



Hongos aislados asociados a las enfermedades de la madera con los que trabaja el ICVV. Rafael Lafuente

La importancia de lo que no se ve

El ICVV reúne en un banco único las colecciones fragmentadas de microorganismos y mesofauna imprescindibles para preservar la biodiversidad e identidad del Rioja

Agrupar más de 200 géneros biológicos diferentes de levaduras, bacterias, hongos y nematodos

➤ **TEXTO Y FOTOGRAFÍAS:** Raquel Peña, Raquel Campos-Herrera, David Gramaje, Pilar Santamaría, Pilar Morales, Fernanda Ruiz-Larrea, Elisabet Vaquero-Jiménez, Rebeca Bujanda, Ana Rosa Gutiérrez, Cristina Juez, Rocío Fernández-Pérez, Javier Manzanares, Lucía González-Arenzana, Laura López-Berges, Carmen Tenorio, Beatriz Larreina, Ramón González. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja)



Los microorganismos –como bacterias, levaduras y hongos– y la mesofauna del suelo –incluidos nematodos y microartrópodos– desempeñan funciones clave en la agricultura y la alimentación, ya que ayudan a que las plantas absorban mejor los nutrientes, las protegen frente a enfermedades y favorecen la calidad y sostenibilidad de los suelos.

En el mundo del vino, su papel resulta aún más especial: son indispensables en la transformación del mosto de uva en vino, influyendo directamente en el sabor, el aroma, el carácter y, en definitiva, en la calidad del producto final. Por ello, en el sector vitivinícola, conservar colecciones de microorganismos y mesoorganismos locales constituye una estrategia de gran valor. Estas colecciones permiten preservar la biodiversidad propia de cada región, un recurso fundamental para afrontar desafíos como el cambio climático, la transición hacia una viticultura más sostenible o la creciente demanda de vinos con menor graduación alcohólica y mayor diferenciación del *terroir*.

El acceso a estos organismos abre la puerta a nuevas formas de producción,

más respetuosas con el entorno y mejor adaptadas a las preferencias de los consumidores. Su obtención se realiza principalmente de viñedos, bodegas y suelos, mediante técnicas de aislamiento y cultivo *in vivo* que permiten disponer de cepas o poblaciones puras para su conservación y aprovechamiento. Una vez identificados, se conservan en condiciones controladas –como congelación o liofilización– para garantizar su viabilidad a largo plazo.

Colección centralizada

Varios de los grupos de investigación que integran el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) han generado, a lo largo de los años –en muchos casos incluso antes de la creación del Instituto–, colecciones de organismos de distinta naturaleza (bacterias, hongos, levaduras y nematodos), todos ellos de gran interés para sus líneas de investigación.

Este esfuerzo ha dado lugar a una colección muy interesante, pero hasta ahora fragmentada. Gracias a los fondos del programa Agroalnext (European Union NextGenerationEU, PRTR-C17.11), ha sido posible consolidar estas colecciones en

una colección centralizada del ICVV, que integra diferentes tipos de organismos.

La puesta en marcha de esta colección responde a varios objetivos. El más inmediato es facilitar el acceso a la información y al material biológico para todos los grupos del Instituto, tanto aquellos que trabajan habitualmente con estos organismos como los que se dedican a otras especialidades y puedan aprovechar estos recursos de manera complementaria. Otro objetivo fundamental es garantizar su conservación a largo plazo. La estructura de los grupos de investigación es dinámica y, en ocasiones, esta circunstancia puede suponer un riesgo para la continuidad en el mantenimiento de determinadas colecciones.

La unificación de esta colección, que además contará con varias copias de respaldo, contribuirá a resolver los problemas asociados con la fragmentación y la falta de continuidad en su mantenimiento. Por otro lado, muchos de los estudios que actualmente se llevan a cabo en el ICVV se centran en las interacciones entre especies de distinta naturaleza: planta-nematodo, nematodo-bacteria, nematodo-bacteria-insecto, bacteria-insecto, levadura-insecto, levadura-bacteria, levadura-hongo filamentoso, levadura-levadura, planta-levadura, entre otras. Para abordar este tipo de investigaciones resulta esencial contar con una colección amplia y diversa de organismos, que permita disponer de los modelos biológicos adecuados en su caso. Además, esta diversidad abre la puerta a la construcción de comunidades “quiméricas” en el laboratorio; es decir, construcciones de comunidades que integren múltiples cepas y especies para fines concretos de investigación. Estas comunidades son herramientas muy valiosas para obtener resultados más realistas, pero en condiciones controladas y reproducibles, lo que favorece tanto la investigación básica como el desarrollo de aplicaciones prácticas.

Colecciones del ICVV

La colección de organismos del ICVV se nutre de las colecciones desarrolladas a lo largo de los años por varios grupos de investigación. La mayor parte de los organismos que se conservan son microorganismos –bacterias, hongos y levaduras– aislados dentro de los proyectos de investigación de estos grupos del Instituto. Sin embargo, también se mantienen organismos cedidos por otras instituciones para fines de investigación, cuyo uso está res-

Figura 1. Géneros representados en la colección del ICVV por al menos 100 cepas diferentes. Para los dos más abundantes se indica el número concreto de cepas. El código de color indica si son levaduras o bacterias (ninguno de los géneros de nematodos u hongos filamentosos está representado por más de 100 cepas). En el caso de *Lactobacillus* se ha conservado la nomenclatura original del aislamiento, aunque actualmente muchas de esas cepas pertenecen al género *Lactiplantibacillus*.

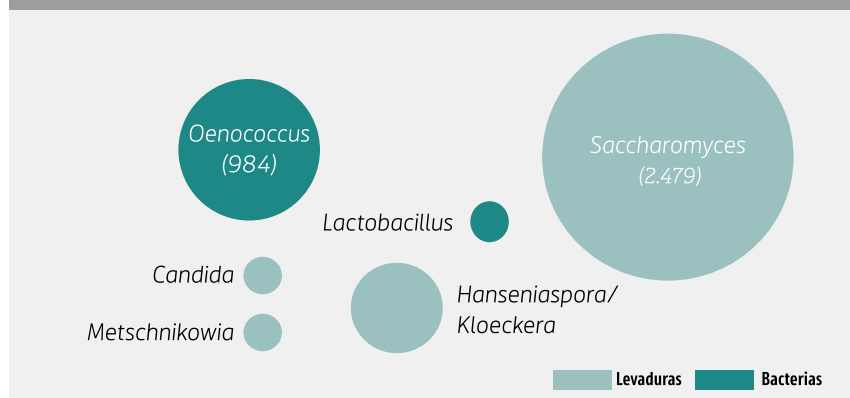


Figura 2. Vista en detalle de colonias de levaduras *Metschnikowia pulcherrima* (puntos rojos) y *Saccharomyces cerevisiae* (punto negro) cultivadas en una placa de medio YPD. Se pueden apreciar las diferencias de tamaño, relieve, color y contorno de la colonia entre las dos especies.



tringido por los acuerdos de cesión correspondientes. Además, la colección cuenta con numerosas cepas que son fruto de la modificación y mejora en el laboratorio, tanto por técnicas de ingeniería genética (que se usan en condiciones confinadas, de acuerdo con la legislación, y para experimentos muy concretos), como por otras técnicas como la evolución experimental o la mutagénesis al azar. Para el desarrollo de técnicas de ingeniería genética se cuenta con vectores recombinantes propagados en cepas bacterianas. En conjunto, la colección alberga más de 11.000 cepas, que representan cerca de 200 géneros biológicos diferentes. Los géneros con mayor representación en la colección se muestran en la figura 1.

Cinco grupos del ICVV han contribuido al establecimiento de la colección y participarán en su crecimiento, mantenimiento y explotación: MicroWine, Gesvin, Biovitis, IN-vid, y UR-Biotec. A continuación, se describe la naturaleza de la colección que aporta cada grupo, los proyectos de investigación en los que se usan dichos recursos biológicos, qué repercusión han tenido o pueden tener en el sector vitivinícola y con qué horizonte futuro se está trabajando.

Grupo MicroWine

El grupo de investigación MicroWine trabaja con **levaduras de interés enológico** y ha desarrollado a lo largo de los años una colección diversa de cepas que incluye tanto aislados propios como cepas cedidas por otros grupos, entre ellas algunas desde los años 50 provenientes del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI-CSIC). Esta colección se ha enriquecido mediante aislamientos realizados en uvas, mostos y fermentaciones tempranas, principalmente en viñedos y bodegas de La Rioja. La estrategia del grupo se centra en explorar la biodiversidad microbiana en contextos enológicos, con especial interés en fermentaciones mixtas que involucren múltiples especies de levadura. Cada vendimia representa una oportunidad para incorporar nuevos aislados, ya sea como parte de proyectos colaborativos con empresas o como iniciativa propia para cubrir vacíos taxonómicos en la colección. Además, se generan nuevas cepas mediante técnicas de mejora genética, como mutagénesis, evolución dirigida, hibridación e ingeniería genética, adaptadas a los objetivos de cada proyecto.

Actualmente, más de 300 aislados han sido identificados molecularmente a nivel de especie mediante secuenciación

Figura 3. Bacterias y levaduras aisladas por el grupo Gesvin. A. Cultivo de diferentes especies de levadura aisladas en los trabajos del grupo Gesvin. B. Formato comercial de la bacteria láctica de la especie *Oenococcus oeni* comercializada por la empresa Lallemand como Lalvin SILKA. C. Formato comercial de la levadura de la especie *Saccharomyces cerevisiae* comercializada por la empresa Lallemand como Uvaferm VRB.



parcial del rDNA 26S. Para diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, se emplean técnicas como PCR de elementos inter-delta y análisis de restricción de ADN mitocondrial. Aunque existen múltiples cepas de una misma especie, se procura evitar redundancias, seleccionando cepas únicas por origen y características.

En cuanto a la transferencia al sector productivo, el grupo ha logrado comercializar cepas obtenidas por mutagénesis en colaboración con una empresa del sector. Estas cepas se utilizan para enriquecer el contenido en manoproteínas de los vinos. También se ha mejorado para otra empresa la resistencia al etanol de cepas que mostraban características interesantes, pero tenían problemas en algunos finales de fermentación. Asimismo, se han desarrollado y protegido por patentes sistemas de fermentación con menor rendimiento alcohólico y cepas de las levaduras *S. cerevisiae* y *Metschnikowia pulcherrima* adecuadas para ese propósito (figura 2). Por último, a pesar del auge de las técnicas genómicas como la metagenómica o la metatranscriptómica, el grupo defiende la vigencia y relevancia de las colecciones vivas de microorganismos. Estas colecciones son esenciales para estudiar la fisiología microbiana, validar resultados -ómicos y desarrollar aplicaciones biotecnológicas, ya que permiten cultivar y experimentar directamente con los microorganismos.

Grupo Gesvin

Desde hace más de tres décadas, el grupo Gesvin ha reunido una valiosa colección de

microorganismos –**levaduras y bacterias**– procedentes de la Denominación de Origen Calificada Rioja, asociados a todos los procesos implicados en la elaboración del vino. Esta colección comenzó con el aislamiento de levaduras autóctonas para mejorar la fermentación de los vinos blancos, y con el tiempo se ha ampliado a tintos, levaduras no convencionales y bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica (figura 3A). Así, el banco del grupo consta de 1.143 bacterias y 2.846 levaduras, identificadas más del 90% por una o varias técnicas moleculares. La colección continúa aumentando cada año gracias a los trabajos que se desarrollan mediante proyectos de investigación y también en colaboración con bodegas. Estas cepas se obtienen directamente de uvas, fermentaciones y vinos, y se conservan mediante técnicas específicas que permiten mantener su viabilidad a largo plazo. Cada año, solo especies o cepas concretas pasan a incrementar la colección, ya que en los trabajos que se llevan a cabo se evalúan más de 1.000 colonias por campaña.

El grupo ha transferido tres cepas a la industria: dos levaduras de la especie *S. cerevisiae* y una bacteria de la especie *O. oeni* (figura 3B y 3C). Una de las levaduras (Uvaferm VRB) lleva en explotación desde 1997 y ha generado importantes ingresos en forma de *royalties* a la Comunidad Autónoma de La Rioja y al grupo de investigación. La bacteria (Lalvin SILKA) lleva siendo explotada industrialmente desde 2018 y sus ventas a nivel internacional se incrementan cada año. Además, hemos

seleccionado un inóculo mixto de levaduras no-*Saccharomyces*, que está en disposición para ser transferido y comercializado. Todas ellas han sido aisladas de la naturaleza y se han diferenciado genéticamente de aislados comerciales.

Además, se trabaja en nuevos proyectos con empresas interesadas en seleccionar cepas propias que les ayuden a adaptarse a los efectos del cambio climático y a las nuevas demandas del mercado, como vinos con menor graduación alcohólica.

Mantener esta colección no solo permite conservar la biodiversidad microbiana de la región, sino que también abre la puerta a futuras aplicaciones, incluso con tecnologías que aún están por desarrollarse. En un contexto de transformación del sector, estas cepas representan una herramienta estratégica para avanzar hacia una viticultura más sostenible, innovadora y conectada con el territorio.

Grupo Biovitis

Desde 2016, el grupo Biovitis ha creado una colección de **hongos asociados a las enfermedades de la madera de la vid**, uno de los problemas más complejos y persistentes en viticultura. Esta colección, que ya cuenta con unos 2.700 aislados identificados molecularmente, se ha convertido en una herramienta clave para estudiar la diversidad de especies fúngicas presentes en viñedos afectados, principalmente en La Rioja y otras zonas vitivinícolas de España. Los hongos se aíslan en medios de cultivo a partir de plantas con síntomas, y se incorporan regularmente a la colección

entre 10 y 20 nuevos aislados al mes—según la época del año y los proyectos en curso.

Aunque muchas especies se repiten, disponer de una colección amplia y bien caracterizada permite, por un lado, realizar estudios de patogenicidad, necesarios para determinar el grado de virulencia de cada hongo y su impacto en la vid; por otro, llevar a cabo análisis de genética de poblaciones, que ayudan a entender cómo se dispersan y evolucionan estos patógenos en diferentes viñedos y regiones; y, además, avanzar en la clasificación taxonómica, lo que facilita la identificación precisa de especies emergentes o poco conocidas. Todo ello es fundamental para comprender mejor la epidemiología de las enfermedades de la madera y sentar las bases para su manejo.

Aunque aún no se ha transferido ningún aislado a la industria, esta colección representa un paso importante

hacia posibles soluciones prácticas, ya que proporciona el material biológico necesario para evaluar estrategias de control biológico, ensayar productos fitosanitarios, seleccionar cepas con potencial de uso en biotecnología o desarrollar métodos de diagnóstico más precisos. De este modo, la colección constituye una base sólida para generar aplicaciones transferibles al sector vitivinícola en el futuro. Conocer mejor los hongos implicados es esencial para desarrollar estrategias de manejo más eficaces y sostenibles.

Además, mantener microorganismos vivos sigue siendo imprescindible, incluso en tiempos de técnicas genómicas avanzadas. Solo con cepas vivas se pueden hacer ensayos funcionales y estudios morfológicos que complementan la información genética. En el futuro, el grupo Biovitis espera enriquecer la colección con especies poco estudiadas como *Cytospora*, y seguir aportando co-

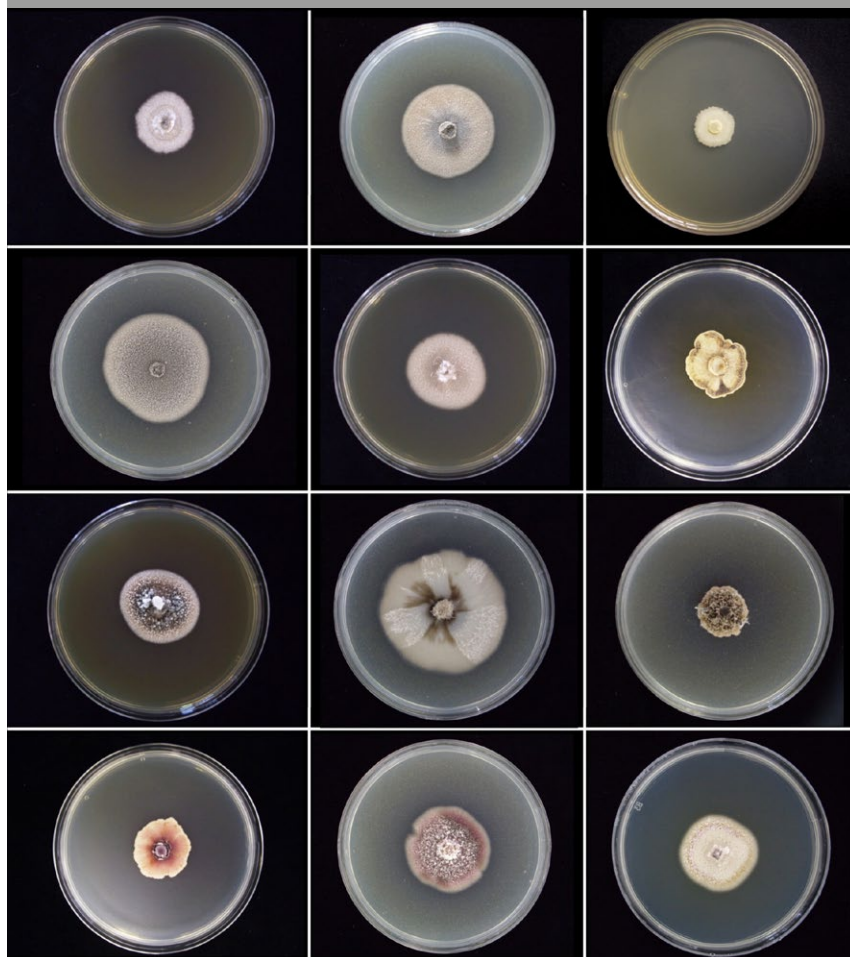
nocimiento que acerque al sector vitivinícola a una gestión más precisa y eficaz de las enfermedades de la madera.

Grupo IN-vid

El grupo IN-vid cuenta con una colección de **nematodos entomopatógenos** que se inició en 2009, a partir de estudios de campo realizados durante estancias internacionales. Estos nematodos son organismos microscópicos que viven en el suelo y parasitan insectos, provocando su muerte mediante la liberación de bacterias simbióticas. Su importancia en la agricultura radica en que actúan como agentes de control biológico, reduciendo poblaciones de plagas de manera natural y sostenible, lo que disminuye la dependencia de pesticidas químicos y contribuye a la salud del ecosistema y la productividad agrícola. Actualmente, incluye unas 30 poblaciones identificadas molecularmente a nivel de especie mediante la secuenciación de la región ITS y con secuencias depositadas en GenBank. Además, se han caracterizado las bacterias simbiotas de unas 10 poblaciones mediante la región 16S rDNA. La colección se enriquece con nuevos aislados, especialmente cuando hay proyectos activos que implican trabajo de campo. La estrategia de exploración se basa en preguntas ecológicas específicas que permiten aislar poblaciones nativas con características propias derivadas del ambiente. Esto incluye tanto el nematodo como su bacteria simbiote (figura 5), cuya actividad puede variar según el entorno, el hospedador y las condiciones de reproducción. Aunque existen múltiples aislados de especies como *Steinernema feltiae* y *Heterorhabditis bacteriophora*, no se considera redundancia, sino una valiosa diversidad intraespecífica. Entre las especies más difíciles de conservar a largo plazo se encuentran *Steinernema affine* y los heterorhabditidos distintos de la especie *H. bacteriophora*.

La colección ha servido como base para proyectos de investigación aplicada, incluyendo estudios de interacciones multitróficas y desarrollo de agentes de biocontrol. Se ha registrado una patente con la bacteria simbiote asociada al nematodo *H. bacteriophora* 102, aislado en un viñedo de La Rioja. Esta patente explora el uso de los derivados volátiles de su bacteria simbiote, *Photorhabdus laumondii* subsp. *laumondii*, para el manejo de plagas y enfermedades de la vid, tales como *Lobesia botrana* y *Botrytis cinerea*.

Figura 4. Colonias de diferentes especies de *Phaeoacremonium* aisladas de plantas de vid con síntomas de enfermedades de la madera, pertenecientes a la colección de hongos del grupo Biovitis.



Aunque aún no se ha transferido al sector productivo, representa un avance significativo en la valorización de los recursos microbianos locales. Actualmente no hay proyectos activos de transferencia inmediata, pero se están evaluando posibles aplicaciones de estos volátiles con acción repelente e inhibitoria del crecimiento, en sistemas abiertos, lo que podría abrir nuevas oportunidades de colaboración con el sector en el futuro cercano.

El grupo aspira a enriquecer la colección con especies de otras localizaciones, especialmente del grupo “bicornotum” y del grupo “africano”, para aumentar la diversidad genética y funcional. Además, se destaca la importancia de mantener colecciones vivas en la era de las técnicas genómicas. La conservación de organismos vivos permite estudiar su comportamiento frente a retos ambientales o bióticos, reproducir estudios previos y explorar nuevas preguntas científicas que aún no se han formulado.

Grupo UR-Biotec

Desde los años noventa, el grupo UR-Biotec ha desarrollado una extensa colección de **cepas microbianas** procedentes del ecosistema enológico de la DOC Rioja. Esta colección, iniciada con bacterias lácticas aisladas de mostos y vinos, ha crecido hasta incluir bacterias acéticas y levaduras alterantes como *Brettanomyces*/*Dekkera*, así como otras especies menos conocidas de géneros como *Oenococcus*, *Pichia*, *Trigonopsis* o *Arthroascus* (figura 6). El aislado más antiguo data de 1994, y desde entonces se ha mantenido una estrategia de aislamiento cultivo-dependiente que permite conservar células vivas para su caracterización funcional.

La mayoría de las cepas provienen de uvas, mostos, vinos y vinagres obtenidas gracias a la colaboración con viticultores, bodegas y empresas del sector, así como a través de proyectos de I+D+i financiados en convocatorias públicas. Aunque el ritmo de incorporación de nuevos aislados varía según los proyectos, se estima que solo una pequeña fracción de las colonias estudiadas se incorpora finalmente a la colección permanente, tras una rigurosa selección. Actualmente, el grupo trabaja en la diversificación del origen de los aislados, incluyendo estudios sobre microbiota intestinal tras la ingesta de extractos polifenólicos de uva tinta. A nivel técnico, se han identificado centenares de cepas mediante técnicas moleculares como PCR espe-

Figura 5. Colección de nematodos entomopatógenos y sus bacterias simbiotes del grupo IN-vid. A. Larva de la polilla de la vid, *Lobesia botrana*, muerta por nematodos entomopatógenos, que están emergiendo (en la parte posterior de la larva, en forma de hilos blancuecinos). B. Bacterias simbiotes de los nematodos entomopatógenos.

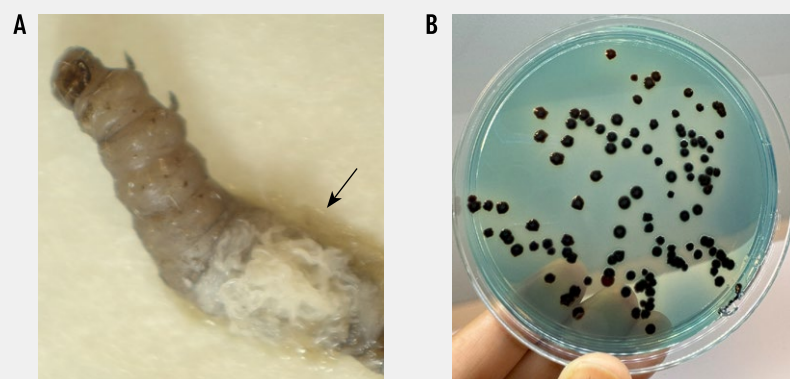
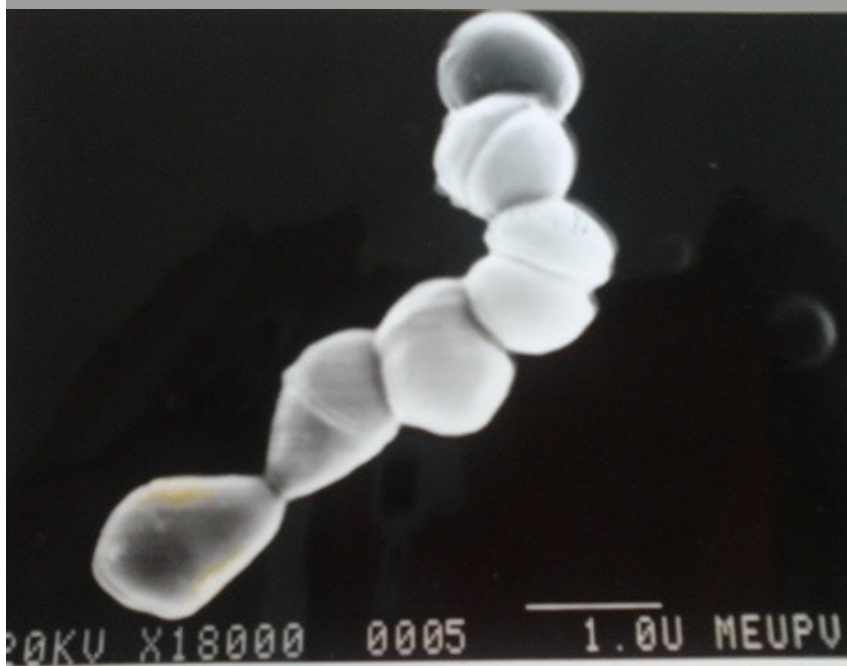


Figura 6. Imagen de microscopía electrónica de una cadena de bacterias enológicas *Oenococcus oeni*.



cífica, secuenciación de genes ribosomales, RAPD, PFGE, RT-PCR, análisis de regiones ITS y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Aunque no se han transferido cepas directamente al sector productivo, muchas de las levaduras alterantes conservadas han sido cedidas como patrones de identificación a laboratorios enológicos, contribuyendo así al control de calidad microbiológico en bodegas.

De cara al futuro, el grupo defiende firmemente la importancia de mantener colecciones vivas de microorganismos

fermentativos, incluso en la era de las tecnologías -ómicas. Estas colecciones no solo preservan la biodiversidad microbiana, sino que también ofrecen herramientas valiosas para afrontar nuevos retos en la producción de alimentos y bebidas fermentadas. Las técnicas genómicas como la metagenómica, metataxonómica, metatranscriptómica y metabolómica permiten estudiar procesos biológicos complejos, pero solo las colecciones vivas garantizan la posibilidad de reactivación, cultivo y aplicación biotecnológica de los microorganismos.