

## Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos

Jesús Manuel Cantoral, Francisco Javier Fernández-Acero, María Carbú, Carlos Garrido, Victoria E. González-Rodríguez, Gustavo A. Cordero y Ana Fernández



Laboratorio de Microbiología. Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública. Facultades de Ciencias. Instituto Universitario de Investigaciones Vitivinícolas y Agroalimentarias (IVAGRO). Universidad de Cádiz. Puerto Real (Cádiz)



Foto de grupo. De izquierda a derecha: María Carbú, Ana Fernández-Morales, Victoria E. González-Rodríguez, Jesús M. Cantoral, Gustavo Cordero y Carlos Garrido

El grupo de investigación «**Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos**» se crea en la Universidad de Cádiz hace más de dos décadas, siendo desde su inicio un equipo multidisciplinar. Desde su origen el grupo ha abarcado diferentes aspectos tanto teóricos como aplicados al sector de la Viticultura 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 de la vid *Botrytis cinerea*. 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, Barbadillo, Dominio de Pingus, Lustau, etc.) solucionando problemas microbiológicos, caracterizando las levaduras en distintos sistemas enológicos o dirigiendo y controlando la fermentación con levaduras seleccionadas de la propia Bodega.

La primera línea de investigación se lleva a cabo en colaboración con el Dr. Isidro G. Collado de Química Orgánica de la Universidad de Cádiz. Se centra en el estudio de distintos hongos fitopatógenos como *Colletotrichum acutatum*, que afecta a frutos de gran importancia comercial como la fresa y *Botrytis cinerea* responsable de la “podredumbre gris” (Botrytis) que afecta no solo a la cantidad de la uva, sino a la calidad del vino resultante.

Con el desarrollo de varios proyectos 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 patogenidad implicados en los procesos infecciosos. La coordinación 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, mem-

branoma, fosfoproteoma, etc.). Por otro lado, la secuenciación del genoma de *B. cinerea* ha supuesto un importante avance. Se sabe que al menos 43 enzimas específicas 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. Sin embargo, salvo 4 genes que están bien caracterizados, los demás son desconocidos o se encuentran en estudios muy preliminares. 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.

El objetivo final de esta línea de investigación es la profundización en el estudio funcional de los genes del metabolismo secundario del hongo *B. cinerea* y en la caracterización de las enzimas o complejos enzimáticos implicados en sus rutas biosintéticas, utilizando distintas técnicas "ómicas" (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica). Todos estos estudios nos permitirán la determinación de nuevas dianas moleculares que proporcionen un control eficiente del patógeno, el descubrimiento de nuevos factores de virulencia y/o toxinas implicadas en el metabolismo secundario y la profundización en el conocimiento del potencial mecanismo de adaptabilidad al huésped. Todo ello nos permitirá abordar nuevas estrategias de control del patógeno y diseñar fungicidas selec-



**Figura 1.**

Ordenación de las barricas sobre el albero en una Bodega típica del marco jerezano para la crianza biológica y detalle de las levaduras de «velo de flor» creciendo en la superficie.

tivos y eficientes compatibles con el Medio Ambiente.

La otra línea de investigación se centra en diferentes aspectos de levaduras enológicas. Hemos aislado y caracterizado un elevado número de levaduras de velo de flor (figura 1), utilizando diferentes técnicas microbiológicas y moleculares, (campo pulsante, RFLPs del ADN mitocondrial, etc.). El desarrollo de estas técnicas nos ha permitido caracterizar genéticamente estas levaduras; concluyendo que estos grupos 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 compa-

rativo 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 en Europa. Son parentales dioicos de las variedades de cultivo actuales y en la actualidad figuran como especie amenazada (figura 2). Esta especie constituye hoy en día un importante recurso fitogenético que alberga una importante diversidad genética, con la que



**Figura 2.**

Vides y uvas silvestres (Garganta del Capitán y Río Majaceite, Parque Natural de los Alcornocales, Cádiz).

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. En este sentido se ha obtenido una importante colección de levaduras aisladas de vides silvestres en Azerbayán, Georgia, Rumanía, Italia y España. Este estudio pionero, nos permitirá conocer nuevas especies de levaduras o ya conocidas 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. Participamos 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.

Para su financiación el grupo ha contado ininterrumpidamente durante estos años con varios Proyectos del Ministerio, Proyectos de Infraestructura, FEDER, INNFACTO, Talent Hub, CDTI y OTRI con distintas Bodegas, así como diferentes ayudas de la Junta de Andalucía. Esta financiación ha permitido la creación y desarrollo del grupo, en el que se han formado 14 Doctores de los cuales varios han seguido su carrera en la Universidad y el resto ocupan puestos relevantes en Empresas Biotecnológicas. 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, como el de Biotecnología que se pondrá en marcha el próximo curso. 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), "XV<sup>th</sup> International Botrytis Symposium" (2010), «XI Congreso Nacional de Micología» (2012) y tiene previsto el «VII Congreso Nacional de Microbiología Industrial y Biotecnología Microbiana» (previsto para 6-10 de Junio de 2018).

Desde estas líneas, nuestro más sincero agradecimiento a todos los compañeros que con su trabajo han forjado la breve, pero intensa, historia del grupo de **Microbiología Aplicada y Biotecnología de Hongos**.

## BIBLIOGRAFÍA

- 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: 10.1007/s00203-016-1287-4.
- Cordero-Bueso G, Foschino R, Maghradze D, Mangieri N, Cantoral JM, Vigentini I.** (2017) Wild grape-associated yeasts as a promising strategy of biocontrol against *Vitis vinifera* fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology* (under review).
- Fernández-Acero FJ, Jorge I, Calvo E, Vallejo I, Carbú M, Camafeita E, Lopez JA, Cantoral JM, Jorrín J.** (2006). Two-dimensional electrophoresis protein profile of the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Proteomics* 6: S88-96. doi: 10.1002/pmic.200500436.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA, Cantoral JM.** (2000). Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of Sherry wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 5: 15-21.
- Muñoz-Bernal E, Deery J, Rodríguez ME, Cantoral JM, Howard J, Feret R, Natera R, Dodero MC, Lilley KS, Fernández-Acero FJ.** (2016). Analysis of temperature-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.