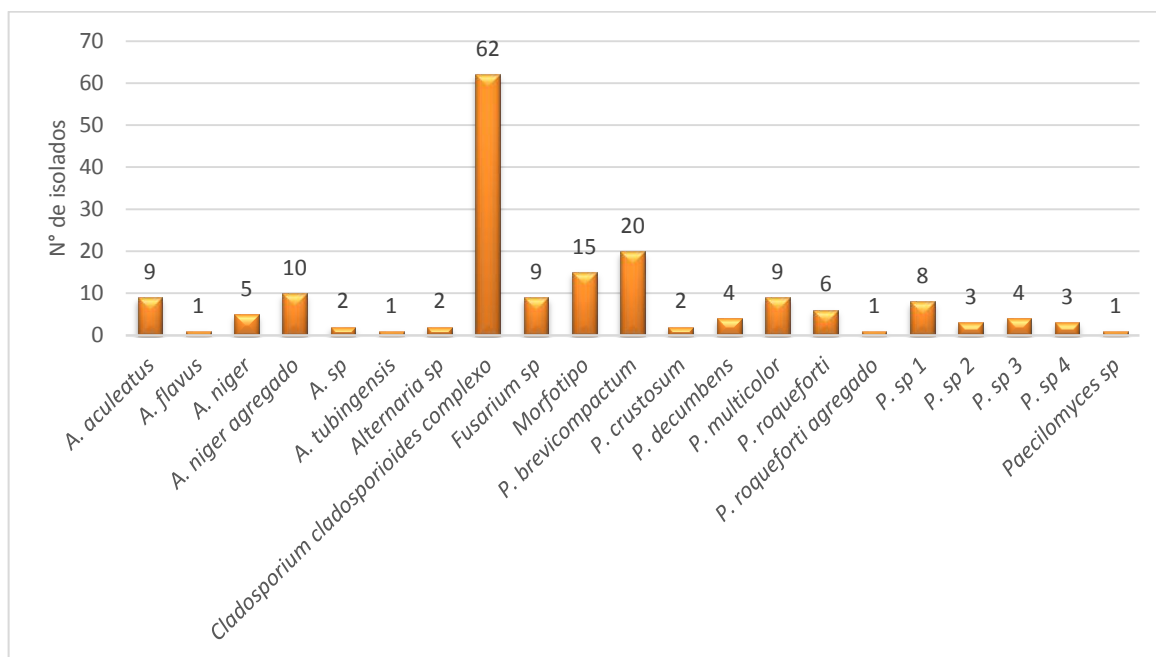
4.1 Diversidade de fungos filamentosos em uvas

Em todas as vinícolas avaliadas foram isolados, no total, 560 fungos e os gêneros mais frequentes foram *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*, representando 43,75%, 30,89% e 10,53%, respectivamente, dos isolados. Os gêneros *Cladosporium* e *Penicillium* foram frequentes na Vinícola 1 (V1), na Vinícola 2 (V2) e na Vinícola 3 (V3) e o gênero *Aspergillus* somente nas vinícolas V1 e V2.

De acordo com os resultados obtidos, a espécie *Cladosporium cladosporioides* complexo ocorreu nas três vinícolas, enquanto algumas espécies foram encontradas somente em uma vinícola, como *Penicillium multicolor*, *P. crustosum* e *Penicillium roqueforti*, isolados da vinícola 1. Dentro do gênero *Aspergillus*, a espécie *Aspergillus niger*, pertencente à seção *Nigri*, predominou na V1, seguido por *Aspergillus flavus* (Seção *Flavi*). Já na V2 foram detectados somente isolados da espécie *Aspergillus ochraceus*, pertencentes à seção *Circumdati*. Todos esses fungos do gênero *Aspergillus* são considerados potencialmente toxigênicos.

Na amostra de uva coletada na vinícola 1 (Campos Gerais, MG) foram isolados e identificados, no total, 177 fungos filamentosos da safra 2016, sendo eles *Aspergillus aculeatus* (9), *Aspergillus flavus* (1), *Aspergillus niger* (5), *Aspergillus niger* Agregado (10), *Aspergillus* sp. (2), *Aspergillus tubingensis* (1), *Alternaria* sp. (2), *Cladosporium cladosporioides* complexo (62), *Fusarium* sp. (9), morfotipo (15), *Penicillium brevicompactum* (20), *Penicillium crustosum* (2), *Penicillium decumbens* (4), *Penicillium multicolor* (9), *Penicillium roqueforti* (6), *Penicillium roqueforti* Agregado (1), *Penicillium* sp.1 (8), *Penicillium* sp.2 (3), *Penicillium* sp.3 (4), *Penicillium* sp.4 (3) e *Paecilomyces* sp. (1) (Gráfico 1).

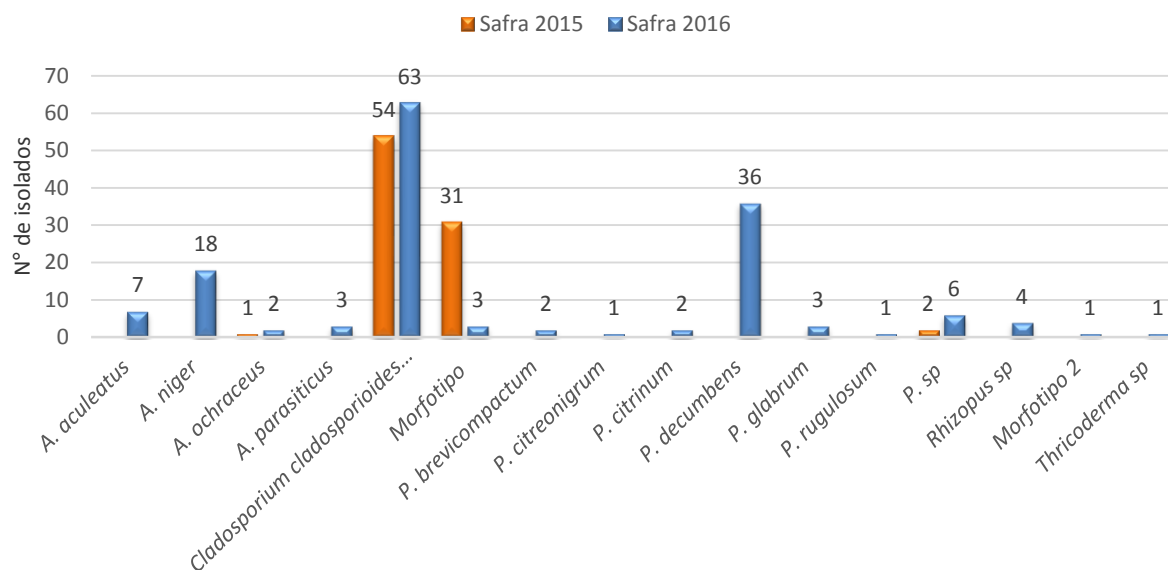
Gráfico 1 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Na vinícola 2 (Boa Esperança, MG) foram isolados e identificados, no total, 241 fungos filamentosos, sendo 88 da safra 2015: *Cladosporium cladosporioides* complexo (54), *Penicillium* sp. (2), morfotipo (31), *Aspergillus ochraceus* (1) e 153 isolados da safra 2016, assim distribuídos: *Aspergillus aculeatus* (7), *Aspergillus niger* (18), *Aspergillus ochraceus* (2), *Aspergillus parasiticus* (3), *Cladosporium cladosporioides* complexo (63), morfotipo 1 (3), *Penicillium brevicompactum* (2), *Penicillium citreonigrum* (1), *Penicillium citrinum* (2), *Penicillium decumbens* (36), *Penicillium glabrum* (3), *Penicillium rugulosum* (1), *Penicillium* sp. (6), *Rhizopus* sp. (4), morfotipo 2 (1), *Thricoderma* sp. (1) (Gráfico 2).

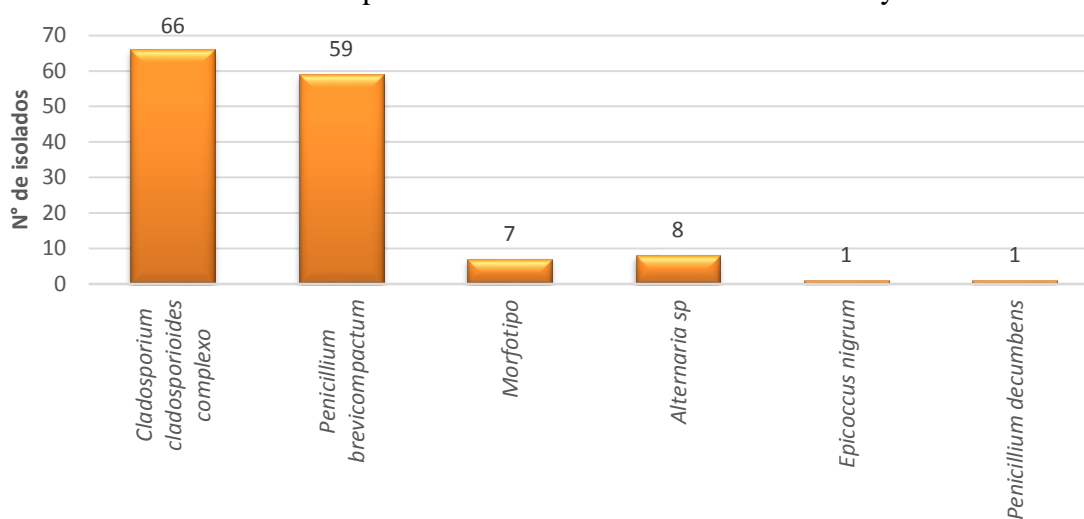
Gráfico 2 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 2, safra 2015 e 2016.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

No vinícola 3 (Três Corações, MG) foram isolados e identificados, no total, 142 isolados da safra 2015, distribuídos nas seguintes espécies: *Cladosporium cladosporioides* complexo (66), *Penicillium brevicompactum* (59), morfotipo (7), *Alternaria sp.* (8), *Epicoccus nigrum* (1) e *Penicillium decumbens* (1) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de uva Syrah da vinícola 3.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

O gênero *Cladosporium* spp. foi o que apresentou a maior incidência e é considerado um dos fungos responsáveis pela podridão do cacho, sendo encontrado com frequência em uvas viníferas (*Vitis vinifera* L.) de várias regiões vinícolas. No Chile, mais de 50% das uvas apresentam-se contaminadas com *Cladosporium herbarum* e *C. cladosporioides*, que causam desidratação das bagas. Isto pode estar relacionado com a colheita tardia dos frutos, em que as bagas encontram-se maduras. Segundo os autores, tal método está sendo adotado, a fim de melhorar a composição fenólica dessas uvas e assim obter vinhos com qualidade diferenciada (BRICEÑO; LATORRE, 2007; PSZCZÓLKOWSKI; LATORRE; CEPPI DI LECCO, 2001). Entretanto, alguns estudos mostram que esse procedimento, além de reduzir o rendimento da produção, favorece o crescimento fúngico que acarreta alteração na cor, no aroma e no sabor do vinho, além de afetar o desempenho das leveduras responsáveis pela fermentação do vinho (BRICEÑO; LATORRE; BORDEU, 2009).

Do total de fungos isolados das uvas, 30,89% pertenciam ao gênero *Penicillium*, sendo identificadas as espécies *P. brevicompactum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. multicolor*, *P. roqueforti*, *P. roqueforti* agregado, *P. sp.* (morfortipo 1), *P. sp.* (morfortipo 2), *P. sp.* (morfortipo 3), *P. sp.* (morfortipo 4), *P. citreonigrum*, *P. citrinum*, *P. glabrum* e *P. rugulosum*.

As espécies de *Penicillium brevicompactum* e *Penicillium glabrum* podem ser encontradas em todas as fases de maturação da uva, estando associadas à superfície da baga durante o seu desenvolvimento, pois são espécies que apresentam rápido crescimento (SERRA; BRAGA; VENÂNCIO, 2005; SERRA et al., 2006).

Penicillium brevicompactum foi a espécie mais frequente nas uvas, o que corrobora estudos realizados por Sage et al. (2002) e Serra et al. (2006), na França e em Portugal, sendo *Penicillium decumbens* a segunda espécie mais encontrada. Freire (2016) também obteve a presença dessa espécie em 50% das uvas da variedade Touriga Nacional, cultivadas na região do Vale Submédio do São Francisco. No entanto, as condições climáticas da região de estudo não são favoráveis ao crescimento dessa espécie, visto que o clima quente e seco, o que diverge das condições ótimas de seu desenvolvimento. Os autores relataram que a presença foi justificada pela composição química desta variedade da uva, o que pode ter favorecido o seu crescimento. No entanto, neste estudo foram identificados apenas três isolados de *Penicillium glabrum* de uvas coletadas na vinícola 3.

No Brasil, trabalhos realizados com amostras de uvas de diferentes variedades mostraram predominância de *Penicillium* na região de Minas Gerais (SILVA, 2013) e *Aspergillus* em São Paulo e no Vale do Submédio São Francisco (FREIRE, 2016; SILVA, 2013). Segundo os autores, tal fato pode ser explicado pelo fato de as espécies de *Penicillium*

serem frequentemente encontradas em climas temperados e frios, enquanto as espécies de *Aspergillus* estão mais associadas às regiões de clima tropical e quente (PITT; HOCKING, 1997; SERRA et al., 2006). Terra (2011), avaliando o percentual de contaminação por espécies de fungos filamentosos na região do Vale Submédio do São Francisco, com clima tropical, temperatura média anual de 27 °C e baixo índice pluviométrico, encontrou maior percentagem de contaminação por *Aspergillus* seção *Nigri* (91%), o que ressalta a temperatura da região como um fator importante para o desenvolvimento desses fungos nas uvas.

No gênero *Aspergillus*, as espécies mais frequentes foram *A. aculeatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. niger agregado*, *A. tubingensis*, *A. sp.*, *A. ochraceus* e *A. parasiticus*, correspondendo a 10,53% dos isolados. As espécies *A. niger* e *A. niger agregado* foram as que apresentaram maior incidência. A baixa incidência desse gênero pode estar associada ao clima subtropical da região de estudo, com temperatura média anual de 19 °C e verões chuvosos e invernos secos. Passamani (2014) também encontrou baixa incidência (2%) de fungos do gênero *Aspergillus* nas uvas Syrah cultivadas na região sul de Minas Gerais.

Apesar de o gênero *Aspergillus* ter ocorrido em menor frequência, a presença de espécies da seção *Nigri* tem relevada importância, já que são os principais produtores de ocratoxina A e sua presença nas uvas, junto com as condições ambientais ideais, possibilita que esses fungos produzam a toxina, colocando em risco a saúde do consumidor final (VARGA; KOSAKIEWICZ, 2006).

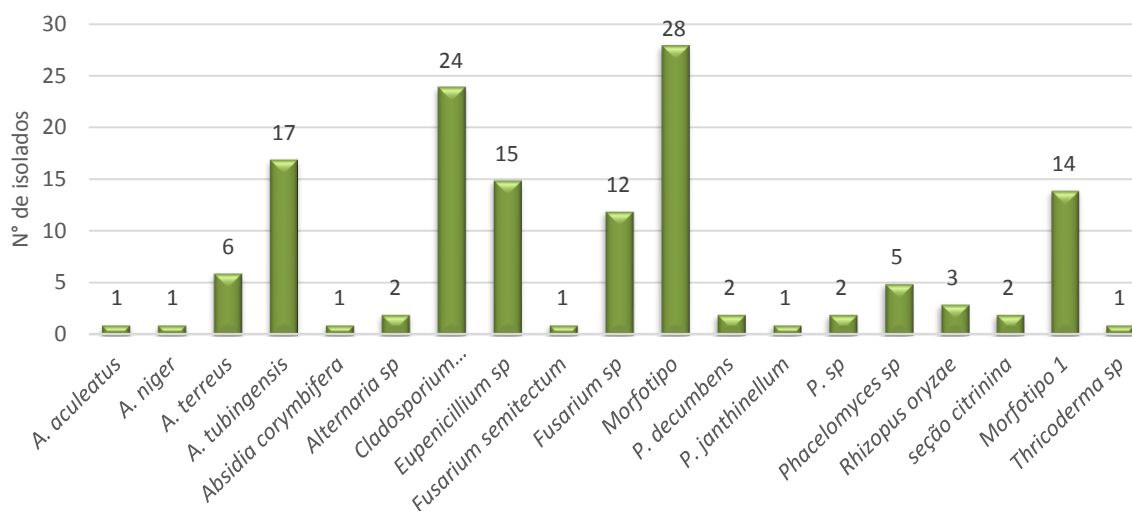
Outros fungos foram encontrados em menor frequência neste trabalho, dentre eles estão *Alternaria* sp. (10), *Fusarium* sp. (9), *Paecilomyces* sp. (1), *Rhizopus* sp. (4), *Thricoderma* sp. (1) e *Epicoccus nigrum* (1), representando cerca de 4,64% dos isolados. Segundo Serra et al. (2006), esses fungos são amplamente distribuídos, podendo estar presentes em diferentes ambientes, como solo, detritos, superfície de plantas e, principalmente, no ar e fazem parte de um complexo de fungos que são responsáveis pela podridão ácida da uva (LOUREIRO; MALFEITO-FERREIRA, 2003).

4.2 Diversidade de fungos filamentosos do solo

Na vinícola 1 (Campos Gerais, MG) foram isolados e identificados do solo, no total, 138 fungos filamentosos na safra 2016, sendo eles *Aspergillus aculeatus* (1), *Aspergillus niger* (1), *Aspergillus terreus* (6), *Aspergillus tubingensis* (17), *Absidia corymbifera* (1), *Alternaria* sp. (2), *Cladosporium cladosporioides* complexo (24), *Eupenicillium* sp. (15), *Fusarium semitectum* (1), *Fusarium* sp. (12), morfotipo (28), *Penicillium decumbens* (2),

Penicillium janthinellum (1), *Penicillium* sp. (2), *Phacelomyces* sp. (5), *Rhizopus oryzae* (3), *Penicillium* sp. seção citrina (2), morfotipo 1 (14) e *Thricoderma* sp. (1) (Gráfico 4).

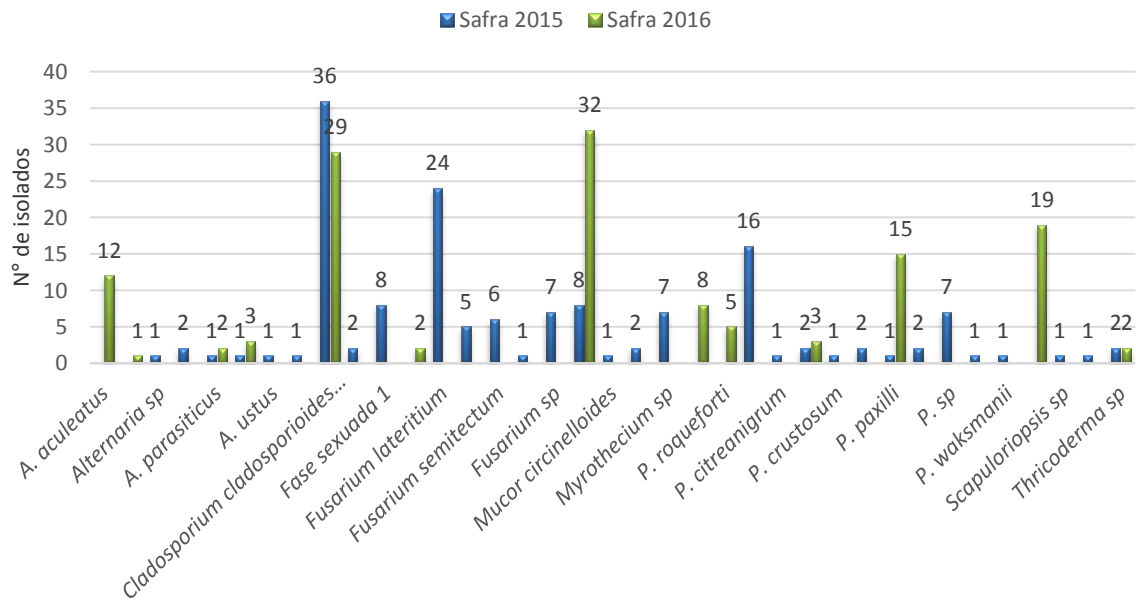
Gráfico 4 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 1.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Na vinícola 2 (Boa Esperança, MG) foram isolados e identificados do solo, no total, 288 fungos filamentosos, sendo 152 isolados da safra 2015: *Alternaria* sp. (1), *Aspergillus japonicus* (2), *Aspergillus parasiticus* (1), *Aspergillus terreus* (1), *Aspergillus ustus* (1), *Bisoclames* sp. (1), *Cladosporium cladosporioides* complexo (36), *Epicoccus nigrum* (2), Fase sexuada (8), *Fusarium lateritium* (24), *Fusarium oxysporum* (5), *Fusarium semitectum* (6), *Fusarium solani* (1), *Fusarium* sp. (7), morfotipo 1 (8), *Mucor circinelloides* (1), *Mucor racemosus* (2), *Myrothecium* sp. (7), *Penicillium brevicompactum* (16), *Penicillium citreanigrum* (1), *Penicillium citrinum* (2), *Penicillium crustosum* (1), *Penicillium decumbens* (2), *Penicillium paxilli* (1), *Penicillium pinophilum* (2), *Penicillium* sp. (7), *Penicillium verruculosum* (1), *Penicillium waksmanii* (1), *Scapuloriopsis* sp. (1), morfotipo 2 (1), *Thricoderma* sp. (2) e 136 da safra 2016, assim distribuídos: *Aspergillus aculeatus* (12), *Aspergillus parasiticus* (2), *Aspergillus terreus* (3), *Absidia corymbifera* (1), *Cladosporium cladosporioides* complexo (29), fase sexuada 1 (3), fase sexuada 2 (2), morfotipo (32), *Penicillium citrinum* (3), *Penicillium implicatum* (8), *Penicillium paxilli* (15), *Penicillium roqueforti* (5), *Rhizopus* sp. (19) e *Thricoderma* sp. (2) (Gráfico 5).

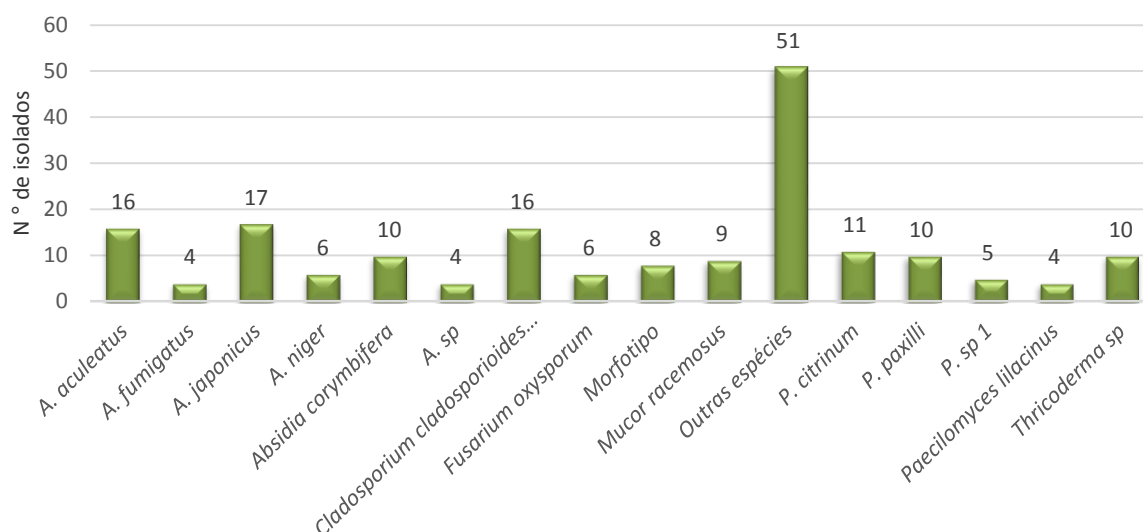
Gráfico 5 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 2, safra 2015 e 2016.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Na vinícola 3 (Três Corações, MG) foram isolados e identificados, no total, 187 fungos filamentos da safra 2015, sendo eles: *Aspergillus aculeatus* (16), *Aspergillus foetidus* (1), *Aspergillus fumigatus* (4), *Aspergillus japonicus* (17), *Aspergillus niger* (6), *Aspergillus niger* agregado (1), *Aspergillus niveus* (3), *Aspergillus ochraceus* (2), *Aspergillus* sp. (1), *Aspergillus sydowii* (1), *Aspergillus tubingensis* (1), *Absidia corymbifera* (10), *Aspergillus melleus* (3), *Aspergillus* sp. (4), *Cladosporium cladosporioides* complexo (16), *Eupenicillium lapidosum* (3), *Eupenicillium* sp. (1), fase sexuada (3), *Fusarium* sp. (1), *Fusarium oxysporum* (6), *Fusarium proliferatum* (1), *Fusarium solani* (1), *Geotrichum candidum* (1), *Mucor racemosus* (9), *Penicillium aurantiogriseum* (1), *Penicillium brevicompactum* (3), *Penicillium citrinum* (11), *Penicillium corylophilum* (1), *Penicillium griseofulvum* (1), *Penicillium miczynskii* (1), *Penicillium oxalicum* (1), *Penicillium paxilli* (10), *Penicillium restrictum* (1), *Penicillium roqueforti* (1), *Penicillium* sp. seção citrina 2 (1), *Penicillium* sp. (2), *Penicillium* sp.1 (5), *Penicillium variabile* (1), *Penicillium* sp. 4 (2), *Penicillium* sp.5 (1), *Paecilomyces lilacinus* (4), morfotipo 1 (1), morfotipo 2 (1), morfotipo 3 (1), morfotipo 4 (1), morfotipo 6 (1), morfotipo 7 (1), morfotipo 8 (8), morfotipo 9 (1), *Talaromyces* spp.1 (1), *Talaromyces* spp.2 (2) e *Thricoderma* sp. (10) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Diversidade de espécies identificadas na amostra de solo da vinícola 3.



Fonte: Elaborado pela autora (2016).

Nas três vinícolas foram isolados, no total, 613 fungos do solo, sendo os gêneros mais frequentes *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, representando 18,60%, 17,13%, 16,97% e 12,40%, respectivamente, do total de isolados. Os gêneros *Cladosporium* e *Aspergillus* foram mais frequentes na Vinícola 1 (V1), na Vinícola 2 (V2) e na Vinícola 3 (V3); o gênero *Penicillium* foi mais frequente na V2 e na V3 e o gênero *Fusarium*, somente na V2 e na V3 e o grupo de morfotipo foi predominante na V1 e na V2. Outros gêneros puderam ser observados, como *Absidia corymbifera* (11), *Alternaria* sp. (3), *Phacelomyces* sp. (5), *Rhizopus oryzae* (22), *Thricoderma* sp. (15), *Bisoclames* (1), *Epicoccus nigrum* (2), *Mucor circinelloides* (1), *Mucor racemosus* (11), *Myrothecium* sp. (7), *Scapuloriopsis* sp. (1), *Geotrichum candidum* (1), *Paecilomyces lilacinus* (4), *Talaromyces* sp. (3), *Eupenicillium lapidosum* (3) e *Eupenicillium* sp. (1), representando 14,85% dos isolados.

Moreira e Siqueira (2002) citaram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Lecanicillium*, *Alternaria*, *Mucor* e *Pythium* são fungos frequentemente isolados do solo de várias cultivares, confirmando, assim, os resultados encontrados no presente estudo, com exceção do *Pythium* e *Lecanicillium*, que não foram isolados.

Os principais gêneros de fungos relatados por Rech et al. (2013), em estudo com solo de vinhedo, foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium* e *Gliocladium*. Em estudo realizado por Dias, Souza e Pereira (1998), na região de Jales, SP, observou-se que os fungos responsáveis pela podridão de cachos pós-colheita foram *A. niger*, *Penicillium* spp.,

Rhizopus stolonifer e *Alternaria alternata*. Serra et al. (2006) explicam que a espécie *Alternaria alternata* é responsável por uma doença fúngica pós-colheita conhecida como podridão da alternaria. Isso demonstra que, apesar de esse gênero não ter sido isolado das uvas, ele está presente no solo e pode, então, colonizar as uvas, se encontrar condições que favoreçam o seu desenvolvimento. Também é importante ressaltar que a adoção de medidas preventivas é fundamental para evitar essa contaminação das uvas por esporos fúngicos presentes nos solos das áreas de cultivo.

Nas vinícolas estudadas foi encontrado o gênero *Fusarium*, sendo possível identificar alguns isolados em nível de espécie como *Fusarium oxysporum*. No entanto, não se pode descartar a possibilidade da presença desse fungo nas outras vinícolas, pois houve a identificação de outros isolados em nível de gênero, sendo necessária, posteriormente, a identificação em nível de espécie, já que seu crescimento é favorecido em solo ácido e todas as vinícolas apresentaram solo levemente ácido (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2005).

O gênero *Fusarium* também foi encontrado e está relacionado a doenças da videira. A fusariose é causada por *Fusarium oxysporum*, que acomete as videiras por meio do sistema vascular, causando a sua morte. O principal dano é uma diminuição da produtividade do vinhedo decorrente da grande perda de plantas e, além disso, sua ocorrência é favorecida na presença de solo ácido e rico em matéria orgânica, o que possibilita a infecção através de suas raízes (DIAS; SOUZA; PEREIRA, 1998).

A presença desse fungo nos solos mostra a importância do monitoramento contínuo dessas áreas de cultivo, auxiliando na prevenção, por meio da adoção de práticas agrícolas que possam vir a controlar a presença dessas doenças nas uvas, que podem levar a uma diminuição ou à perda da produção.

As espécies do gênero *Cladosporium* também são frequentemente encontradas em ambientes interiores e exteriores, em matéria orgânica e são consideradas importantes contaminantes de alimentos (ALMATAR; MAKY, 2016; HOOG et al., 2000; SAN-MARTIN et al., 2005) São fungos que estão amplamente dispersos no ar e, por isso, podem ser encontrados em vários ambientes, sendo frequentemente causadores de alergias. Estes fungos podem utilizar diferentes substratos de crescimento, tais como madeira, plantas mortas, alimentos, solo, palha e têxteis (TASIĆ; MILADINOVIĆ-TASIĆ, 2007).

O solo tem uma biomassa microbiana que representa a parte viva da matéria orgânica presente, atuando nos processos biogeoquímicos. Fungos e bactérias contribuem com importantes funções do solo, como a ciclagem de nutrientes e energia, regulando as

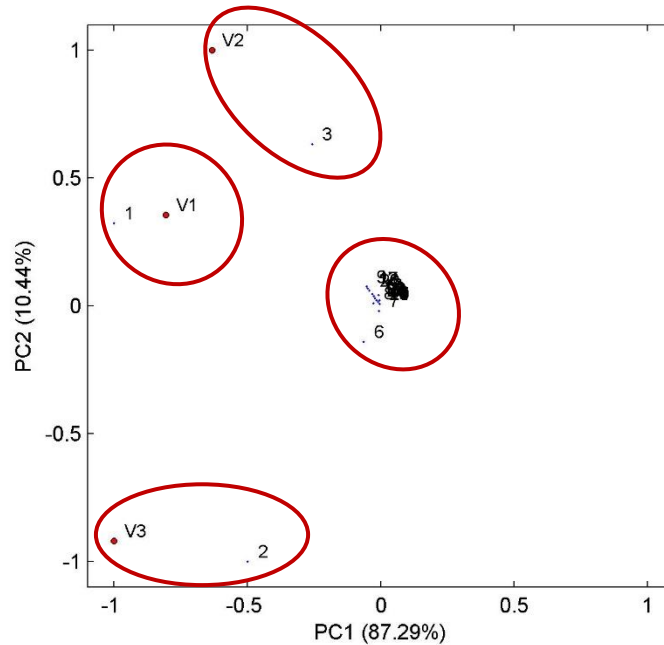
transformações da matéria orgânica, controlando pragas e doenças (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002; TURCO; KENNEDY; JAWSON, 1994).

O hábitat principal de fungos é o solo, onde é possível isolar uma variedade de espécies. De acordo com cada tipo de solo, pode-se favorecer mais uma espécie do que outras. A diversidade de fungos difundida na superfície de plantas e frutos ocorre através dos ventos, da chuva, de insetos, de pássaros, de maquinários, entre outros, que são os veículos de dispersão desses esporos. Esses esporos são a forma reprodutiva presente no solo. Seu crescimento vai ser possível quando encontrar condições favoráveis de temperatura, atividade de água (a_w) e substrato que, em conjunto, vão formar o ambiente ideal para o seu desenvolvimento.

4.3 Análise de componentes principais da uva Syrah

A análise de componentes principais (PCA) teve como objetivo obter um panorama geral dos isolados fúngicos e da distribuição desse isolados nas vinícolas avaliadas, além da influência dos componentes físico-químicos do solo das videiras na contaminação pelos fungos filamentosos.

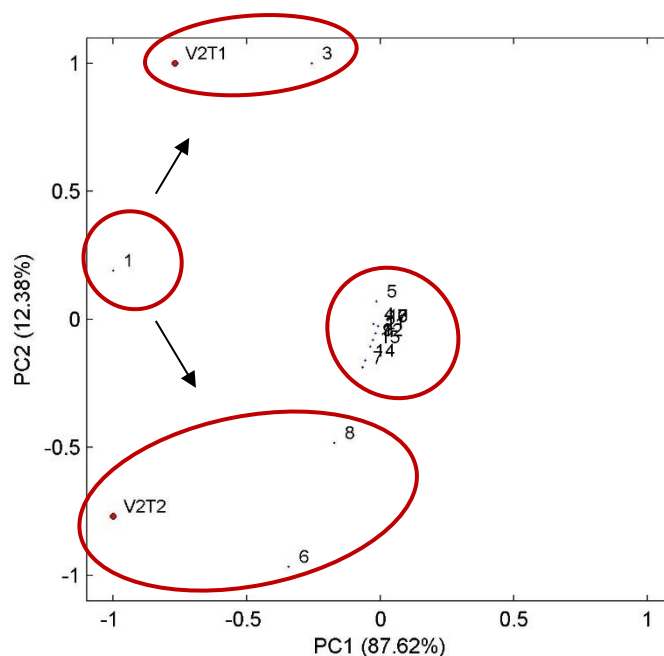
Figura 3 – Análise de componente principal (PCA) da diversidade fúngica de uva variedade Syrah e sua comparação entre a Vinícola 1 (V1), a Vinícola 2 (V2) e a Vinícola 3 (V3). (1) *Cladosporium cladosporioides* Complexo, (2) *Penicillium brevicompactum*, (3) morfotipo.



Fonte: Resultado da pesquisa (2016).

Na Figura 3 observa-se a incidência de fungos filamentosos na Vinícola 1 (V1), na Vinícola 2 (2) e na Vinícola 3 (V3). Observou-se que na V1 houve uma maior ocorrência do complexo *Cladosporium cladosporioides* (1), na V2 do complexo *Cladosporium cladosporioides* (1) e Morfotipo (3) e, na V3, foi observada a predominância do complexo *Cladosporium cladosporioides* (1) e do *Penicillium brevicompactum* (2). As três vinícolas apresentaram resultado semelhante no que diz respeito aos demais fungos, pois nenhum desses fungos apresentou uma expressividade que pudesse ser significativa para alguma vinícola, e essa expressão é determinada pela presença desses isolados próximos ao eixo 0.

Figura 4 – Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos isolados de uva variedade Syrah, safra de 2015, da Vinícola 2 (V2T1) e, da safra de 2016, da Vinícola 2 (V2T2). (1) *Cladosporium cladosporioides* Complexo, (3) morfotipo, (6) *Aspergillus niger* Agregado, (8) *Aspergillus ochraceus*.



Fonte: Resultado da pesquisa (2016).

Na Figura 4 avalia-se a diversidade de fungos em uva de duas safras da vinícola 2 e se houve uma incidência de fungos de um mesmo grupo na safra seguinte. Na primeira safra (V2T1) houve predominância de fungos do complexo *Cladosporium cladosporioides* (1) e morfotipo (3); já na segunda safra (V2T2) houve maior ocorrência do complexo *Cladosporium cladosporioides* (1), *Aspergillus niger* Agregado (6) e *Aspergillus ochraceus* (8). As outras espécies não apresentaram contagem expressiva.

4.4 Análise de componentes principais do solo

Na Tabela 2 observa-se a composição físico-química do solo da Vinícola 1 (V1), da Vinícola 2 (V2) e da Vinícola 3 (V3).

Tabela 2 – Composição físico-química do solo da Vinícola 1 (V1), da Vinícola 2 (V2) e da Vinícola 3 (V3).

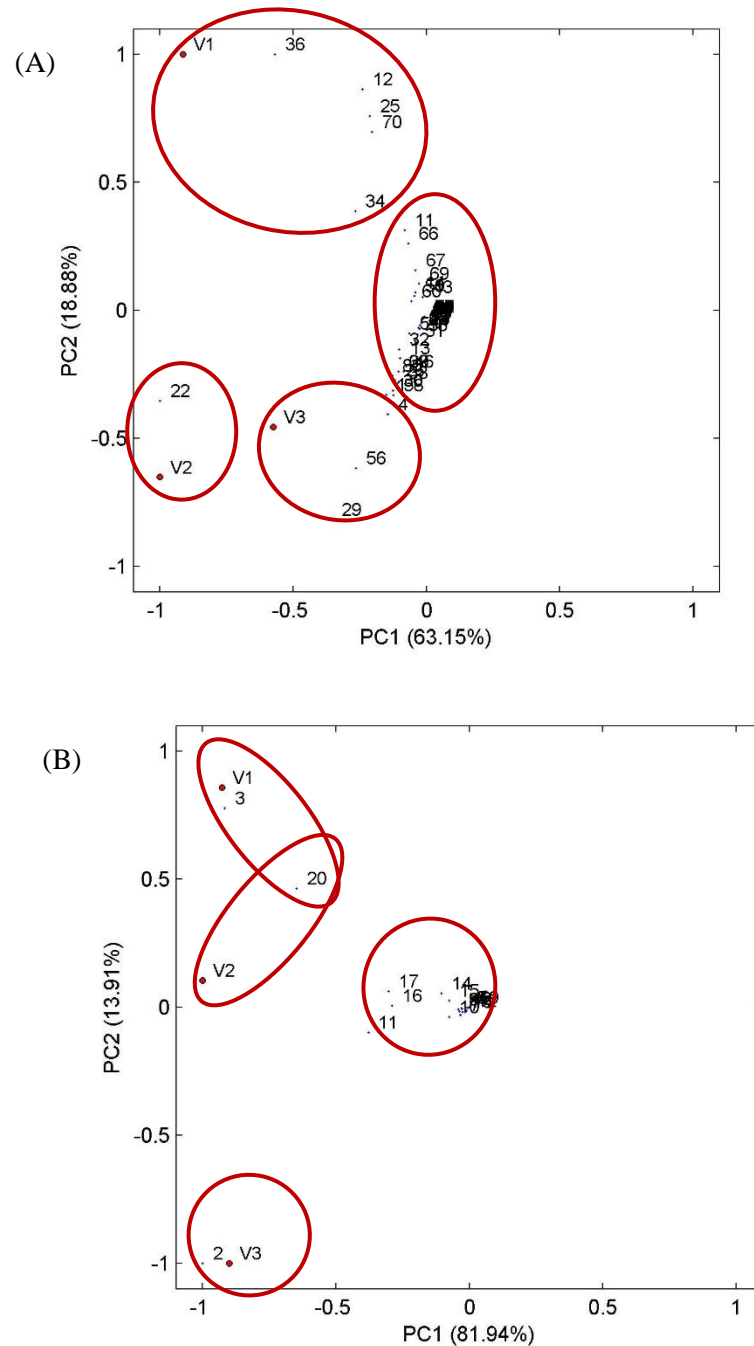
	Solo	pH	Na	Macronutrientes					Micronutrientes					M.O.*		
				P	K	Mg	Ca	Al	H+Al	Zn	Fe	Mn	Cu		B	S
				mg/dc ³	cmol/dm ³											
V1	Argiloso	5,20	-	235,26	84,00	0,84	5,01	0,10	4,47	15,92	68,19	24,57	4,11	0,19	211,48	2,98
V2	Argiloso	5,90	-	183,51	152,00	1,90	5,20	0,00	3,95	14,28	31,14	99,46	4,70	0,45	60,72	3,84
V3	Argiloso	4,70	-	31,02	164,00	0,70	3,10	0,10	5,77	5,35	32,76	10,97	2,97	0,31	47,67	3,70

*Matéria orgânica

Fonte: Dados fornecidos pelo Laboratório de Análise de Fertilidade do Solo da UFLA (2016).

Na Figura 5A descreve-se a ocorrência de fungos filamentosos isolados do solo das três vinícolas e se houve ocorrência expressiva de algum grupo de fungos que fosse expressivo para uma vinícola. Pode-se observar que a V1 teve maior incidência de *Aspergillus tubingensis* (12), complexo *Cladosporium cladosporioides* (22), *Fusarium* sp. (34), Morfotipo (36), *Eupenicillium* sp. (25) e Morfotipo (70); a V2, uma maior expressão do complexo *Cladosporium cladosporioides* (22) e a V3 obteve maior ocorrência do complexo *Cladosporium cladosporioides* (22), *Fusarium lateritium* (29) e *Penicillium brevicompactum* (56). Os demais isolados apresentaram comportamento semelhante, não sendo possível o agrupamento com alguma vinícola.

Figura 5 – Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química do solo da Vinícola 1 (V1), da Vinícola 2 (V2) e da Vinícola 3 (V3). A. PCA da diversidade de fungos filamentosos. (22) complexo *Cladosporium cladosporioides*, (25) *Eupenicillium* sp., (29) *Fusarium lateritium*, (34) *Fusarium* sp., (36) morfotipo, (56) *Penicillium brevicompactum*. B. Composição físico-química. (2) Potássio, (3) Fósforo, (16) Ferro, (17) Magnésio, (20) Enxofre.



Fonte: Resultado da pesquisa (2016).

Na Figura 5B mostra-se a composição físico-química do solo da V1, da V2 e da V3, sendo possível observar que a V1 apresentou valor significativo de fósforo (3), enxofre (20) e ferro (16); na V2, enxofre (20), ferro (16) e magnésio (17), e, na V3, teve somente o índice de potássio (2) expressivo.

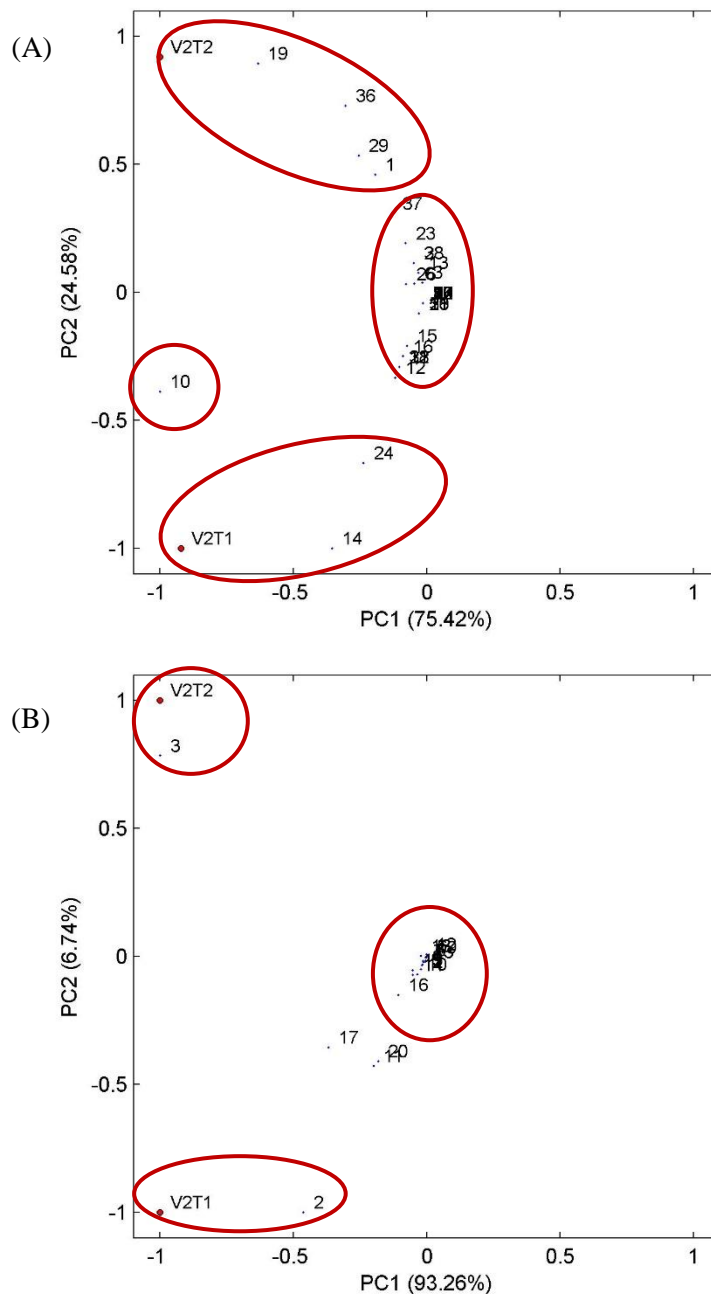
Na V1 e na V2 houve predominância dos grupos *Cladosporium cladosporioides* complexo, seguidos de morfotipo e essa presença pode estar relacionada à presença elevada de fósforo, enxofre e ferro. Já foi visto que na V3 a concentração desses nutrientes não foi significativa, fazendo com que o complexo *Cladosporium cladosporioides* tivesse sua proporção próxima à de outras espécies, como *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus aculeatus*, não tendo uma expressividade dos demais isolados.

A presença de magnésio na V2 foi, possivelmente, um fator preponderante para a ocorrência de *Penicillium brevicompactum* (56) e *Fusarium lateritium* (29), pois esse nutriente não foi expressivo nas demais vinícolas, assim como a presença dessas espécies.

A presença de enxofre, ferro e magnésio no solo na V2 em sinergismo pode ter sido um fator preponderante para que ocorresse uma incidência frequente de *Rhizopus* sp., já que nas demais vinícolas essa espécie não foi relatada. O mesmo ocorreu com o fósforo na V1, que apresentou nível elevado, onde houve uma ocorrência expressiva de *Aspergillus tubingensis* e *Eupenicillium* sp., o que não pôde ser observado nas demais vinícolas.

O potássio, como só foi relatado com significância na V3, pode ser um fator que favoreceu a incidência do gênero *Aspergillus*, como *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus aculeatus*, já que esse gênero só pôde ser observado com expressividade na V3, não tendo sido observado nas demais vinícolas.

Figura 6 – Análise de componente principal (PCA) da diversidade de fungos filamentosos e a composição físico-química do solo, entre as safras de 2015, da Vinícola 2 (V2T1) e da safra de 2016, da Vinícola 2 (V2T2). A. Diversidade de fungos filamentosos. (1) *Aspergillus aculeatus*, (10) complexo *Cladosporium cladosporioides*, (12) *Aspergillus aculleatus*, (14) *Fusarium lateritium*, (19) morfotipo, (24) *Penicillium brevicompactum*, (29) *Pencillium paxilli*, (36) *Thricoderma* sp. B. Composição físico-química. (2) Potássio, (3) Fósforo, (17) Magnésio, (20) Enxofre.



Fonte: Resultado da pesquisa (2016).

Na Figura 6A retrata-se a diversidade de fungos isolados do solo de duas safras da V2 e se algum grupo fúngico da safra 2015 foi incidente na safra 2016. Na safra de 2015 (V2T1) houve uma tendência do complexo *Cladosporium cladosporioides* (10), *Fusarium lateritium* (14) e *Penicillium brevicompactum* (24); já na safra de 2016 (V2T2), complexo *Cladosporium cladosporioides* (10), morfotipo (19), *Penicillium paxilli* (29), *Aspergillus aculeatus* (1) e *Thricoderma* sp. (36). Os demais isolados apresentaram comportamento semelhante, não sendo expressivos entre as safras. Esse comportamento está expresso na proximidade do eixo 0.

Na Figura 6B está retratada a composição físico-química do solo da V2 nas safras de 2015 e 2016. Na safra de 2015 (V2T1) houve uma expressividade de potássio (2) e enxofre “S” (20); já na safra de 2016 (V2T2), fósforo (3) e magnésio (17) foram os que apresentaram maior expressividade.

A incidência de complexo *Cladosporium cladosporioides* (10), *Fusarium lateritium* (14) e *Penicillium brevicompactum* (24) pode estar relacionada com a presença de potássio (2); já na V2T2, com uma quantidade expressiva de fósforo (3) ocorreu uma maior incidência de morfotipo (19), *Penicillium paxilli* (29) e *Aspergillus aculleatus* (12). Os demais componentes do solo (Tabela 2) apresentaram quantidades semelhantes, não exercendo um fator determinante para o agrupamento de alguma espécie em determinada safra.

A presença de potássio expressiva na V2T1 pode não ter favorecido a incidência de *Aspergillus* e morfotipos, visto que sua presença foi relatada na V2T2, não tendo presença expressiva desse nutriente.

Altos níveis de fósforo podem ter sido um fator decisivo para a presença de *Fusarium lateritium*, visto que sua presença não pôde ser observada na V2T2.

Os fungos são considerados seres heterotróficos, necessitando de materiais orgânicos já formados, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares. A maioria dos fungos tem como necessidades nutricionais os elementos C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe e Zn. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição é por absorção de nutrientes solúveis simples. São considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta, sendo encontrados na água, no ar, no solo, sobre animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, em produtos alimentícios e industriais (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009).

Estima-se que os microrganismos estejam envolvidos em mais de 80% das reações que ocorrem no solo. Desses microrganismos, os fungos representam a maioria dos habitats do

solo e grande parte da biomassa microbiana, onde desempenham papel importante como decompositores de substratos complexos e participam do ciclo natural do carbono, nitrogênio e fósforo, representando até 90% da produtividade primária líquida desses elementos na maioria dos ecossistemas terrestres (BELL et al., 2009).

O solo é um dos fatores mais importantes do *terroir*, pois participa da composição mineral da videira. Esta composição reflete o ambiente onde as videiras são cultivadas. Como resultado, os produtos decorrentes da videira, como sumo, uvas e vinho, serão influenciados por essa composição. O pH e o teor de cálcio presentes no solo são as características que mais afetam a composição das videiras e podem ter efeitos significativos no processo de disponibilidade e absorção de minerais pela videira (LIKAR et al., 2015).

5 AVALIAÇÃO DAS ESPÉCIES PRODUTORAS DE OCRATOXINA A, AFLATOXINAS B1, B2, G1 E G2 E CITRININA

Todas as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* potencialmente toxigênicas foram testadas quanto à produção de ocratoxina A; aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram testadas quanto à sua produção pelo método de plug ágar (Figura 9) e a citrinina foi avaliada pelo método Coconut Agar (Figura 10).

Tabela 3 – Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* isoladas de uva vinífera e solo potencialmente toxigênicos.

Fungos filamentosos	Vinícola 1		Vinícola 2				Vinícola 3		Total por espécie
			Safra 2015		Safra 2016				
	Uva	Solo	Uva	Solo	Uva	Solo	Uva	Solo	
<i>Aspergillus flavus</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	1 (1)
<i>Aspergillus niger</i>	5	1	-	-	18	-	-	6	30
<i>Aspergillus niger</i> agregado	10	-	-	-	-	-	-	1	11
<i>Penicillium</i> sp. seção citrina	-	2	-	-	2	3	-	1	8 (4)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	1	-	2	-	-	2	5
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	2	-	-	-	11	13
<i>Aspergillus parasiticus</i>	-	-	-	1	3	2	-	-	6 (6)
<i>Aspergillus melleus</i>	-	-	-	-	-	-	-	3	3
Total por amostra	16	3	1	3	25	5	-	24	
Total de isolados									77

() Total de isolados produtores de toxina.

Fonte: Dados obtidos pela autora (2015, 2016).

Dos 56 isolados do gênero *Aspergillus*, nenhum isolado de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* agregado, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus melleus* foi considerado produtor de OTA. O *Aspergillus flavus* isolado do solo da V1 foi produtor de aflatoxina B1 e

B2 e os 6 isolados de *Aspergillus parasiticus* obtidos da uva e solo da V2 foram produtores de aflatoxina B1, B2, G1 e G2.

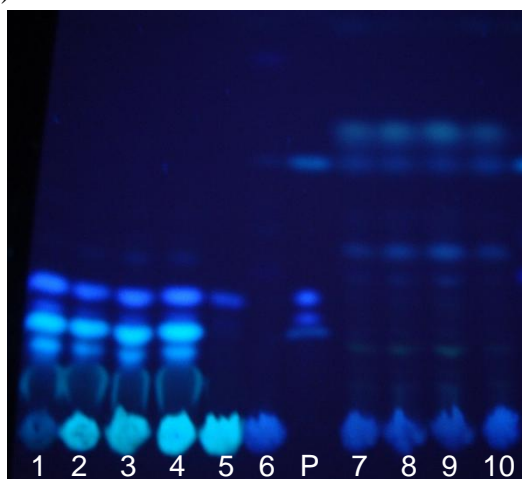
Dentre os isolados potencialmente produtores de ocratoxina A, a espécie *Aspergillus niger* foi a que apresentou a maior frequência, no entanto, nenhum isolado foi considerado produtor.

Segundo Battilani et al. (2003) e Rocha-Rosa et al. (2002), apenas de 5% a 30% dos isolados de *Aspergillus niger* são produtores de ocratoxina A, mesmo aqueles isolados encontrados em substratos que favorecem o crescimento desses fungos, como uva e cereais. Em um estudo realizado em vinhedos na Austrália foi demonstrado que, de um total de 113 isolados de *A. niger*, somente três foram produtores de toxina (LEONG et al., 2007), resultado que corrobora o do presente estudo.

A variedade da uva, o sistema de colheita e de irrigação e os tratamentos fitossanitários podem ser fatores que influenciarão a contaminação fúngica de uvas e o ecossistema do vinho, determinando, assim, a incidência de espécies potencialmente toxigênicas e a presença de ocratoxina A nas uvas (LASRAM et al., 2012).

A incidência de *Aspergillus* da seção *Flavi*, como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, foi baixa, pois estas espécies não são comumente encontradas como componentes da microbiota das uvas (MARTÍNEZ-CULEBRAS; RAMON, 2007; MEDINA et al., 2005).

Figura 7 – Avaliação da produção de ocratoxina e aflatoxina por cromatografia de camada delgada (CCD).

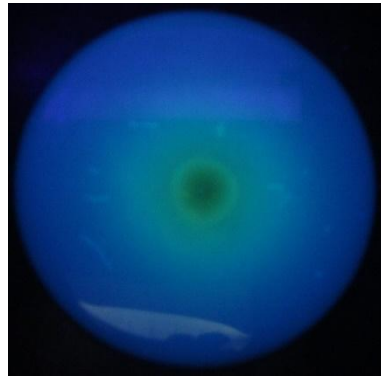


A. parasiticus (1-4); *A. flavus*(5); *A. niger* (6);
A. ochraceus (7-10); P (padrão)

Fonte: Foto feita pela autora (2016).

Dos 21 isolados de *Penicillium citrium* e *Penicillium* Seção *Citrina* testados quanto à produção de citrinina, apenas quatro foram produtores da toxina, sendo três isolados do solo da Vinícola 1 e um isolado da uva da safra 2016 da vinícola 2.

Figura 8 – Avaliação da produção de citrinina pelo método coconut agar.



Fonte: Foto feita pela autora (2016).

6 CONCLUSÃO

O complexo *Cladosporium cladosporioides* e os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* foram os principais componentes da microbiota da uva e do solo da região estudada, sendo os grupos de maior predominância neste estudo.

A análise físico-química do solo mostrou que a incidência em maior concentração de alguns nutrientes pode favorecer um grupo de espécies. O enxofre e o ferro foram indicadores da alta incidência de *Cladosporium cladosporioides* complexo nas vinícolas 1 e 2 e o potássio foi indicativo para a presença de fungos unisseriados, como *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus aculeatus*.

Das espécies potencialmente produtoras de ocratoxina A isoladas da uva Syrah e do solo, nenhum isolado foi considerado produtor, o que diminui o risco da presença desta micotoxina nos vinhos produzidos na região.

REFERÊNCIAS

- ALMATAR, M.; MAKKY, E. A. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. **Biotech**, Heidelberg, v. 6, n. 1, p. 1-8, June 2016.
- BATTILANI, P. et al. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 633-636, 2003.
- BELL, C. W. et al. Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan desert grassland. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 827-842, 2009.
- BRICEÑO, E. X.; LATORRE, B. A. Outbreaks of Cladosporium rot associated with delayed harvest wine grapes in Chile. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, p. 1060-1060, 2007.
- BRICEÑO, E. X.; LATORRE, B. A.; BORDEU, E. Effect of Cladosporium rot on the composition and aromatic compounds of red wine. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v. 7, n. 1, p. 119-128, 2009.
- DE HOOG, G. S. et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Medical Mycology**, London, v. 38, p. 243-250, 2000.
- DIAS, M. S. C.; SOUZA, S. M. C. de; PEREIRA, A. F. Principais doenças da videira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 19, n. 194, p. 76-84, 1998.
- DIGUTA, C. S. et al. PCR ITS-RFLP: a useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiology**, London, v. 28, p. 1145-1154, Sept. 2011.
- EINLOFT, T. C. **Caracterização micotóxica de uvas viníferas produzidas no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2012. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF, 1999. 370 p.
- FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. A simple screening method for toxigenic moulds in pure cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 13, n. 2, p. 128-130, 1980.
- FLEET, G. H. Wine. In: BEUCHAT, L. R.; MONVILLE, T. J.; DOYLE, M. P. (Ed.). **Food microbiology fundamentals and frontiers**. 2nd ed. Washington: ASM, 2001. p. 747-772.
- FREIRE, L. **Ocorrência de *Aspergillus* e *Penicillium* e a correlação entre espécies ocratoxigênicas e uvas viníferas da região topical do Brasil**. 2016. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Utrecht: CBS, 2002. 116 p.

LASRAM, S. et al. Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic áreas. **Food Control**, Guildford, v. 25, n. 1, p. 75-80, May 2012.

LEONG, S. L. et al. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 301-306, 2007.

LIKAR, M. et al. Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 505, n. 1, p. 724-731, Feb. 2015.

LOUREIRO, V.; MALFEITO-FERREIRA, M. Spolaige yeasts in the wine industry. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 23-50, 2003.

MARTÍNEZ-CULEBRAS, P. V.; RAMÓN, D. An ITS-RFLP method to identify black *Aspergillus* isolates responsible for OTA contamination in grapes and wine. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 147-153, 2007.

MEDINA, A. et al. Study of spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4696-4702, 2005.

MOHAMED, S. et al. An extension of the coconut cream agar method to screen *Penicillium citrinum* isolates for citrinin production. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 57, p. 214-219, June 2013.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. In: _____. **Micologia**. Rio de Janeiro: EPSJV, IOC, 2009. v. 4, p. 399-496.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Xenobióticos no solo: microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 284 p.

PASSAMANI, F. R. F. **Ocorrência e desenvolvimento de um modelo preditivo para a incidência de *Aspergillus* Seção *Nigri* e ocratoxina A em regiões vitícolas do Brasil**. 2014. 119 p. Tese (Doutrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. Melbourne: Food Science Australia, 2000. 187 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 2nd ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 593 p.

PSZCZOLKOWSKI, P. H.; LATORRE, B. A.; CEPPI DI LECCO, C. Efectos de los mohos presentes en uvas cosechadas tardiamente sobre la calidad de los mostos y vinos cabernet sauvignon. **Ciencia e Investigacion Agraria**, Santiago, v. 28, n. 3, p. 157-163, 2001.

RECH, M. et al. Microbiota do solo em vinhedos agroecológico e convencional e sob vegetação nativa em Caxias do Sul, RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 141-151, 2013.

ROCHA-ROSA, C. A. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, Oxon, v. 19, p. 408-414, 2002.

SAGE, L. et al. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 1306-1311, 2002.

SAMSON, R. A. et al. **Introduction to food-borne fungi**. 4th ed. Berlin: Centraalbureau Voor Schimmelcultures, 2000. 322 p.

SAN-MARTIN, A. et al. Metabolites From The Marine Fungus *Cladosporium Cladosporioides*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, Buenos Aires, v. 93, p. 247-251, 2005.

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

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

SILVA, D. M. **Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões sudeste e nordeste do Brasil**. 2013. 185 p. Tese (Doutrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

SÔNIGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. 32 p. (Circular Técnica, 56).

TASIĆ, S.; MILADINOVIĆ-TASIĆ, N. *Cladosporium spp.*: cause of opportunistic mycosis. **Acta Facultatis Medicae Naissensis**, Warsaw, v. 24, p. 15-19, 2007.

TERRA, M. F. **Fungos toxigênicos em solos de vinhas, uvas e mostos e ocratoxina A em vinhos e sucos do Vale do Submédio São Francisco**. 2011. 152 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

TURCO, R. F.; KENNEDY, A. C.; JAWSON, M. D. Microbial indicators of soil quality. In: DORAN, J. W. et al. (Ed.). **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 73-90.

VARGA, J.; KOZAKIEWICZ, Z. Ochratoxin in grapes and grape-derived products. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 17, n. 2, p. 72-81, Feb. 2006.

CAPÍTULO 3

Determinação da microbiota *terroir* de vinhedos do sul de Minas Gerais por meio da metagenômica

RESUMO

O estudo do *terroir* está envolvido com os fatores que formam o chamado microclima que determina o desempenho dos vinhedos, a qualidade das uvas produzidas, formando a tipicidade do produto final, ou seja, é a assinatura das regiões produtoras de vinhos, e somente naquela região será produzido um vinho com aquelas características típicas. Na última década, em alguns estudos foi demonstrado que os microrganismos também fazem parte desse ambiente, influenciando também as características do vinho, surgindo, então, o conceito de microbiota *terroir*. Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar a microbiota *terroir* de uvas variedade Syrah de vinhedos localizados no sul de Minas Gerais por meio da técnica de metagenômica, a qual foi utilizada para determinar a diversidade de microrganismos presentes na amostra. O material genético foi extraído utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Pomega) para a obtenção do DNA total e seu sequenciamento foi realizado pelo programa Illumina, usando a região ITS rRNA. Perfis taxonômicos foram obtidos em Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, observando-se que houve uma maior predominância do filo Ascomycota, seguido de Basidiomycota. Construiu-se uma árvore filogenética com as 20 principais espécies de fungos presente nas uvas, representadas pelos gêneros *Cercospora*, *Uwebraunia*, *Aureobasidium*, *Leptospora*, *Pseudopithomyces*, *Periconia*, *Acrocalyma*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Hansfordia*, *Meyerozyma*, *Candida*, *Wickerhamomyces*, *Acremonium*, *Sarocladium*, *Giberella* e *Colletotrichum*, o que possibilitou estimar a relação dos grupos procarióticos obtidos. A caracterização da diversidade microbiana das uvas foi obtida com sucesso, no entanto, pôde-se observar um grande número de indivíduos que não foram classificados, levando a crer que estudos futuros nessa área precisam ter continuidade para que, cada vez mais, possamos ter conhecimento dessas espécies e entender como funcionam esses sistemas.

Palavras-chave: Uva. Diversidade de fungos. ITS rRNA. Metagenoma. Illumina.

1 INTRODUÇÃO

O *terroir* compreende todos os fatores que formam o chamado microclima e que influenciam o desempenho dos vinhedos, a qualidade das uvas colhidas e a tipicidade do produto final, ou seja, é a assinatura das regiões produtoras de vinhos, que indica que somente naquela localização será produzido um vinho com aquelas características únicas (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012). Na última década, alguns estudos mostraram que os microrganismos fazem parte desse ambiente, influenciando também as características do vinho, surgindo, então, o conceito de microbiota *terroir*.

A microbiota *terroir* pode ser determinada por meio de técnicas convencionais, consideradas mais trabalhosas e demoradas, ou, então, por técnicas moleculares que permitem a determinação de um maior número de espécies, inclusive de espécies não cultivadas pelas técnicas convencionais. Isso torna o uso dessas técnicas bastante promissor para estudos relacionados à diversidade de microrganismos.

Uma dessas técnicas moleculares é a metagenômica, que é o estudo de genomas, ou seja, material genético recuperado diretamente a partir de amostras ambientais, muito utilizada para estudos da diversidade de microrganismos presentes em um determinado ambiente. Em alguns estudos vem sendo utilizada essa técnica, como diversidade de microrganismos em solos de vários biomas, detecção de comunidades oceânicas, biodiversidade marinha e fungos endofíticos em folhas e caule de plantas. No entanto, grande parte dos estudos é realizada em solo, que é considerado um dos ambientes mais complexos, por conter a maior diversidade microbiana (GOULART; OMORI; SOUZA, 2013).

A metagenômica abre um leque de oportunidades de estudos sobre os mais diversos ambientes, por meio do sequenciamento do material genético obtido da amostra. A partir desse sequenciamento será possível estudar a composição da população de seres vivos desse ambiente, assim como as funções que eles desempenham entre si e no ambiente em que vivem (PEIXOTO, 2013). Diante de tanta diversidade de microrganismos, a metagenômica vem sendo o principal método de prospecção para o conhecimento dessas comunidades.

Nesse sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar a microbiota *terroir* presente nas amostras de uva da variedade Syrah cultivadas em dois vinhedos localizadas na região sul de Minas Gerais, por meio da metagenômica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi identificar as espécies de fungos filamentosos e leveduras que compõem a microbiota de uvas de vinhedos cultivados em vinícolas localizadas no sul de Minas Gerais, auxiliando na composição do *terroir* microbiano dessas regiões.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a diversidade de fungos filamentosos e leveduras presente nas uvas de duas vinícolas do sul de Minas Gerais, por meio da técnica de metagenômica.
- b) Caracterizar a microbiota *terroir* das regiões produtoras, auxiliando no processo de indicação geográfica dos vinhos produzidos nessas regiões.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de uva da variedade Syrah foram coletadas em duas vinícolas localizadas nos municípios de Boa Esperança e Três Corações, localizadas na região sul de Minas Gerais. Na Tabela 4 apresentam-se as coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras e a área plantada, em hectare, de cada vinhedo.

Tabela 1 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta das amostras de uva da variedade Syrah nos vinhedos localizados em dois municípios do sul de Minas Gerais e sua área de produção.

Variedade	Vinícola	Local	Ponto	Local de coleta	Coordenadas geográficas			Área de produção
					Latitude	Longitude	Altitude	Hectares (ha)
Syrah	Vinícola 1	Boa Esperança, MG	1	R30P25	21°12'43 "	44°24'59"	889	6 ha
			2	R60P50	21°12'45"	45°34'58"	886	
			3	R90P56	21°12'45"	45°34'54"	883	
Syrah	Vinícola 2	Três Corações, MG	1	R8P20	21°36'49"	45°07'42"	989	10 ha
			2	R16P40	21°36'47"	45°07'41"	988	
			3	R26P60	21°36'50"	45°07'40"	985	

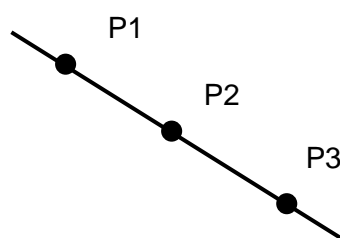
Fonte: Dados obtidos pela autora (2015, 2016).

3.1 Amostragem

3.1.1 Coleta das uvas

Foram coletadas amostras de uvas tintas das safras de junho/julho da variedade Syrah, no estágio final de maturação (época da colheita), nos anos de 2015 e 2016. Para isso, foi traçado um transecto diagonal ao longo do vinhedo, onde foram coletados três cachos de uvas em três videiras equidistantes (P1, P2 e P3), desprezando-se as extremidades (FIGURA 1). As amostras coletadas foram armazenadas em sacos estéreis e transportadas em caixas térmicas para o Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, onde foram analisadas.

Figura 1 - Transecto diagonal traçado ao longo do vinhedo para coleta das amostras de uva.



Fonte: Freire (2016).

4 ANÁLISE DE METAGENÔMICA

4.1 Extração do DNA total

A extração do DNA total foi realizada no Laboratório de Micologia e Micotoxinas, no Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras, utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (Pomega), seguindo o protocolo conforme discriminado abaixo.

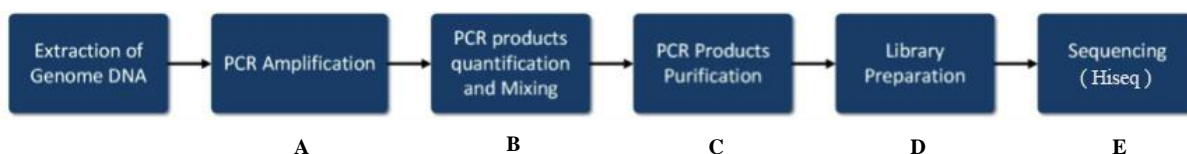
As bagas foram congeladas e, depois, maceradas com o auxílio de nitrogênio líquido para se obter a biomassa. O nitrogênio líquido foi adicionado duas vezes consecutivas e, antes de adicioná-lo, foi acrescentada polivinilpropilona (PVP). Em seguida, uma porção da biomassa foi adicionado em eppendorf, junto com 600 µL de Nuclei Lysis Solution e 6 µL de β-mercaptoetanol, levando-se para agitação em vortex. Após a agitação, a biomassa foi incubada, a 65 °C, por 40 minutos e, a cada 10 minutos, foi realizada uma agitação em vórtex. Ao final do período de incubação, a amostra foi deixada em repouso, por 5 minutos, à temperatura ambiente. Após esse período foram adicionados 3 µL de RNase e incubou-se, a 37 °C, por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de *protein precipitation solution* e a amostra foi agitada em vórtex e centrifugada, a 10.000 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, foram transferidos 300 µL do sobrenadante para um novo eppendorf e adicionados 100 µL de acetato de sódio mais 300 µL de isopropanol. A amostra foi delicadamente misturada por inversão e incubada, a -20 °C, por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugada, a 10.000 rpm, por 15 minutos. Foram retirados 300 µL do sobrenadante e transferidos para um novo eppendorf, ao qual foram adicionados, novamente, 100 µL de acetato de sódio mais 300 µL de isopropanol. A amostra foi delicadamente misturada por inversão e incubada, a -20 °C, por 30 minutos e, depois, centrifugada, a 10.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado para não descartar o pellet formado no fundo do eppendorf. Em seguida, foram adicionados 660 µL de etanol 70% e centrifugou-se, a 10.000 rpm, por 5 minutos. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e o eppendorf foi aberto em uma bacia forrada com papel toalha para secar o pellet. Após a secagem do pellet, o mesmo foi ressuspensão em 100 µL de *DNA rehydration solution*. Em seguida, a amostra foi agitada delicadamente para a obtenção de uma solução homogênea.

A amostra foi, então, levada para o Laboratório de Genética, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, para verificar a concentração do DNA extraído, utilizando-se o equipamento Nanodrop.

4.2 Sequenciamento e bioinformática

O DNA total extraído foi enviado, conforme especificações, para o Laboratório Ponto Labor, em Betim, MG, onde foi realizada a análise metagenômica da amostra, conforme Figuras 2 e 3.

Figura 2 – Esquema das etapas do sequenciamento das amostras.



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

A . Amplificação DNA por PCR

As regiões 18SrRNA/ITS genes de regiões distintas (18S V4 / 18S V9, ITS1 / ITS2, Arc V4) foram amplificadas utilizando-se iniciadores específicos (18S V4: 528F-706R, 18S V9: 1380F-1510R) e todas as reações de PCR foram realizadas com Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs).

B. Quantificação e qualificação dos produtos PCR

O mesmo volume de 1X tampão de carga (contendo SYB verde) foi misturado com os produtos de PCR e foi corrido por eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção. Amostras entre 400-450 pb foram escolhidas para testes adicionais.

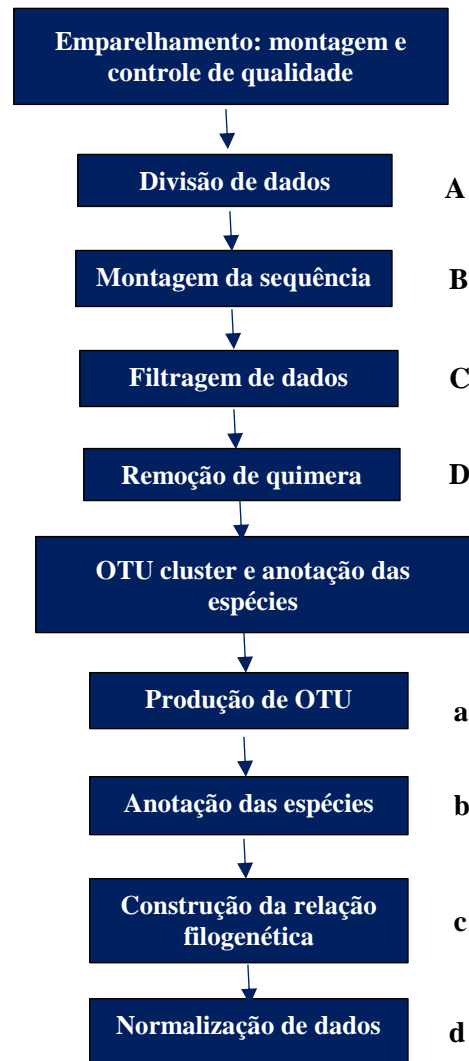
C. Produtos de PCR Mistura e Purificação

Os produtos de PCR foram misturados em proporções de equidensidade. Em seguida, os produtos de PCR da mistura foram purificados com Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Alemanha).

D e E. Preparação e sequenciamento da biblioteca

As bibliotecas de sequenciação foram geradas utilizando-se TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparação (Illumina, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e códigos de índice foram adicionados. A qualidade da biblioteca foi avaliada no Qubit @ 2.0 Fluorômetro (Thermo Scientific) e Agilent Bioanalyzer 2100 sistema. Finalmente, a Biblioteca foi sequenciada numa plataforma IlluminaHiSeq2500 e gerou reads paired-end com 250pb.

Figura 3 – Esquema das etapas de tratamento dos dados (bioinformática).



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

4.2.1 Bioinformática

4.2.1.1 Emparelhamento: montagem e controle de qualidade

A. Divisão de dados

As leituras emparelhadas foram atribuídas a amostras com base no seu código de barras único e cortando-se o código de barras e a sequência do iniciador.

B. Montagem da sequência

Os reads foram estendidos usando o software FLASH (V1.2.7), uma ferramenta muito rápida e precisa, capaz de estender os reads quando há alguma sobreposição. As sequências consenso foram então denominadas raw tags.

C. Filtragem de Dados

A filtragem de qualidade nas etiquetas brutas foi realizada sob condições de filtragem para obter as etiquetas de limpeza de elevada qualidade de acordo com o QIIME (V1.7.0) processo de qualidade controlada.

D. Remoção de quimera

As tags foram comparadas com o banco de dados de referência (Unite Database) utilizando-se o algoritmo UCHIME para detectar sequências de quimera e, em seguida, as sequências de quimera foram removidas. No final, as Tags efetivas foram finalmente obtidas.

4.2.1.2 OTU cluster e anotação das espécies

a. Produção de OTU

As análises de sequências foram realizadas pelo software Uparse (V.7.0.1001) Sequências com $\geq 97\%$ de similaridade foram de mesmo OTUs. A sequência representativa para cada unidade operacional taxonômica (OTU) foi selecionada para anotação.

b. Anotação de espécies

Para cada representante da sequência, foi utilizado o banco de dados Unite, baseando-se no algoritmo Blast, que foi calculado pelo software QIIME (Versão 1.7.0) para anotar informações taxonômicas.

c. Construção da relação filogenética

A fim de estudar a relação filogenética de diferentes OTUs e a diferença de espécies dominantes em diferentes amostras (grupos), o alinhamento de sequências foi realizado com o software MUSCLE (Versão 3.8.31).

d. Normalização de dados

As informações de abundância de OTU foram normalizadas utilizando-se um padrão de número sequencial correspondente à amostra com as mesmas sequências.

5 RESULTADOS

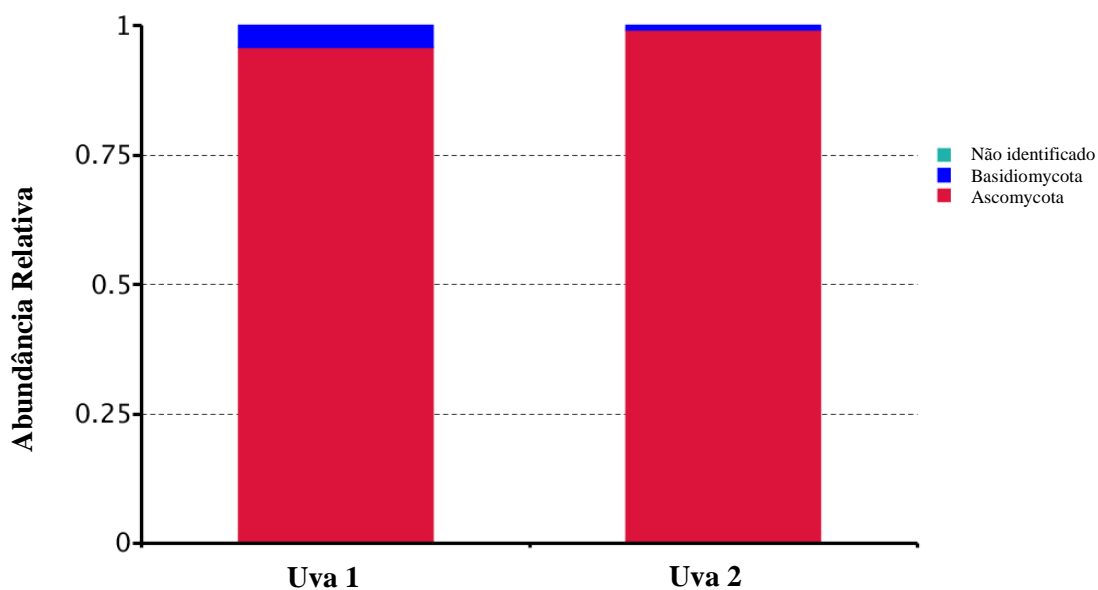
A microbiota da uva variedade Syrah de duas vinícolas localizadas no sul de Minas Gerais foi investigada com base na sequência parcial do gene ITS rRNA. Foram analisadas duas bibliotecas ITS rRNA provenientes de duas amostras de uva, denominadas Uva 1 e Uva 2. Cada amostra foi resultante da união de três amostras coletadas em ponto equidistantes de cada vinhedo, sendo, no final, feita uma amostra composta cada uma pesando, aproximadamente, 2 g, de onde foi extraído o DNA total. A amostra da vinícola 1 (Uva 1) gerou um total de 58.351 sequências que conseguiram ser agrupadas, sendo 55.905 pertencentes ao Filo Ascomycota e 2.446 do Filo Basidiomycota. Na vinícola 2 (Uva 2) foram geradas 58.351 sequências assim distribuídas: 57.857 de Ascomycota e 494 sequências de Basidiomycota.

Na Vinícola 1 houve uma menor proporção de sequências que não foram classificadas, obtendo-se 7.326 sequências, representando 13%; já a Vinícola 2 apresentou alta proporção de não classificados, com um total de 26.359 sequências, representando 45%.

A sequência Barcode e os links iniciadores para o sequenciamento da uva 1 foram (TCAAGT,GGTGCT GCATCGATGAAGAACGCAGC,TCCTCCGCTTATTGATATGC) e da uva 2, (TCAAGT,TGTGGA GCATCGATGAAGAACGCAGC,TCCTCCGCTTATTGATATGC). A partir dos resultados obtidos do DNA da uva 1 foram gerados perfis taxonômicos das amostras em sete níveis da taxonomia, sendo eles Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, os quais estão discriminados nos gráficos a seguir.

O gráfico 1 retrata a abundância relativa a nível de filo dos fungos identificados na uva variedade Syrah da Vinícola 1 (Uva 1) e na Vinícola 2 (Uva 2), tendo o grupo Ascomycota (vermelho) sido o que ocorreu com maior incidência, quase que 100% da amostra, seguido do grupo Basidiomycota (azul). O verde corresponde às espécies que não foram classificadas.

Gráfico 1 – Abundância relativa, em nível de filo dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



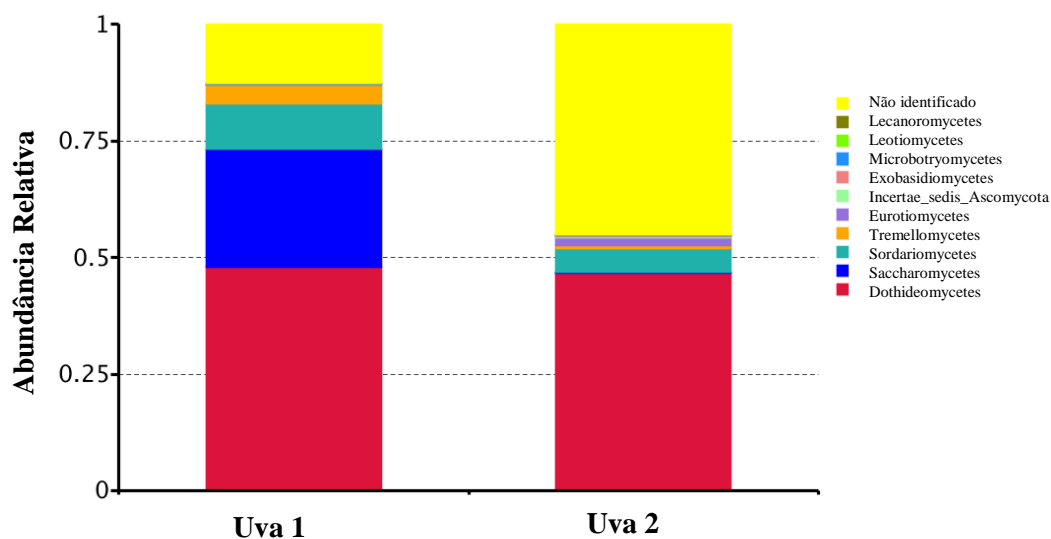
Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

O gráfico 2 retrata a abundância relativa em nível de classe dos fungos identificados na uva variedade Syrah da Vinícola 1 (Uva 1) e na Vinícola 2 (Uva 2). Pode-se observar que as duas vinícolas apresentaram comportamento semelhante quanto à presença de fungos pertencentes à classe Dothideomycetes, representando quase 50% das amostras de DNA.

A Vinícola 1 (Boa Esperança, MG) apresentou uma contagem significativa de fungos pertencentes à classe Saccharomycetes, representando 25%, seguida de Sordariomycetes e Tremellomycetes, em torno de 10% e 5%, respectivamente. Uma média de 15% não foi agrupada em nenhuma classe.

Já a Vinícola 2 (Três Corações, MG) teve uma incidência de Sordariomycetes de 5%, seguida de Tremellomycetes e Eurotiomycetes, em torno de 1% e 3%, respectivamente. No entanto, quase 50% da amostra não foram agrupados em nenhuma classe, indicando uma diversidade de fungos que, possivelmente, até o momento não foram identificados.

Gráfico 2 – Abundância relativa, em nível de classe dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

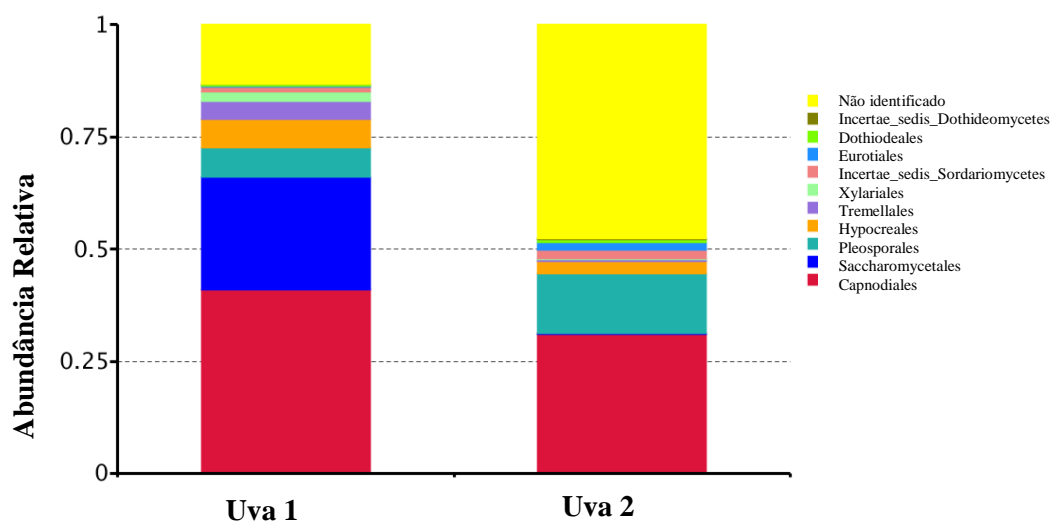
O gráfico 3 retrata a abundância relativa em nível de ordem dos fungos identificados na uva variedade Syrah da Vinícola 1 (Uva 1) e na Vinícola 2 (Uva 2).

A Vinícola 1 (Boa Esperança, MG) apresentou uma contagem expressiva de fungos pertencentes à ordem Capnodiales, com 42% de representatividade, seguidos das Saccharomycetales, representando 25%, e Pleosporales, Hypocreales, Tremellales e Xylariales, em torno de 8%, 8%, 5% e 3%, respectivamente. Uma média de 15% não foi agrupada em nenhuma ordem.

Já a Vinícola 2 (Três Corações, MG) teve incidência de Capnodiales de 30%, de Pleosporales de 15%, e de Hypocreales, Sordariomycetes e Eurotiales em torno de 4%, 4% e 3%, respectivamente. No entanto, quase 50% da amostra não foram agrupados em nenhuma classe, indicando uma diversidade de fungos que, possivelmente, até o momento, não foram ordenados.

As demais ordens apresentaram baixa incidência nas amostras, não tendo uma expressividade que possa ser visualizada com clareza no gráfico.

Gráfico 3 – Abundância relativa em nível de ordem dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

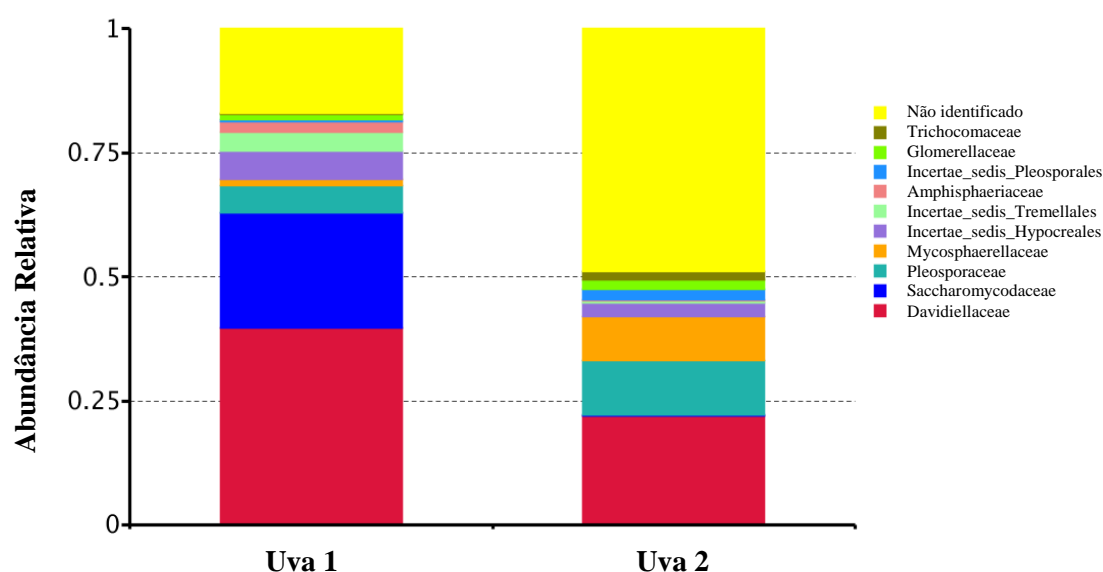
Os dados do Gráfico 4 retratam a abundância relativa, em nível de família, dos fungos identificados na uva variedade Syrah da Vinícola 1 (Uva 1) e na Vinícola 2 (Uva 2).

A Vinícola 1 (Boa Esperança, MG) apresentou uma contagem expressiva de fungos pertencentes à família *Davidiellaceae*, com 40% de representatividade, seguida de *Saccharomycodaceae*, com 25%; *Pleosporales*, *Hypocreales* e *Tremellales*, em torno de 8%, 8% e 5%, respectivamente. Uma média de 17% não foi agrupada em nenhuma família.

A Vinícola 2 (Três Corações, MG) teve uma incidência de *Davidiellaceae* de 22%, de *Pleosporales* de 10%, de *Mycosphaerellaceae* de 8%, seguidos de *Hypocreales*, *Pleosporales* e *Glomerellaceae* e *Trichocomaceae*, representando, aproximadamente, 4%, 4%, 3% e 3%, respectivamente. No entanto, 50% da amostra não foram agrupados em nenhuma classe, indicando uma diversidade de fungos que, possivelmente, até o momento, não foram classificados em nenhuma família.

A maioria das famílias estava presente nas duas vinícolas. Entretanto, as famílias *Saccharomycodaceae*, *Tremellales* e *Amphisphaeriaceae* estavam presentes na Vinícola 1 representativamente, enquanto na Vinícola 2 estas famílias quase não puderam ser observadas.

Gráfico 4 – Abundância relativa, em nível de família, dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

Os dados do Gráfico 5 retratam a abundância relativa em nível de gênero dos fungos identificados na uva variedade Syrah da Vinícola 1 (Uva 1) e Na vinícola 2 (Uva 2). Pode-se observar que as duas vinícolas apresentaram comportamento semelhante quanto à classificação de outros (amarelo), ou seja, mais de 75% do DNA não foram enquadrados em nenhum gênero.

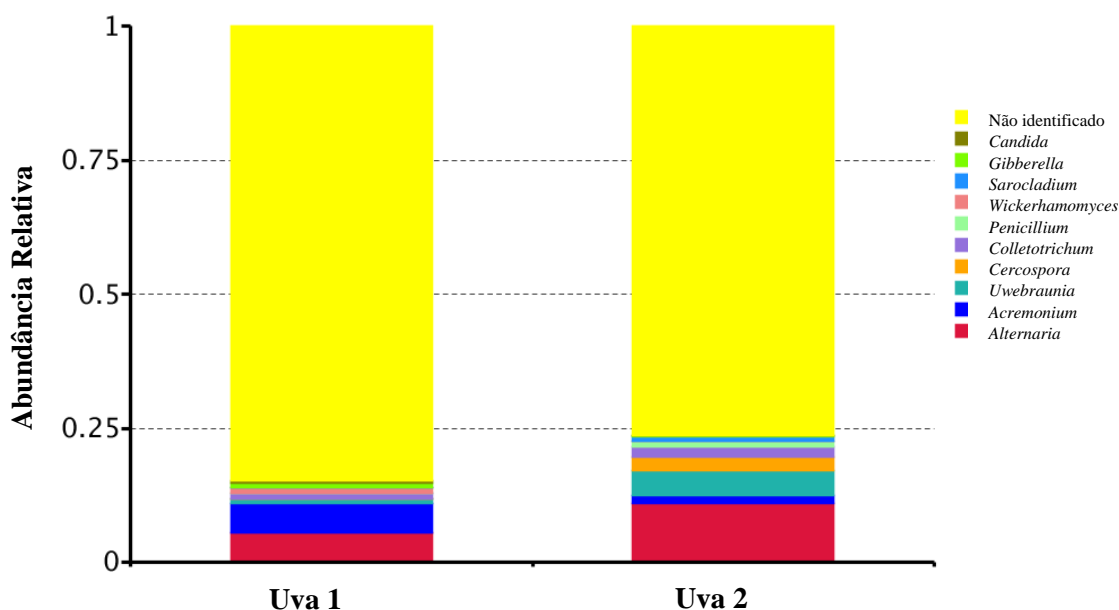
Na Vinícola 1 (Boa Esperança, MG), dentre os diversos gêneros de fungos filamentosos encontrados, *Alternaria* e *Acremonium* foram os que apresentaram maior incidência, em torno de 5% cada grupo. Demais gêneros apresentaram baixa concentração, em torno de 2% cada grupo.

Já na Vinícola 2 (Três Corações, MG), o gênero *Alternaria* teve, aproximadamente, 10% de incidência, seguido de *Uwebraunia*, com 5%. Os demais gêneros apresentaram comportamento semelhante, em torno de 3% cada grupo. A presença de leveduras não foi observada, talvez pela sua baixa incidência.

A presença de leveduras pôde ser observada na Vinícola 1 com apenas dois gêneros, *Candida* e *Wickerhamomyces*.

Observa-se que houve um maior enquadramento em nível de gênero na Vinícola 2, em relação à vinícola 1.

Gráfico 5 – Abundância relativa, em nível de gênero, dos fungos identificados da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

No Gráfico 6 está retratado o relacionamento filogenético dentre as Unidades Operacionais Taxonômicas (OTU). Foram coletados os dados de relações filogenéticas OTU dos dez gêneros mais incidentes (superiores), combinados com a abundância relativa de OTUs e as informações de cada espécie.

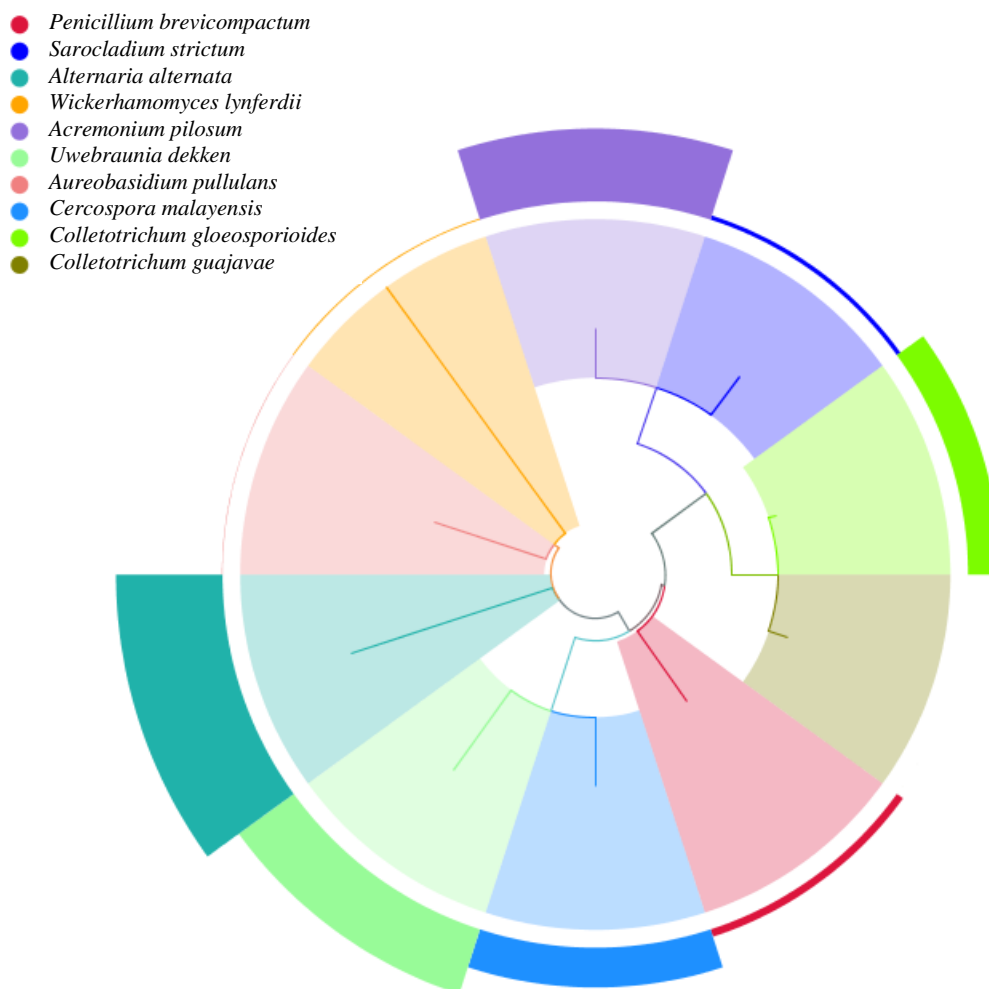
Primeiramente, é necessário entender que as OTUs são a forma como são representados os indivíduos da amostra. Esses indivíduos têm TAGs (fragmentos curtos de DNA) que, de acordo com seu tamanho, vão codificar proteínas do banco de dados para se chegar numa classificação. As TAGs, além de codificar proteínas conhecidas, vão fornecer um perfil taxonômico da comunidade microbiana.

O tamanho das TAGs vai definir a que nível de identificação vai se conseguir chegar. Quanto maior o tamanho das TAGs, ou seja, se o fragmento de DNA tiver mais que 27 aminoácidos, maior a indentificação, podendo-se chegar ao nível de espécie; se for menor que 27 aminoácidos, tem uma especificidade de 97% para reino e 93% para ordem.

As espécies relacionadas no Gráfico 6 apresentaram maior quantidade de OTUs.

Dois gráficos foram integrados *inside out*: a camada interna é a árvore filogenética usando a sequência representativa OTUs; a cor correspondente ao nome científico e cada cor representa um gênero individual; a camada externa é a abundância relativa das OTUs e o tamanho da coluna representa a abundância relativa.

Gráfico 6 – Quantidade de fungos, em nível de espécie, da uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2, representados como uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU).



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

Dentre os fungos filamentosos, destacam-se *Penicillium brevicompactum*, *Sarocladium strictum*, *Alternaria alternata*, *Acremonium pilosum*, *Uwebraunia dekkeri*, *Aureobasidium pullulans*, *Cercospora malayensis*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum guajavae*.

Nas leveduras, observou-se a presença de *Wickerhamomyces lynferdii*.

Os Basidiomycetos (Tabela 2) da Vinícola 1 foram relatados de acordo com a ordem de classificação, tendo o grupo Incertae sedis Tremellales apresentado maior ocorrência dentre os encontrados, tendo como representantes *Hannaella*, *Bulleromyces*, *Cryptococcus*, *Filobasidium* e *Mrakiella*. Já o grupo Sporidiobolales teve maior incidência de *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporomolomyces*, que são leveduras basidiomicetosas com estágio anamorfo,

além de *Exobasidium*, pertencente à ordem Exobasidiaceae, não apresentando estrutura leveduriforme.

Tabela 2 – Diversidade de fungos basidiomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 1.

	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	%		
BASIDIOMYCOTA	TREMELLOMYCETES	Incertae sedis Tremellales	-	<i>Hannaella</i>	0,6		
				<i>Bulleromyces</i>	0,6		
				<i>Cryptococcus</i>	0,09		
				<i>Filobasidium</i>	2		
				<i>Mrakiella</i>	0,5		
	-	-	Sporidiobolales	-	<i>Sporidiobolus</i>	78	
					Incertae sedis Sporidiobolales	<i>Rhodotorula</i>	87
						<i>Sporomolomyces</i>	13
	EXOBASIDIOMYCETES	Exobasidiales	Exobasidiaceae	<i>Exobasidium</i>	54		

Obs: O valor que falta para chegar a 100%, referente a cada família, representa o número de isolados não identificados.

Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

Para um melhor entendimento, a incidência dos fungos filamentosos da divisão Ascomycota será relatada de acordo com a ordem em que pertencem, assim como está especificado na Tabela 3. A ordem Incertae sedis Sordariomycetes apresentou maior incidência de *Colletotrichum*, seguido de *Gibellulopsis* e *Eucasphaeria*; a ordem Diaporthales predominou com *Diaphorte*, *Phomopsis*, *Cytospora* e *Chaetomium*; para Hypocreales a maior incidência foi de *Acremonium* e *Gibberella*, seguidos de *Sarocladium* e *Fusarium*. Estes grupos pertencem à classe dos Sordariomicetes.

Os pertencentes à classe dos Dothideomycetes apresentaram *Acrocalymma* e *Alternaria* como dominantes, seguidos de *Setophaeosphaeria* e *Periconia*, além de *Massarina* em menor quantidade, representantes da ordem dos Pleosporales. Já na ordem Capnodiales foram observados com maior ocorrência *Aureobasidium*, *Devriesia* e *Uwebraunia*, seguidos de *Leptospora*, *Microdiplodia*, *Pseudoteratosphaerella*, *Cercospora*, *Xenomycosphaerella*, *Selenophoma* e *Zygophiala* com menor ocorrência.

Outro representante da divisão Ascomycota foram as leveduras, pertencentes à classe Saccharomycetes, com maior ocorrência de *Wickerhamomyces*, seguido de *Candida* e *Starmerella*. Os demais grupos não foram expressivos, como *Meyerozyma*, *Metschnikowia*, *Pichia* e *Hanseniaspora*. Este grupo é caracterizado por leveduras vegetativas que se reproduzem por brotamento ou fissão binária.

Tabela 3 – Diversidade de fungos ascomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 1.

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	%	
SORDARIOMYCETES	Incertae sedis sordariomycetes	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	97	
		Plectosphaerellaceae	<i>Gibellulopsis</i>	0,3	
		Incertae sedis	<i>Eucasphaeria</i>	0,3	
		Valsaceae	<i>Cytospora</i>	7	
		Diaporthaceae	<i>Phomopsis</i>	7	
		Diaporthales	<i>Diaporthe</i>	29	
		Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	0,2	
		Nectriaceae	<i>Giberella</i>	90	
		Hypocreales	<i>Fusarium</i>	1	
		Incertae sedis hypocreales	<i>Acremonium</i>	96	
		<i>Sarocladium</i>	3		
	SACCHAROMYCETES	Saccharomycetales		<i>Wickerhamomyces</i>	53
			Incertae sedis saccharomycetales	<i>Candida</i>	31
			<i>Starmerella</i>	10	
-			<i>Meyerozyma</i>	1	
Metschnikowiaceae			<i>Metschnikowia</i>	0,1	
Saccharomycetaceae			<i>Pichia</i>	0,1	
Saccharomycodaceae			<i>Hanseniaspora</i>	0,3	
DOTHIDEOMYCETES	Pleosporales	Incertae sedis Pleosporales	<i>Periconia</i>	27	
			<i>Phoma</i>	0,9	
		Lophiostomataceae	<i>Acrocallymma</i>	100	
		Massarinaceae	<i>Massarina</i>	0,1	
		Phaeosphaeriaceae	<i>Setophaeosphaeria</i>	25	
		Pleosporaceae	<i>Alternaria</i>	100	
		Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i>	0,4	
			<i>Uwebraunia</i>	70	
		Mycosphaerellaceae	<i>Cercospora</i>	6	
			<i>Xenomycosphaerella</i>	1	
			<i>Devriesia</i>	9	
		Teratosphaeriaceae	<i>Pseudoteratosphaeria</i>	9	
		Capnodiales	Schizothyriaceae	<i>Zygophiala</i>	0,004
			Dothioraceae	<i>Aureobasidium</i>	100
				<i>Selenophoma</i>	0,4
			Incertae sedis Dothideomycetes	<i>Leptospora</i>	40
	Botryosphaeriaceae	<i>Microdiplodia</i>	24		

Obs: O valor que falta para chegar a 100%, referente a cada família, representa o número de isolados não identificados.

Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

Os Basidiomycetos (Tabela 4) da vinícola 2 foram relatados de acordo com a ordem de classificação, tendo o grupo Incertae sedis Tremellales apresentado maior ocorrência, dentre os encontrados, tendo como representantes *Bulleromyces*, *Hannaella*, *Cryptococcus* e *Filobasidium*. Já o grupo Sporidiobolales teve maior incidência de *Sporomolomyces*, *Sporidiobolus* e *Rhodotorula* são leveduras basidiomicetosas com estágio anamorfo, além do *Exobasidium*, pertencente à ordem Exobasidiaceae e o *Tilletiopsis*, pertencente à ordem Incertae sedis Exobasidiomycetes, não apresentando estrutura leveduriforme.

Tabela 4 – Diversidade de fungos basidiomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 2.

	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	%
BASIDIOMYCOTA	TREMELLOMICETES	Incertae sedis Tremellales	-	<i>Bulleromyces</i>	14
				<i>Hannaella</i>	9
				<i>Cryptococcus</i>	2
				<i>Filobasidium</i>	1
	EXOBASIDIOMICETES	Exobasidiaceae	-	<i>Exobasidium</i>	66
				Incertae sedis Exobasidiomycetes	-
			-	<i>Sporidiobolus</i>	41
		Sporidiobolales		<i>Sporobolomyces</i>	67
			Incertae sedis Sporidiobolales	<i>Rhodotorula</i>	10

Obs: O valor que falta para chegar a 100%, referente a cada família, representa o número de isolados não identificados.

Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

A incidência dos fungos filamentosos da divisão Ascomycota foi relatada de acordo com a ordem a que pertencem, assim como está especificado na Tabela 5. A ordem Incertae sedis Sordariomycetes apresentou maior incidência de *Colletotrichum*, seguido de *Gibellulopsis*; da ordem Diaporthales predominaram *Phomopsis*, *Diaphorte* e *Chaetomium*; de Hypocreales predominaram *Gibberella* e *Acremonium*, com maior incidência, seguidos de *Sarocladium*, *Engyodontium* e, em menor proporção *Purpureocillium* e *Gliomastix*. Estes grupos pertencem à classe dos Sordariomicetes. Os pertencentes à classe dos

Dothideomycetes apresentaram *Alternaria* e *Lophiostoma* com maior ocorrência, seguidos de *Acrocalymma*, *Periconia* e *Setophaeosphaeria*, além de *Ophiosphaerella*, *Pithomyces* e *Pseudopithomyces* em menor quantidade, representantes da ordem dos Pleosporales. Já na ordem Capnodiales foram observados, com maior ocorrência, *Aureobasidium*, *Leptospora*, *Uwebraunia*, *Devriesia* e *Cercospora*, seguidos de *Septoriella*, *Pseudoteratosphaeria*, *Selenophoma*, *Passalora*, *Zygophiala*, *Cladosporium*, *Phloeospora*, *Zasmidium*, *Ramichloridium* e *Toxicocladosporium* em baixa concentração. Na classe dos Eurotiomicetes, a ordem Eurotiales teve alta incidência de *Penicillium*, seguido de *Aspergillus*, com baixa ocorrência de *Talaromyces* e *Neophaeomoniella*. A ordem Chaetothyriales teve como representante unicamente *Rhinocladiella*. A classe Leotiomycetes apresentou três ordens, sendo Helotiales com a presença de *Lambertella* e *Botrytis*, a ordem Incertae sedis Ascomycota teve *Hansfordia* como único representante e a ordem Teloschistales com *Dimelaena*.

Outro representante da divisão Ascomycota foram as leveduras, pertencentes à classe Saccharomycetes, apresentando maior ocorrência de *Wickerhamomyces* e *Candida*. Os demais grupos não foram expressivos, como *Starmerella*, *Meyerozyma* e *Hanseniaspora*. Este grupo é caracterizado por serem leveduras vegetativas que se reproduzem por brotamento ou fissão binária.

Tabela 5 – Diversidade de fungos Ascomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola 2. (Continua)

CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	%	
SORDARIOMICETES	Incert sedis sordariomycetes	Glomerellaceae	<i>Colletotrichum</i>	100	
		-	<i>Gibellulopsis</i>	0,3	
	Diaporthales	Diaporthaceae	<i>Phomopsis</i>	40	
			<i>Diaporthe</i>	22	
		Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	0,2	
	Hypocreales	Nectriaceae	<i>Giberella</i>	90	
		Incertae sedis Hypocreales		<i>Acremonium</i>	59
				<i>Sarocladium</i>	33
			<i>Gliomastix</i>	0,07	
		Cordycipitaceae	<i>Engyodontium</i>	33	
		-	<i>Purpureocillium</i>	0,2	
ASCOMYCOTA	Pleosporales	Incertae sedis Pleosporales	<i>Periconia</i>	16	
		Lophiostomataceae	<i>Lophiostoma</i>	75	
		<i>Acrocalyma</i>	25		
	Phaeosphaeriaceae		<i>Setophaeosphaeria</i>	14	
			<i>Ophiosphaerella</i>	7	
	Pleosporaceae		<i>Alternaria</i>	100	
			<i>Pithomyces</i>	0,05	
		-	<i>Pseudopithomyces</i>		
	DOTHIDEOMYCETES	Davidiellaceae		<i>Cladosporium</i>	0,2
				<i>Uwebraunia</i>	52
			<i>Cercospora</i>	28	
		Mycosphaerellaceae		<i>Xenomycosphaerella</i>	0,08
				<i>Phloeospora</i>	0,2
				<i>Zasmidium</i>	0,2
		Capnodiales		<i>Ramichloridium</i>	0,08
				<i>Passalora</i>	0,5
				<i>Devriesia</i>	38
		Teratosphaeriaceae	<i>Pseudoteratosphaeria</i>	8	

Tabela 5 – Diversidade de fungos Ascomicetos identificados da uva Syrah da Vinícola. (Conclusão)

	CLASSE	ORDEM	FAMÍLIA	GÊNERO	%		
ASCOMYCOTA	DOTHIDEOMYCETES		-	<i>Zygothiala</i>	0,3		
				-	<i>Toxicocladosporium</i>	0,02	
			Capnodiales				
				Dothioraceae	<i>Aurebasidium</i>	99	
					<i>Selenophoma</i>	1	
			Incertae sedis	Incertae sedis	<i>Leptospora</i>	87	
				Dothideomycetes	<i>Septoriella</i>	11	
		SACCHAROMYCETES			Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora</i>	1
				Saccharomycetales	Incertae sedis	<i>Wickerhamomyces</i>	35
					Saccharomycetales	<i>Candida</i>	35
					<i>Starmerella</i>	8	
				-	<i>Meyerozyma</i>	2	
	EUROTOMYCETES			Eurotiales	Trichocomaceae	<i>Penicillium</i>	68
					<i>Aspergillus</i>	29	
					<i>Talaromyces</i>	0,3	
			-	-	<i>Neophaeomoniella</i>	0,1	
			Chaetothyriales	-	<i>Rhinochlaidiella</i>	20	
		LEOTIOMYCETES			Rutstroemiaceae	<i>Lambertella</i>	38
			Helotiales		<i>Botrytis</i>	25	
			Incertae sedis Ascomycota	-	<i>Hansfordia</i>	98	
	Teloschistales		Physciaceae	<i>Dimelaena</i>	0,003		

Obs: O valor que falta para chegar a 100%, referente a cada família, representa o número de isolados não identificados.

Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

A Vinícola 1 e a Vinícola 2 apresentaram diversidades de fungos Ascomicetos bem discrepantes. Na Vinícola 1 pôde-se observar a presença dos gêneros que não foram observados na Vinícola 2, como *Eucasphaeria*, *Cytospora*, *Fusarium*, *Phoma*, *Zygothiala*, *Microdiploia*, *Metschnikowia* e *Pichia*. Já a Vinícola 2 apresentou maior diversidade e muitos dos gêneros encontrados não foram relatados na Vinícola 1, como *Gliomastix*,

Gliomastix, *Engyodontium*, *Lophiostoma*, *Ophiosphaerella*, *Pithomyces*, *Pseudopithomyces*, *Phloeospora*, *Zasmidium*, *Ramichloridium*, *Passalora*, *Toxicocladosporium*, *Septoriella*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Neophaeomoniella*, *Rhinochlaediella*, *Lambertella*, *Botrytis*, *Hansfordia*, *Dimelaena* e *Tilletiopsis*.

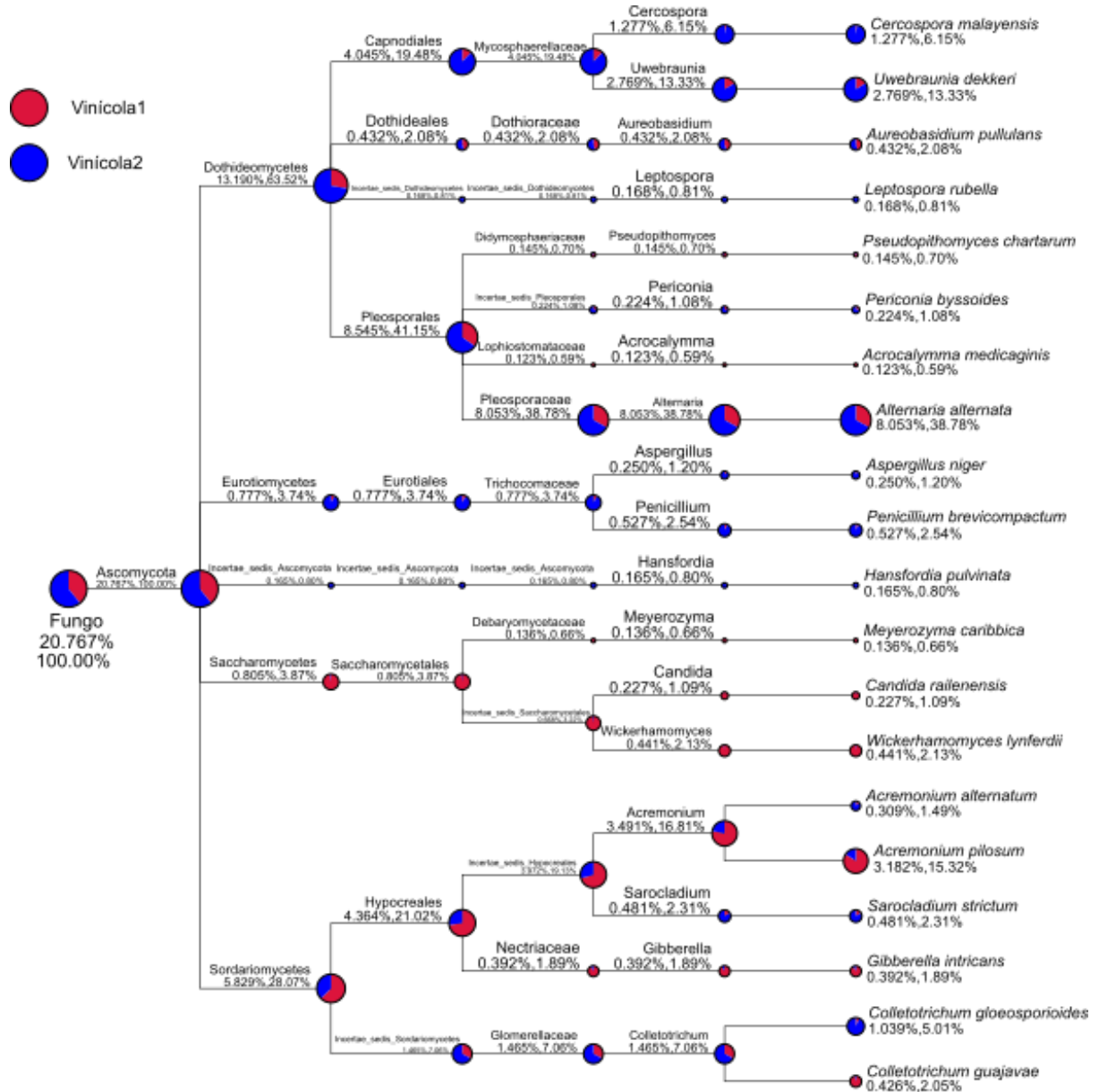
Apesar da diversidade de fungos filamentosos existente nas duas vinícolas, apenas alguns gêneros ocorreram com alta frequência, como é o caso de *Colletotrichum* (97%), *Giberella* (90%), *Acremonium* (96%), *Acrocalymma* (100%), *Alternaria* (100%), *Uwebraunia* (70%), *Devriesia* (91%), *Aureobasidium* (100%), *Leptospora* (40%), *Microdiplodia* (24%), *Periconia* (27%) e *Diaporthe* (29%), na Vinícola 1 e, na Vinícola 2, *Colletotrichum* (100%), *Phomopsis* (40%), *Gibberella* (90%), *Acremonium* (59%), *Lophiostoma* (75%), *Alternaria* (100%), *Cercospora* (28%), *Devriesia* (38%), *Aurebasidium* (99%), *Leptospora* (87%), *Penicillium* (68%), *Aspergillus* (29%), *Lambertella* (38%), *Botrytis* (25) e *Hansfordia* (98%). A porcentagem está se referindo à incidência desse gênero dentro da família a que pertence.

Nas Tabelas 6 e 7 (Vinícola 1) e 8 e 9 (Vinícola 2) pode-se observar a diversidade de fungos filamentosos e leveduras pertencentes ao grupo Ascomycota e Basidiomycota. Todos os identificados foram retratados em nível de Classe, Ordem, Família e Gênero, não sendo possível observar em nível de espécie. Assim, na Figura 10 está retratada a diversidade de fungos em nível de espécie, tendo sido feita uma árvore filogenética distribuída em sete etapas, que são Reino, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie. Nessa árvore foram selecionadas as 20 principais espécies identificadas da amostra de uva Syrah da vinícola 1 e da vinícola 2, retratando o nível de incidência em cada vinícola.

De acordo com a Figura 10, as 20 principais espécies de fungos filamentosos e leveduras comuns entre a Vinícola 1 e a Vinícola 2, pertencentes ao filo Ascomycota, foram assim discriminadas: na ordem dos Capnodiales estão *Cercospora malayensis* (0,49% e 9,81%) e *Uwebraunia dekkeri* (5,50% e 18,40%); Dothideales, *Aureobasidium pullulans* (2,38% e 1,88%); Incertae sedis Dothideomycetes, *Leptospora rubella* (0,13% e 1,25%); Pleosporales, *Pseudopithomyces chartarum* (1,48% e 0,19%), *Periconia byssoides* (0,66% e 1,35%), *Acrocalymma medicaginis* (1,50% e 0,01%) e *Alternaria alternata* (32,62% e 42,77%). Já os Eucariotales foram *Aspergillus niger* (0,29% e 1,79%) e *Penicillium brevicompactum* (0,48% e 3,87%); Incertae sedis Ascomycota, *Hansfordia pulvinata* (0,15% e 1,22%), Hypocreales são *Acremonium alternatum* (0,51% e 2,12%), *Acremonium pilosum* (32,88% e 3,96%), *Sarocladium strictum* (0,97% e 3,19%) e *Gibberella intricans* (4,42% e 0,25%); Incertae sedis Sordariomycetes, *Colletotrichum gloeosporioides* (0,86% e 7,69%) e *Colletotrichum guajavae* (5,0% e 5,0%). Dentre as leveduras pertencentes à classe

Saccharomycetales, têm-se *Meyerozyma caribbica* (1,64% e 0,02%), *Candida railenensis* (2,72% e 0,04%) e *Wickerhamomyces lynferdii* (5,31% e 0,06%).

Figura 4 – Árvore filogenética das 20 principais espécies encontradas na uva variedade Syrah da Vinícola 1 e da Vinícola 2.



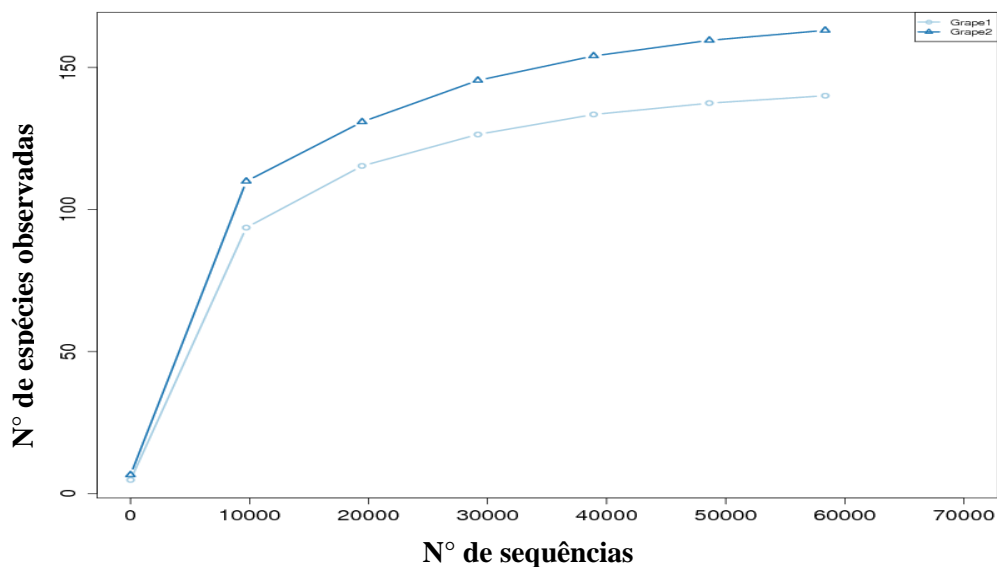
Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

Dessa maneira, sequências gênicas da região ITS rRNA foram utilizadas para o sequenciamento por meio do software Uparse. Sequências que apresentaram similaridade maior ou igual a 97% foram atribuídas às mesmas OTUs. Em seguida, foi gerada uma curva de rarefação que retrata o número de espécies encontrada em relação ao número de organismos coletados. Portanto, quanto mais côncava descendente for a curva, mais a comunidade foi bem representada (Gráfico 7).

A técnica de rarefação surge como uma solução para avaliar os índices de diversidade que irão depender do tamanho da amostra, pois essas comunidades serão comparadas por meio das curvas, em que a curva que estiver acima será aquela que tem a maior diversidade. As curvas de rarefação tendem a aumentar muito rapidamente logo no início, mostrando uma inclinação que expressa que as espécies mais comuns estão sendo encontradas. No entanto, grande parte da diversidade ainda precisa ser descoberta. Quanto menos espécies raras aparecem, menos plana a curva vai ficando, mas, normalmente, as mais raras vão aparecendo. Isto mostra que, mesmo que mais coletas sejam realizadas, provavelmente poucas espécies serão adicionadas (HUGHES et al., 2001; YOUSSELF; ELSHAHED, 2009).

O Gráfico 7 retrata que o lado esquerdo íngreme indica que uma grande fração da diversidade de espécies ainda não foi descoberta; já o côncavo mostra o número de espécies raras observadas, sendo que a Vinícola 1 (Grape1) apresenta maior número de OTUs em relação à Vinícola 2 (Grape2), ou seja, maior diversidade.

Gráfico7 – Curva de rarefação com quantidade de espécies representadas da Vinícola 1 (Grape1) e Vinícola 2 (Grape 2).



Fonte: Informações fornecidas pelo laboratório “Ponto Labor”, Betim (2016).

6 DISCUSSÃO

A Vinícola 1 e a Vinícola 2 apresentaram diversidades de fungos Ascomicetos bem discrepantes, sendo a Vinícola 2 mais rica, com um grande número de gêneros que não foram encontrados na Vinícola 1. Tal diversidade pode ser, talvez, explicada pela composição diversa de plantações que ocorrem em cada vinícola, podendo contribuir selecionando-se esses fungos, no caso da Vinícola 1, que apresentou uma diversidade mais discreta ou, até mesmo, ampliando a presença de diferentes gêneros, como na Vinícola 2, que teve ocorrência do espectro mais expressiva.

Em estudo realizado com mosto de uva da Califórnia foi observada predominância de *Cladosporium* spp. (2%), *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) (15,2%), *Penicillium* spp. (9,5%), *Davidiella tassiana* (9,2%) e *Aureobasidium pullulans* (7,3%), além das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (4,0%), *Hanseniaspora uvarum* (5,0%) e *Candida zemplinina* (1,3%) (BOKULICH et al., 2013). Os resultados mostraram uma similaridade com o presente estudo, a não ser pela presença do gênero *Davidiella*. Essas diferenças de gênero encontradas podem estar relacionadas às características ambientais da região e à variedade da uva e sua composição.

O gênero *Colletotrichum* foi o único representante da família Glomerellaceae e, no trabalho realizado por Brum (2008), sobre diversidade de fungos associados à variedade de uva Niagara rosada, também este foi o gênero mais frequentemente encontrado. Algumas espécies deste gênero, como *Colletotrichum gloeosporioides*, são consideradas fungos fitopatogênicos em diversas culturas e também têm sido isoladas endofiticamente de plantas, sendo responsável pela podridão da uva madura em vinhedos, o que poderia representar uma ameaça aos vinhedos do presente estudo. No entanto, apesar da sua alta incidência, a temperatura entre 25 °C e 30 °C e a alta umidade são as condições ideais para a ocorrência e o desenvolvimento da doença, o que diverge da temperatura da região de estudo que, na época da colheita, apresenta temperatura média de 19 °C e baixa pluviosidade.

Outras espécies estão associadas a doenças em videiras, como é o caso do *Botrytis cinerea*, responsável por uma doença chamada podridão cinzenta da uva, também conhecida como mofo-cinzento ou podridão de botrytis. Apesar de essa espécie não ter sido encontrada, seu gênero foi observado na Vinícola 2, com boa representatividade, mostrando a importância do monitoramento deste fungo nas áreas de cultivo, pois sua presença acarreta danos tanto à produtividade como à qualidade da uva (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI, 2005).

O *Botrytis cinerea* afeta diretamente a qualidade do vinho pela degradação de compostos qualitativos e pela presença de substâncias indesejáveis para a vinificação, além da conservação e da qualidade gustativa do vinho. As uvas com *Botrytis* contêm fenoloxidasas e lacases, enzimas responsáveis pela oxidação enzimática dos compostos fenólicos, produzindo a casse oxidasica, prejudicando a cor, o aroma e o sabor do vinho. Sua presença pode ser relatada em diferentes espécies de frutas, no entanto, o processo infeccioso ocorre entre 16 e 21 °C. Esta temperatura é atingida após às 18 horas, na região sul do Brasil, entretanto, seu desenvolvimento só será possível com umidade relativa maior que 90% e temperaturas em torno de 25 °C (SÔNEGO; GARRIDO; GRIGOLETTI, 2005).

Os *Aspergillus* mais frequentemente detectados nas uvas pertencem à Secção *Nigri*, tendo o *A. niger* o quarto taxon de fungos filamentosos mais frequentemente isolado, seguido de *A. carbonarius*. Cerca de 5% das estirpes de *A. niger* têm capacidade de produzir OTA, enquanto quase 100% das estirpes de *A. carbonarius* são consideradas potencialmente produtoras. No entanto, esse isolado não foi observado nas amostras analisadas neste estudo. Ambas as espécies são saprófitas e causam podridão nas uvas, mas só conseguem penetrar caso haja microfissuras na uva, que podem ser causadas por insetos, transporte e pássaros, entre outros. Estes fungos, devido aos seus esporos negros, resistem à exposição solar e chegam a ser dominantes no momento da vindima, quando existe maior disponibilidade de açúcares e outros nutrientes nas uvas. O conhecimento das espécies produtoras de ocratoxina A presentes nas bagas é importante para avaliar o risco de contaminação do vinho, mas a presença de fungos potencialmente produtores de micotoxinas não significa a presença de micotoxinas nas uvas e, conseqüentemente, nos vinhos (SERRA; ABRUNHOSA; VENÂNCIO, 2002) já que sua produção está relacionada com diferentes fatores, como temperatura, umidade e pH.

Diante da estimativa de 1,5 milhão de espécies de fungos existentes (HAWKSWORTH, 2001), a maioria deles é desconhecida. Esses microrganismos vivem nos mais diferentes habitats da terra e essa habilidade é devido à sua diversidade metabólica, isto é, podem usar uma grande variedade de fontes de energia e conseguir crescer sob diferentes condições físicas. A diversidade de populações microbianas indica que elas tiram proveito de qualquer nicho encontrado em seu ambiente e, assim sendo, os microrganismos detêm a maior proporção da diversidade genética global estimada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Em decorrência dessa diversidade, muitos microrganismos vivem de maneira harmoniosa, ou seja, sem causar prejuízos ao ambiente ou à planta; quaisquer mudanças, tanto

abióticas como bióticas, no meio podem favorecer o desenvolvimento de um grupo determinado, o que pode causar prejuízos à planta ou ao fruto.

As leveduras são outro grupo de fungos que têm um grande papel no processo de fermentação da uva vinífera, sendo responsável pelas características que o vinho vai adquirir. As leveduras não *Saccharomyces* que integram os gêneros *Kloeckera*, *Cryptococcus*, *Torulaspota*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Zygosaccharomyces*, *Metschnikowia*, *Debaromyces*, *Issatchenkia* e *Rhodotorula* estão presentes na fase inicial da fermentação espontânea do mosto de uva, por serem predominantes nas superfícies das uvas (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2006).

Os grupos de leveduras basidiomicetosas oxidativas, tais como *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Sporobolomyces* spp. e *Filobasidium* spp., assim como a levedura negra ascomicetosa dimórfica *Aureobasidium pullulans* (BARATA et al., 2008; BARATA; MALFEITO-FERREIA; LOUREIRO, 2012; RENOUF; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2005), estão presentes em bagas intactas, desde o término da germinação até a maturação total da uva. Essas leveduras pertencem ao ambiente de vinhedos, sendo tipicamente associadas com a filosfera das uvas e do solo (BARATA; MALFEITO-FERREIA; LOUREIRO, 2012). Esses grupos também foram relatados em vinhedos na região de Polkadraai, em Stellenbosch, na África do Sul, em amostras de uva Cabernet Sauvignon (SETATI et al., 2012). No entanto, a presença da levedura negra não foi observada neste estudo, diferente dos demais gêneros que foram observados.

Em estudo realizado por Nisiotou e Nichas (2007) as leveduras ascomicetadas oxidativas, como *Candida* spp., *Pichia* spp. e *Metschnikowia* spp. e as leveduras fermentativas ascomicetadas *Hanseniaspora/Kloeckera* spp. foram encontradas em baixas concentrações em uvas não danificadas, o que corrobora o resultado encontrado neste trabalho, assim como a baixa concentração de *Saccharomyces cerevisiae*, retratada por Fleet (2003), sabendo-se que esta levedura é a mais relevante do vinho, pelo seu alto poder de produção de álcool.

Os gêneros *Kloeckera* e *Saccharomyces*, apesar de apresentarem baixa incidência nas duas vinícolas, são importantes por produzirem metabólitos interessantes na fabricação do vinho. Em estudo realizado por Mamede e Pastore (2004), *Kloeckera apiculata* produziu altas concentrações de acetato de etila e acetato de isoamila. Já *Saccharomyces cerevisiae* teve baixa produção desses compostos, mas alta produção de etanol, um ponto positivo para a produção de vinho. O acetato de etila é o éster predominante no vinho, sendo produzido em pequenas quantidades pelas leveduras durante a fermentação (RIBÉREAU-GAYON et al.,

2006). Estudos desenvolvidos por Jolly, Augustyn e Pretorius (2006) determinaram que *Pichia anomala*, *Kloeckera apiculata* e *Candida pulcherrim* são conhecidas pela alta produção de ésteres.

Em uvas maduras que apresentam injúria, nas quais existe maior disponibilidade de nutrientes e elevada concentração de açúcar, predominam as leveduras com fraca capacidade fermentativa, como *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* e *Candida*, como também as de alta capacidade fermentativa, como a *Pichia* spp. (BARATA; MALFEITO-FERREIRA; LOUREIRO, 2012), tendo esta última sido encontrada apenas na vinícola 1. As demais foram comuns nas duas vinícolas.

Estudos têm demonstrado que *Rhodotorula glutinis* (CASTORIA et al., 1997) e *Sporobolomyces roseus* apresentam potencial como agente de biocontrole de *Penicillium expansum* e *Botrytis cinérea*, assim como a *Tilletiopsis albescens*, que tem se mostrado capaz de inibir o crescimento de *Penicillium italicum* (ALVES, 2007). Apesar de não ter sido identificado em nível de espécie, esses gêneros foram encontrados nas duas vinícolas, com exceção da *Tilletiopsis*, que foi encontrada apenas na Vinícola 2. Não se pode deixar de ressaltar a importância desses gêneros, com possível produção de metabólito com atividade antifúngica (FILONOW, 1998; FILONOW et al., 1996; JANISIEWICZ; PETERSON; BORS, 1994).

De acordo com trabalhos publicados, as espécies de leveduras encontradas, como *Meyerozyma caribbica*, *Candida railenensis* e *Wickerhamomyces lynferdii*, não foram relatadas em trabalhos com mosto de uva. No entanto, seus gêneros estavam presentes neste trabalho, mas tendo como representantes outras espécies. Isso mostra uma variedade de espécies que ainda não foram identificadas e, por isso, não se tem o conhecimento do seu papel nos processos fermentativos.

Os demais gêneros citados e suas respectivas espécies não foram encontrados em nenhum dos estudos já realizados em uvas, mas vale ressaltar que algumas dessas espécies podem ser encontradas em solo e talvez por isso tenha sido detectada a sua presença nas uvas (LEVEAU; TECH, 2011).

Estudos de diversidade microbiana em uvas viníferas têm colaborado com a descoberta de espécies com propriedades enológicas positivas, possibilitando o conhecimento de um número crescente de leveduras e bactérias reconhecidas como participantes ativos em processos fermentativos e nas qualidades sensoriais do vinho (CIANI et al., 2010).

Caruso et al. (2002) e Urso et al. (2008) constataram que os métodos moleculares, quando associados aos tradicionais, ampliaram a possibilidade de estudar a dinâmica de

populações de leveduras indígenas durante a fermentação espontânea do vinho, permitindo compreender de forma precisa as relações e as interações entre diferentes espécies de leveduras envolvidas no processo fermentativo.

Diversos estudos realizados em diferentes países atribuíram uma contribuição importante de espécies não *Saccharomyces* à dinâmica de crescimento de leveduras durante fermentações de vinho (COMBINA et al., 2005; JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2003; ZOTT et al., 2011). Assim, as espécies de leveduras não *Saccharomyces* fornecem um fator de diversidade que requer estudos específicos para evitar consequências negativas e para explorar suas contribuições benéficas (JOLLY; AUGUSTYN; PRETORIUS, 2003).

A população de leveduras correlacionadas com fermentações espontâneas consiste em estirpes genotípicamente diferentes, geralmente com diferentes propriedades fenotípicas e, portanto, potencialmente capazes de influenciar, proporcionalmente à sua abundância relativa, as propriedades aromáticas do produto final do vinho (ROMANO et al., 2003). Geralmente, apenas alguns *S. cerevisiae* são capazes de dominar as fases finais do processo (VINCENZINI; ROMANO; FARRIS, 2005).

Durante os últimos anos, a melhoria e aplicação de abordagens moleculares para a análise de populações de leveduras mostrou que, juntamente com a variabilidade das espécies, a fermentação espontânea é caracterizada por uma significativa biodiversidade intraespecífica (COCOLIN; BISSON; MILLS, 2000). Com isso, a biodiversidade natural de bagas de uva, suco de uva e ambiente vinícola possuem um *terroir* específico, onde apresentam uma composição única e representam um grande recurso para o processo de vinificação. Com efeito, o microrganismo autóctone está mais adaptado ao "ambiente químico" do mosto proveniente de uma determinada zona vitícola e pode dar características regionais distintas aos vinhos. Portanto, a formulação de um iniciador multistirpe não *Saccharomyces/Saccharomyces* pode ser uma alternativa confiável para fermentações não controladas espontâneas (CAPOZZI et al., 2015).

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos em relação aos fungos filamentosos pode-se observar que a Vinícola 2 obteve maior diversidade desses microrganismos. Para as leveduras foi obtida grande similaridade das espécies encontradas nas duas vinícolas.

Foi retratada dominância de acordo com os níveis de Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie e foi observado que houve maior incidência de Ascomycetos, quando comparada com a ocorrência de Basidiomycetos.

As técnicas de metagenômica e as ferramentas de bioinformática propiciaram a elaboração de perfis taxonômicos, com os diversos fungos filamentosos e leveduras que compõem os vinhedos das duas vinícolas localizadas no sul de Minas Gerais, possibilitando uma melhor compreensão de quais microrganismos estão presentes naquele ambiente e como eles podem interferir no produto final. Também se pode observar que existe uma grande quantidade de microrganismos que não foram classificados taxonomicamente, mostrando que apenas uma pequena porcentagem desses microrganismos é conhecida em nível de espécie. Por fim, ressalta-se a importância da continuidade de estudos nessa área para que cada vez mais microrganismos possam ser identificados, favorecendo o conhecimento da identidade de cada ambiente e o entendimento das características dos vinhos dessas regiões.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. L. N. **Avaliação do potencial de leveduras dos géneros *Pseudozyma* e *Rhodospordium* no controlo biológico pós-colheita de bolores**. 2007. 121 p. Dissertação (Mestrado em Controle da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos)-Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.
- BARATA, A. et al. Sour rot-damaged grapes are sources of wine spoilage yeasts. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 8, p. 1008-1011, 2008.
- BARATA, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. The microbial ecology of wine grape berries. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 3, p. 243-259, 2012.
- BOKULICH, N. A. et al. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 111, p. E139-E148, 2013.
- BRUM, M. C. P. **Fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. var. Niagara Rosada e o seu potencial biotecnológico**. 2009. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia)-Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2008.
- CAPOZZI, V. et al. Microbial terroir and food innovation: the case of yeast biodiversity in wine. **Microbiological Research**, Jena, v. 181, p. 75-83, 2015.
- CARUSO, M. et al. Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. **Letters in Applied Microbiology**, Berlin, v. 34, n. 5, p. 323-328, 2002.
- CASTORIA, R. et al. [beta]-1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 293-300, 1997.
- CIANI, M. et al. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 10, n. 2, p. 123-133, 2010.
- COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, p. 81-87, 2000.
- COMBINA, M. et al. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 237-243, 2005.
- FILONOW, A. B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple. **Biocontrol Science and Technology**, Oxon, v. 8, p. 243-256, 1998.
- FILONOW, A. B. et al. Biological control of *Botrytis cinerea* in apple by yeasts from various habitats and their putative mechanisms of antagonism. **Biological Control**, Orlando, v. 7, n. 2, p. 212-220, 1996.

FLEET, G. H. Yeast interactions and wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 11-22, 2003.

GOULART, K. C. S.; OMORI, W. P.; SOUZA, J. A. M. Metagenômica aplicada à biotecnologia. **Revista Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, v. 5, n. 1, p. 1-14, mar. 2013.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revised. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, p. 1422-1431, 2001.

HUGHES, J. et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 4399-4406, 2001.

JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, B. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, Quebec, v. 78, n. 5, p. 466-470, 1994.

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The effect of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation and wine quality. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 24, n. 2, p. 55-62, 2003

JOLLY, N. P.; AUGUSTYN, O. P. H.; PRETORIUS, I. S. The role and use of nonsaccharomyces yeasts in wine production. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 27, n. 1, p. 15-39, 2006.

LEVEAU, J. H. J.; TECH, J. J. Grapevine microbiomics: bacterial diversity in grape leaves and berries revealed by high throughput sequence analysis of 16S rRNA amplicons. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 905, n. 2, p. 31-42, 2011.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da “Serra Gaúcha” (RS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 453-458, jul./set. 2004.

NISIOTOU, A. A.; NYCHAS, G. J. E. Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a Vineyard in Attica, Greece. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 73, p. 2765-2768, 2007.

PEIXOTO, M. B. **Classificação e sequências e análise de diversidade em metagenômica**. 2013. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, p. 316-327, 2005.

RIBÉREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology: the microbiology of wine and vinifications**. 2nd ed. New York: J. Wiley, 2006. v. 1, 481 p.

ROMANO, P. et al. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 86, p. 169-180, 2003.

SERRA, R.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. **Micoflora das uvas e micotoxinas**. Braga: Universidade do Minho, 2002. 9 p.

SETATI, M. E. et al. Corretion: the vineyard yeast microbiome a mixed model microbial Map. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, Dec. 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0052609>>. Acesso em: 10 out. 2016.

SÔNEGO, O. R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A. **Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho, 2005. 32 p. (Circular Técnica, 56).

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 731 p.

URSO, R. et al. Yeast biodiversity and dynamics during weet wine production as determined by molecular methods. **FEMS Yeast Research**, New York, v. 8, n. 7, p. 1053-1062, 2008.

VINCENZINI, M.; ROMANO, P.; FARRIS, G. A. **Microbiologia del vino**. Milano: Casa Editrice Ambrosiana, 2005. 520 p.

ZOTT, K. et al. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 151, p. 210-215, Dec. 2011.

ANEXOS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Fungos isolados de uva vinícola 1 (safra 2016).

Gênero/ espécie	Nº de isolados
<i>Alternaria</i> sp.	2
<i>Aspergillus aculeatus</i>	9
<i>Aspergillus flavus</i>	1
<i>Aspergillus niger</i>	5
<i>Aspergillus niger</i> Agregado	10
<i>Aspergillus</i> sp.	2
<i>Aspergillus tubingensis</i>	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	62
<i>Fusarium</i> sp.	9
Morfotipo	15
<i>Paecylomyces</i> sp.	1
<i>Peicillium</i> sp. 3	4
<i>Penicillium brevicompactum</i>	20
<i>Penicillium crustosum</i>	2
<i>Penicillium decumbens</i>	4
<i>Penicillium multicolor</i>	9
<i>Penicillium roqueforti</i>	6
<i>Penicillium roqueforti</i> Agregado	1
<i>Penicillium</i> sp. 1	8
<i>Penicillium</i> sp. 2	3
<i>Penicillium</i> sp. 4	3

Tabela 2 – Fungos isolados do solo Vinícola 1 (safra 2016).

Gênero/ espécie	Nº de isolados
<i>Absidia corymbifera</i>	1
<i>Alternaria</i> sp.	2
<i>Aspergillus aculeatus</i>	1
<i>Aspergillus niger</i>	1
<i>Aspergillus terreus</i>	6
<i>Aspergillus tubingensis</i>	17
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	24
<i>Eupenicillium</i> sp.	15
<i>Fusarium semitectum</i>	1
<i>Fusarium</i> sp.	12
Morfotipo 1	28
Morfotipo 2	14
<i>Penicillium decumbens</i>	2
<i>Penicillium janthinellum</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	2
<i>Penicillium</i> sp. seção citrinina	2
<i>Phacelomyces</i> sp.	5
<i>Rhizopus oryzae</i>	3
<i>Thricoderma</i> sp.	1

Tabela 3 – Fungos isolados de uva vinícola 2 (safra 2015).

Gênero/ espécie	Nº de isolados
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	54
Morfotipo	31
<i>Penicillium</i> sp.	2

Tabela 4 - Fungos isolados do solo vinícola 2 (safra 2015).

Gênero/ espécie	Nº de isolados
<i>Alternaria</i> sp.	1
<i>Aspergillus japonicus</i>	2
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1
<i>Aspergillus terreus</i>	1
<i>Aspergillus ustus</i>	1
<i>Bisoclames</i> sp.	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	36
<i>Epicoccus nigrum</i>	2
<i>Fase sexuada</i>	8
<i>Fusarium lateritium</i>	24
<i>Fusarium oxysporum</i>	5
<i>Fusarium semitectum</i>	6
<i>Fusarium solani</i>	1
<i>Fusarium</i> sp.	7
Morfotipo 1	8
Morfotipo 2	1
<i>Mucor circinelloides</i>	1
<i>Mucor racemosus</i>	2
<i>Myrothecium</i> sp.	7
<i>Penicillium brevicompactum</i>	16
<i>Penicillium citreanigrum</i>	1
<i>Penicillium citrinum</i>	2
<i>Penicillium crustosum</i>	1
<i>Penicillium decumbens</i>	2
<i>Penicillium paxilli</i>	1
<i>Penicillium pinophilum</i>	2
<i>Penicillium</i> sp.	7
<i>Penicillium verruculosum</i>	1
<i>Penicillium waksmanii</i>	1
<i>Scapuloriopsis</i> sp.	1
<i>Thricoderma</i> sp.	2

Tabela 5 - Fungos isolados de uva vinícola 2 (safra 2016).

Gênero/ espécie	N° de isolados
<i>Aspergillus aculeatus</i>	7
<i>Aspergillus niger</i>	18
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2
<i>Aspergillus parasiticus</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	63
Morfotipo 1	3
Morfotipo 2	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	2
<i>Penicillium citreonigrum</i>	1
<i>Penicillium citrinum</i>	2
<i>Penicillium decumbens</i>	36
<i>Penicillium glabrum</i>	3
<i>Penicillium rugulosum</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	6
<i>Rhizopus</i> sp.	4
<i>Thricoderma</i> sp.	1

Tabela 6 - Fungos isolados do solo vinícola 2 (safra 2016).

Gênero/ espécie	N° de isolados
<i>Absidia corymbifera</i>	1
<i>Aspergillus aculeatus</i>	12
<i>Aspergillus parasiticus</i>	2
<i>Aspergillus terreus</i>	3
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	29
Fase sexuada 1	3
Fase sexuada 2	2
Morfotipo	32
<i>Penicillium roqueforti</i>	5
<i>Penicillium citrinum</i>	3
<i>Penicillium implicatum</i>	8
<i>Penicillium paxilli</i>	15
<i>Rhizopus</i> sp.	19
<i>Thricoderma</i> sp.	2

Tabela 7 - Fungos isolados de uva vinícola 3 (safra 2015).

Gênero/ espécie	N° de isolados
<i>Alternaria</i> sp.	8
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	66
<i>Epicoccus nigrum</i>	1
Morfotipo	7
<i>Penicillium brevicompactum</i>	59
<i>Penicillium decumbens</i>	1

Tabela 8 - Fungos isolados de solo vinícola 3 (safra 2015).

Gênero/ espécie	Nº de isolados
<i>Absidia corymbifera</i>	10
<i>Aspergillus niger</i>	6
<i>Aspergillus aculeatus</i>	16
<i>Aspergillus foetidus</i>	1
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4
<i>Aspergillus japonicus</i>	17
<i>Aspergillus melleus</i>	3
<i>Aspergillus niger</i> Agregado	1
<i>Aspergillus niveus</i>	3
<i>Aspergillus ochraceus</i>	2
<i>Aspergillus</i> sp. 1	1
<i>Aspergillus</i> sp. 2	4
<i>Aspergillus sydowii</i>	1
<i>Aspergillus tubingensis</i>	1
<i>Cladosporium cladosporioides</i> complexo	16
<i>Eupenicillium lapidosum</i>	3
<i>Eupenicillium</i> sp.	1
Fase sexuada 2	3
<i>Fusarium oxysporum</i>	6
<i>Fusarium proliferatum</i>	1
<i>Fusarium solani</i>	1
<i>Fusarium</i> sp.	1
<i>Geotrichum candidum</i>	1
Morfotipo 1	1
Morfotipo 2	1
Morfotipo 3	1
Morfotipo 4	1
Morfotipo 5	1
Morfotipo 6	1
Morfotipo 7	1
Morfotipo 8	8
<i>Mucor racemosus</i>	9
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	4
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1
<i>Penicillium brevicompactum</i>	3
<i>Penicillium citrinum</i>	11
<i>Penicillium corylophilum</i>	1
<i>Penicillium griseofulvum</i>	1
<i>Penicillium miczynskii</i>	1
<i>Penicillium oxalicum</i>	1
<i>Penicillium paxilli</i>	10
<i>Penicillium restrictum</i>	1
<i>Penicillium roqueforti</i>	1
<i>Penicillium</i> sp.	2
<i>Penicillium</i> sp. seção citrina 2	1
<i>Penicillium</i> sp.1	5
<i>Penicillium</i> sp.4	2
<i>Penicillium</i> sp.5	1
<i>Penicillium variabile</i>	1
<i>Talaromyces</i> spp.1	1
<i>Talaromyces</i> spp.2	2
<i>Thricoderma</i> sp.	10

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Árvore filogenética das 20 principais espécies identificadas na uva 1.

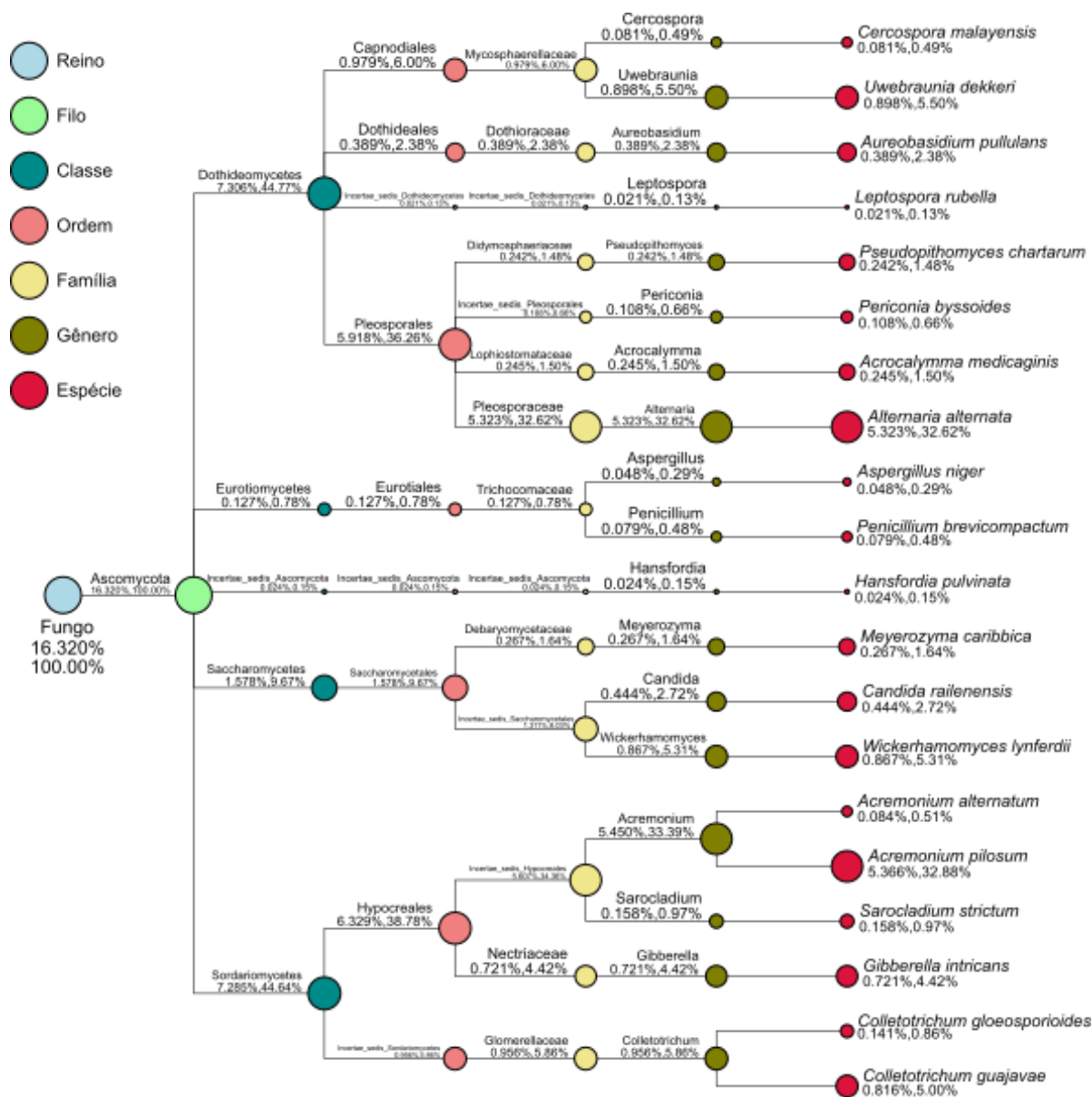


Figura 2 - Árvore filogenética das 20 principais espécies identificadas na uva 2.

