

Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos

Jesús Manuel Cantoral, María Carbú, Carlos Garrido, Gustavo Cordero-Bueso, Victoria E. González-Rodríguez, Javier Moraga, Inmaculada Izquierdo-Bueno, Ana Fernández-Morales, Marina Ruiz-Muñoz y Alejandro Bódalo



Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Facultades de Ciencias y de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. Puerto Real (Cádiz).



De izquierda a derecha:
Inmaculada, Ana, María, Gustavo, Javier, Victoria,
Carlos, Marina, Jesús y Alejandro

Nuestro grupo de **“Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos”** se crea en la Universidad de Cádiz en el año 1992, siendo desde el inicio un equipo multidisciplinar. El grupo ha abarcado diferentes aspectos tanto teóricos como aplicados al sector de la Vitivinicultura y la Agroalimentación. Pertenece al Grupo BIO 219 (Biología y Biotecnología) del Plan Andaluz de Investigación y Desarrollo, y se enmarca dentro del Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3 “International Campus of excellence in Agrifood”). Una de las líneas de investigación, ha centrado sus estudios en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, causante de numerosas enfermedades en cultivos de

gran interés en el sector agrolimentario, convirtiéndolo en un gran problema para dicho sector. La otra línea de investigación se ha centrado en las levaduras enológicas responsables de la elaboración de vinos sometidos a crianza biológica (finos y manzanillas), vinos blancos de la provincia de Cádiz y vinos de crianza en barrica de la DO Ribera del Duero. Desde su creación el grupo ha colaborado estrechamente con diferentes Bodegas (Sandeman, Domecq [Fig. 1 y 2], Barbadillo, Dominio de Pingus, Lustau, Caballero, etc.) solucionando problemas microbiológicos, caracterizando las levaduras en distintos sistemas enológicos o dirigiendo y controlando la fermentación con levaduras seleccionadas autóctonas.

Dentro de la línea de investigación de *B. cinerea*, los trabajos se llevan a cabo en colaboración con el Dr. Isidro G. Collado del Dpto. de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz. Se centran en el estudio tanto de *B. cinerea* (Fig. 3) como de otros hongos, como *Colletotrichum acutatum*. Ambos fitopatógenos son capaces de afectar a frutos de gran importancia comercial, especialmente en Andalucía, como son la fresa y la vid, generando elevadas pérdidas tanto de la cantidad como calidad del fruto producido. Además, en el caso de la vid, la enfermedad producida por *B. cinerea*, denominada “Podredumbre Gris”, no solo afecta a la cantidad de la uva, sino a la calidad del vino resultante. Con el desarrollo de varios proyectos (Ministerio y Junta



Fig. 1. Bodega típica del marco jerezano para la crianza biológica del vino fino: Bodega la Mezquita (Domecq, Jerez de la Frontera)



Fig. 2. Detalle de las levaduras de "velo de flor" creciendo en la superficie del vino (izquierda). Bota firmada por A. Fleming en Bodegas Domecq, Jerez (derecha)



Fig. 3. Placas Petri del fitopatógeno *Botrytis cinerea*: esporulación en presencia de luz a la izquierda y en ausencia de luz (formación de esclerocios) a la derecha

de Andalucía) hemos realizado grandes avances en la profundización del conocimiento del hongo fitopatógeno *B. cinerea*, desde el estudio de la bioquímica y biología molecular, el metabolismo secundario y el conocimiento de los mecanismos de patogenicidad implicados en los procesos infecciosos. La participación de ambos grupos ha sido clave para poder abordar estos aspectos multidisciplinarios, además ha sido de gran ayuda la estrecha colaboración con prestigiosos grupos tanto nacionales como internacionales. El grupo ha sido pionero en la aplicación de técnicas proteómicas al estudio de este patógeno. Así, se ha estudiado el complejo conjunto de proteínas expresadas por el hongo, responsables de su fenotipo y de sus características patológicas, desde la publicación del primer mapa proteómico de *B. cinerea*, hasta la caracterización de sus distintos subproteomas (secretoma, membranoma, fosfoproteoma, etc.). Por otro lado, la secuenciación del genoma de *B. cinerea* ha supuesto un importante avance. Se sabe que al menos 43 enzimas son clave en el metabolismo secundario de este hongo y que tienen relación con la patogenicidad. Igualmente, hemos realizado estudios

de expresión y caracterización funcional de cada una de estas enzimas. Estudios recientes ponen de manifiesto que *B. cinerea* posee un mecanismo de adaptabilidad al huésped, por el que podrían disponer de diferentes armas químicas dependiendo de la situación y peculiaridades ambientales en el que se encuentre.

En los últimos años nuestro grupo, ha llevado a cabo el estudio, mediante el uso de técnicas "ómicas" (metabolómicas, genómicas, transcriptómicas y proteómicas), de los genes implicados en el metabolismo secundario de este fitopatógeno, teniendo especial interés en las enzimas o complejos enzimáticos implicados en las rutas biosintéticas que conducen a nuevos metabolitos crípticos. Así pues, se han utilizado distintos modificadores epigenéticos adicionados a los medios de fermentación, para activar la producción de los metabolitos secundarios crípticos durante el crecimiento del hongo. Estos estudios han permitido demostrar la expresión diferencial de algunos genes implicados en el metabolismo secundario gracias a la presencia de modificadores tales como, el 1,3-diaminopro-

pano, la espermina, espermidina y el ácido hidroxámico suberoilánilida. Actualmente, el grupo está realizando la caracterización química y funcional de los genes que codifican para las enzimas: péptido sintasa no ribosomales (NRPS) y policétido sintasas (PKS). Todos estos estudios se dirigen a la determinación de nuevas dianas moleculares que proporcionen un control eficiente del patógeno, el descubrimiento de nuevos factores de virulencia y la profundización en el conocimiento del potencial mecanismo de adaptabilidad al huésped. Todo ello nos permitirán abordar nuevas estrategias de control del patógeno y diseñar fungicidas selectivos y eficientes compatibles y respetuosos con el Medio Ambiente.

La otra línea de investigación, se centra en diferentes aspectos de levaduras enológicas. Así, hemos aislado y caracterizado un elevado número de levaduras de velo de flor, utilizando diferentes técnicas microbiológicas y moleculares, (campo pulsante, RFPLs del ADN mitocondrial, etc.). El desarrollo de estas técnicas nos ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras; concluyendo que estos grupos



Fig. 4. Vides y uvas silvestres (verdes: Garganta del Capitán y maduras: Río Majaceite, Parque Natural de los Alcornocales, Cádiz)

son muy heterogéneos, apareciendo una gran variabilidad genética entre ellas que podrían reflejar la selección artificial debido al sometimiento de estas levaduras a condiciones industriales tan específicas. Hemos sido pioneros en la aplicación de modernas técnicas como la hibridación competitiva mediante el uso de “microarrays”. Este estudio comparativo a nivel del genoma explicaría que la gran variabilidad encontrada respondería a un mecanismo de adaptación evolutiva de estas

levaduras, que se encuentran sometidas a unas condiciones tan adversas (alto contenido en etanol y acetaldehído). Los estudios llevados a cabo han permitido en algunos casos la correlación entre la composición particular de un determinado grupo de levaduras y el estado de envejecimiento del vino o las peculiaridades organolépticas del vino fino.

Vitis vinifera L. subespecie *sylvestris* Gmelin (Hegi) es la única especie ancestral

de vid en Europa. Son parentales dioicos de las variedades de cultivo actuales y en la actualidad figuran como especie amenazada. Esta especie constituye hoy en día un importante recurso fitogenético que alberga una importante diversidad genética, con la que hay que contar para futuros programas de mejora de viníferas y portainjertos, así como para la reforestación de ecosistemas naturales. Sin embargo, hasta ahora, no existían estudios que determinasen la ecología de microorganismos asociados a la uva de la vid silvestre, siendo de especial relevancia aquéllos implicados en la fermentación vínica como las levaduras. Hemos obtenido una importante colección de levaduras aisladas de vides silvestres en Azerbaián, Georgia, Rumanía, Italia y España (Fig. 4). Este estudio pionero, nos permitirá conocer nuevas especies de levaduras con propiedades de interés enológico y capaces de hacer frente a ataques de hongos fitopatógenos. A su vez estimula la economía de forma sostenible y nos permitirá proveer a las Bodegas de nuevas cepas de levaduras con la finalidad de crear nuevos estilos de vinos. Colaboramos en el proyecto europeo YeSVitE 7FP (IRSES) en el que están implicados 9 Universidades de 8 países de 4 continentes, coordinado por la Universidad de Milán. El trabajo desarrollado en esta línea de investigación está cada vez más orientado a generar un conocimiento tecnológico que surja como respuesta a un problema o necesidad tanto a nivel regional, nacional o internacional.

Nuestro grupo ha contado con financiación ininterrumpida durante estos años con varios Proyectos del Ministerio, Proyectos de Infraestructura, FEDER, Junta de Andalucía, INNPACTO, Andalucía Talent Hub, CDTI y OTRI con distintas Bodegas. Esta financiación ha permitido la creación y desarrollo del grupo, en el que se han formado 16 Doctores de los cuales varios han seguido su carrera en la Universidad y el resto ocupan puestos relevantes en Empresas Biotecnológicas y Bodegas. La actividad científica desarrollada ha quedado plasmada en un alto rendimiento de publicaciones de las que se destacan algunas en la Bibliografía, así como la participación en Congresos de ámbito Internacional y Nacional. Además de la actividad investigadora el grupo es el responsable de la docencia de varias asignaturas

de Microbiología en distintos Grados de CC del Mar, Ambientales, Enología, Ingeniería Química y Biotecnología, así como en varios Master (Agroalimentación, Biotecnología, Ingeniería Química y Gestión integral del agua). Por otra parte, dentro de las actividades de difusión de la SEM ha organizado el "X y XVI Curso de Iniciación a la Investigación en Microbiología" (2006 y 2012). Igualmente ha organizado los siguientes Congresos: "SEM: Microbiología Molecular" (2008), "XVth International *Botrytis* Symposium" (2010), "XI Congreso Nacional de Micología" (2012), "XVII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana" (2018). Ver: <http://cadiz.congresoseci.com/mibm/> y <https://youtu.be/6TmGKaDJS0>

Desde este pequeño resumen, nuestro más sincero agradecimiento a todos los compañeros que con su trabajo e ilusión han forjado la historia del grupo de Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos de la Universidad de Cádiz.

BIBLIOGRAFÍA

- Cordero-Bueso G, N. Mangieri, Foschino R, D. Maghradze, R. Foschino, F. Valdetara, JM. Cantoral, I. Vigentini I.** (2017). Wild grape-associated yeasts as promising biocontrol agents against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*. Article 2025. 3 nov. 2017. 10.1007/s00203-016-1287-4
- Cordero-Bueso G, Rodríguez ME, C Garrido, Cantoral JM.** (2017). Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations. *Archives of Microbiology* 199: 135–143. doi: doi.org/10.3389/fmicb.2017.02025
- Fernández-Acero FJ, Colby T, Harzen A, Cantoral JM, Schmidt J.** (2009). Proteomic analysis of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* during cellulose degradation. *Proteomics* 9 (10): 2892-2902. doi: 10.1002/pmic.200800540
- Fernández-Acero FJ, Colby T, A Harzen, Carbú M, U Wieneke, Cantoral JM, Schmidt J.** (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *Proteomics* 10 (12): 2270-2280. doi: 10.1002/pmic.200900408
- Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Boonham N, Colyer A, Cantoral JM, Budge G.** (2009). Development of protocols for detection of *Colletotrichum acutatum* and monitoring of strawberry anthracnose using real-time PCR. *Plant Pathology* 58 (1): 43-51. doi: 10.1111/j.1365-3059.2008.01933.x
- Garrido C, Carbú M, Fernández-Acero FJ, Vallejo I, Cantoral JM.** (2009). Phylogenetic relationships and genome organization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose in strawberry. *European Journal of Plant Pathology*. 125 (3): 397-411. doi: 10.1007/s10658-009-9489-0
- Garrido C., Victoria E. González-Rodríguez, María Carbú, Amjad M. Husaini, Jesús M. Cantoral.** Genomics, Transgenics, Molecular Breeding and Biotechnology of Strawberry. Chapter 10: Fungal Diseases of Strawberry and their Diagnosis Publisher: Global Science Books, Editor: Amjad M. Husaini and Jose A. Mercado, ISBN: 978-4-903313-81- 2016
- González-Rodríguez VE, Liñeiro E, Colby T, Harzen A, Garrido C, JM Cantoral, Schmidt J, Fernández-Acero FJ.** (2015) Proteomic profiling of *Botrytis cinerea* conidial germination. *Archives of Microbiology* 197 (2) : 117–133
- González-Rodríguez VE, Garrido C, Cantoral JM, Schumacher J.** (2016). The F-actin capping protein is required for hyphal growth and full virulence but is dispensable for septum formation in *Botrytis cinerea*. *Fungal Biology* 120: 1225-1235 doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.007
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM, Young ET.** (2003). Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* 165: 1745-1759
- Liñeiro E, Chiva C, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ** (2016) Modifications of fungal membrane proteins profile under pathogenicity induction: A proteomic analysis of *Botrytis cinerea* membrane. *Proteomics* 16: 2363-2376. doi:10.1002/pmic.201500496
- Liñeiro E, Chiva E, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ.** (2016) Dataset of the *Botrytis cinerea* phosphoproteome induced by different plant-based elicitors. *Data Brief*. 2016 Jun; 7: 1447–1450. doi: 10.1016/j.dib.2016.04.039
- Liñeiro E, Chiva E, Cantoral JM, Sabidó E, Fernández-Acero FJ** (2016) Phosphoproteome analysis of *B. cinerea* in response to different plant-based elicitors. *Journal of Proteomics* (SSN: 1874-3919) 139: 84-94 doi:10.1016/j.jprot.2016.03.019
- Liñeiro E., Antonio J. Macias-Sánchez, M. Espinazo, Jesús M. Cantoral, Javier Moraga, Isidro G. Collado and Francisco. J. Fernández-Acero.** Phenotypic effects and inhibition of Botrydial biosynthesis induced by different plant-based elicitors in *Botrytis cinerea*. *Current Microbiology*. Nov. 2017. doi: 10.1007/s00284-017-1399-3
- Muñoz-Bernal E, Deery J, Rodríguez ME, Cantoral JM, Howard J, Feret R, Natera R, Doder MC, Lilley KS, Fernández-Acero FJ.** (2016). Analysis of temperatura-mediated changes in the wine yeast *Saccharomyces bayanus var uvarum*. An oenological study of how the protein content influences wine quality. *Proteomic* 16: 576–592. doi: 10.1002/pmic.201500137
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Domínguez M, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2010). Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. *J. Appl. Microbiol.* 108: 1292-1302
- Rodríguez ME, Infante JJ, Molina M, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2011). Using RFLP-mtDNA for the rapid monitoring of the dominant inoculated yeast strain in industrial wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 145: 331-335
- Rodríguez ME, Infante JJ, Mesa JJ, Rebordinos L, Cantoral JM.** (2013). Enological behaviour of biofilms formed by genetically-characterized strains of sherry flor yeast. *The Open Biotechnology Journal* 7: 23-29. doi: 10.2174/1874070701307010023.



ISME
LATIN AMERICA

September 11 - 13, 2019
Valparaíso, Chile