

# Análisis de totivirus "killer" en poblaciones naturales de levaduras vínicas y su aplicación como herramienta biotecnológica en enología

Se abordarán algunos de los siguientes objetivos

- Identificación y caracterización molecular de la diversidad biológica presente en fermentaciones vínicas espontaneas
- Identificación y caracterización de cepas "killer" y análisis de su capacidad competitiva
- Análisis del efecto de la presencia de factores killer sobre la levadura y sobre la calidad del vino
- Caracterización de la eficacia de los sistemas "killer" en biofilms industriales durante la elaboración de vinos de crianza biológica
- Diseño de intervenciones en bodega para la mejora de las fermentaciones vínicas
- Totivirus como modelo de infecciones víricas por virus de RNA

Proyecto propuesto por Juan Jiménez y Andrés Garzón

Área de Genética

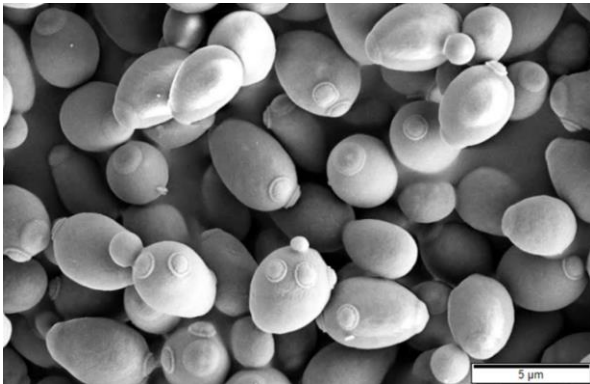
[agarvil@upo.es](mailto:agarvil@upo.es) [jjimmar@upo.es](mailto:jjimmar@upo.es)

# Nuestro modelo de infección por virus RNA2c

## Nuestro organismo modelo

La levadura *S.cerevisiae* posee un indudable interés biotecnológico al constituir o formar parte de la microbiota que produce la mayoría de las fermentaciones industriales de alimentos

### *Saccharomyces cerevisiae*

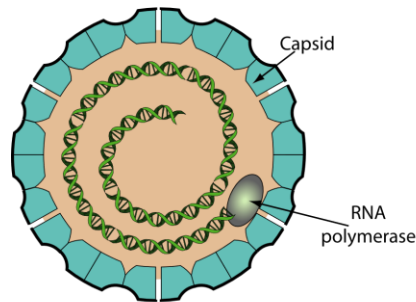


Mogana Das Murtey and Patchamuthu Ramasamy  
([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces\\_cerevisiae\\_SEM.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Saccharomyces_cerevisiae_SEM.jpg)), „Saccharomyces cerevisiae SEM“, <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>

## Totivirus como sistema de estudio

Los totivirus son virus de RNA2c sin intermediario de DNA (no son retrovirus). Infectan a gran número de cepas de levadura

### Totivirus L-A2

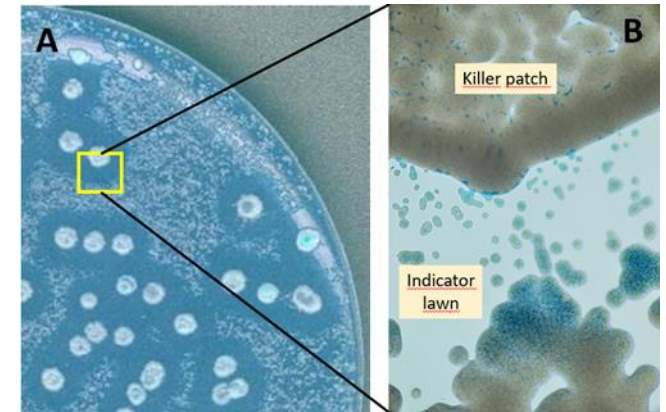


ViralZone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Philippe Le Mercier et al.

## Totivirus “killer” ¿Un factor de competitividad?

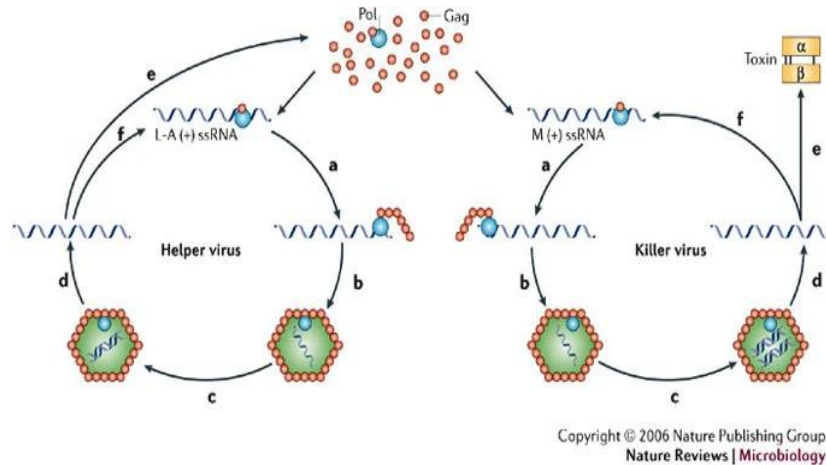
En muchos casos la infección le aporta a la levadura la capacidad de producir una toxina que afecta a competidores sensibles. En esta imagen se observa cómo se produce la letalidad sobre un césped sensible. Las células muertas acumulan un colorante azul.

### Totivirus L-A2+M2



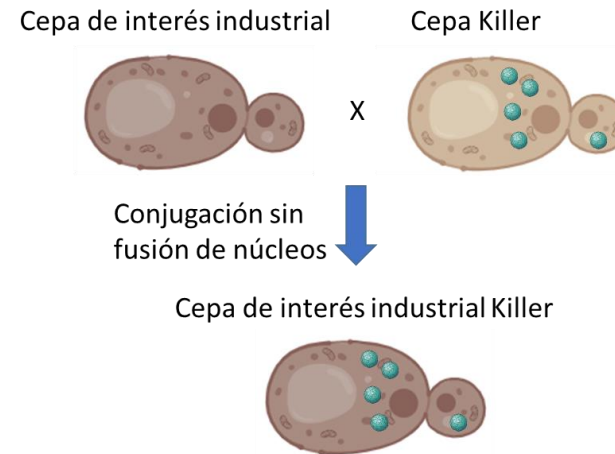
Quintero et al. Tesis doctoral

# Aplicación biotecnológica



## Origen del carácter killer

El carácter killer depende de un segundo virus defectivo que necesita un virus completo “helper” para mantenerse. En lugar de los genes de replicación contiene un gen para la toxina y el “antídoto”

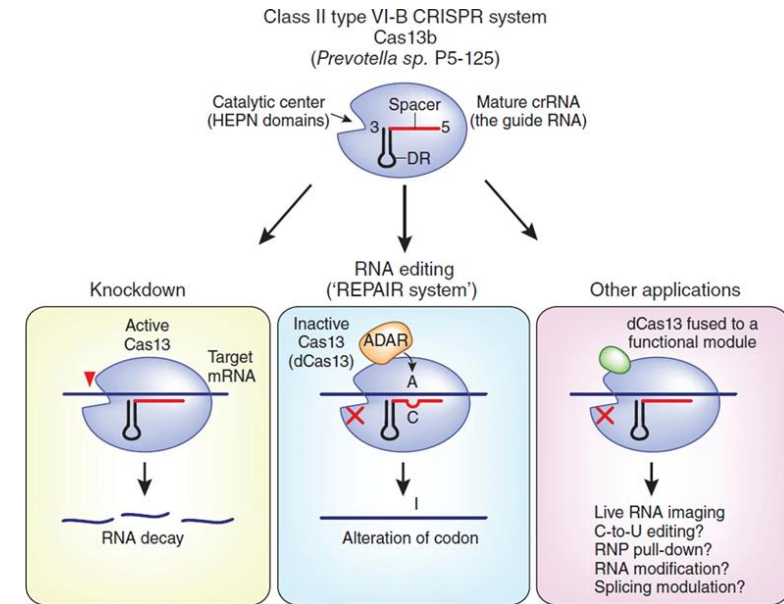


## ¿Podemos fabricar cepas killer?

### Fabricación de cepas killer

Mediante conjugación podemos transferir (infectar) el carácter killer a cualquier cepa de interés biotecnológico.

Al ser la conjugación un fenómeno natural estas nuevas cepas pueden usarse en aplicaciones biotecnológicas.



## ¿Podemos curar a las cepas del virus?

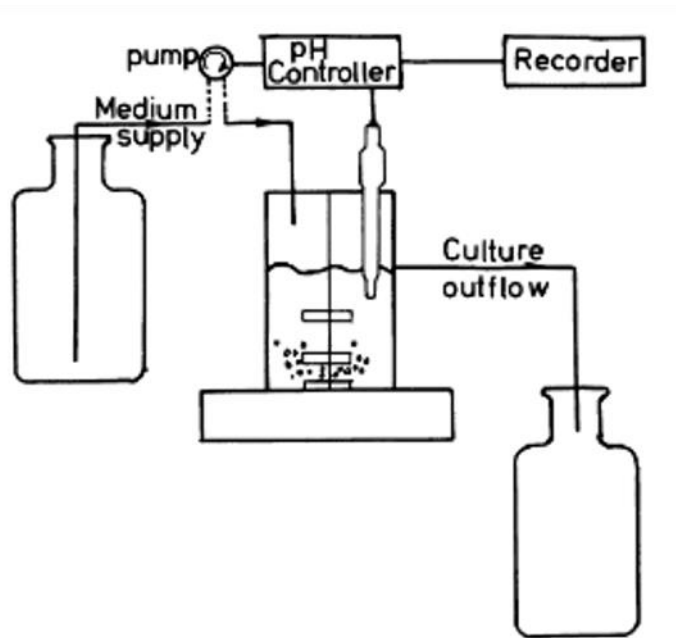
Podemos usar este sistema como modelo de infecciones víricas e intentar curarlo con CRISPR-CAS13 que degrada RNA

Kim, V. RNA-targeting CRISPR comes of age. *Nat Biotechnol* 36, 44–45 (2018). <https://doi.org/10.1038/nbt.4054>

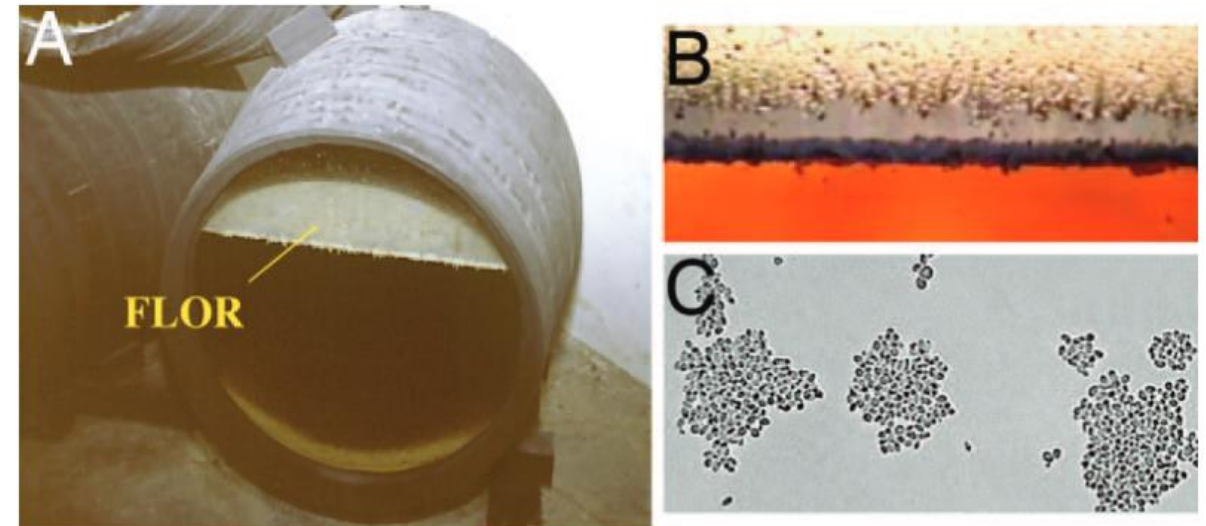
# ¿Supone el carácter killer una ventaja o una desventaja para el huésped?

## Experimentos de competencia en cultivo semicontinuo

Se realizarán experimentos de competencia entre cepas isogénicas con y sin killer para demostrar si realmente supone una ventaja competitiva. Para medir competencia durante muchas generaciones se usará un sistema semicontinuo.



Esquema del sistema de cultivo semicontinuo. Sistema de cultivo semicontinuo basado en la regulación del pH, compuesto por un biorreactor conectado a un pH-metro, una bomba peristáltica para la adición automática de medio fresco, y un depósito de desecho. Figura adaptada de: Jiménez, J., & Benítez, T. (1988). Selection of ethanol-tolerant yeast hybrids in pH-regulated continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(4), 917–922.



## Análisis de competencia en estado de biofilm

Algunas cepas de *S.cerevisiae* son capaces de formar biofilm como forma de resistir ambientes extremos como una alta concentración de alcohol. Este biofilm conocido como “flor” es el que fabrica los vinos finos y manzanilla en las bodegas y es muy delicado. Conocerlo es importante para ayudar a la industria viticultora andaluza. Estudiaremos la competitividad que supone la adquisición del carácter killer para cepas de interés enológico