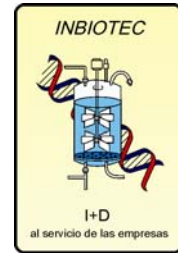
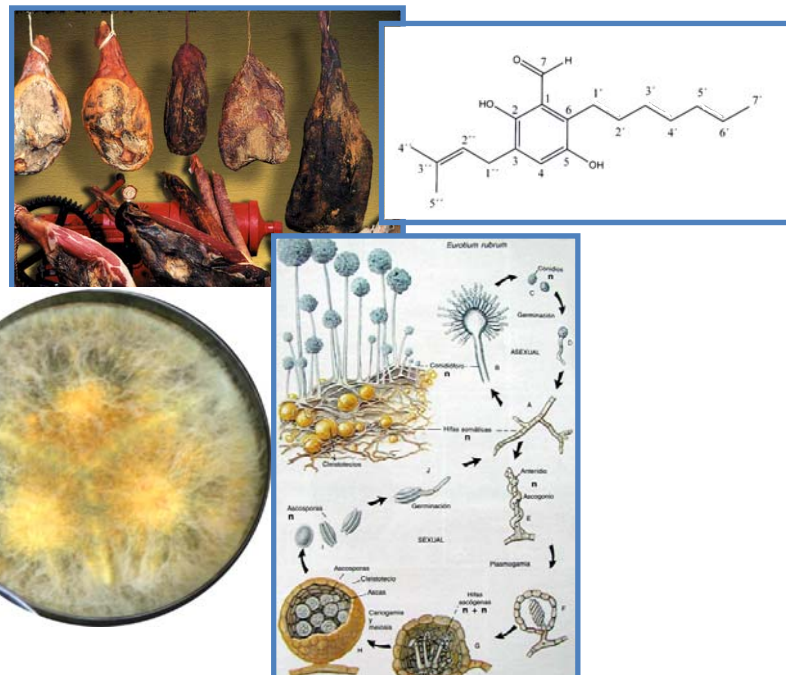




Universidad de León  
Departamento de Biología Molecular  
Instituto de Biotecnología  
INBIOTEC



# Estudio de la ruta biosintética del acaricida flavoglaucina producido por *Eurotium rubrum* C47, aislado natural de la cecina de León



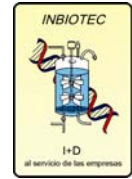
Memoria presentada para optar al  
Grado de Doctor en Biología  
Ma Ángeles Vidales Colinas  
2010

UNIVERSIDAD DE LEÓN

Departamento de Biología Molecular



INBIOTEC



Instituto de Biotecnología

Estudio de la ruta biosintética del  
acaricida flavoglauцина producido por  
*Eurotium rubrum* C47, aislado natural  
de la cecina de León

Memoria presentada para optar al

Grado de Doctor en Biología

M<sup>a</sup> Ángeles Vidales Colinas



Tras cuatro duros años de mi vida ha llegado el momento de agradecer a aquellos a quienes han colaborado de alguna forma en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Quiero comenzar esta memoria agradeciendo a la Excma. Diputación de León por su financiación para la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Dr. Juan Francisco Martín por su dirección y por ofrecerme la posibilidad de realizar la Tesis Doctoral en INBIOTEC.

A la Doctora Ana Gómez por su labor en la dirección a lo largo de este trabajo de investigación, por haber sido codirectora y compañera, gracias por tu ayuda, paciencia, confianza y apoyo. Además agradecerte las numerosas sugerencias y críticas en la redacción de esta tesis, así como la corrección minuciosa de la misma.

A la Dra. Sonia Campoy por su amistad, ayuda, apoyo y aporte de conocimientos químicos en los primeros años de mi trabajo de investigación.

A José Félix, por toda la información aportada y por su ayuda al principio de este trabajo.

Al Dr. Rumbero de la Universidad Complutense de Madrid por su colaboración en la determinación de la estructura química de los compuestos purificados en el este trabajo.

Agradecer a Ramiro Godio por sus consejos y predisposición permanente e incondicional a aclarar mis dudas científicas sobre genética, PCR y Southern.

A mis compañeras M<sup>a</sup> de los Ángeles Fernández, Ethel, Nuria y Silvia por su confianza, apoyo, amistad y ayuda tanto en lo laboral como en lo personal. Gracias por haber estado ahí en los buenos y malos momentos, por escuchar, por las terapias de grupo, por los momentos de charla y por toda la ayuda moral. Gracias por hacer del trabajo una experiencia enriquecedora académica y personalmente durante estos años.

A Vanesa y Rubén que con su fuerza y entusiasmo me han aportado energía y ánimo.

A Sonia Baños por haberme soportado en estos últimos meses, meses de nervios y tensión de finalización de tesis.

Al servicio técnico y administrativo por su colaboración.

A todos mis compañeros de INBIOTEC, los presentes y los que ya se han ido, que de alguna manera han colaborado en la realización de este trabajo.

A mis amigos Roberto y Ana por escucharme y aguantarme durante todo este tiempo y por vuestro apoyo y ánimo.

Agradecer a mi familia todo su apoyo. Gracias a mis padres porque han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme y gracias a ese esfuerzo, sacrificio y apoyo he llegado hasta el final de este camino.

A mi hermano José Luis por todo su apoyo moral e intelectual y por estar ahí cada vez que le necesito.

A las personas más importantes de mi vida, mi marido y mis hijos. Alejandro y Alba por ser el motor que impulsáis mi vida y por hacer que cada día sea un reto y que me sienta más satisfecha de mi esfuerzo y superación. Gracias a Venancio por estar ahí cada día, apoyándome y animándome incondicionalmente, gracias por acompañarme durante este tortuoso camino y gracias por haber llegado conmigo hasta el fin de una de las metas de mi vida.

El éxito consiste en obtener lo que se desea.

La felicidad, en disfrutar lo que se obtiene.

Ralph Waldo

**A** mi familia



# 1. ÍNDICE

---





<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>1.1 Aspectos generales del género <i>Eurotium</i></b> .....	13
1.1.1 Clasificación taxonómica de <i>E. rubrum</i> .....	13
1.1.2 Ciclo Biológico de <i>E. rubrum</i> .....	14
1.1.3 Metabolismo secundario de <i>E. rubrum</i> .....	15
<b>1.2 Los hongos en la elaboración de alimentos</b> .....	16
1.2.1 Producción de embutidos .....	17
1.2.2 Actividad fúngica en el proceso de elaboración de jamón y cecina .....	17
<b>1.3 Evolución de la microbiota en el proceso de elaboración de jamón y cecina</b> .....	19
A. Perfilado.....	21
B. Salazonado .....	21
C. Post-salado.....	22
D. Secado .....	23
E. Maduración en bodega .....	24
<b>1.4 Posible uso industrial del género <i>Eurotium</i> en la elaboración de jamón y cecina</b> .....	25
1.4.1 Los ácaros .....	25
a) Características generales .....	25
b) Distribución y hábitat .....	26
c) Morfología .....	26
d) Ciclo biológico.....	27
1.4.2 Los ácaros en los alimentos .....	28
1.4.3 Los ácaros del jamón y cecina.....	29

## Índice

---

<b>1.5 Control de los ácaros del jamón y cecina</b>	30
<b>1.6 Control biológico de los ácaros: Experiencia previa en INBIOTEC</b>	33
<b>2. OBJETIVOS</b>	35
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	39
<b>3.1 Organismos utilizados</b>	41
3.1.1 Cepas bacterianas	41
3.1.2 Cepas fúngicas	42
<b>3.2 Vectores utilizados</b>	42
3.2.1 Vectores fágicos	42
3.2.2 Vectores plasmídicos	43
<b>3.3 Reactivos específicos para biología molecular</b>	49
3.3.1 Enzimas	49
3.3.2 Marcadores de peso molecular	49
3.3.3 Oligonucleótidos	50
<b>3.4 Medios de cultivo</b>	51
3.4.1 Medios de cultivo para bacterias	51
3.4.2 Medios de cultivo para hongos	53
a) Medios de cultivo utilizados para la caracterización fenotípica de <i>E. rubrum</i>	53
b) Medios de cultivo utilizados para la regeneración de protoplastos	55
c) Medios de cultivo para la producción de flavoglucina	57
<b>3.5 Cultivo y conservación de los organismos</b>	58
3.5.1 Crecimiento de las cepas bacterianas	58
3.5.2 Propagación de bacteriofagos	59

---

a) Infección en medio sólido -----	59
b) Infección en medio líquido -----	59
3.5.3 Crecimiento de las cepas de <i>Eurotium</i> -----	60
A. Para la obtención de esporas -----	60
B. Para la obtención de compuesto acaricida -----	60
3.5.4 Conservación de los organismos -----	61
A. Cepas bacterianas -----	61
B. Cepas fúngicas -----	61
C. Bacteriofagos -----	61
D. Ácaros -----	62
<b>3.6 Mutagénesis con nitrosoguanidina -----</b>	<b>62</b>
<b>3.7 Obtención de ADN plasmídico de <i>Escherichia coli</i> -----</b>	<b>63</b>
3.7.1 Maxipreparaciones de ADN plasmídico -----	63
3.7.2 Minipreparaciones de ADN plasmídico -----	64
<b>3.8 Obtención de ADN total de <i>Eurotium rubrum</i> -----</b>	<b>65</b>
3.8.1 Extracción de ADN total a gran escala -----	65
3.8.2 Extracción de ADN total a pequeña escala -----	66
<b>3.9 Obtención de ADN a partir de bacteriofagos -----</b>	<b>67</b>
3.9.1 Obtención de ADN a partir de medio sólido -----	67
3.9.2 Obtención de ADN a partir de medio líquido -----	68

## Índice

---

<b>3.10 Manipulación del ADN</b> .....	69
3.10.1 Hidrólisis con endonucleasas de restricción .....	69
3.10.2 Fraccionamiento de fragmentos de ADN por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa .....	70
3.10.3 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis .....	70
3.10.3.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	71
3.10.3.2 Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	71
3.10.4 Cuantificación y análisis de la pureza del ADN .....	72
a) Por fluorescencia .....	72
b) Por espectrometría .....	72
3.10.5 Reacciones de modificación del ADN .....	73
a) Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN .....	73
b) Ligación de fragmentos de ADN .....	73
3.10.6 Reacciones en cadena de la polimerasa .....	74
3.10.7 Rastreo de la biblioteca genómica construida en el vector $\lambda$ -Dash II por PCR .....	74
3.10.8 Secuenciación de ADN .....	77
3.10.9 Análisis informático de las secuencias .....	78
<b>3.11 Hibridación de ADN</b> .....	79
3.11.1 Marcaje de sondas de ADN .....	79
3.11.2 Hibridación .....	80

---

<b>3.12 Transformación de microorganismos</b>	83
3.12.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	83
3.12.1.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	83
3.12.1.2 Transformación de <i>E. coli</i>	84
3.12.1.3 Análisis de los transformantes mediante PCR	84
3.12.2 Transformación de <i>E. rubrum</i>	84
3.12.2.1 Obtención de protoplastos	85
3.12.2.2 Transformación de protoplastos	86
3.12.2.3 Extensión de placas	86
<b>3.13. Técnicas cromatográficas</b>	87
3.13.1 Obtención del extracto crudo a partir del micelio de <i>E. rubrum</i> C47	87
3.13.2 Cromatografía en en capa fina (TLC)	88
3.13.3 Cromatografía en fase normal-Sílica gel	88
3.13.4 Columna de filtración en gel	89
3.13.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	89
a) Cromatografía líquida en HPLC semipreparativo	90
b) Cromatografía líquida en HPLC analítico	90
<b>3.14 Ensayos de la actividad acaricida</b>	91
3.14.1 Ensayos en placa	91
a) Ensayos con micelios fúngicos	91

## Índice

---

b) Ensayos con muestras líquidas-----	92
3.14.2 Ensayos experimentales en industrias chacineras-----	92
3.14.2.1. Ensayos de inoculación en condiciones controladas-----	92
3.14.2.2. Ensayos de inoculación en condiciones naturales-----	93
a) Preparación de material biológico: Esporas de <i>Eurotium rubrum</i> -----	94
b) Inoculación de los jamones-----	94
c) Toma de muestras -----	95
d) Análisis de muestras -----	95
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----</b>	<b>97</b>
<b>4.1. Selección de mutantes de <i>E. rubrum</i> no productores y superproductores de flavoglaucaína-----</b>	<b>99</b>
4.1.1 Mutagénesis de <i>E. rubrum</i> C47 con nitrosoguanidina-----	99
4.1.2 Selección de mutantes-----	100
<b>4.2. Caracterización morfológica y genotípica de los mutantes no productores de flavoglaucaína-----</b>	<b>105</b>
4.2.1 Caracterización morfológica-----	106
4.2.2 Identificación génica por secuenciación de ITS <sub>S</sub> -----	109
A. Amplificación de la región intergénica 18S/28S-----	110
B. Secuenciación de la región intergénica 18S/28S -----	111
<b>4.3 Purificación y caracterización de posibles intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavoglaucaína en <i>Eurotium rubrum</i> C47 -----</b>	<b>113</b>

---

4.3.1 Extracción y purificación de los posibles intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavoglaucaína a partir del micelio del mutante no productor de <i>E. rubrum</i> A <sub>3</sub> 13 -----	115
4.3.1.1 Cromatografía en fase normal de sílica gel -----	115
4.3.1.2 Columna de filtración en gel -----	116
4.3.1.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)-----	117
A. Cromatografía líquida en HPLC semipreparativo-----	117
B. Cromatografía líquida en HPLC analítico -----	119
4.3.2 Elucidación de la estructura molecular de los compuestos P1 y P2 -----	120
A. Espectrometría de masas-----	120
B. Estudio de resonancia magnética nuclear-----	120
4.3.3 Ensayos de actividad acaricida-----	123
A. Ensayos con micelio fúngico -----	123
B. Ensayos con compuestos purificados -----	124
<b>4.4. Caracterización genética de la ruta de biosíntesis de flavoglaucaína -----</b>	<b>126</b>
4.4.1 Hipotética ruta biosintética de la flavoglaucaína -----	126
4.4.2. Puesta a punto y optimización del proceso de transformación de <i>E. rubrum</i> -----	133
4.4.3. Construcción de una biblioteca genómica de <i>E. rubrum</i> C47 en el vector $\lambda$ -DASH II -----	145



## Índice

---

4.4.4. Búsqueda de posibles desaturasas y poliquétidosintas implicadas en la ruta de biosíntesis de flavoglauцина	148
a) Diseño de oligonucleótidos degenerados	148
b) Amplificación y clonación de las posibles poliquétidosintas y desaturasas en el vector pGEM-T Easy	152
c) Análisis de los transformantes en pGEM-T Easy	155
d) Búsqueda de genes en la biblioteca genómica	158
4.4.5 Análisis de los clones seleccionados mediante Southern blot	160
4.4.6 Complementación de los mutantes no productores de flavoglauцина	165
<b>4.5. Desarrollo de un sistema de control biológico de las plagas de ácaros en jamones</b>	<b>166</b>
A. Ensayo de inoculación en condiciones naturales	167
B. Ensayos en condiciones controladas	170
<b>4.6. Discusión general</b>	<b>177</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>185</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>189</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1 Aspectos generales del género *Eurotium*.

Los hongos del orden Eurotiales se encuentran entre los más distribuidos en la naturaleza. En este orden se engloban géneros como *Penicillium*, *Eurotium* y *Aspergillus*, de gran interés en la industria alimentaria por intervenir en procesos de maduración de quesos, productos cárnicos y producción de aditivos. Por otro lado, dentro de este orden también se engloban algunas especies productoras de micotoxinas, las cuales son metabolitos con actividad hepatotóxica, carcinogénica, teratogénica y/o mutagénica.

El género *Eurotium* también está presente entre los hongos contaminantes que crecen sobre las paredes y maderas de edificios, incluyendo casas habitadas en climas húmedos (Slack y col, 2009).

Todas las especies del género *Eurotium* son xerófilas lo que implica que sólo puedan ser cultivadas en medios de cultivo que le proporcionen una baja cantidad de agua. Por tanto, en su recuperación y aislamiento son empleados medios de cultivo suplementados con un 20% de sacarosa o glicerol (Thom y Raper, 1941, Pitt y Hocking, 1985) a fin de disminuir la actividad de agua ( $a_w$ ). Con estos medios de cultivo, además se consigue la coexistencia de sus dos estadios, el sexual y el asexual. El medio de cultivo CY20S ( apartado 3.4.2. de Materiales y Métodos) es óptimo, tanto para el crecimiento de las diferentes especies de *Eurotium*, como para su identificación, según la coloración que presente el micelio transcurridos 14 días de incubación a 25 o 28 °C (Thom y Raper, 1941, Pitt y Hocking, 1985).

### 1.1.1 Clasificación taxonómica de *E. rubrum*.

Anteriormente el orden *Eurotiales* se incluía dentro del Filo *Deuteromycota*, pero actualmente este Filo ha sido eliminado de la taxonomía de hongos y los diferentes géneros que estaban englobados en él fueron clasificados, en base a los resultados obtenidos mediante análisis moleculares, en diferentes taxones dentro de los hongos con reproducción sexual.

La clasificación taxonómica de *Eurotium* es compleja y confusa, ya que, algunas de las especies que se recogen bajo este género, se identifican paralelamente como especies del género *Aspergillus* (Raper y Fennell, 1965). Actualmente se le reconoce y se le acepta como género y su clasificación taxonómica es la siguiente:

**Reino:** Fungi.

**División:** *Ascomycota* (Eriksson, 1998).

**Subdivisión:** *Pezizomycotina*.

**Clase:** *Eurotiomycetes*.

**Orden:** Eurotiales (green and blue molds) (G.W. Martin ex Benny & Kimbr., 1980).

**Familia:** *Trichocomaceae* (Fischer, 1897).

**Género:** *Eurotium*.

### 1.1.2. Ciclo Biológico de *E. rubrum*.

*Eurotium* es un hongo ascomiceto, saprófito y su micelio es ramificado y septado. Presenta una gran cantidad de cleistotecios y sus conidióforos son simples y con ápice en forma vesicular (Pitt y Hocking, 1985).

Su ciclo de vida se desarrolla en dos etapas:

1. Etapa de propagación asexual o anamórfica (**figura 1a**), mediante la formación de conidios que presentan pared espinosa y se agrupan formando cadenas, de color verde grisáceo.
2. Etapa sexual o teleomórfica (**figura 1b**), mediante la formación de cleistotecios que nacen del nudo de una hifa sobre un tallo bien definido, asemejándose a un puño cogido fuertemente a un antebrazo estrecho. Cuando las ascosporas están maduras, los cleistotecios tienen aspecto de saco lleno con una masa de esporas elipsoidales y de pared lisa.

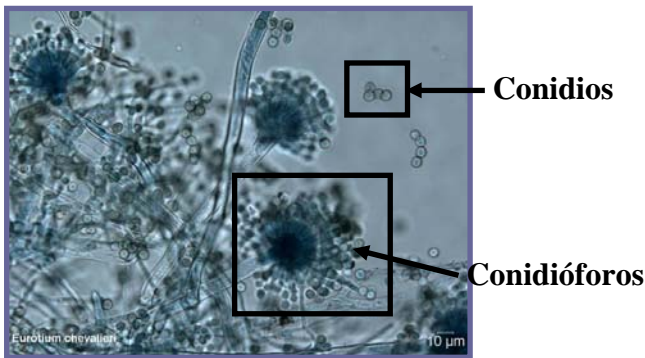


Figura 1a



Figura 1b

**Figura 1a:** Fase de propagación asexual de *E. rubrum* caracterizada por la formación de conidios.

**Figura 1b:** Fase de propagación sexual de *E. rubrum* caracterizada por la formación de cleistotecios.

### 1.1.3. Metabolismo secundario de *E. rubrum*.

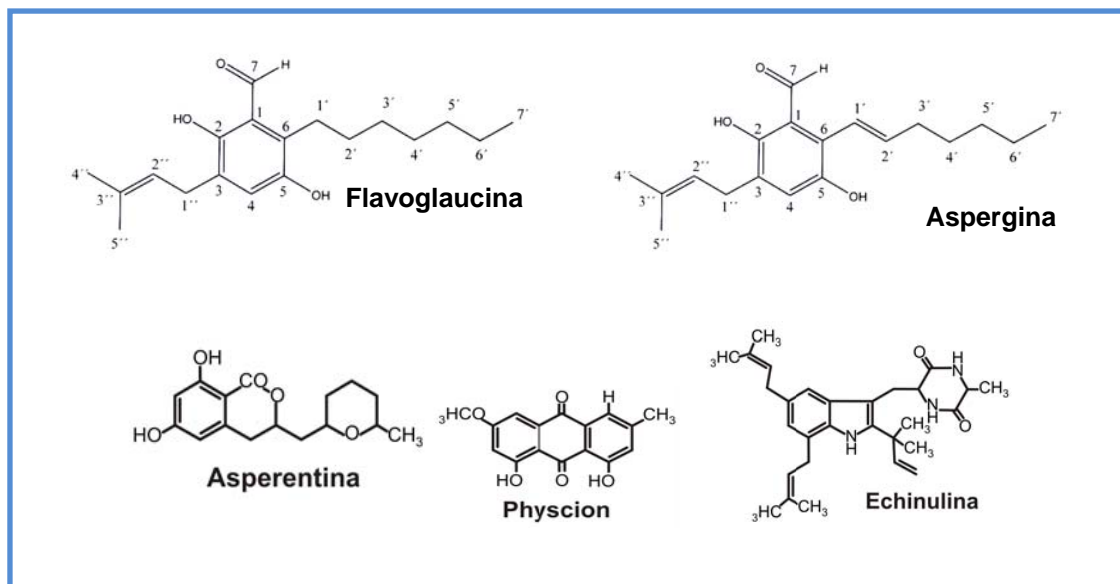
Los metabolitos obtenidos a partir de cultivos de varias especies del género *Eurotium* presentan una gran variedad de actividades biológicas: insecticida, antibacteriana, antifúngica, tóxica y citotóxica.

Entre los metabolitos descritos (**figura 2**), encontramos la flavoglaucina ( $C_{19}H_{28}O_3$ ), metabolito que se caracteriza por su color amarillo oro. Fue identificada por Quilico y col. (1949) a partir de extracciones con solvente orgánico del micelio de *Eurotium repens* (*Aspergillus repens*). Presenta actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* y tóxica frente a *Artemia salina*, además de citotoxicidad sobre cultivos primarios de hepatocitos (Podojil y col., 1979) y conejos (Nazar y col., 1984). Otros compuestos identificados en esta misma especie, son la echinulina ( $C_{29}H_{39}N_3O_2$ ) y la asperentina ( $C_{16}H_{20}O_5$ ), con actividad antibacteriana y tóxica, y en este último, además, se ha observado actividad antifúngica. Entre los metabolitos identificados, sólo el physcion ( $C_{16}H_{12}O_5$ ), tiene un bajo poder citotóxico frente a las células HeLa (Podojil y col., 1979).

Así mismo, a partir de *E. tonophilum* se han purificado otros metabolitos, entre los que está, la aspergina ( $C_{19}H_{26}O_3$ ), que muestra actividad antibacteriana (Sokolov y col., 1971). Otros compuestos, como la

## Introducción

esterigmatocistina (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), con actividad citotóxica en embriones de pollo y considerada como un compuesto intermediario en la biosíntesis de aflatoxinas, es producida por algunas especies de *Aspergillus* y de *Eurotium* (Rabie y col., 1977; Schroeder y Helton, 1975).



**Figura 2.** Estructura de algunos metabolitos con diversas actividades biológicas, producidos por *Eurotium*.

## 1.2 Los hongos en la elaboración de alimentos.

Desde la Antigüedad, la curación o secado de determinados alimentos ha sido un método eficaz para su conservación.

Existe una gran variedad de alimentos madurados con hongos; entre ellos se encuentran, quesos, dulces, vegetales y carnes. En oriente los vegetales se maduran con distintas especies de hongos como *Mucor*, *Aspergillus*, *Monascus*, etc. En occidente los hongos utilizados en alimentos se reducen casi exclusivamente al género *Penicillium*, excepto en los productos cárnicos con un largo periodo de curación, donde también se desarrollan especies de *Aspergillus* y *Eurotium*.

### **1.2.1. Producción de embutidos.**

A nivel mundial existen una gran variedad de productos cárnicos elaborados a partir de piezas enteras de carne de bovino, y aunque su producción es muy inferior a la alcanzada a partir de carne porcina, son igualmente apreciados por su calidad.

Existe una gran heterogeneidad en el proceso de elaboración de estos productos, por lo que conviene destacar aquellos jamones y cecinas que han logrado el aval y reconocimiento de la Unión Europea en las formas: Denominación de Origen Protegida (DOP), Indicación Geográfica Protegida (IGP) o Especialidad Tradicional Garantizada (ETG), figuras comunitarias de calidad que, respaldadas por un riguroso reglamento de elaboración y control, se aplican a ciertos productos agrícolas y alimenticios.

La mayor parte de la producción y consumo de jamón curado se localiza en Europa. Entre los estados miembros de la Unión Europea, los que tienen mayor producción y exportación de jamón curado son, en primer lugar Italia, seguido por España. Tanto en Castilla y León como en otras regiones de España, las industrias chacineras dedicadas a la elaboración y comercialización de productos curados procedentes de carne porcina y bovina tienen una gran importancia económica.

En España se elabora la cecina, un producto obtenido a partir de carne de vacuno y cuya área de mayor producción se centra en la provincia de León. Por su calidad y representatividad, este producto cárnico ha quedado recogido en el Catálogo de Embutidos y Jamones Curados de España. Actualmente, la elaboración de la cecina de León se encuentra amparada bajo la IGP (Indicación Geográfica Protegida).

### **1.2.2. Actividad fúngica en el proceso de elaboración de jamón y cecina.**

En los productos cárnicos crudos y curados generalmente (con excepción de las salchicheras) no se utilizan cultivos iniciadores, sino que la inoculación



## Introducción

---

normalmente se produce de forma espontánea a partir de la microbiota fúngica ambiental. Esto incrementa el riesgo de colonización por especies micotoxigénicas, excepto en el caso de *Eurotium*, donde la mayoría de especies no producen micotoxinas.

El desarrollo fúngico confiere a los embutidos curados un aspecto externo característico. La capa de micelio que se forma en la superficie del producto regula la pérdida de humedad, lo protege de la luz y del oxígeno evitando que se rancie. El microclima creado en la superficie impide la formación de un borde seco y untuoso y favorece el desarrollo del aroma y del sabor característico a través de la actividad de proteasas y lipasas (Lücke, 1986).

Algunos autores describen la existencia de proteasas (Kinsella y Hwang, 1976) y lipasas (Seitz, 1990) en muchas especies de *Penicillium* y *Aspergillus*, las cuales forman parte de la microbiota natural de los embutidos. La actividad proteolítica "in situ" de los hongos que se desarrollan sobre embutidos curados también ha sido descrita, aunque se ha determinado experimentalmente en escasas ocasiones (Leistner, 1987).

Otros autores como Grazia y col, (1986) también describen la participación de los hongos en el proceso de maduración. Estos autores proponen que las características organolépticas de los productos madurados con hongos, respecto a los producidos exclusivamente por fermentación ácida, no se deben a procesos proteolíticos, sino al descenso de la concentración de ácido láctico y al aumento de los niveles de nitrógeno y amonio como consecuencia del metabolismo fúngico.

En cuanto a la actividad lipolítica, autores como Huerta y col. (1987b) observaron una importante actividad en la microbiota aislada a partir del jamón curado, determinando que todos los aislados de *Aspergillus* y la mayoría de *Penicillium* presentaban dicha actividad. Además, se piensa que la presencia de algunos hongos xerófilos, como *E. rubrum*, favorece el desarrollo de las características organolépticas del jamón, debido a su posible acción lipolítica sobre la grasa externa de la pieza (Hugas y col., 1987).

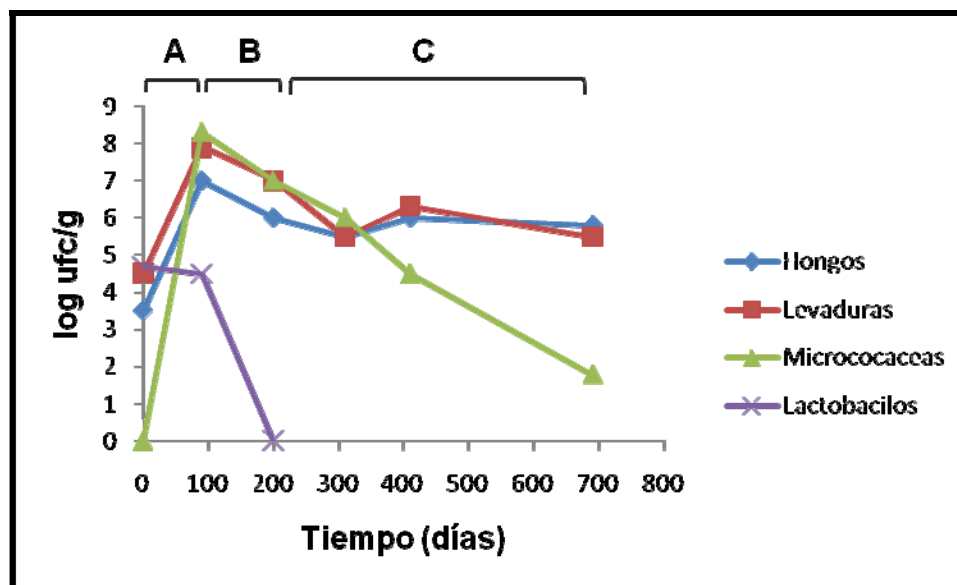
Por todo ello, la elaboración de productos cárnicos curados es un proceso sujeto a unas condiciones de maduración concretas que van a determinar las características y la calidad del producto final.

### 1.3. Evolución de la microbiota en el proceso de elaboración de jamón y cecina.

Existen diferentes especies microbianas identificadas en variedades de jamón y cecina (Núñez, 1995; Núñez y *col.*, 1998).

Las condiciones ambientales que se alcanzan a lo largo del proceso de elaboración del jamón y la cecina, tales como temperatura, humedad relativa (HR), actividad de agua ( $a_w$ ) y pH, permiten únicamente el desarrollo de los grupos microbianos mejor adaptados a estas condiciones, mientras que el desarrollo de microorganismos alterantes y/o patógenos se ve inhibido (Rodríguez y *col.*, 1994, Núñez y *col.*, 1998). Dichas condiciones, favorecen el desarrollo superficial de una población microbiana que varía a lo largo del proceso de elaboración.

Inicialmente predominan las bacterias del género *Lactobacillus*, micrococáceas (Carrascosa y Cornejo, 1991; Rodríguez y *col.*, 1994) y levaduras (Núñez y *col.*, 1996a). A partir de la etapa en secadero predomina una población fúngica constituida, principalmente, por especies de hongos xerófilos como *E. rubrum* (Rojas y *col.*, 1991; Núñez y *col.*, 1996b). En la siguiente gráfica se representa la evolución de los diferentes microorganismos en las sucesivas etapas de curado (**figura 3**).



**Figura 3.** Evolución superficial de los principales grupos microbianos, durante las etapas de elaboración del jamón y cecina: postsalado (A), secadero (B) y bodega (C). (Rodríguez y col., 2001).

Hongos (◆), levaduras (■), Micrococaceas (▲) y Lactobacilos (×).

El proceso de elaboración del jamón y cecina puede seguir dos procedimientos distintos. Uno de ellos se puede considerar artesanal y se lleva a cabo por métodos tradicionales, aprovechando los meses fríos del año y con humedad relativa baja. El otro procedimiento, usado en la industria, utiliza métodos artificiales para lograr las condiciones ambientales requeridas y se lleva a cabo durante todo el año. Según lo describen Ventanas y col., 2001, el proceso de curado de jamón y cecina consta de cuatro etapas clásicas: salado, post-salado, secado y maduración, precedidas de una fase previa de perfilado, que incluye la preparación, selección y clasificación de la materia prima.

El método de elaboración de la cecina es similar al descrito anteriormente para el jamón curado y al igual que en ese caso, para su producción se pueden seguir dos procedimientos, artesanal e industrial. Sin embargo, se diferencian, además de en la materia prima empleada, en que la cecina es sometida a una etapa de ahumado que tiene lugar entre el postsalado y el secado (Zumalacárregui y Díez, 2001). El ahumado se realiza mediante la combustión natural de leña de roble (*Quercus pyrenaica*) o encina (*Quercus rotundifolia*) durante 12-16 días. El humo permite fijar el color, proporciona aromas y da

estabilidad a la cecina deshidratando homogéneamente la carne, lo cual impide su alteración y favorece su maduración (García y col., 1997). De acuerdo con la IGP la maduración de la cecina debe extenderse como mínimo 7 meses a partir de la etapa de salazón (Fernández, 1997).

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre los distintos factores que influyen en el proceso de curado y sobre la identificación y caracterización de la microbiota fúngica de productos cárnicos durante las diferentes etapas de elaboración.

### **A. Perfilado.**

Con el perfilado se consigue dar la forma típica de corte serrano en "V" mediante la eliminación de grasa y piel superficial. Además, se eliminan los restos de sangre (sangrado) de forma manual siguiendo la trayectoria de las arterias. En esta etapa los perniles se mantienen a temperaturas de refrigeración, entre 0-3 °C durante 1-2 días, para evitar contaminaciones microbianas y favorecer la penetración de la sal en la siguiente etapa del proceso.

En las piezas de carne, antes de ser sometidas al salado, ya se detectan levaduras, aunque es el aumento de la temperatura al final del post-salado y en el secadero, lo que favorece realmente la multiplicación de las mismas.

### **B. Salado.**

El salado de los perniles de cerdo se realiza aplicando una mezcla de sal marina de grano grueso y sales nitrificantes (nitratos y nitritos). Los perniles permanecen dentro de la cámara de salazón entre 7 y 20 días a temperatura entre 1-5 °C y con una humedad relativa del 80-90%. Terminado el proceso, se retira la sal mediante lavado y cepillado.

El salado favorece la deshidratación paulatina de los jamones y cecinas y su perfecta conservación, al inhibir el desarrollo de microorganismos alterantes y/o patógenos, ya que la sal disminuye la actividad de agua ( $a_w$ ) presente en la carne e impide el crecimiento de estos microorganismos.

En las piezas, antes del salado, no se produce un desarrollo visible de los hongos, debido a que en esas condiciones son incapaces de competir con la población bacteriana, e incluso con las levaduras presentes (Hugas y *col.*, 1987). Sin embargo, en esta etapa cuando se toman muestras ya se pueden detectar sus esporas.

En la etapa de salado, los microorganismos presentes en el jamón son principalmente bacterias micrococáceas, mayoritariamente del género *Staphylococcus*. Éstas llegan al producto a través de la sal, ya que en piezas frescas no se detecta la presencia de este grupo bacteriano, mientras que en la sal utilizada para el procesado sí. Además, las cepas aisladas en la sal coinciden con las que se implantan en las piezas de carne. Las bacterias del género *Staphylococcus* toleran grandes concentraciones de cloruro sódico, lo cual es un criterio utilizado para su caracterización en taxonomía clásica. Estos microorganismos alcanzan su mayor recuento al final del post-salado. En las siguientes etapas de secadero y bodega, se produce un descenso de los mismos, debido a la disminución progresiva de la actividad de agua.

Durante esta etapa, la población de levaduras supera a la microbiota fúngica, aunque también suele aislarse con frecuencia el hongo *Mucor mucedo*.

### **C. Post-salado (Asentamiento).**

Las piezas de carne son trasladadas a cámaras climatizadas donde se consigue un reparto homogéneo y natural de la sal en los tejidos. De esta forma, las piezas sufren un proceso de deshidratación lento y controlado, hasta adquirir una consistencia adecuada para su maduración. El tiempo medio de permanencia en la cámara oscila entre 60-90 días a una temperatura entre 3-5 °C y con una humedad relativa del 75-85%. Estas condiciones evitan el crecimiento de microorganismos indeseables. Al final de esta etapa la carne presenta una  $a_w$  inferior a 0,96.

Como vimos anteriormente, los hongos y levaduras son los grupos mayoritarios durante la mayor parte del procesado, excepto en el salado, donde predomina el crecimiento bacteriano.

En las piezas de carne, antes de ser sometidas al salado, ya se detectan levaduras, pero es el aumento de la temperatura al final del post-salado y en el secadero lo que favorece el aumento de las mismas. Dentro de las especies autóctonas predominantes en el jamón ibérico, se encuentran *Candida zeylanoides* y *Debaryomyces hansenii*. Además, esporádicamente se han identificado *C. blankii*, *C. intermedia*, *Pichia carsonii* y *Rhodotorula rubra* (Huerta y col., 1988; Núñez y col., 1996a).

### **D. Secado.**

La etapa de secado varía según el tipo de elaboración que se lleve a cabo. En los secaderos artesanales, la etapa de secado coincide con la época primaveral y estival, en la que la temperatura oscila entre los 15-30 °C con una HR del 60-80%, lográndose así que los perniles se sequen por acción directa de las variables ambientales. Las piezas se mantienen durante, aproximadamente, seis a nueve meses colocadas en salas de secado al aire libre, controlando la temperatura y la humedad relativa, por medio de canales o ventanas de ventilación.

En los secaderos artificiales, tras la salida del post-salado, se aplica a los perniles un incremento progresivo y constante de temperatura (1-2 °C diarios) desde los 5 °C hasta los 26 °C y una HR de 70-80%, consiguiendo así el secado homogéneo de las piezas en 60 días, aproximadamente.

En ambos casos, durante esta fase, mediante el incremento de la temperatura y la reducción de la humedad relativa, se estimula la formación de compuestos responsables del sabor y el aroma, se estabiliza el color y se consigue disminuir la  $a_w$  hasta valores inferiores a 0,92.

Durante esta etapa se produce una pequeña disminución en los recuentos de hongos, bacterias micrococáceas y levaduras, mientras que la población de lactobacilos es desplazada completamente por la colonización del resto de microorganismos, llegando a desaparecer al final de esta etapa.

### E. Maduración en bodega.

Para conseguir una maduración lenta, es esencial mantener constante la temperatura y la humedad. Una vez los jamones se han trasladado a la bodega se mantienen, durante 6 a 18 meses (dependiendo de su peso), a temperaturas entre 15 y 20 °C y con una humedad del 60 al 80%.

En esta etapa, los hongos que han ido apareciendo desde la fase final del secado se observan de forma visible en la superficie de los jamones, favoreciendo el aroma (*bouquet*) que enriquece el producto final. En todo este proceso de maduración se pierde entre un 30-35% del peso, debido a la hidrólisis de proteínas y lípidos, se generan una serie de compuestos responsables del sabor y del aroma como son aminoácidos, péptidos, aminos, ácidos grasos libres, aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres. Durante esta etapa se estabiliza definitivamente la conservación del alimento a temperatura ambiente.

Tras el salado, los hongos y las levaduras encuentran las condiciones ambientales propicias para su desarrollo y se convierten en la población dominante durante la maduración en bodega. A lo largo de esta etapa se establece una sucesión entre los principales géneros fúngicos presentes (Monte y col., 1986; Núñez, 1995). Durante el postsalado y hasta mediada la etapa de maduración en bodega, predominan las especies del género *Penicillium* (*P. commune*, *P. crustosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nalgiovense*, *P. verrucosum*, *P. glabrum*, *P. variable*, *P. roqueforti*), aunque éstas pueden aislarse en el jamón hasta el final del proceso. Estos organismos son desplazados en la última fase de maduración por las especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* (*A. versicolor*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. restrictus*) y *Eurotium* (*E. rubrum*, *E. cristatum*, *E. repens*) (Laich, 2001; Rodríguez y col., 2001). Este cambio de la población dominante se debe a una mayor disminución de la actividad de agua del producto. Además, durante esta etapa se produce una importante disminución de las bacterias micrococáceas.

Por tanto, en las últimas etapas del proceso de curado del jamón y cecina se ve favorecido el aumento de las poblaciones fúngicas xerófilas, entre las cuales se encuentra la especie *E. rubrum* objeto de nuestro estudio.

### **1.4. Posible uso industrial del género *Eurotium* en la elaboración del jamón y la cecina.**

Como ya hemos descrito anteriormente, durante las últimas etapas de curado del jamón ibérico y de la cecina, cuando la actividad de agua ( $a_w$ ) del producto es baja, la microbiota predominante en la superficie de estos productos son hongos xerófilos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Eurotium* (Rodríguez, 1995; Laich, 2001).

En la especie *E. rubrum* se han identificado metabolitos que por su actividad biológica principalmente insecticida, hacen interesante el uso de este hongo como biopreservante frente a la infestación por ácaros en la industria cárnica.

#### **1.4.1. Los ácaros.**

La contaminación masiva de los jamones y cecinas por ácaros, que supone cuantiosas pérdidas económicas en las industrias chacineras, ha impulsado el desarrollo de diversos métodos de control frente a las plagas de ácaros.

##### **a) Características generales de los ácaros.**

Los ácaros son insectos que pertenecen al grupo de los artrópodos quelicerados y se incluyen dentro de la clase Arácnida (Lamarck, 1815); subclase Acari (Nitzsch, 1818). Dentro de esta subclase se han descrito más de 30.000 especies, pero se estima que tan sólo corresponde al 5% del número real de especies que pueden existir (Evans-Walter y col., 1996). La sistemática de esta subclase es realmente complicada, por la gran cantidad y diversidad de especies existentes. Por ello, en la actualidad la taxonomía de los ácaros avanza conforme lo hace la microscopía, apoyándose fundamentalmente en



## Introducción

---

estudios morfológicos comparativos, que permiten establecer los criterios de clasificación de estos organismos (Hammen, 1980; Escudero y López, 2001).

La vida media de los ácaros adultos depende de las condiciones medio-ambientales y varía en función del hábitat que les rodea, oscilando desde algunos días hasta varios meses, existiendo diferencias entre el cultivo en laboratorio y en medio natural. Los factores más importantes, que afectan al desarrollo y a la reproducción de los ácaros son:

- Humedad relativa. Es el factor más crítico e influyente en su desarrollo. Los huevos pueden soportar un amplio rango, que oscila entre el 50 y 100%. A fin de mantener su equilibrio hídrico, los ácaros absorben el agua de la atmósfera circundante a través de la cutícula que les envuelve (Hart y Whitehead 1990; Arlian, 1992).
- Temperatura. La temperatura es un factor limitante en la fecundidad de los ácaros. El rango de supervivencia se encuentra entre -18 °C y 45 °C, aunque la T<sup>a</sup> óptima se estima entre 25-30 °C.

### **b) Distribución y hábitat.**

Los ácaros son cosmopolitas y su distribución y supervivencia depende de las condiciones ecológicas imperantes en cada región, principalmente de la temperatura y la humedad (Evans-Walter y *col.*, 1996). Abundan donde hay vegetación, entre los desechos en descomposición y en asociación con musgos y líquenes, donde pueden llegar a constituir el 70-90% del total de la población del suelo. Una gran cantidad de especies de ácaros constituyen plagas en distintos sectores agroalimentarios, tanto en productos de origen animal como vegetal, causando cuantiosas pérdidas económicas.

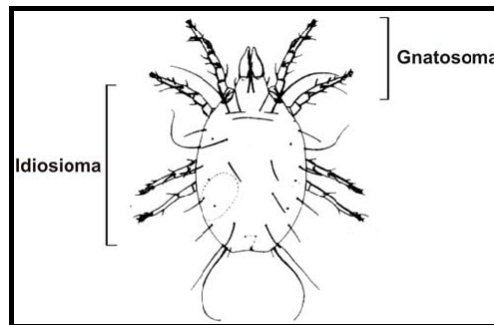
### **c) Morfología.**

Externamente los ácaros se caracterizan por la ausencia de segmentación, sin embargo, se pueden diferenciar dos regiones (**Figura 4**):

- a) El gnatosoma o región anterior del cuerpo, donde se localizan las piezas bucales o quelíceros con los que toman y/o trocean el alimento para

llevarlo al tubo digestivo y los pedipalpos (apéndices), que tienen función sensorial y prensil al sujetar la comida.

b) El idiosioma, región que constituye el tronco del cuerpo, donde se encuentran ancladas las patas. Además, en ambos sexos el orificio genital se sitúa en posición posteroventral en esta región.



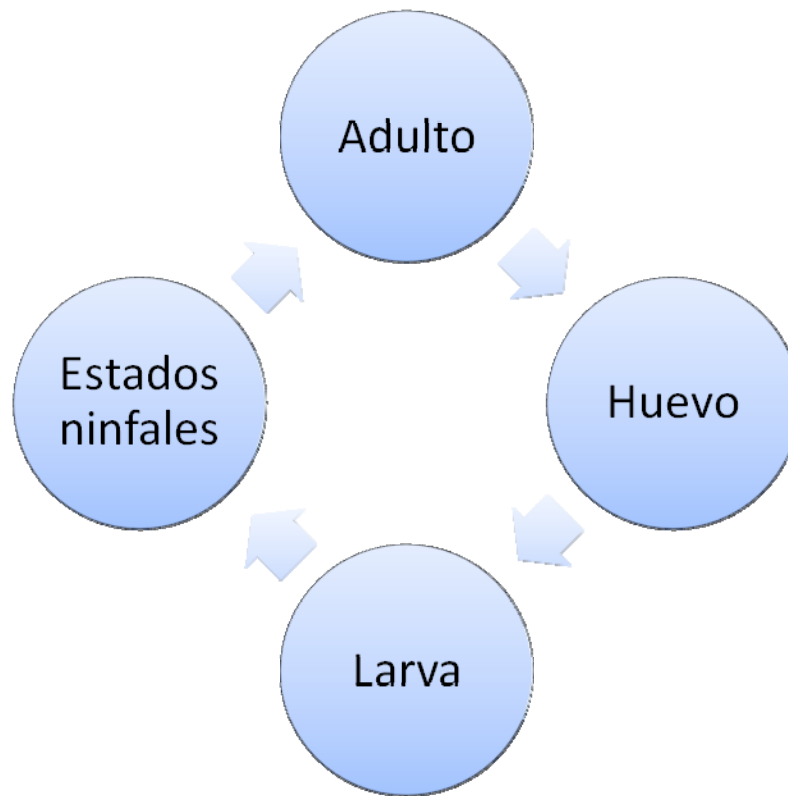
---

**Figura 4.** Partes del cuerpo de un ácaro. Modificado de Hughes (1976).

---

### **d) Ciclo biológico.**

El ciclo biológico de los ácaros consta de una serie de fases que se representan en la **figura 5**. Este comienza con el huevo, que al eclosionar origina una larva con tres pares de patas. Tras esta fase pasan por 2 o 3 estadios ninfales, según la especie (protoninfa, deutoninfa y/o tritoninfa). Después de la última fase ninfal emerge el adulto, macho o hembra. Todos los estadios ninfales, así como los adultos son octópodos y el paso de una fase a otra se realiza por un proceso de muda. No obstante, bajo condiciones naturales adversas (invierno), los ácaros pueden resistir retrasando su paso a la fase adulta, disminuyendo sus necesidades de agua y alimento o formando estados hipopiales que corresponden a un segundo estadio ninfal, que les permite resistir y diseminarse (Dusbabek, 1975; Bronswijk, 1981). Las poblaciones de ácaros normalmente presentan un mayor número de hembras que de machos (García y col., 1991).



---

**Figura 5.** Ciclo biológico de los ácaros. Modificado de Navarrete y *col.* (2000).

---

Los ácaros pueden ser ovíparos, ovovivíparos y vivíparos (Fain y Hérin, 1978). El tipo de reproducción es sexual, diferenciándose el sexo en los individuos adultos (Walzl, 1992; Witalinski y Walzl, 1995).

### **1.4.2 Los ácaros en los alimentos.**

Tradicionalmente, los ácaros han estado asociados a alteraciones en procesos de fabricación y almacenamiento de quesos (Wilkin, 1979). En Inglaterra, por ejemplo, son particularmente graves los ataques a los quesos tradicionales de Stilton, Cheshire y Cheddar, llegando a destruir el 25% del producto en ausencia de medidas de control (McClymont, 1983). Así mismo, en España, las industrias de queso y embutidos sufren elevadas pérdidas económicas asociadas con la alteración del producto por la infestación de ácaros.

Entre los factores que influyen negativamente en la producción del jamón curado y de la cecina, la contaminación por ácaros es considerada como el problema más importante.

### 1.4.3. Los ácaros del jamón y la cecina.

Los ácaros producen en secaderos y bodegas de jamón importantes pérdidas económicas. A pesar de ello, éstas son difícilmente cuantificables a causa del hermetismo de las industrias. Sin embargo, se sabe que un elevado porcentaje de dichas pérdidas se debe a devoluciones por contaminación acarina o a devaluaciones en la calidad del producto por idéntico motivo.

Por otro lado, los ácaros pueden producir alergias en personas sensibilizadas, provocando una gran variedad de síntomas alérgicos en los trabajadores de estas empresas, tales como procesos asmáticos, rinitis y dermatitis (Larche y *col.*, 1993; Armentia y *col.*, 1994).

Por tanto, los ácaros son considerados una plaga en la elaboración de alimentos cárnicos curados y uno de sus principales problemas sanitarios. En España se estima que entre el 70% y el 100% de las industrias dedicadas a la elaboración de embutidos sufren esta plaga, lo que supone grandes pérdidas económicas (alrededor del 10% del total de la producción), (Arnau y *col.*, 2001; Jorrín, 2001). En jamones de larga curación, como es el caso del ibérico, los ácaros forman las llamadas “cuevas o coqueras” que están repletas de ácaros y detritus, dando al jamón un aspecto, sabor y aroma desagradables. Además, dichas cuevas pueden ser aprovechadas por otros microorganismos que a su vez pueden producir putrefacción.

Guinelli (1950) fue el primero en constatar la presencia de ácaros en el jamón curado. En España, la principal especie acaricida identificada en el jamón curado, corresponde a *Tyroborus lini* (Estrada y *col.*, 1981). Posteriormente, se han identificado más de una decena de especies en los principales centros productores de jamón y cecina (Jorrín, 2001). Las especies predominantes en estos productos son: *Tyrophagus putrescentiae*, *Tyrophagus longior* y *Tyrolichus casei* (Jorrín y *col.*, 2001; Zumalacárregui y Díez, 2001). Morfológicamente estas tres especies, observadas a la lupa, son indistinguibles, siendo necesario un estudio morfológico a fondo para su identificación.

Las condiciones ecológicas de temperatura y humedad que se mantienen en la elaboración del jamón y la cecina, especialmente durante las etapas de secado y curado en bodega, favorecen el desarrollo de los ácaros. En los secaderos de jamón, a una temperatura de 29,5 °C, y una humedad elevada, se estima que la población de ácaros se duplica en menos de dos días (Sánchez, 2000). Además, su proliferación se ve favorecida por la presencia de hongos, que predominan durante estas etapas y que constituyen una fuente de alimento altamente apetecible para los ácaros (Rivard, 1961; Sinha y Mills, 1969; Rota, 1972).

Como consecuencia de la masiva proliferación de los ácaros sobre la superficie del jamón y de la cecina durante la etapa de curado, se forma una fina capa de polvo, comúnmente denominada "piojillo", de color ligeramente amarillo y textura sedosa (Guinelli, 1950). Los ácaros no sólo se mantienen en la superficie del producto, sino que también, llegan a colonizar el interior de la carne, al penetrar en ella a través de agujeros naturales, como son las fascias musculares, o de calado y por las grietas originadas durante el secado (Arnau y *col.*, 1987), interfiriendo en los procesos de curado y favoreciendo la instalación de otros hongos y bacterias perjudiciales para el proceso de curación.

### **1.5. Control de los ácaros del jamón y cecina.**

En general, la utilización de productos químicos ha sido el método más conocido, extendido y usado en el control de plagas. Esta lucha química ha creado una serie de problemas, fundamentalmente debidos a la selección de individuos resistentes a los productos utilizados y a la propia toxicidad de las sustancias para el consumo humano. En productos cárnicos, hasta hace poco tiempo, se han venido utilizando productos químicos para recubrir paletas y jamones con el fin de impedir el ataque de insectos y ácaros. Uno de esos productos era el ácido bórico, cuyo uso fue prohibido debido a su toxicidad.

Actualmente los insecticidas y acaricidas autorizados han de aplicarse dejando los locales sin jamones, paletas ni útiles de trabajo y con una serie de normas de seguridad. Además, una vez realizada la desinfección hay que tener en cuenta los tiempos de eliminación de los productos químicos utilizados.

Entre los acaricidas empleados destacan aquellos que contienen en su formulación principios activos de tipo piretroides sintéticos de nueva generación y otros productos como d-fenotrin, d-tetrametrina, butóxido de piperonilo, etc.

Los principales métodos físicos y químicos que se utilizan para el control de ácaros se muestran en la siguiente **tabla**:

Métodos	Medidas de control	Efecto	Referencia bibliográfica	
<b>Físicos</b>	Luz e infrarrojos	Repele los ácaros debido al carácter lucífugo de estos.	Arnau y Guerrero (1995).	
	Temperatura	Alta	Destruye los ácaros, pero no los huevos.	Arnau y Guerrero (1995).
		Refrigeración y congelación		Arnau y Guerrero(1995), Maraza y Persiana (1959).
	Radiaciones	Ultravioleta	Destruye todos los estadios del ciclo biológico del ácaro. Pero su instalación es compleja y costosa.	Escudero y López (2001).
		Ionizante		Arnau y Guerrero (1995).
	Microondas	Efecto acaricida.	Arnau y Guerrero (1995).	
	Ultrasonidos	Repele parcialmente los ácaros sobre la superficie del producto.	Escudero y López (2001).	
	Control termohigrométrico		Garcia (2004).	

Químicos	Plaguicidas	sólidos	Eliminación de todos los estadios del ciclo biológico de los ácaros. Causa graves daños en el producto al alterar el sabor y el olor.	Benz (1987), Arnau y col. (1987).
		gaseosos		Arnau y col. (1987).
	Atmósferas modificadas con CO <sub>2</sub> , CO, SO <sub>2</sub> , etc		Eliminación de todos los estadios del ciclo biológico de los ácaros. Algunos de estos compuestos no afectan al estadio de huevo.	Flores y col. (1989), Guerrero y Arnau (1995).
	Feromonas		Repele los ácaros temporalmente. Producen alteraciones organolépticas del producto.	Escudero y López (2001), Sonenshine (1984) y Kuwahara (1991).
	Aceites esenciales		Estas sustancias tienen diversos efectos (repelente, acaricida, etc.)	Sánchez (2002), Perrucci (1995), Escudero y López (2001), Sánchez y Castañera (2001) y Guerrero y Arnau (1995).
	Compuestos de origen vegetal (Piriproxifén, Halofenocida, etc)		Interviene en el desarrollo del ácaro	Rembold (1995), Kraus (1995), Hiisaar y col. (2001), Ishaaya y col. (1994), RohMid (1996) y Komblas y Hunter (1986).
	Compuestos de origen fúngico (Destruxinas, Beauverolide, Isariin, etc)		Poseen diferente actividad: Insecticida, citotóxica, antimicrobianos, etc.	Turner y Aldridge, 1983, Salgado, 1997, Bret y col., 1997, Chapman y Hall, 1999 y Berdy, 2000.

**Tabla 1.** Métodos físicos y químicos utilizados para el control de los ácaros en jamón y cecina.

Tanto los métodos químicos como físicos utilizados son métodos de implantación costosa, compleja, en ocasiones peligrosa y que pueden alterar las características organolépticas del producto. Además, hasta el momento no se ha encontrado un método 100% efectivo y sin riesgo para la salud humana.

Debido a las desventajas que presenta el uso de estos métodos, desde hace algunos años están surgiendo nuevos métodos de control, entre los que

destacan los métodos biológicos (Turner y Aldridge, 1983; Salgado, 1997; Bret y col., 1997; Chapman y Hall, 1999; Berdy, 2000).

Para establecer un mecanismo que controle o minimice la actividad de los ácaros en la elaboración del jamón y la cecina, se requiere partir del conocimiento de las especies predominantes que colonizan estos productos.

En el control de los ácaros se debe tener en cuenta una serie de aspectos que influyen directamente en el desarrollo de estos organismos. En primer lugar, el alto grado de adaptación que presentan los ácaros a los productos cárnicos, debido principalmente a su composición, rica en grasa y proteína, e igualmente, a la microbiota natural que se desarrolla en la superficie de estos productos y que son una fuente alimenticia asequible para ellos. Además, las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa bajo las cuales se secan y curan estos productos, son óptimas para que los ácaros proliferen. De hecho, al ser organismos altamente prolíficos, es más difícil establecer un mecanismo directo de control. Ante todo, el método que permita controlar la actividad de los ácaros o su erradicación deberá tener en cuenta la naturaleza de estos productos cárnicos y, por consiguiente, no podrá ir en contra del proceso de elaboración o introducir modificaciones que alteren las propiedades organolépticas del producto final (Arnau y Guerrero., 1995; Jorrín, 2001).

### **1.6. Control biológico de los ácaros: Experiencia previa en INBIOTEC.**

Desde el año 1997, en INBIOTEC se han desarrollado diversas líneas de investigación dedicadas al estudio de la microbiota fúngica de productos tradicionales de Castilla y León como son la cecina y el jamón. El principal objetivo de estos estudios ha sido el aislamiento y caracterización de hongos que por su capacidad acaricida (hongos entomopatógenos), puedan emplearse como vector de control biológico en las plagas de ácaros que afectan a los jamones y cecinas. Así, se han aislado de forma selectiva especies del género *Eurotium*, pertenecientes a la microbiota fúngica predominante en la superficie del jamón y cecina en las etapas tardías del proceso de curado de los mismos. Entre las distintas cepas aisladas se caracterizó una cepa de *E. rubrum*, que se



## Introducción

---

denominó C47, con actividad acaricida. Esta se determinó mediante ensayo "in vivo" con ácaros. Posteriormente se realizó la caracterización de la/s sustancia/s responsable/s de dicha actividad y se determinó que la actividad acaricida era debida a la producción de flavoglaucina por la cepa C47 (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral 2006), metabolito secundario descrito en la página 16.

Dado que este hongo podría ser un buen mecanismo de control biológico frente a las plagas de ácaros, centramos los estudios de esta Tesis Doctoral en la caracterización de la ruta de biosíntesis de flavogloglaucina, con el fin de optimizar la producción de esta sustancia acaricida, y en el desarrollo de un método de implantación de este hongo en piezas de jamón. Esto último se ha llevado a cabo en colaboración con una industria chacinera de la zona, intentando sustituir los hongos inocuos para los ácaros de la superficie del jamón por la cepa C47 de *E. rubrum* con actividad acaricida. Una de las ventajas de este método es que este hongo es un aislado natural de cecina y por tanto no altera las propiedades organolépticas de estos productos.

Por tanto este trabajo pretende analizar las múltiples variables y condiciones que permitan optimizar la implantación de un sistema de control biológico frente a las plagas de ácaros en la industria cárnica.

## 2. OBJETIVOS

---



Actualmente, los ácaros son considerados una plaga en la elaboración de productos cárnicos, tales como el jamón y la cecina. Representan el mayor problema sanitario para la comercialización de estos productos, nacional e internacionalmente. Tanto es así, que se estima que casi el 100 % de las industrias dedicadas al ramo, padecen esta plaga. Por ello, teniendo en cuenta la ausencia de un método de control completamente eficaz y permitido por la legislación internacional, nos hemos propuesto los siguientes objetivos, encaminados a ofrecer una alternativa a este problema.

1. Obtención y selección de cepas de *Eurotium rubrum* superproductoras de una sustancia acaricida, la flavoglaucina.

2. Estudio de la posible ruta biosintética de la flavoglaucina. Se llevaron a cabo tres estrategias para enfocar el problema:

- Obtención y selección de cepas de *Eurotium rubrum* no-productores de flavoglaucina.
- Búsqueda de genes implicados en la biosíntesis y complementación de mutantes no-productores. Para ello se llevó a cabo previamente la construcción de una biblioteca genómica de la cepa productora de flavoglaucina.
- Purificación y caracterización de posibles intermediarios de la biosíntesis de flavoglaucina, con el fin de obtener información acerca de los posibles enzimas implicados en la ruta biosintética.

3. Desarrollo de un sistema de control biológico de la infestación por ácaros, mediante la implantación de la cepa productora de flavoglaucina, *E. rubrum* C47, en la superficie de los jamones sin que ello afecte a las características organolépticas del producto final.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 3.1 Microorganismos utilizados.

### 3.1.1 Cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli* DH5 $\alpha$**  (Hanahan, 1983): Cepa empleada normalmente en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico. Permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $1 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Entre sus características está la de poseer una delección en el gen *lacZ*, que hace posible la selección de transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.
- ***Escherichia coli* SURE<sup>®</sup>**: Cepa empleada en experimentos de transformación y amplificación de ADN plasmídico inestable. Esta cepa carece de los genes (por ejemplo: *uvrC* y *umuC*) implicados en la reparación y delección de secuencias de ADN que poseen estructuras secundarias (ADN-Z) o secuencias repetidas invertidas, lo que aumenta la estabilidad de las mismas. Esta cepa permite la obtención de células competentes con alta eficiencia de transformación (hasta  $1 \times 10^8$  transformantes/ $\mu\text{g}$  de ADN). Entre sus características está la de poseer una delección en el gen *lacZ*, que hace posible la selección de transformantes que posean un plásmido capaz de originar la  $\alpha$ -complementación de dicha mutación.
- ***Escherichia coli* XL1- Blue MRA y *Escherichia coli* XL1- Blue MRA (P2 Lysogen)**. Ambas son cepas sensibles a la infección por el fago  $\lambda$ -DASH<sup>R</sup> II (Stratagene). La diferencia radica en que la cepa XL1- Blue MRA (P2 Lysogen) sólo puede ser infectada de forma efectiva por fagos portadores de inserto cuando  $\lambda$ -DASH II se utiliza como vector de clonación en la construcción de una biblioteca genómica. Por tanto, esta cepa sirve para estimar el número de fagos recombinantes.



### 3.1.2 Cepas fúngicas.

A continuación se describen las especies fúngicas empleadas en el presente trabajo:

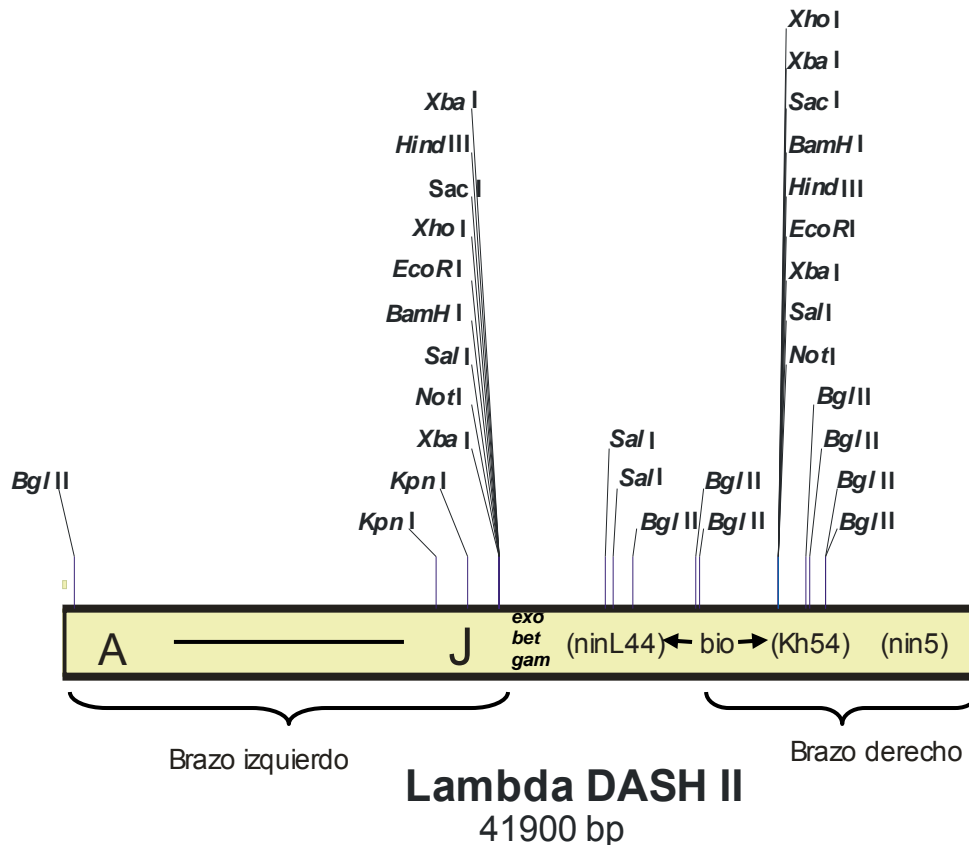
- ***Eurotium rubrum* C47**: Cepa aislada de la cecina, con una alta actividad acaricida. Caracterizada y catalogada siguiendo criterios taxonómicos, análisis RAPD y secuenciación de las secuencias ITS (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral 2006).

## 3.2 Vectores utilizados.

---

### 3.2.1. Vectores fágicos

- **Bacteriofago  $\lambda$ -DASH<sup>®</sup> II** (Stratagene, **Figura 6**). Es un vector utilizado para clonar fragmentos de entre 9 y 23 Kpb de ADN genómico. Entre los brazos del vector posee dos genes, *red* y *gam*, que impiden la infección de la cepa *E. coli* XL1 - Blue MRA (P2). Por ello la sustitución del fragmento central del vector por un inserto clonado permite la propagación de los fagos recombinantes resultantes de esta cepa. Además contiene los promotores de las ARN polimerasas T7 y T3 flanqueando los policonectores.



**Figura 6:** Mapa del vector  $\lambda$ -DASH®II

### 3.2.2. Vectores plasmídicos

- **pGEM-T Easy (Figura 7).** Vector de 3.018 pb comercializado por Promega, para la clonación de productos de PCR. Este vector se suministra digerido con EcoRV y con una timidina en el extremo 3', de forma que los productos de PCR generados con ADN polimerasas que añaden una desoxiadenosina en los extremos 3' tienen una elevada compatibilidad para ligar con el vector. Contiene promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6 flanqueando un policonector con sitios de restricción específicamente dispuestos para el uso del kit "Promega's Erase-a-Base System" para la generación de deleciones. Este policonector se encuentra dentro del gen *lacZ*, lo que permite la selección de recombinantes por su color blanco en medio con X-GAL (80 $\mu$ g/mL) e IPTG (0,05mM). Presenta también, un origen de replicación de *E. coli* (*colE1*) y el origen de replicación monocatenario

del fago *f1*, además de contener como marcador de selección el gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>R</sup>*).

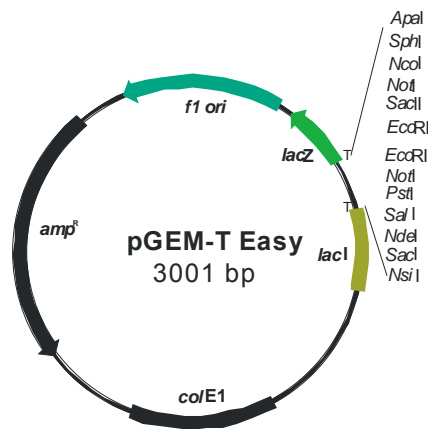


Figura 7

- **pULJL43 (Figura 8)**. Plásmido de 4,5 Kpb (Gutiérrez y col., 1991) derivado del vector pBluescript. Contiene el gen *ble* de *Streptoalloteichus hindustanus* (Austin y col., 1990), que confiere resistencia al antibiótico bleomicina y fleomicina, bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* que codifica para la isopenicilina N sintetasa. Contiene también la región terminadora del gen de la citocromo oxidasa-1 (*cyc1*), de *Saccharomyces cerevisiae*. El marcador de selección en *E. coli* es el gen de resistencia a ampicilina (*amp<sup>R</sup>*).

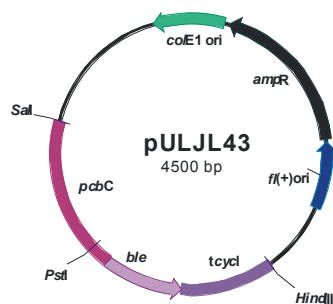


Figura 8

- **pAMPF21 (figura 9)**. Plásmido de replicación autónoma en hongos, derivado de pBluescript (Fierro y col., 1996). Con un tamaño de 9,8 Kpb, este plásmido contiene la región AMA1 de *Aspergillus nidulans*, lo

que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en hongos (Gems y col., 1991). Además posee el gen *ble* de *S. hindustanus*, que confiere resistencia a fleomicina, bajo el control del promotor del gen *pcbC* de *P. chrysogenum* y el terminador del gen de la citocromo oxidasa-1 (*cyc1*), de *Saccharomyces cerevisiae*. El marcador de selección en *E. coli* es el gen de resistencia a cloranfenicol ( $cm^R$ ).

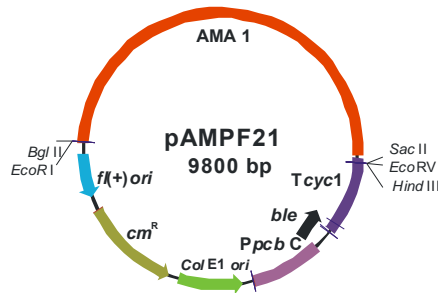


Figura 9

- **pAUR316 (figura 10).** Plásmido comercial (Takara) de 11,6 Kpb que contiene la región AMA1 de *Aspergillus nidulans*, lo que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en hongos (Gems y col., 1991). Además posee como marcador de selección en hongos el gen de resistencia a aureobasidina,  $aurA^R$ , de *A. nidulans* bajo el control del promotor del gen *pade1*, que codifica para la adenina deaminasa de la cepa “Japanese Sake Yeast Kyokai No. 701” y el terminador del mismo gen. El gen  $amp^R$  de resistencia a ampicilina sirve como marcador de selección en *E.coli*.

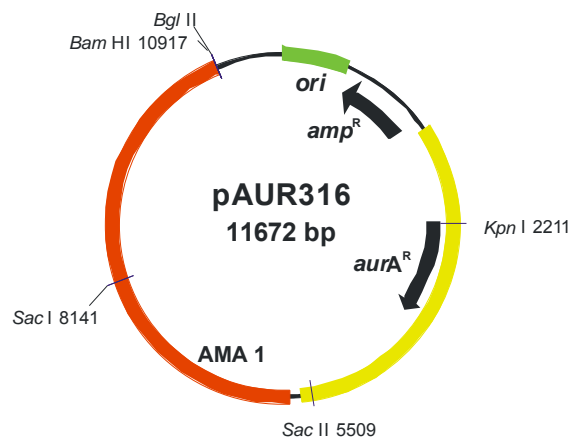
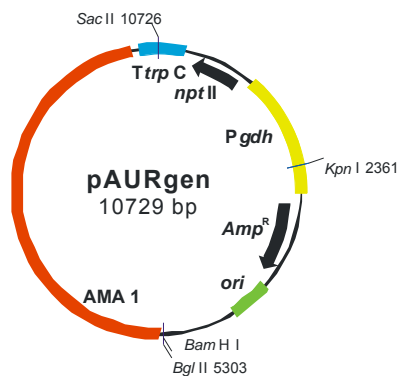


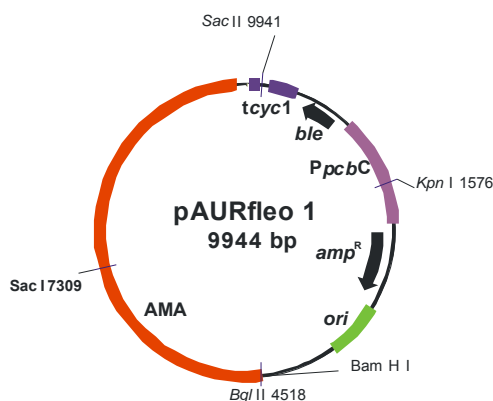
Figura 10

- **pAURgen (figura 11).** Plásmido de 10,7 kpb derivado del anterior (A. Gómez, INBIOTEC, comunicación personal). Se substituyó el gen *aurA*<sup>R</sup> de resistencia a aureobasidina por el gen de la neomicina transferasa II (*npt* II) del transposon Tn5 de eucariotas, el cual confiere resistencia a geneticina, bajo el control del promotor *Pgdh* de la glutamato deshidrogenasa de *P. chrysogenum* y el terminador del gen *trpC* de *A.nidulans*.



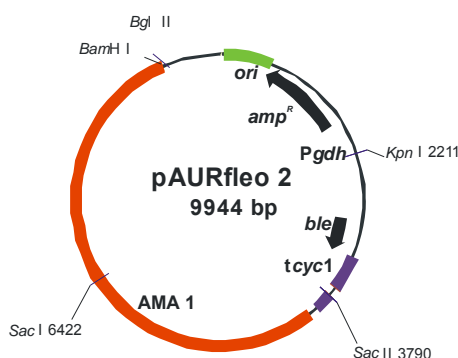
**Figura 11**

- **pAURfleo1 (figura 12).** Plásmido de 9,9 kpb derivado del pAUR316 (A. Gómez, INBIOTEC, comunicación personal). Se substituyó el gen *aurA*<sup>R</sup> de resistencia a aureobasidina por el gen *ble* de *S. hindustanus*, que confiere resistencia a bleomicina y fleomicina, bajo el control del promotor *pcbC* de *P. chrysogenum* y el terminador del gen de la citocromo oxidasa-1 (*cyc1*), de *S. cerevisiae*. Además contiene la región AMA1 de *A. nidulans*, lo que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en hongos (Gems y col., 1991) y el gen *amp<sup>R</sup>* de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E.coli*.



**Figura 12**

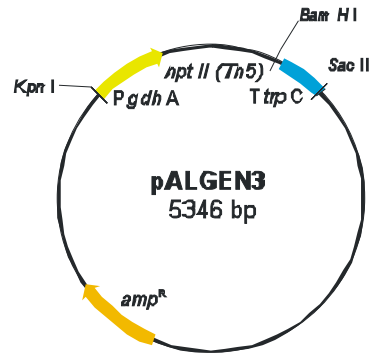
- **Vector pAURfleo2 (figura 13).** Plásmido derivado de pAUR316 (A. Gómez, INBIOTEC, comunicación personal). Se substituyó el gen *aurA*<sup>R</sup> de resistencia a aureobasidina por el gen *ble* de *S. hindustanus*, que confiere resistencia a bleomicina y fleomicina, bajo el control del promotor del gen *Pgdh* de la glutamato deshidrogenasa de *P. chrysogenum* y el terminador del gen de la citocromo oxidasa-1 (*cyc1*), de *S. cerevisiae*. Además contiene la región AMA1 de *A. nidulans*, lo que le confiere la capacidad de replicarse autónomamente en hongos (Gems y col., 1991) y el gen *amp*<sup>R</sup> de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E.coli*.



**Figura 13**

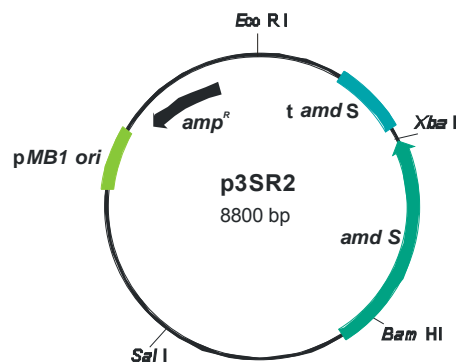
- **pALGEN3 (figura 14).** Plásmido de 6 Kpb (Rodríguez Sáiz M. y col., 2004), que contiene el gen (*nptII*) del Tn5 que confiere resistencia al

antibiótico geneticina que sirve como marcador de selección en hongos, bajo el control del promotor *PgdhA* de la glutamato deshidrogenada de *P. chrysogenum*. Contiene también el terminador del gen *trpC* de *A. nidulans* y el gen *amp<sup>R</sup>* de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E. coli*.



**Figura 14**

- **p3SR2 (figura 15)**. Plásmido de 8,8 Kpb (Hynes y col., 1983), que contiene el gen *amdS* que codifica para una acetamidasa de *A. nidulans*. Contiene también el promotor y el terminador del gen *amdS* y el gen *amp<sup>R</sup>* de resistencia a ampicilina como marcador de selección en *E. coli*.



**Figura 15**

### 3.3 Reactivos específicos para biología molecular.

#### 3.3.1. Enzimas.

Las enzimas de restricción mencionadas en esta memoria fueron suministradas por las casas comerciales: New England BioLabs, MBI Fermentas y Takara.

Otro tipo de enzimas utilizadas fueron: ADN ligasa del fago T4 (Roche), lisozima (Fluka Chemical & Biochemical Co); ARNasa y Ampli Taq™ ADN polimerasa (Sigma Chemical Co).

Todas las enzimas se utilizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

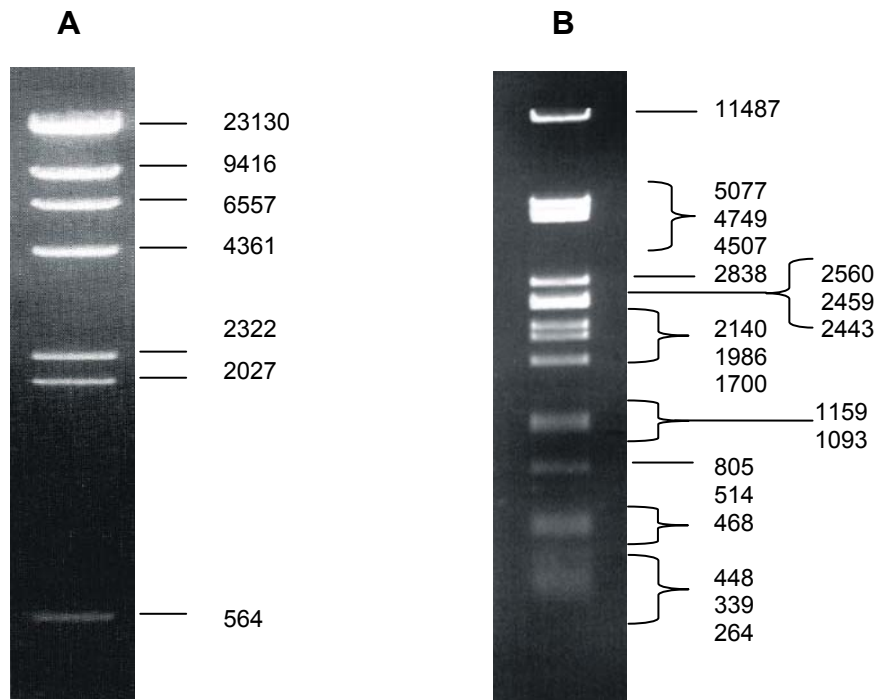
#### 3.3.2. Marcadores de peso molecular.

Los marcadores de peso molecular utilizados fueron:

**A.** ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III. La longitud, en pares de bases, de los fragmentos obtenidos tras la digestión del ADN son: 23.130; 9.416; 6.557; 4.361; 2.322; 2.027; 564 y 125 pb.

**B.** ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Pst*I. La longitud, en pares de bases, de los fragmentos obtenidos tras la digestión del ADN son: 11.509; 5.080; 4.649; 4.505; 2.840; 2.577; 2.454; 2.443; 2.140; 1.980; 1.700; 1.159; 1.093; 805; 516; 467; 448; 339; 265; 216; 210.





---

**Figura 16.** ADN del fago  $\lambda$  digerido con **(A)** *Hind* III y **(B)** *Pst* I

---

### 3.3.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Sigma Genosys y se describen en la siguiente tabla.

Uso	oligonucleótidos	Secuencia (5' - 3')
ITS <sub>s</sub>	Secuenciación	ITS1 5'-CCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
	Amplificación	ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Fago λ-DASH II	Secuenciación	T3-fago 5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
pGEM-T Easy	Secuenciación	M13-Forward. 5'-GTA AACGACG GCCAGT-3'
		M13-Reverse 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'
		T7-Universal 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
		SP6-Universal 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
pAUR316 pAURgen <sup>R</sup>	Secuenciación	pAUR sense 5'-GGAAAACTTCGTGCTATCACAAAA-3'
		pAUR antisense 5'-CACTGTCCAATGCCAGATTGAATA-3'
		pAUR-R 5'-ACTAGCGTGCTTGGCGTTAG-3'
Desaturasas	Amplificación	D1 5'-ATHACIGCIGGITAYCAYMG-3'
		D2 5'-CAYCAYMGITRIACIGAYAC-3'
		D3 5'-TGRTGRWARTTRTGIYAICCYTC-3'
	Secuenciación Amplificación	DES1A 5'-CGCATCTCGGTTGGATGGTCAT-3'
		DES1B 5'-TAGTTGTGGTAGCCCTCGCCCA-3'
		DES2A 5'-ACACCGACAAGGACCCCTACTCG-3'
DES2B 5'-CAGTGATCACATGGTCACGGGG-3'		
Policétidosintasas	Amplificación	PKS1 5'-GCYTAYGARGCYYTIGA-3'
		PKS2 5'-CCYGGYCGYATYAAYTA-3'
		PKS3 5'-RGCRCGR CARTARCCRTCRCG-3'
		PKS4 5'-RCCRGTRCCRAGCATYTC-3'
	Secuenciación Amplificación	PKS1A 5'-CCCAGTGCTTCGCATGACGTTG-3'
		PKS1B 5'-CGATACGGCTTTGGCTGGAGGT-3'
		PKS2A 5'-CAGCACTGCATCCCATGTCTT-3'
		PKS2B 5'-TCCTGGTCGCATTA ACTACTTC-3'

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se indica el nombre, la secuencia (5' a 3'). Siendo R=A+G, Y=C+T, M=A+C, W=A+T, H=A+T+C, I=INOSINA.

### 3.4 Medios de cultivo.

#### 3.4.1 Medios de cultivo para bacterias.

- **Medio Luria-Bertani (LB)** (Miller, 1972). Utilizado para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli*:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

## Materiales y Métodos

---

NaCl	10 g
------	------

Se ajusta el pH a 7,5 con NaOH 1N y se añade agua destilada hasta 1 litro. Para obtener medio sólido se añade agar (20 g/L). Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min.

- **Medio SOB:** (Hanahan, 1983): medio de cultivo para la preparación de células competentes de *E. coli*.

Bacto-triptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0,5 g

Disolver y añadir 10 mL de KCl 250 mM. Se ajusta el pH a 7,0 y se añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min. Antes de ser utilizado se añaden soluciones estériles de glucosa (0,36%) y MgCl<sub>2</sub> (10 mM).

- **Medio 2xTY.** Utilizado para la obtención de ADN plasmídico de *E. coli*:

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
Glicerol (87%)	4 mL

Se ajusta el pH a 7,2 con KOH y se añade agua destilada hasta 1 litro. Para obtener medio sólido se añade agar (20 g/L). Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 20 min.

- **Medio NZY.** Utilizado para la propagación del bacteriófago λ-DASH II en células de *E. coli* XL1-Blue MRA y *E. coli* XL1-Blue MRA P2.

N-Z Amina	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

Mg SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g
Agar	2% o 0,7%

Se ajusta el pH a 7.5 y se añade agua destilada hasta 1L. Se esteriliza a 121 °C durante 20 min. Para obtener medio sólido al 2% se añade agar (20 g/L) y para obtener medio semisólido (“Top agar”) se añade agar al 0,7% (7g/L).

### Suplementos de los medios de cultivo:

- **Ampicilina (amp):** se preparó a partir del fármaco Britapen (Laboratorio Reig Jofré, S.A., Barcelona) en solución acuosa concentrada a 200 mg/mL. Se utilizó a una concentración final de 100 µg/mL. Se conservó a -20 °C.
- **Cloranfenicol (cm):** se preparó en etanol a una concentración de 50 mg /mL y se utilizó a una concentración final de 30 µg/mL. Se conservó a -20 °C.
- **IPTG (1-isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido):** se preparó a una concentración de 100 mM en agua y para la selección de transformantes se usó a una concentración final de 0,05 mM. Se conservó a -20 °C.
- **X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido):** se preparó en solución concentrada a 40 mg/mL en N,N-dimetilformamida. En los experimentos de transformación de *E. coli* se utilizó a una concentración final de 80 µg/mL. Se conservó a -20 °C, protegido de la luz.

### 3.4.2 Medios de cultivo para hongos.

#### a) Medios de cultivo utilizados para la caracterización fenotípica de *E. rubrum*.

- **CY20S** (Pitt y Hocking, 1985): Este medio se utilizó también para el crecimiento y mantenimiento de *E. rubrum*.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g

## Materiales y Métodos

---

MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	200 g
Agar	15 g

Se ajusta el pH a 5,2 y se le añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min. Cuando se prepara en medio líquido no se adiciona agar.

- **CYA** (Pitt y Hocking, 1985):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KCl	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Solución de metales traza	1 mL
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g

Se ajusta el pH a 6,7 y se le añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

**Solución de metales traza:**

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g

Se le añade agua destilada hasta 100 mL y se esteriliza por filtración.

- **G25N** (Pitt, 1973, Pitt y Hocking, 1985):

Extracto de levadura	3,7 g
KCl	0,03 g
NaNO <sub>3</sub>	0,22 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,03 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,75 mg

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 g
Agar	15 g

Se añade agua destilada, y una vez el agar se ha disuelto, se añade glicerol al 25% (v/v), se ajusta el pH a 7,0 y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

- **MEA** (Pitt, 1973, Pitt y Hocking, 1985):

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g

Se ajusta el pH a 5,6 y se le añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

### **b) Medios de cultivo utilizados para la regeneración de protoplastos.**

- **Medio Mínimo de *Trichoderma* (MMT) + 1 M sorbitol (medio no selectivo):**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
Glucosa	20 g
Sorbitol	182,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
Solución de metales de <i>Trichoderma</i>	1 mL
Bactoagar	20 g

Se ajusta el pH a 5,5 con KOH y se le añade agua milli-Q hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

Cuando fue necesario seleccionar transformantes se sustituyó el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por acetamida 50 mM o acrilamida 50 mM como fuentes de nitrógeno. En el caso de la acetamida se añade además CsCl 12,5 mM como estabilizador.

Para 1 L de medio de cultivo se añadió posteriormente 2,4 mL MgSO<sub>4</sub> 1 M y 4,1 mL CaCl<sub>2</sub> 1 M.

## Materiales y Métodos

---

Las soluciones de  $MgSO_4$  y  $CaCl_2$  se esterilizaron en autoclave y la acetamida, el  $CsCl$  y la acrilamida por filtración.

### Solución de metales de *Trichoderma*:

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2,5 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,8 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,7 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,85 g

Se le añade agua milli-Q hasta 0,5 litros y se esteriliza por filtración. Se añade 1 mL /litro de medio de cultivo.

- **CMM (medio CM modificado, Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006):**

Sacarosa	200 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de malta	5 g

Se ajusta el pH a 5,5 y se le añade agua milli-Q hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

- **Cz-sorbitol**

Sacarosa	30 g
$NaNO_3$	2 g
$K_2HPO_4$	0,5 g
$MgSO_4$	0,01 g
Sorbitol	182,2 g
Agar	20 g

Se le añade agua milli-Q hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

- **SDA-sacarosa (Sabouraud Dextrose Agar de Difco)**

SDA	65 g
Sacarosa	200 g

Se le añade agua milli-Q hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

### c) Medios de cultivo para la producción de flavoglucina.

- **CY20SA** (Modificado de Pitt y Hocking, 1985):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NaCl	5 g
KCl	0,5 g
NaNO <sub>3</sub>	3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Extracto de carne (Bovril)	5 g
Sacarosa	200 g
Agar	15 g

Se ajusta el pH a 5,2 y se le añade agua destilada hasta 1 litro. Se esteriliza a 121 °C durante 15 min.

En determinados experimentos el extracto de carne (Bovril) fue sustituido por infusión de cerebro y corazón (Brain Heart Infusión Broth de Scharlau Chemie S.A.) en la misma proporción. Este medio de cultivo se denominó CY20S-BHI.

### Suplementos de los medios de cultivo:

- **Acetamida y acrilamida:** Se prepararon en solución acuosa a una concentración 5 M y se utilizaron a una concentración final entre 5 mM y 100 mM. Se conservaron a -20 °C.
- **Fleomicina:** Se preparó en solución acuosa a una concentración de 10 mg/mL y para la selección de transformantes se utilizó a una concentración final entre 10 µg/mL y 50 µg/mL. Se conservó a -20 °C.
- **Aureobasidina:** Se preparó en etanol a una concentración de 2 mg/mL y para la selección de transformantes se utilizó a una concentración final entre 3 µg/mL y 5 µg/mL. Se conservó a -20 °C.



## Materiales y Métodos

---

NOTA. Los reactivos empleados en los anteriores medios de cultivo fueron adquiridos en las siguientes casas comerciales: Difco Laboratories Inc.; Fluka Chemika-Biochemika; Oxoid Ltd; Panreac; Prolabo; Sigma-Aldrich Chemical Co.; Scharlau; Merck y Pronadisa.

---

**Geneticina:** Se preparó en solución acuosa a una concentración de 10 mg/mL y para la selección de transformantes se utilizó a una concentración final entre 40 µg/mL y 80 µg/mL. Se conservó a -20 °C.

### 3.5 Cultivo y conservación de los organismos.

---

#### 3.5.1. Crecimiento de las cepas bacterianas.

- ***Escherichia coli*.**

Para el crecimiento de las cepas de *E. coli* en medio líquido se utilizaron LB y 2xTY y cuando fue necesario su crecimiento en medio sólido se utilizó LB con una concentración de agar del 2% (p/v). Para la selección de transformantes, el medio se suplementó con los antibióticos adecuados a la concentración descrita anteriormente.

Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37°C y 250 rpm, durante 16-18 horas, en matraces lisos de 500 mL. Para la determinación del crecimiento de las bacterias, se calculó la turbidez del cultivo, valorándose la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) en un espectrofotómetro.

- ***E. coli* blue XL1-Blue MRA y *E. coli* blue XL1-Blue MRA (P2).**

Estas cepas son sensibles a la infección con el bacteriofago  $\lambda$  y se cultivaron en las siguientes condiciones: A partir de una colonia aislada se inocularon 10 mL de LB suplementados con MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mM y maltosa 0,2%. El cultivo se incubó a 37 °C y 250 rpm durante 4-5 horas de forma que la DO<sub>600</sub> no fuese superior a 1. Se recogieron las bacterias por centrifugación y se resuspendieron en una solución de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM de forma que la DO<sub>600</sub> final de la suspensión celular fuera igual a 0,5. Esta suspensión bacteriana se almacenó a 4 °C y se utilizó en un periodo de hasta 10 días desde su preparación, en experimentos de infección con  $\lambda$ .

### 3.5.2. Propagación de bacteriófagos.

La propagación del bacteriófago  $\lambda$  se realizó utilizando como hospedador las cepas *E. coli* XL1-Blue MRA P2 y *E. coli* XL1-Blue MRA, preparadas como se describe en el apartado anterior.

Las suspensiones fágicas se mantuvieron a 4°C en tampón SM <sup>(1)</sup> con un 0,1%(v/v) de cloroformo o bien a -70°C en tampón SM con un 7% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Cuando fue necesario utilizar diluciones de las suspensiones fágicas, estas se realizaron en tampón SM.

---

<sup>(1)</sup>Tampón SM: Gelatina al 0,01% (p/v); NaCl 100 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

---

#### a) Infección en medio sólido

La infección se llevó a cabo en tubos de 10 mL mezclando 200  $\mu$ L de células preparadas como se indica en el apartado anterior y 10  $\mu$ L de la suspensión fágica. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37 °C y posteriormente se añadieron 3 mL de medio NZY 0,7%. Con la mezcla se realizó una cobertera sobre placas Petri de 9 cm. de diámetro, con una base de NZY 2%. Las placas se incubaron a 37 °C durante 12 horas hasta la aparición de halos de lisis y se realizó el recuento de las unidades formadoras de placa (ufp).

#### b) Infección en medio líquido.

Este tipo de infección se empleó fundamentalmente para la obtención de ADN de bacteriófagos. Se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Malik y *col.* (1990).

- a) Se infectaron 10<sup>9</sup> células de las cepas de *E. coli* blue XL1-Blue MRA y *E. coli* blue XL1-Blue MRA (P2) preparadas según se describe en el apartado 3.5.1. con 10<sup>7</sup> ufp de la suspensión fágica y se incubaron en

dos etapas: una inicial a temperatura ambiente durante 10 minutos y otra posterior a 37 °C durante 30 minutos.

- b) Las células infectadas se inocularon en un matraz de 500 mL con 100 mL de NZY, maltosa 0,2% y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  10 mM. Se incubó a 37 °C y 250 rpm durante 4-6 horas, hasta que se observó un aclaramiento del cultivo y la formación de hilillos indicativos de que la lisis celular se había producido.

### **3.5.3. Crecimiento de las cepas de *Eurotium*.**

#### **A. Para la obtención de esporas.**

El procedimiento empleado para obtener esporas de las cepas de *Eurotium* se describe a continuación:

Se sembraron las cepas a partir de esporas conservadas en glicerol en medio CY20S y se incubaron a 28 °C durante 3 - 5 días.

Posteriormente, las esporas se recogieron mediante un hisopo, una pipeta Pasteur o con bolas de vidrio en glicerol al 40%.

La suspensión de esporas se conservó en 1 o 2 mL de una solución de glicerol al 40% a una temperatura de -20 °C o -80 °C.

#### **B. Para la producción de compuesto acaricida.**

Para la producción del compuesto acaricida (flavoglaucina) en medio sólido, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de esporas conservadas en glicerol, sobre la superficie del medio de producción (CY20SA/CY20S-BHI), sobre el que previamente se había colocado un disco de papel filtro. Esto facilita la posterior extracción del micelio con ayuda de una espátula, sin arrastrar medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 14 días a 28 °C.

### 3.5.4 Conservación de los organismos.

La conservación de las cepas bacterianas y fúngicas se realizó de diferentes formas, dependiendo del periodo de tiempo de almacenamiento requerido:

#### A. Cepas bacterianas.

- Colonias en medio sólido en placas de Petri selladas con Parafilm y a 4 °C. Se conservan durante 2-3 semanas.
- Suspensión bacteriana en glicerol al 40% (p/v) y a -20 °C. Se conservan durante 1 año.
- Liofilizadas. Se conservan durante varios años.

#### B. Cepas fúngicas.

En todos los casos se emplearon esporas.

- Hongos esporulados en medio sólido en placas de Petri selladas con Parafilm y a 4 °C. Se conservan durante 1 mes.
- Suspensión de esporas a -20 °C o - 80 °C en glicerol al 40% (p/v). Se conservan durante 2-3 años.
- Liofilizado de esporas. Se conservan a 4 °C. Se conserva durante varios años.

#### C. Bacteriofagos.

Para la conservación de la genoteca de *E. rubrum* C47 en el vector fágico  $\lambda$ -DASH II (Promega) se añadió a la suspensión fágica gelatina (concentración final de 0,01%) y DMSO (concentración final de 7%). La genoteca se repartió en alícuotas de 15  $\mu$ L en tubos eppendorf y éstas se conservaron a - 80 °C.

### D. Ácaros.

Los ácaros se mantuvieron en el sustrato descrito por Griffiths (1966) y George (1982), formado por la mezcla de levadura de cerveza y germen de trigo (El Clérigo, Madrid) a 25 °C y alto porcentaje de humedad (80-90%) en el ambiente. Cada 7 días se reemplazó el sustrato para conservar el cultivo fresco.

Se utilizaron placas de 50 mm de diámetro con el fondo cubierto de una capa no muy gruesa de sustrato, dentro de recipientes con el fondo cubierto de agua a fin de mantener un alto grado de humedad. Transcurridos, aproximadamente, 7 días se acumulan productos del metabolismo (excrementos) de los ácaros, por lo que es necesario reemplazar las placas que presentan mayor cantidad de desechos, por placas nuevas. Se deja siempre una placa que contenga ácaros en crecimiento, los cuales colonizan las nuevas placas. Así se mantiene un cultivo que se renueva constantemente y que contiene todas las fases del ciclo biológico de los ácaros.

### 3.6. Mutagénesis con nitrosoguanidina (NTG).

La nitrosoguanidina es un mutágeno químico que actúa sobre el ADN produciendo una alta tasa de mutación y que se adiciona a la suspensión celular que se pretende mutar a una concentración no superior a 0.5 mM. Debemos determinar la tasa de supervivencia de las células tratadas con el mutágeno a distintos tiempos de exposición para elegir la más adecuada., que debería ser del 80%-90%.

- Se inocularon 100 mL de Tris-maleato 0,1 M pH 9,0 con 1 mL de una solución de esporas conservadas a -20 °C. El cultivo se incubó durante 24 horas a 28 °C y 250 rpm.
- Se añadieron los siguientes aditivos al medio para que se iniciara la germinación de las esporas:

- Glucosa a una concentración final de 1,5%
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración final de 0,1%
- El cultivo se incubó durante 4 horas como mínimo a 28 °C y 250 rpm hasta que las células comenzaron a dividirse.
- Se dividieron los 100 mL en alícuotas de 20 mL en matraces de 250 mL. Se recogió una muestra de 1 mL como control no tratado con nitrosoguanidina. Las cinco alícuotas de 20 mL se trataron con nitrosoguanidina 0.5 mM y se incubaron a 250 r.p.m y a 28 °C durante diferentes tiempos entre 30 y 150 minutos.
  - Cada una de las muestras se trató con L-cisteína, (50 mg de L-cys por cada mg de nitrosoguanidina utilizado), para inactivar la nitrosoguanidina y se recogieron muestras de 1 mL de cada una de ellas, correspondientes a los distintos tiempos de tratamiento.
  - Cada muestra se centrifugó y las esporas se lavaron dos veces con L-cisteína a la misma concentración. Posteriormente se recogieron las esporas por centrifugación y se resuspendieron en 1 mL de glicerol al 40%.
  - La tasa de supervivencia se calculó determinando el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por mililitro de esporas, para lo cual se sembró un volumen determinado de las esporas recogidas en medio de cultivo CY20S y se incubaron durante 3-5 días a 28 °C.

### **3.7. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*.**

#### **3.7.1 Maxipreparaciones de ADN plasmídico.**

- Se inocularon 50 mL de medio 2xTY suplementado con el antibiótico adecuado, según el plásmido utilizado, con una colonia aislada de la cepa de *E. coli* empleada. El cultivo se incubó 12-14 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm.

## Materiales y Métodos

---

- Se centrifugaron las células a 10.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 5 mL de una solución de lisozima y TES<sup>(1)</sup> y se incubaron durante 5-10 minutos a 0 °C.
- Se añadieron 2,5 mL de NaOH/SDS<sup>(2)</sup> y se mezcló bien.
- Se incubó la mezcla a 65 °C durante 15 minutos y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente y después en hielo.
- Se añadió acetato potásico 3 M, pH 4,8 a una concentración final de 1 M y se incubó 5 minutos a 0 °C. A continuación se centrifugó la mezcla durante 20 minutos a 10.000 rpm para sedimentar los restos celulares.
- Posteriormente se precipitó la muestra con un volumen de isopropanol y se lavó el precipitado con etanol al 70%<sup>(3)</sup>. El precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de agua milli-Q y se trató con ARNasa<sup>(4)</sup> (10 µg/ mL durante 30 minutos a 37 °C). Posteriormente el ADN se extrajo mediante tratamientos con un volumen de fenol-CIA<sup>(5)</sup> hasta que la interfase estuvo limpia y por último se sometió la muestra a un tratamiento con un volumen de CIA<sup>(6)</sup>. La fase acuosa se volvió a precipitar con un volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y el precipitado se resuspendió en un volumen adecuado de agua milli-Q.

---

<sup>(1)</sup>TES: 5 mL EDTA 0,5 M pH 8; 1,25 mL Tris-HCl 2 M pH 8; 93,75 mL sacarosa 10,3%.

<sup>(2)</sup>NaOH/SDS: NaOH 0,3 M; SDS 2%.

<sup>(3)</sup>Etanol al 70%: Diluir etanol absoluto en agua al 70% (v/v).

<sup>(4)</sup>ARNasa: Stock preparado a 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM.

<sup>(5)</sup>Fenol-CIA: 0,5 volúmenes de fenol neutro pH 7,4:0,5 volúmenes de CIA. El fenol neutro se preparó mezclando 50 g de fenol, 50 mg de hidroxiquinoleína y Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, se dejó reposar hasta que se formaron dos fases. Se eliminó la fase superior y se añadió Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 hasta que se alcanzó un pH 7,4-7,5. Se conservó a 4 °C en un recipiente opaco.

<sup>(6)</sup>CIA (Cloroformo-isoamílico): Mezclar 24 partes de cloroformo y 1 de alcohol isoamílico.

---

### 3.7.2. Minipreparaciones de ADN plasmídico.

Se realizaron adaptando el método descrito por Zhou y *col.* (1990).

Se inocula una colonia de *E. coli* en un tubo eppendorf estéril con 1,5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado, según el plásmido de interés. Se incuba un mínimo de 6 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm. Posteriormente se sigue el siguiente proceso:

- Se centrifugan las células a temperatura ambiente y 14.000 rpm durante 30 segundos.
- Se descarta el sobrenadante, dejando aproximadamente 50-100 µL del mismo y se resuspenden las células en ese volumen.
- Se adicionan 300 µL de TENS<sup>(1)</sup> y se mezcla bien. Se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Se añaden 150 µL de acetato sódico 3M, pH 5,2.
- La mezcla se centrifuga durante 5 minutos a 14.000 rpm para sedimentar los restos celulares. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipita el ADN plasmídico añadiendo 900 µL de etanol absoluto. El precipitado se lava con etanol al 70%, se deja secar y se disuelve en 30-50 µL de agua mili-Q.

---

<sup>(1)</sup>TENS: 0,1 N NaOH; 0,5% SDS. Solución preparada en el momento de usarla en tampón TE: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; pH 8,0; en agua milli-Q.

---

### **3.8. Obtención de ADN total de *E. rubrum*.**

#### **3.8.1. Extracción de ADN total a gran escala.**

Este procedimiento fue descrito por Specht y *col.* (1982).

- Se inocularon matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio CY20S líquido con las esporas frescas procedentes de 5 placas crecidas en el mismo medio de cultivo sólido durante 3 a 5 días. El cultivo se incubó a 28 °C y 240 rpm durante 48 horas.



- Se recogió el micelio por filtración a través de un filtro de nailon (Nytal) estéril de 30  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Se lavó con 100 mL de NaCl 0,9% (p/v) y 100 mL de tampón A<sup>(1)</sup>.
- Se liofilizó el micelio y seis gramos del mismo se trituraron en un mortero con ayuda de N<sub>2</sub> líquido. El micelio triturado se añadió a un matraz de 500 mL con 100 mL de Tampón de Extracción<sup>(2)</sup> de ADN al que se le adicionó tolueno al 10% (p/v). Se homogeneizó la mezcla y se incubó a 25 °C y 100 rpm en un agitador orbital durante 48 horas.
- Transcurrido este tiempo se añadió un volumen de fenol neutro, se mezcló, se centrifugó durante 30 minutos a 8.000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Ésta se desproteinizó mediante extracciones sucesivas con un volumen de fenol-CIA (1:1 v/v) hasta que se obtuvo una interfase limpia y se recuperó la fase acuosa. Por último, se efectuó una nueva extracción con un volumen de CIA para eliminar los restos de fenol que puedan interferir en el uso posterior del ADN.
- Para precipitar el ADN se añadieron 0,7 volúmenes de isopropanol y se mantuvo durante 2-4 horas a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 4 °C durante 20 min a 8.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 5 mL de etanol al 70% (v/v) frío. Se secó y se resuspendió en 0,5 mL de TE.

---

<sup>(1)</sup>Tampón A: Tris-HCl 50 mM pH 8 con NaCl 150 mM pH 8,0 y EDTA 100 mM pH 8,0.

<sup>(2)</sup>Tampón de Extracción: Tampón A con SDS al 2% (p/v).

---

### 3.8.2. Extracción de ADN total a pequeña escala.

El procedimiento empleado es una modificación del método descrito por Cenis (1992).

- Se inocula con esporas un matraz indentado de 50 mL conteniendo 10 mL de medio CY20S y se incuba durante 48 horas a 28 °C y 240 rpm.
- Se recoge el micelio por centrifugación y se mezcla con 300  $\mu\text{L}$  de Tampón de Extracción <sup>(1)</sup>, 50  $\mu\text{L}$  de bolas de vidrio de 200-300  $\mu\text{m}$  de

diámetro (Sigma) y se trata con un homogeneizador cónico eléctrico durante 10 segundos.

- Se añaden 200  $\mu\text{L}$  más del mismo tampón y 500  $\mu\text{L}$  fenol-CIA, se mezcla por inversión y se incuba durante 30 min a 60 °C. Se centrifuga y se recupera la fase acuosa, la cual se trata con un 1  $\mu\text{L}$  de ARNasa (10 mg/mL) por cada 100  $\mu\text{L}$  de solución y se incuba a 37 °C durante 30 a 60 min.
- Se adiciona un volumen de fenol-CIA, se mezcla y se centrifuga a 13.200 rpm a temperatura ambiente. Se recupera la fase acuosa desproteinizada y se mezcla con un volumen de CIA. Se centrifuga a 13.200 rpm, a temperatura ambiente, durante 5 min más.
- Para precipitar el ADN se añade a la fase acuosa recuperada un volumen de isopropanol y se mantiene durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifuga durante 20 min a 13.200 rpm, se elimina el sobrenadante y el precipitado se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% frío. Se seca el precipitado y se resuspende en 20  $\mu\text{L}$  de tampón TE

---

<sup>(1)</sup>**Tampón de Extracción:** Tris-HCl 200 mM pH 8,5; EDTA 25 mM; SDS 0,5% (p/v); NaCl 250 mM.

---

### 3.9. Obtención de ADN a partir de bacteriófagos

#### 3.9.1. Obtención de ADN a partir de medio sólido

La extracción de ADN de los fagos recombinantes a partir de medio sólido se realizó según el siguiente procedimiento:

- Se infectaron células de *E. coli* XL1-Blue MRA con la suspensión fágica según se describe en el punto 3.5.2.a, de forma que se obtuviera una lisis confluyente.
- Sobre la placa lisada se añaden 10 mL de tampón  $\lambda$ -diluyente (diluent)<sup>(1)</sup> y se deja en agitación durante 1-2 horas.

- Se recoge el tampón con una pipeta, se transfiere a tubos de 10 mL y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
- Se recoge el sobrenadante y se añade 1 µL de ARNasa<sup>(2)</sup> (1 mg/mL) y 1 µL ADNsa<sup>(3)</sup> (1 mg/mL). Se incuba a 37 °C durante 15 minutos.
- Se añade un volumen de una solución de polietilenglicol 8.000 (PEG) 20% (p/v) y NaCl 2 M, se mezcla bien y se incuba 1 hora a 0 °C.
- Se recogen las partículas fágicas mediante centrifugación y se elimina completamente el sobrenadante.
- Las partículas fágicas se resuspenden en 0,5 mL de tampón TE (pH 8,0), se añaden 2,5 µL de SDS 20% y se incuban 5 minutos a 68 °C.
- Se añaden 10 µL de NaCl 5 M y se realiza una extracción con un volumen de cloroformo-fenol (v/v) y otra con un volumen de cloroformo.
- Se precipita la fase acuosa añadiendo un volumen de isopropanol e incubando a -70 °C durante 15 minutos. Tras centrifugar 15 minutos a 14000 rpm el precipitado se lava con etanol al 70%. Una vez seco se resuspende el ADN en 100 µL de tampón TE.

---

<sup>(1)</sup>λdiluente: Tris HCl (pH 7.5) 10 mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

<sup>(2)</sup>ARNasa: Stock preparado a 10 mg/mL en Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 15 mM. Las ADNsas presentes se eliminaron por ebullición de la solución durante 15 minutos y posteriormente se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente y se conservó en alícuotas a -20 °C.

<sup>(3)</sup>ADNsa: Solución a 10 mg /mL en agua milli-Q.

---

### **3.9.2 Obtención de ADN a partir de medio líquido.**

Se realizó el siguiente procedimiento:

- Se llevó a cabo la infección de las células siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2.b. Una vez producida la lisis celular, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm durante 20 minutos para sedimentar los restos celulares y se recogió el sobrenadante en un tubo limpio. Se añadieron ADNsa y ARNasa a una concentración de 10 µg/mL y se incubó durante 1 hora a 37 °C.

- Posteriormente se añadieron 10 g de PEG 8000, 4 g de NaCl y se calentó a 65 °C hasta la completa disolución del PEG, tras lo cual se incubó la mezcla 12-14 horas a 4 °C.
- Se centrifugó a 8000 rpm y 4 °C durante 40 minutos para precipitar los fagos, los cuales se resuspendieron posteriormente en 5,4 mL de tampón L3<sup>(1)</sup>.
- Para eliminar las proteínas se añadieron 600 µL de SDS al 20% y 50 µL de proteinasa K <sup>2)</sup> y se incubó la mezcla 1 hora a 37 °C.
- Se realizó una extracción con fenol y se precipitó la fase acuosa añadiendo 2,5 volúmenes de etanol frío y 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M pH 5,2. Tras centrifugar 15 minutos a 14000 rpm el precipitado se lavó con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió el ADN en el volumen adecuado de tampón TE.

---

<sup>(1)</sup>Tampón L3: 25 mM EDTA; 0,1 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5.

<sup>(2)</sup>Proteinasa K: Solución preparada en agua destilada a una concentración de 10 mg/mL.

---

### 3.10. Manipulación del ADN.

#### 3.10.1. Hidrólisis con endonucleasas de restricción.

Las enzimas de restricción necesarias para este trabajo se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los distintos proveedores, Takara, Roche y Fermentas.

El procedimiento general de la digestión de ADN con una endonucleasa de restricción es el siguiente. En un tubo Eppendorf de 1,5 mL se mezclaron los componentes de la reacción en el siguiente orden:

- Agua destilada estéril            hasta completar 20 µL
- Tampón de digestión 10x    1/10 del volumen total de la digestión.
- ADN                                    n ng de ADN
- Enzima                                2n unidades

Se incubó a la temperatura adecuada durante 2-3 horas y el ADN digerido se analizó por migración en geles de agarosa, tal y como se indica en el apartado siguiente.

### **3.10.2 Fraccionamiento de fragmentos de ADN por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.**

Este método fue descrito por Ausubel y *col.* (1987). Se añadieron 2,4 mL de una solución de sacarosa al 40% (p/v) a un tubo de 5 mL de ultracentrifuga y sobre esta se añadieron 2,4 mL de una solución de sacarosa al 10% (p/v), de forma que ambas soluciones quedaran en dos fases separadas. Se formó el gradiente dejando el tubo reposar horizontalmente 8 horas a 4 °C para que ambas fases se mezclaran. Posteriormente se depositaron sobre el gradiente 50 µg de ADN genómico de *E. rubrum* digerido previamente con *Sau3AI* y se separaron las distintas fracciones por una ultracentrifuga (Optima™ MAX Ultracentrifuge de Beckman) durante 18 horas a 4 °C y 30.000 rpm. Finalizada la centrifugación se recogieron fracciones de 500 µl del gradiente de sacarosa con la ayuda de un tubo capilar conectado a una bomba peristáltica. Se analizaron 20 µl de las fracciones recogidas en gel de agarosa al 0,4%. Las fracciones que tenían un tamaño adecuado (15-23 Kb) se precipitaron con acetato sódico 3 M pH 5,2 y etanol frío. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en el volumen adecuado de agua milli-Q.

### **3.10.3. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis.**

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas moléculas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), dependiendo de una combinación de factores como su carga, peso molecular y estructura tridimensional.

### **3.10.3.1. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.**

Para llevar a cabo la electroforesis del ADN en geles de agarosa, el porcentaje utilizado de ésta fue del 0,6-1,5% siguiéndose los métodos descritos por Sambrook y *col.* (1989). La concentración de agarosa a utilizar depende del rango de tamaño de los fragmentos de ADN que se quieren separar.

### **3.10.3.2. Extracción de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.**

Para realizar la extracción de ADN a partir de geles de agarosa se utilizaron dos métodos:

1) El primero de ellos es una técnica basada en la congelación rápida de la banda de agarosa denominado “freeze-squeeze” (Tautz y Renz, 1983). Es un método rápido y sencillo, con un porcentaje de recuperación de ADN de aproximadamente el 70%. Una vez separado el ADN mediante electroforesis, se corta la banda del gel procurando escindir la menor cantidad de agarosa posible. Se introduce el fragmento de agarosa en un microtubo de 1,5 mL, al que se ha practicado un orificio en el fondo que se ha obturado con algodón hidrófilo. El tubo perforado se coloca sobre un microtubo intacto y se congela a -80 °C durante 10-15 minutos. Posteriormente se centrifuga a 14.000 rpm durante 5-8 minutos y se recoge la suspensión acuosa que ha pasado a través del algodón. A continuación se lleva a cabo un proceso de extracción con fenol y/o cloroformo y se precipita con un volumen de isopropanol durante 15 minutos a -80 °C. Posteriormente se centrifuga a 14000 rpm durante 15 minutos, se lava el precipitado con etanol al 70% y se resuspende el ADN en el volumen adecuado de agua milli-Q.

2) El segundo método utilizado se basa en el kit comercial “GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit” (Amersham-Biosciences), que permite la purificación, aislamiento y concentración de productos de PCR y fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa o soluciones acuosas. Este kit emplea un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión de ADN de doble cadena (0,1-48 Kb) a la matriz de la

columna. Una vez que el ADN se ha unido a la matriz las proteínas y las sales son eliminadas mediante un proceso de lavado. Posteriormente el ADN es eluido con un tampón de baja fuerza iónica. Mediante este método la recuperación de ADN es aproximadamente del 60%.

### **3.10.4. Cuantificación y análisis de la pureza del ADN.**

La cuantificación de ADN se realizó por dos métodos diferentes según fue necesario que ésta fuera más o menos precisa.

#### **a) Por fluorescencia**

Las preparaciones de ADN se cuantificaron de forma visual en geles de agarosa. Para ello se sometió el ADN digerido o sin digerir a electroforesis en geles de agarosa que posteriormente se tiñeron con Bromuro de Etidio<sup>(1)</sup>. Se visualizó la intensidad de las bandas con luz UV y se cuantificó la cantidad de ADN comparando la intensidad de fluorescencia que poseen las bandas de la muestra con la intensidad de las cantidades conocidas del marcador de peso molecular. Para este tipo de cuantificación se tuvo en cuenta que la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN en las bandas.

---

<sup>(1)</sup>Bromuro de Etidio: Se prepara una solución de 10 mg/mL en agua y se conserva a 4 °C. Se diluyen 200 µL de bromuro de etidio de la solución concentrada en 2 litros de agua milli-Q.

---

#### **b) Por espectrometría.**

Cuando se precisó una cuantificación más exacta de la cantidad de ácidos nucleicos presentes en la muestra, esta se realizó por espectrometría, valorando la absorbancia de la muestra a 260 nm. La relación absorbancia/concentración de ADN en la muestra es la siguiente: 1 unidad de absorbancia (UA) a 260 nm corresponde a 50 µg/mL de ADN bicatenario. Además la relación  $A_{260}/A_{280}$  indica la pureza de la muestra. Una muestra pura de ADN presenta una relación  $A_{260}/A_{280} = 1,8$ .

### 3.10.5. Reacciones de modificación del ADN.

Para el empleo de las enzimas de modificación que se citan a continuación, se siguió el protocolo recomendado por cada casa comercial.

#### a) Desfosforilación de extremos 5' de fragmentos de ADN.

Se utilizó la Fosfatasa Antártica de BioLabs, enzima que hidroliza los extremos 5' fosfato del ADN, lo cual impide la formación de enlaces fosfodiéster entre los dos extremos de la misma molécula. Este tipo de tratamiento se aplica a los vectores de clonación que han sido linearizados por digestión con una endonucleasa de restricción para prevenir su autoligación. El ADN se calienta previamente 5 minutos a 65 °C para su completa disolución y separación de sus extremos. La reacción se efectúa entonces en el tampón específico de la enzima a una concentración final 1X y se incuba en presencia de la enzima ( $5 \times 10^{-3}$  unidades) durante 15 minutos a 37 °C.

#### b) Ligación de fragmentos de ADN.

Se utilizó la T4 ADN ligasa de Roche, enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster en presencia de iones  $Mg^{2+}$  y ATP como cofactores.

Para preparar la reacción de ligación se mezcla en un microtubo:

ADN del vector	50 ng
ADN del inserto	cantidad equimolecular o superior al vector
Tampón de ligación (10X)	1/10 del volumen final
Ligasa del fago T4	2 - 7 U
Agua destilada	completar hasta el volumen final (10-20 $\mu$ L).

Se incubó la reacción a 14-16 °C durante 12 horas y posteriormente se inactivó la ligasa por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos.

En la ligación de fragmentos de ADN se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- La relación vector/inserto varió según: i) si ambos extremos eran romos o cohesivos, ii) si las ligaciones direccionales tenían un extremo romo y



el otro cohesivo, iii) o ambos extremos cohesivos. Las relaciones moleculares variaron entre 1:3 y 1:15.

- La reacción se efectuó en el mínimo volumen posible (preferiblemente 10  $\mu$ L-20  $\mu$ L).

### 3.10.6 Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se preparó la mezcla de reacción para PCR de la siguiente forma:

Agua destilada	completar hasta 50 $\mu$ L
Tampón GoTaq polimerasa (10X)	1/10 del volumen final
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTPs mix	0,2 mM
GoTaq ADN polimerasa o Biotools	0,5 U
Cebador 1	0,2 $\mu$ M
Cebador 2	0,2 $\mu$ M
ADN molde	160 ng

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (T Gradient, Biometra) y se utilizó como enzima catalizadora de la reacción la enzima BIOTOOLS ADN polimerasa (Biotools). Cuando fue necesario clonar los fragmentos amplificados por PCR en vectores del tipo pGEM-T Easy (Promega) se utilizó la GoTaq ADN polimerasa (Sigma), la cual deja una desoxiadenosina en cada extremo 3', lo que permite clonar directamente los fragmentos amplificados por PCR en estos vectores para posteriormente ser secuenciados.

### 3.10.7. Rastreo de la biblioteca genómica construida en el vector $\lambda$ -Dash II por PCR.

Se utilizó el método descrito por Vaiman, (2002) con algunas modificaciones:

- 1- Se realiza en primer lugar una infección de 10 placas de Petri en medio sólido NZY (apartado 3.5.2a) con  $1 \times 10^6$  ufp de bacteriofagos.

2- Se añaden 2 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM a cada placa y se agita suavemente durante 10 minutos. Posteriormente se transfiere la solución fágica así obtenida a un microtubo y se guardan las placas a 4 °C.

3- Se recogen 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensión fágica, se pasan a un microtubo limpio y se tratan con proteinasa K<sup>(1)</sup> (concentración final 1 mg/mL) durante una hora a 65 °C. Se para la reacción tratándola a 100 °C durante 10 minutos.

4- Se recogen alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  de cada suspensión para usar en reacciones de PCR (volumen final de 20  $\mu\text{L}$ ) según el protocolo descrito en el apartado anterior. Se utilizan dos oligonucleótidos que amplifican un fragmento de ADN de tamaño conocido, correspondiente al gen que estamos rastreando.

5- Se lleva a cabo un proceso de electroforesis en gel de agarosa y se identifican las suspensiones fágicas donde la amplificación es positiva.

6- Una vez identificadas las placas a partir de las que se obtuvieron las suspensiones positivas, éstas se dividen en tacos (50 aproximadamente), colocando cada uno de ellos en un microtubo de 2 mL. Se añade 1,5 mL de  $\text{MgSO}_4$  10 mM y se incuba a 37 °C durante 30 minutos con agitación.

7- Se recogen 100  $\mu\text{L}$  de cada una de estas suspensiones, se pasan a un microtubo limpio y se tratan con proteinasa K<sup>(1)</sup> (1 mg/mL) como se describe en la etapa 3.

8- Se recogen alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  para usar en reacciones de PCR (volumen final de 20  $\mu\text{L}$ ) según el protocolo descrito en el apartado anterior.

9- Se analizan las reacciones de PCR en un gel de agarosa y se identifican aquellos tacos donde hubo amplificación positiva.

## Materiales y Métodos

---

10- Una vez identificados los tacos positivos, se recogen 10  $\mu\text{L}$  de las suspensiones obtenidas a partir de los mismos y se realizan diluciones seriadas (1/10) con  $\text{MgSO}_4$  10mM en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ .

11- Se lleva a cabo una nueva infección de células *E. coli* XL1-Blue MRA con 10  $\mu\text{L}$  de cada dilución siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2a.

12- Después de incubar las placas toda la noche se lleva a cabo el mismo procedimiento de los apartados 2 al 6.

13- Después de 3 o 4 rondas, la menor dilución positiva contiene aproximadamente 50-100 clones, los cuales se recogen de forma aislada mediante una pipeta Pasteur estéril y se introducen en un microtubo estéril con 100  $\mu\text{L}$  de tampón SM<sup>(2)</sup>.

14- Se agita en termomixer a temperatura ambiente durante 15 minutos; posteriormente se incuba durante 2-4 horas a 4 °C para facilitar la difusión de los bacteriófagos.

15- Se lleva a cabo una nueva infección en medio sólido (apartado 3.5.2a con 10  $\mu\text{L}$  de cada suspensión fágica en placas de Petri de 90 mm de diámetro

16- Se añaden a cada placa 2 mL de  $\text{MgSO}_4$  10mM y se agita suavemente durante 10 minutos.

17- Se transfieren las suspensiones fágicas así obtenidas a un microtubo limpio y se tratan con proteinasa K (concentración final 1 mg/mL) según se describe en la etapa 3.

18- Se recogen alícuotas de 1-5  $\mu\text{L}$  para usar en reacciones de PCR (volumen final de 20  $\mu\text{L}$ ) según el protocolo descrito en el apartado 3.10.6..

19- Se identifican así los fagos que producen una amplificación positiva. A partir de estos fagos se obtiene ADN mediante infecciones en medio líquido según lo descrito en el apartado 3.5.2b para su posterior análisis.

<sup>(1)</sup>Proteinasa K de *Tritirachium álbum* (Merck): Disolución en agua a una concentración de 1 mg/mL. Se conserva a - 20 °C.

<sup>(2)</sup>Tampón SM: Gelatina al 0,01% (p/v); NaCl 100 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5.

### 3.10.8. Secuenciación de ADN.

La secuenciación, tanto de productos de PCR como de ADN plasmídico, se llevó a cabo con ayuda del kit comercial “*BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (Applied Biosystems).

La preparación de las muestras se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor (Applied Biosystems, Foster City, CA USA) en un volumen final de 20 µL con la siguiente mezcla:

Solución		cantidad
BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit		2 µL
5x Sequencing buffer (BigDye®Terminator Kit)		2 µL
Cebador		3 pmoles
ADN molde	plásmido	500 ng
	Producto de PCR	50 ng
DMSO (dimetilsulfóxido)		1,4 µL
Agua milli-Q		Hasta 20 µL

**Tabla 3:** Mezcla de la reacción de secuenciación.

La reacción de secuenciación se realizó según el método descrito por Sanger y *col.* (1977) y se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler *Epgradient S* (Eppendorf AG.Hamburg, Germany). El método utilizado se detalla a continuación:

Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98 °C	1 minutos	1
Desnaturalización	98 °C	10 segundos	25
Alineamiento	50 °C	5 segundos	
Extensión	60 °C	4 minutos	

---

**Tabla 4:** Programa de la reacción de secuenciación.

---

El producto obtenido se purificó para eliminar los restos de la reacción (oligos, terminadores marcados, etc.) mediante precipitación con etanol, EDTA y acetato sódico. Una vez purificado el ADN fue sometido a electroforesis en el secuenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Systems) para la detección por fluorescencia.

---

<sup>(1)</sup>EDTA (ácido etilendiaminotetracético).

Nota 1: El BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit contiene los ddNTPs, dNTPs y la ADN polimerasa. No se conoce la composición exacta de la solución anterior, ni del Sequencing buffer (BigDye® Terminator Kit).

Nota 2: Los cebadores utilizados para secuenciar se indican en la tabla 2 de Materiales y Métodos.

---

Una vez terminada la electroforesis las muestras fueron analizadas con el software Secuencing Analysis 5.2, para posteriormente ser comparadas en las bases de datos que se detallan en el siguiente apartado.

### 3.10.9. Análisis informático de las secuencias.

El análisis y comparación de secuencias nucleotídicas se realizó mediante los siguientes programas informáticos y bases de datos:

- ADNstar (ADNstar Inc. Madison, Wisconsin, USA, 1993-95 Versión 3.06): El análisis de las secuencias obtenidas se realiza por alineamiento, empleándose el método Clustal V (Higgins y *col.*, 1991) que forma parte del paquete informático del programa ADNSTAR (ADNstar Inc. Madison, Wisconsin, USA).
- Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogene).

- Chromas. Versión 2.3 (Technelysium).
- Blast: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).
- [www.kazusa.or.jp/codon](http://www.kazusa.or.jp/codon).

### 3.11. Hibridación de ADN.

La transferencia a un soporte sólido de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con endonucleasas de restricción y sometidos a migración electroforética en geles de agarosa se denomina Southern blotting (Southern, 1975). Esta técnica se basa en la fragmentación *in situ* del ADN, desnaturalización del mismo y transferencia de los fragmentos en forma monocatenaria a la membrana, para su posterior fijación a la misma mediante luz UV.

El ADN que se va a analizar por hibridación se digiere con la enzima de restricción adecuada, se separa el ADN mediante electroforesis (apartado 3.10.3.) y se tiñe el gel con bromuro de etidio<sup>(1)</sup>. Posteriormente se coloca el gel sobre una membrana de nailon (Hybond-N<sup>TM</sup> de Amersham Pharmacia Biotech) en el equipo de vacío VacuGene XL, (Amersham Pharmacia Biotech), se lava con agua milli-Q y se trata con HCl 0,25 M, con solución desnaturalizante<sup>(2)</sup> y con solución neutralizante<sup>(3)</sup>, durante 20 minutos cada una. A continuación se lleva a cabo la transferencia con SSC 20X<sup>(4)</sup> durante 2 horas.

---

<sup>(2)</sup>Solución desnaturalizante: Para 1 litro de solución NaOH 20 g; NaCl 87,6 g.

<sup>(3)</sup>Solución neutralizante: Para 1 litro de solución Tris-HCl 121 g; NaCl 87,6 g.

<sup>(4)</sup>SSC 2X: 0,3 M NaCl; 0,03 M citrato sódico, pH 7,0.

---

#### 3.11.1. Marcaje de sondas de ADN.

El fragmento de ADN utilizado como sonda en procesos de hibridación debe ser marcado de tal forma que sea posible su posterior detección. Se utilizaron técnicas de marcaje no radioactivas, concretamente digoxigenina-11-dUTP.

El sistema de marcaje no radiactivo (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, 150 U), comercializado por la compañía Roche, emplea un hapteno esteroide

## Materiales y Métodos

---

(digoxigenina), la cual está unida al nucleótido trifosfato dUTP por un enlace éster. Las sondas marcadas con digoxigenina son generadas enzimáticamente por el método de cebado al azar (random primer) descrito por Feinberg y Vogelstein, (1983).

El procedimiento se realiza de la siguiente forma:

- Se obtienen 0,5-1,5  $\mu\text{g}$  de ADN del fragmento a marcar en forma lineal en un volumen máximo de 16  $\mu\text{L}$ .
- Se desnaturaliza el ADN hirviéndolo durante 10 minutos y se transfiere rápidamente a hielo durante 3-5 minutos. Posteriormente se añaden 4  $\mu\text{L}$  de DIG-High Prime (Roche).
- Se incuba la mezcla a 37 °C entre 16 y 24 horas y posteriormente se para la reacción congelando directamente o añadiendo 2  $\mu\text{L}$  de EDTA 250 mM, pH 8,0. Si la sonda no se utiliza inmediatamente se puede conservar a – 20 °C.

Para comprobar el marcaje de la sonda se realizan diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 y se carga 1  $\mu\text{L}$  de cada dilución sobre una membrana Hybond-N<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences). A continuación se fija el ADN mediante luz ultravioleta (UV-Stratalinker 2400, Stratagene) y se equilibra la membrana con tampón I<sup>(1)</sup> durante 1 minuto, en agitación.

Posteriormente la membrana se trata según lo descrito en el apartado siguiente y tras el revelado se observan las señales de hibridación en el film.

---

Tampón I<sup>(1)</sup>: 100 mM de ácido maléico; 150 mM NaCl, pH 7,5.

---

### **3.11.2. Hibridación.**

El proceso de hibridación se lleva a cabo una vez que se ha realizado la transferencia del ADN y se ha marcado la sonda. En el proceso completo de hibridación se pueden distinguir cuatro fases: prehibridación, hibridación, lavados y detección.

- La prehibridación tiene como finalidad bloquear los sitios activos de la membrana donde no se han unido ácidos nucleicos durante la transferencia y equilibrar ésta con el tampón de hibridación. Para ello se coloca la membrana en un tubo de hibridación de Amersham Biosciences, se añaden 10-20 mL de solución de hibridación <sup>(1)</sup> y se incuba a la temperatura adecuada (37 °C – 42 °C) durante 3 horas.
- La hibridación permite la unión de la sonda marcada al ADN fijado en la membrana. Para llevar a cabo la hibridación, se elimina la solución de prehibridación y se incuba la membrana durante al menos 8 horas con 20-50 mL de la misma solución, a la cual se le añade la sonda marcada y previamente desnaturalizada (15 minutos a 100 °C y 10 minutos en hielo). Finalizada la hibridación se recoge la sonda para su reutilización, conservándola a -20 °C.
- Los lavados, permiten la eliminación de las uniones inespecíficas que hayan podido producirse entre la sonda y el ADN.

El lavado de membrana se realiza de la siguiente forma:

- En primer lugar se lava brevemente en agitación, la membrana con solución de lavado I<sup>(2)</sup> a temperatura ambiente y posteriormente se lava con la misma solución durante 15 minutos a la temperatura de hibridación.
- A continuación se lava dos veces durante 15 minutos (cada una) con solución de lavado II<sup>(3)</sup> a la temperatura de hibridación y en agitación.
- Se trata la membrana con solución de lavado III<sup>(4)</sup> durante 5 minutos en agitación y se bloquea la membrana con tampón II<sup>(5)</sup> durante 30 minutos más.
- Se sustituye el tampón II por la solución de anticuerpos<sup>(6)</sup> y se deja al menos 30 minutos en agitación.
- Se elimina la solución de anticuerpos y se lava la membrana 2 veces con solución de lavado III durante 15 minutos en agitación.



## Materiales y Métodos

---

- La detección permite visualizar la unión de la sonda con los fragmentos de ácidos nucleicos, mediante autorradiografía.

Para llevar a cabo la detección, se elimina la solución de lavado y se trata la membrana con tampón III<sup>(7)</sup> durante 5 minutos en agitación. A continuación se trata la membrana con la solución CDP-Star<sup>(8)</sup> durante 5 minutos en oscuridad y con el lado de la membrana al que fue transferido el ADN hacia abajo. Se seca y envuelve la membrana en plástico y se expone a una película de autorradiografía (Hyper Film, Amersham Pharmacia Biotech) en un estuche con pantallas intensificadoras de calcio-tungsteno-fósforo, durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.

Posteriormente se revela la película mediante el siguiente tratamiento:

- Líquido revelador de rayos X Kodak<sup>(9)</sup> durante 1-5 minutos
- Solución de paro<sup>(10)</sup> durante 1 minuto.
- Líquido fijador Kodak<sup>(11)</sup> durante 5 minutos. La película de autorradiografía revelada se lava con agua y se deja secar.

---

<sup>(1)</sup>Solución de Hibridación: 5X SSC; 2% agente Bloqueante (Blocking Reagent de Roche); 0,1% lauroilsarcosina; 0,02% SDS; formamida 40%. La solución de hibridación puede ser reutilizada varias veces, en caso de ser así, se desnaturalizó de igual manera.

<sup>(2)</sup>Solución de lavado I: 2 X SSC y 0,1% SDS

<sup>(3)</sup>Solución de lavado II: 0,1 X SSC y 0,1% SDS.

<sup>(4)</sup>Solución de lavado III: Tampón I con Tween-20 al 0,3% (v/v).

<sup>(5)</sup>Tampón II: Tampón I más 1% de agente bloqueante (Blocking Reagent de Roche). Tampón I: 100 mM ácido maléico; 150 mM NaCl, pH 7,5.

<sup>(6)</sup>Solución de anticuerpos: diluir en una proporción 1:10.000 los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) en tampón II.

<sup>(7)</sup>Tampón III: Tris HCl 0,1 M pH 9,5; NaCl 0,1 M; MgCl<sub>2</sub> 50 mM. Se preparan dos soluciones: una con 1 M Tris-HCl, pH 9,5 y otra 1 M NaCl; 500 mM MgCl<sub>2</sub> ·6H<sub>2</sub>O. De esta forma las soluciones están 10X, mezclándose con agua destilada antes de usar como 1X.

<sup>(8)</sup>Solución CDP-Star: Se prepara diluyendo 100 veces en el tampón III, la solución del compuesto disodio 2- cloro-5- (4-metoxiespiro {1,2-dioxetano-3,2'- (5'- cloro) triciclo [3.3.1.1<sup>3,7</sup>] decan} -4-il)-1-fenilfosfato, quedando a una concentración final de 0,25 mM. Se almacena a 4 °C en oscuridad.

<sup>(9)</sup>Líquido revelador de rayos X: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:31 en agua milli-Q.

<sup>(10)</sup>Solución de paro: 2,5% (v/v) ácido acético.

<sup>(11)</sup>Líquido fijador: Diluir el preparado comercial de Kodak en proporción 1:9 en agua milli-Q.

---

## 3.12. Transformación de microorganismos

---

### 3.12.1. Transformación de *E. coli*.

#### 3.12.1.1. Preparación de células competentes de *E. coli*.

Se utilizó el método descrito por (Inoue y *col.*, 1990).

- Se sembraron 100  $\mu$ L de *E. coli* DH5 $\alpha$  o SURE conservadas en glicerol al 40% y a -80 °C en medio LB sólido y se incubó a 37 °C durante 12-14 horas para obtener colonias aisladas.
- Se inocularon 250 mL de medio SOB suplementado con glucosa al 0,36% y MgCl<sub>2</sub> 10 mM con 20-30 colonias aisladas de *E. coli* DH5 $\alpha$  o SURE. Se incubaron durante 15-16 horas a 25 °C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6.
- El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se recogieron las células por centrifugación a 4 °C.
- A continuación se resuspendieron las células, con suavidad y manteniendo siempre la temperatura alrededor de 4 °C, en 80 mL de tampón TB <sup>(1)</sup> frío y la suspensión se mantuvo durante 10 min en hielo.
- Se recogieron las células por centrifugación y se resuspendieron en 20 mL de tampón TB frío. A continuación se añadió DMSO a una concentración final del 7% y se mantuvieron las células en hielo durante 10 min.
- Las células así obtenidas se repartieron en alícuotas de 100-200  $\mu$ L, pudiendo ser utilizadas inmediatamente para transformar. Las alícuotas no utilizadas se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se conservaron a

- 80 °C.

---

<sup>(1)</sup>**Tampón TB (400 mL):** 1,21 g de PIPES 10 mM; 0,66 g de CaCl<sub>2</sub> 15 mM; 7,46 g de KCl 250 mM. Ajustar el pH a 6,7 con KOH 1 M y posteriormente añadir MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 55 mM. Filtrar y guardar a 4 °C.

---

### **3.12.1.2. Transformación de *E. coli*.**

El procedimiento utilizado ha sido el descrito por Hanahan (1983):

- Se descongelan las células competentes lentamente en hielo y se mezcla el ADN (entre 1 y 10 µL) con 100 µL de células. Se mantiene la mezcla en hielo durante 30 min.
- Se somete la mezcla de ADN-células competentes a un choque térmico por inmersión en un baño de agua a 42 °C durante 1 minuto.
- Se añaden 300 µL de medio LB y se incuba a 37 °C y 250 rpm durante 1 hora.
- Se siembra en placas de medio LB sólido suplementado con el antibiótico de selección para permitir únicamente el crecimiento de los clones transformados.

### **3.12.1.3. Análisis de los transformantes mediante PCR.**

Se coge con un palillo una colonia de *E. coli* y se disuelve en 50 µL de agua milli-Q. Se rompen las células sometiendo la muestra a 95 °C durante 10 minutos y posteriormente se usa este ADN como molde para una reacción de PCR tal y como se indica en el apartado 3.10.6.

### **3.12.2. Transformación de *E. rubrum*.**

La selección de los transformantes fúngicos puede conseguirse con la introducción de un marcador que confiera resistencia a un compuesto tóxico (por ejemplo un antibiótico) o mediante la complementación de una mutación presente en la cepa receptora de los plásmidos.

### 3.12.2.1 Obtención de protoplastos

- Los protoplastos se obtienen del micelio formado a partir de las esporas utilizadas como inóculo del cultivo, para lo cual se inocula una placa con medio CY20S con 100  $\mu$ l de una suspensión de esporas conservadas en glicerol al 40% y se incuba a 28 °C durante 7 días. Posteriormente se recogen las esporas añadiendo 2 mL de NaCl al 0,9% y se someten a un choque térmico a 50 °C durante 1 minuto y 30 segundos. Con las esporas obtenidas se inoculan 100 mL de medio CY20S con pH 5,5 y se incuba durante 24/48 horas, a 28 °C y 250 rpm.
- El micelio se recupera por filtración a través de un filtro de nylon "Nital" estéril de 30 nm de diámetro de poro y se lava con 100 mL de NaCl al 0.9% (p/v).
- Se seca el micelio entre papel de filtro y se resuspende en 10 mL de tampón TPP<sup>(1)</sup>. Se añade una mezcla de enzimas líticas (Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* de Sigma-Aldrich) disueltas en un volumen igual de tampón TPP a una concentración final de 10 mg/mL. La suspensión se incuba a 28 °C durante 1 hora y media, a 80 rpm. Posteriormente, se añade la enzima  $\beta$ -glucuronidasa de Sigma-Aldrich (1000 u/mL) previamente filtrada y se prosigue la incubación, bajo similares condiciones hasta que la mayor parte del micelio forme protoplastos.
- La formación de protoplastos se sigue por observación en el microscopio y una vez liberados se recuperan por filtración a través de un filtro de nylon "Nital" estéril de 10 nm de diámetro de poro. El filtrado obtenido se centrifuga durante 2,5 minutos a 2500 rpm para sedimentar los protoplastos. Estos se lavan 3 veces con solución KCM<sup>(2)</sup> y se sedimentan en las condiciones anteriores. El sedimento del último lavado se resuspende en 10 mL de tampón KCM y tras efectuar un recuento en cámara Thoma, los protoplastos obtenidos por centrifugación se resuspenden en 20  $\mu$ L de solución PCM<sup>(3)</sup> y se añade KCM hasta completar un volumen de 100  $\mu$ L.

Esta suspensión de protoplastos se mantiene a 4 °C hasta el momento de realizar la mezcla de transformación.

---

<sup>(1)</sup>TPP: KCl 0.5 M; tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 5.8. Antes de utilizar añadir MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a una concentración 0,1 M

<sup>(2)</sup>KCM: CaCl<sub>2</sub> 50 mM; KCl 0.6 M; MES 10 mM, pH 5.8.

<sup>(3)</sup>PCM: CaCl<sub>2</sub> 50 mM; MES 10 mM, pH 5.8; PEG 6.000 50% (p/v).

---

### 3.12.2.2 Transformación de protoplastos.

Se mezclaron, evitando formar burbujas:

- Suspensión de protoplastos.....100 µL (10<sup>7</sup> protoplastos/mL)
- ADN (5-10 µg).....1- 10 µL
- La mezcla de transformación se incubó durante 20 minutos en hielo.
- Posteriormente se añadieron 500 µL de tampón PCM y tras mezclarse bien, la mezcla de transformación se mantuvo a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.
- Finalmente se diluyó el polietilenglicol presente en el tampón PCM añadiendo 600 µL de tampón KCM.

### 3.12.2.3 Extensión en placas:

- Se prepara la base de las placas de transformación (90 mm de diámetro) extendiendo 10 mL de medio CY20S, MMT o CMM pH 5,2. Una vez solidificado el medio se extiende sobre él la mezcla de transformación, en forma de cobertera. Para ello se preparó en un tubo estéril de 10 mL la siguiente mezcla:

Mezcla de transformación.....100 µL

Medio CY20S, MMT o CMM pH 5,2 a 46-50 °C.....10 mL

El antibiótico de selección se utilizó a una determinada concentración según la cepa transformada, siguiendo los parámetros de la siguiente tabla:

Antibiótico	Medio de cultivo	<i>E. rubrum</i> C47	<i>E. rubrum</i> A <sub>3</sub> 13	<i>E. rubrum</i> T <sub>3</sub> 133
Aureobasidina	MMT	3 µg/mL	5 µg/mL	3 µg/mL
Fleomicina	CMM	50 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
Geneticina	CY20S	80 µg/mL	50 µg/mL	60 µg/mL

**Tabla 5:** Parámetros utilizados en la selección de transformantes de las cepas *E. rubrum* C47, *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133.

- La concentración de antibiótico adecuada para seleccionar los transformantes se determinó regenerando los protoplastos sin transformar en presencia de distintas concentraciones del antibiótico de selección.
- Se incuban las placas a 28 °C durante 5 días.

Para comprobar la viabilidad de los protoplastos, el buen funcionamiento de la transformación y detectar alguna posible contaminación, se prepararon placas control con los protoplastos sin transformar y sin antibiótico o con la concentración determinada de antibiótico de selección.

### 3.13. Técnicas cromatográficas

#### 3.13.1 Obtención del extracto crudo a partir de micelio de *E. rubrum* C47.

- Se parte del micelio de varias placas crecidas durante 14 días en medio CY20SA/CY20SBHI sólido. Las esporas se inoculan en placas en las cuales se ha colocado un papel de filtro sobre el medio de cultivo y una vez formado el micelio se recoge mediante raspado. El papel filtro facilita el raspado y evita que se arrastre medio de cultivo junto con el micelio.

- Se añade al micelio 25 mL de acetato de etilo y se extrae por agitación con vórtex durante 5 min, se centrifuga durante 10 min a 4.400 rpm y se recoge la fase orgánica. Este procedimiento se repite tantas veces como sea necesario hasta que el micelio queda casi en su totalidad libre de color amarillo.
- El extracto se concentra a vacío en rotavapor R-210 de Büchi hasta sequedad, y se resuspende en metanol. Los restos insolubles se eliminan por centrifugación a 4.800 rpm durante 15 min.

### **3.13.2 Cromatografía en capa fina (TLC).**

Se realizó utilizando como fase fija un cromatofolio de Silica-gel 60 (Merck) y como fase móvil: benceno: diclorometano (4:1). La fase fija se cargó con 1-5 µl de extracto crudo o con tacos de micelio impregnados con benceno: diclorometano (4:1) y se dejó migrar hasta que la fase móvil alcanza una altura aproximada de 2 cm del borde superior del cromatofolio.

Se reveló mediante un tratamiento con ácido fosfomolibdico (preparado al 20% en etanol) y posterior tratamiento térmico.

### **3.13.3 Cromatografía en fase normal-Sílica gel.**

- El extracto crudo se cargó en una columna de vidrio (Afora) para cromatografía con una altura útil de 800 mm, un diámetro interior de 40 mm y una capacidad aproximada de 980 mL, rellena con un lecho de sílica gel (Sigma) y previamente equilibrada con diclorometano. Esta matriz se utilizó para la separación de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos.
- Las muestras se eluyeron aplicando en primer lugar 1,8 litros de diclorometano a razón de 15 mL por minuto y posteriormente con 1,8 litros de diclorometanometanol en proporción 1:9, en ambos casos a un flujo de 12,5 mL por minuto. Las distintas fracciones se recogieron por separado.

- Cada una de las fracciones recogidas anteriormente se concentraron en el rotavapor hasta sequedad y se resuspendieron en 25 mL de acetona.

### 3.13.4 Cromatografía de filtración en gel.

- Se cargaron 2 mL de la muestra activa resuspendida en acetona en una columna de filtración en gel Bio-Beads S-X3 (Bio-Rad) de 120 x 1,5 cm, previamente equilibrada con acetona. Este gel está compuesto por una matriz polimérica (poliestireno-divinil-benceno) no polar, empleada en la separación, en función del tamaño molecular, de compuestos de naturaleza hidrofóbica de hasta 2000 daltons de peso molecular.
- La muestra se eluyó con acetona a un flujo constante de 1 mL/min, recogándose fracciones cada 5 min.
- Las fracciones se agruparon en función del espectro de absorción a 350 nm.

### 3.13.5 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los metabolitos secundarios se separaron mediante una columna de fase reversa Lichrospher 100-RP18 (Merk) de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y de dimensiones (250 x 4) mm, montada en un equipo Shimadzu modelo 10AD-VP con detector de fotodiodos, inyector automático modelo SIL-10ADVP y módulo controlador modelo SCL-10AVP. La producción de flavoglucina se cuantificó a 390 nm de longitud de onda.

Para realizar la elución se emplearon los siguientes solventes:

**Solvente A:** agua milli-Q.

**Solvente B:** acetonitrilo.



### a) Cromatografía líquida en HPLC semipreparativo.

- La fracciones de interés eluidas de la columna Biogel S-X3, se evaporaron y resuspendieron en el mínimo volumen de acetonitrilo que permite su solubilidad. Se centrifugaron durante 15 min a 13.200 rpm para eliminar cualquier posible partícula y se cargaron en una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 de 10  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y de dimensiones (250 x 10) mm (Merck).
- La cromatografía se realizó en un equipo Waters TM 650E compuesto por una bomba modelo 600 con inyección manual Reodhyne y con detector de longitud de onda fija modelo 486. La longitud de onda se preestableció a 260 nm.
- La elución se lleva a cabo a un flujo de 7,5 mL/min, empleando como fase móvil agua 100% (solvente A) y acetonitrilo 100% (solvente B).
- Bajo estas condiciones se recogieron todos los picos cromatográficos y se concentraron.

### b) Cromatografía líquida en HPLC analítico.

- Los metabolitos secundarios producidos por *E. rubrum* se eluyeron a partir del extracto crudo que se resuspendió en metanol. Por otra parte los picos obtenidos mediante el HPLC semipreparativo se resuspendieron en el mínimo volumen de acetonitrilo que permite su solubilidad. En ambos casos las muestras se centrifugaron durante 15 min a 13.200 rpm para eliminar las partículas insolubles y se inyectaron en una columna de fase reversa LiChrospher 100 RP-18 de 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro y de dimensiones (250 x 4) mm (Merck).
- La cromatografía se realizó en un equipo Shimadzu modelo 10AD-VP con detector de fotodiodos.

- La elución se llevó a cabo a un flujo de 0,7 mL/min, empleando como fase móvil, agua 100% (solvente A) y acetonitrilo 100% (solvente B).
- Bajo estas condiciones se recogieron dos picos cromatográficos puros, se concentraron mediante liofilización y fueron analizados por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear en colaboración con el Dr. Ángel Rumbero de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 3.14. Ensayos de la actividad acaricida.

#### 3.14.1 Ensayos en placa

Los siguientes ensayos se diseñaron en nuestro laboratorio con el fin de analizar el efecto acaricida del micelio de *E. rubrum* y de distintos metabolitos secundarios puros sobre la población de ácaros. El procedimiento seguido en cada caso es el siguiente:

##### a) Ensayo con micelios fúngicos.

Los ácaros del Orden Astigmata son capaces de alimentarse de micelio de manera artificial tal y como describen Okabe y Oconor, (2001).

- Se siembran 80  $\mu$ L de una suspensión de esporas (conservadas en glicerol al 40% a -20 °C o -80 °C) de la cepa de *E. rubrum*, cuyo efecto acaricida se quiere estudiar, en placas de 50 mm de diámetro con medio de cultivo CY20S-BHI. Sobre este se colocan discos de papel de filtro, que actúan como barrera frente a los ácaros, evitando el acceso directo de éstos al medio de cultivo.
- Las placas se incuban durante 10 días a 28 °C y con una humedad relativa, aproximadamente del 75%, de forma que el hongo crece formando un césped homogéneo.
- Una vez crecido el micelio se deposita sobre el mismo un número determinado de ácaros y la placa se sella con parafilm, que se

agujerea con dos o tres pequeños orificios para evitar se salgan los ácaros y evitar su muerte por falta de oxígeno.

- Las placas de ensayo con los ácaros se mantienen durante 15 a 21 días a 25 °C y con un 90% HR, tiempo durante el cual se realiza periódicamente un recuento de los ácaros vivos y muertos.

### **b) Ensayo con muestras líquidas.**

Este ensayo ha sido diseñado con el fin de determinar la actividad acaricida de metabolitos secundarios puros de *E. rubrum*. Este ensayo se realizó con muestras solubilizadas en metanol.

- Las muestras a ensayar se solubilizan en el menor volumen posible de metanol.
- Con esta solución se impregnan entre 80 y 100 mg de sustrato alimenticio para ácaros, previamente depositado en una placa de Petri de 50 mm de diámetro.
- La comida impregnada se evapora al vacío para eliminar el solvente orgánico y posteriormente se humidifica con agua durante 24 horas a 4 °C en una cámara de humidificación.
- Una vez preparada la comida, impregnada con la muestra a evaluar, se deposita un número determinado (normalmente entre 10 y 30 individuos) de ácaros sobre la misma y las placas son selladas con parafilm y el ensayo se lleva a cabo del mismo modo que en el caso anterior.

### **3.14.2 Ensayos experimentales en industrias chacineras.**

#### **3.14.2.1. Ensayos de inoculación en condiciones controladas.**

Se llevó a cabo un estudio de implantación de *E. rubrum* sobre la superficie del jamón en condiciones controladas ( $T^a$  y humedad), en laboratorio, de forma que se pudieran establecer las condiciones óptimas de implantación del hongo y posteriormente poder aplicarlas en la industria chacinera. Los

jamones se dejan en condiciones controladas el mínimo tiempo posible para que el hongo se implante, y posteriormente se pasan al secadero natural para continuar el proceso normal.

Para mantener unas condiciones estables de temperatura y humedad, se acondicionó una cámara refrigeradora de INBIOTEC. En ella la temperatura fue de 18 °C y la humedad relativa del 70-80%.

La limpieza previa de la cámara, se realizó limpiando el suelo y las paredes con lejía. La entrada a la cámara del personal de INBIOTEC encargado de la inoculación y seguimiento de la implantación en los jamones se hizo siempre con bata, gorro, mascarilla y calzas.

Los jamones se inocularon mediante pulverizado manual de una solución en NaCl 0,9% de esporas de *E. rubrum* a una concentración final de  $10^7$  esporas/mL. La pulverización se realizó durante 5 días consecutivos con suspensiones de esporas frescas a las que se les dió previamente un choque térmico de 3 minutos a 50 °C para inducir la germinación.

Como control de la dispersión y viabilidad de las esporas, se colocaron placas de cultivo bajo los jamones tratados y se incubaron 7 días a 28 °C. Tras el tratamiento se observó periódicamente la evolución de los jamones. A los diez días de la administración de la primera dosis de esporas, se tomaron muestras de los hongos que habían crecido en la superficie de los jamones mediante frotis con un bastoncillo estéril y siembra directa en medio de cultivo Power. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 días y la presencia de *Eurotium* se estableció por observación morfológica de los hongos desarrollados sobre las mismas.

### **3.14.2.2. Ensayos de inoculación en condiciones naturales.**

Se intentó implantar un sistema de control biológico de las plagas de ácaros por *E. rubrum* en un número determinado de jamones de una industria chacinera de la zona (embutidos Rodriguez S.A.). Las etapas de actuación de las que constó el ensayo fueron las siguientes:

### a) Preparación de material biológico: Esporas de *Eurotium rubrum*.

- Las esporas de *E. rubrum* se obtuvieron mediante tandas sucesivas de siembra y recogida de esporas. La cepa silvestre *E. rubrum* C47 se creció sobre medio de cultivo CY20S durante 7-9 días a 28 °C.
- La recogida de esporas se realizó en condiciones estériles, mediante asa de siembra y con solución salina al 0,9%.
- La viabilidad de las esporas y la ausencia de contaminación de cada lote se llevó a cabo por observación al microscopio y siembra de diluciones seriadas de cada lote en placas de medio de cultivo CY20S.
- Todos los lotes de esporas presentaban una concentración de esporas viables entre 1 y  $3 \times 10^9$  esporas/mL.

### b) Inoculación de los jamones

Se llevaron a cabo tres inoculaciones de los jamones con las esporas de la cepa *E. rubrum* C47 obtenidas anteriormente. Entre cada una de las inoculaciones transcurrieron 15 días aproximadamente.

La inoculación se realizó mediante dos sistemas: Inmersión y pulverización.

#### **PROCEDIMIENTO DE INMERSIÓN:**

En cada tanda de inoculación se prepararon 60 litros de suspensión de esporas para el tratamiento de inmersión, añadiendo las siguientes cantidades de cada componente:

Agua destilada	59 litros
Sal	540 g
Glicerol	700 mL (87%)
Esporas	60 mL ( $10^9$ esporas/mL)

Se introdujeron manualmente, cada uno de los jamones en un contenedor cilíndrico donde se había preparado la suspensión de esporas y posteriormente se fueron colocando en los carros donde los jamones siguieron el proceso de curado.

### **PROCEDIMIENTO DE NEBULIZACIÓN:**

Para el tratamiento de nebulización se prepararon 15 litros de suspensión de esporas (manteniendo las proporciones anteriores) que se dispusieron en el tanque de una maquina pulverizadora propiedad de la empresa chacinera donde se desarrolló el ensayo.

El proceso de pulverización se realizó durante 2 horas y se empleó un volumen final de suspensión de esporas de unos 8 litros.

#### **c) Toma de Muestras**

La toma de muestras se realizó haciendo un examen visual de la presencia de ácaros y de hongo y tomando muestras de cada jamón con un bastoncillo impregnado en glicerol al 40%, frotando sobre una superficie de 1 cm<sup>2</sup> aproximadamente. El bastoncillo se almacenó en el tubo de 1,5 mL y se conservaron a 4 °C, hasta su análisis en el laboratorio.

#### **d) Análisis de Muestras**

Las muestras se analizaron haciendo diluciones seriadas en NaCl al 0,9% para posibilitar el recuento de colonias aisladas sobre un medio de cultivo general. Las placas sembradas con las muestras se dejaron incubar 7 días a 28 °C y transcurrido este tiempo se llevó a cabo el recuento de las colonias de cada uno de los diferentes microorganismos que aparecieron.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## **4.1 Selección de mutantes de *E. rubrum* C47 no-productores y superproductores de flavoglauцина.**

El primero de nuestros objetivos al comenzar este trabajo era la obtención de cepas de *E. rubrum* afectados en la producción de la sustancia acaricida. Así, nos planteamos obtener mutantes superproductores de flavoglauцина, con el fin de utilizarlos en el desarrollo de un método para el control biológico de las plagas de ácaros en el jamón y la cecina.

Por otro lado y dado que en la bibliografía existente no hay datos sobre la ruta de biosíntesis de este compuesto, decidimos obtener también mutantes no-productores de flavoglauцина con el fin de caracterizar en el futuro los genes implicados en dicha ruta, por complementación de estos mutantes.

### **4.1.1 Mutagénesis de *E. rubrum* C47 con nitrosoguanidina.**

Para obtener tanto los mutantes superproductores como no-productores de flavoglauцина elegimos como agente mutagénico la nitrosoguanidina (NTG). Este compuesto actúa como un agente alquilante, reaccionando directamente con el ADN y originando cambios químicos en las bases nucleotídicas o produciendo apareamientos erróneos, aunque el mecanismo molecular exacto de la acción mutagénica de la NTG no se conoce todavía.

La NTG es uno de los compuestos mutagénicos más potentes y resulta muy efectivo para aplicaciones prácticas, ya que se obtienen, en condiciones óptimas, un gran número de mutantes con una tasa de mortalidad intermedia (Díaz Mínguez y col., 1988).

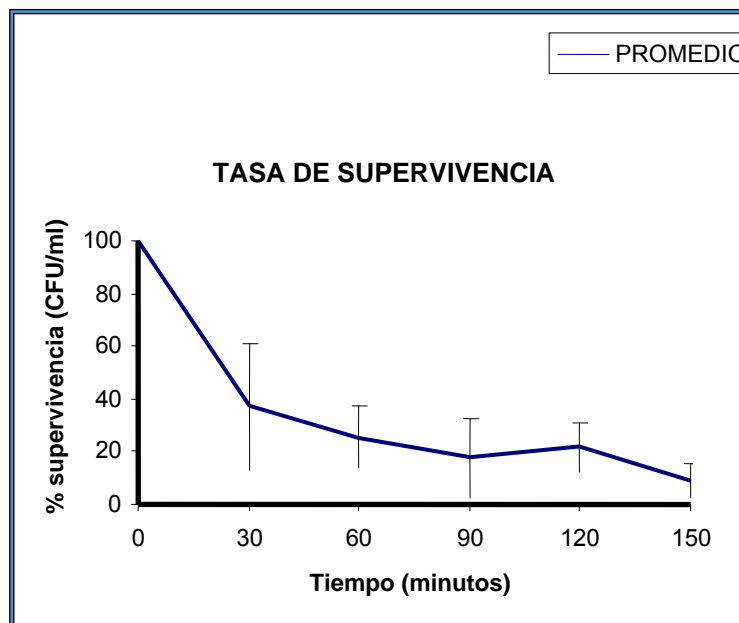
Una vez seleccionada la NTG como agente mutagénico se trató la cepa de *E. rubrum* C47 con este compuesto a una concentración 0,5 mM tal y como se describe en el apartado 3.6 de Materiales y Métodos.

Esporas de *E. rubrum* C47 se sometieron a diferentes tiempos de exposición a NTG, calculándose posteriormente la viabilidad de las esporas mutadas. Para ello se sembraron por triplicado placas de Petri de 90 mm de diámetro con 100  $\mu$ L de las suspensiones de esporas tratadas en el medio de cultivo CY20S y se incubaron durante 5 días a 28 °C. Posteriormente se llevó a

## Resultados y Discusión

---

cabo el recuento de las colonias viables. Los resultados obtenidos se muestran en la **Gráfica 1**.



---

**Gráfica 1:** Tasa de supervivencia de las esporas de *E. rubrum* C47 a los 30, 60, 90, 120 y 150 minutos de exposición a NTG.

---

Los datos obtenidos pusieron de manifiesto que a los treinta minutos de exposición a NTG la tasa de supervivencia de las esporas era de un 40% aproximadamente y que dicha tasa disminuía hasta un 20-30% a los noventa minutos de exposición. A partir de este momento y hasta el final del tratamiento, la tasa de supervivencia, se mantenía prácticamente constante. A los ciento cincuenta minutos de tratamiento la tasa de mutación es elevada por lo que se produce una gran reducción de la tasa de supervivencia. Por tanto concluimos que el rango de tiempo óptimo de exposición a NTG estaba entre 30 y 120 minutos, en el que el 20-40% de las esporas son viables.

### 4.1.2 Selección de mutantes.

Con el fin de seleccionar los mutantes afectados en la producción de flavoglucina, tanto superproductores como no-productores, se sembraron 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  de las suspensiones de esporas, expuestas durante 30, 60, 90 y 120 minutos a NTG, en placas de 90 mm de diámetro con CY20S y se incubaron a 28 °C durante 5-7 días. A partir de estas placas se

obtuvieron colonias aisladas, que se sembraron en un medio de cultivo de producción de flavoglauca (medios de cultivo CY20SA/CY20S-BHI) y se incubaron 14 días a 28 °C.

La selección de los mutantes se llevó a cabo en un primer momento por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando tacos de agar con micelio obtenidos a partir de dichas placas e impregnados en una solución de diclorometano y benceno tal y como se describe en el apartado 3.13.2 de Materiales y Métodos.

La técnica de cromatografía en capa fina permite separar compuestos según su polaridad, de forma que en solventes orgánicos los compuestos de menor polaridad migran más sobre la matriz sólida que los más polares. Mediante el cálculo del factor de retención, <sup>(1)</sup>R<sub>f</sub>, se puede determinar que dos compuestos separados en las mismas condiciones cromatográficas son semejantes o iguales cuando su R<sub>f</sub> es la misma, mientras que son diferentes cuando este valor es distinto.

De este modo se seleccionaron como posibles mutantes superproductores de flavoglauca aquellos en los que se observaba una mayor intensidad en las manchas correspondientes a la aspergina, cuyo R<sub>f</sub> es 0,5, y la flavoglauca (R<sub>f</sub> 0,45) respecto a las manchas obtenidas a partir de la cepa parental *E. rubrum* C47.

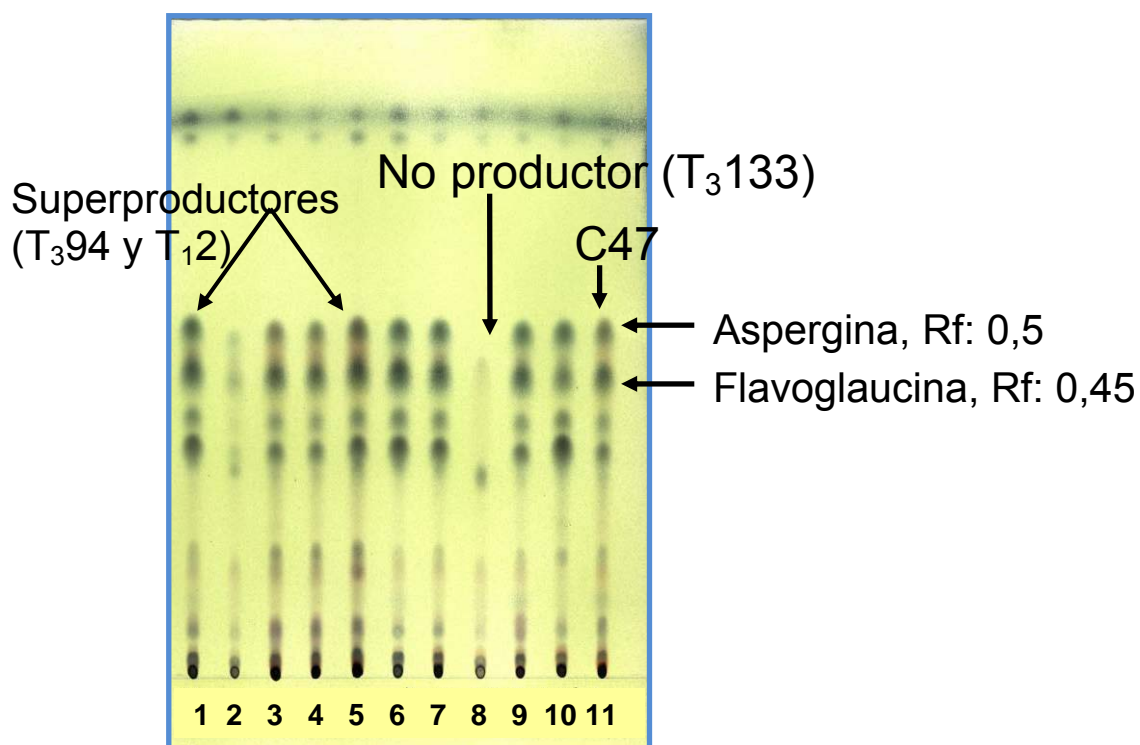
Por otro lado, los posibles mutantes no-productores de flavoglauca se seleccionaron en base a la ausencia de las manchas de interés respecto a la cepa control *E. rubrum* C47.

En la **Figura 17** se muestra como ejemplo una TLC a partir de la que se seleccionaron dos mutantes potencialmente superproductores (T<sub>3</sub>94 y T<sub>1</sub>2) y un posible mutante no productor (T<sub>3</sub>133).

---

<sup>(1)</sup>R<sub>f</sub> o factor de retención. Se obtiene al dividir la distancia que ha migrado el compuesto (cm) entre la distancia que ha migrado el solvente (cm).

---



**Figura 17:** Identificación de mutantes no-productores y superproductores de flavoglauцина y aspergina mediante TLC. Las muestras 1 a 10 se corresponden con distintos mutantes analizados y la 11 a la cepa parental *E. rubrum* C47.

El análisis por TLC nos permitió hacer una selección previa y rápida de todos los mutantes viables. Mediante esta técnica se seleccionaron un total de diez posibles mutantes no-productores y 390 mutantes potencialmente superproductores. Sin embargo esta técnica no es cuantitativa, por lo que los mutantes superproductores y no-productores de flavoglauцина seleccionados se analizaron posteriormente mediante HPLC analítico de acuerdo con el método descrito en el apartado 3.13.5b de Materiales y Métodos y utilizando el gradiente descrito en la **Tabla 6**.

El análisis por HPLC analítico nos permite determinar con mayor precisión si los mutantes seleccionados producen o no realmente aspergina y flavoglauцина. Por otra parte permite cuantificar la producción de ambos compuestos comparando los valores obtenidos con una curva patrón de concentraciones conocidas. Para llevar a cabo este análisis los mutantes seleccionados y la cepa parental *E. rubrum* C47 se sembraron en medio CY20SA/CY20S-BHI y se incubaron durante 14 días a 28 °C. Posteriormente se realizó la extracción de los metabolitos secundarios con solvente orgánico

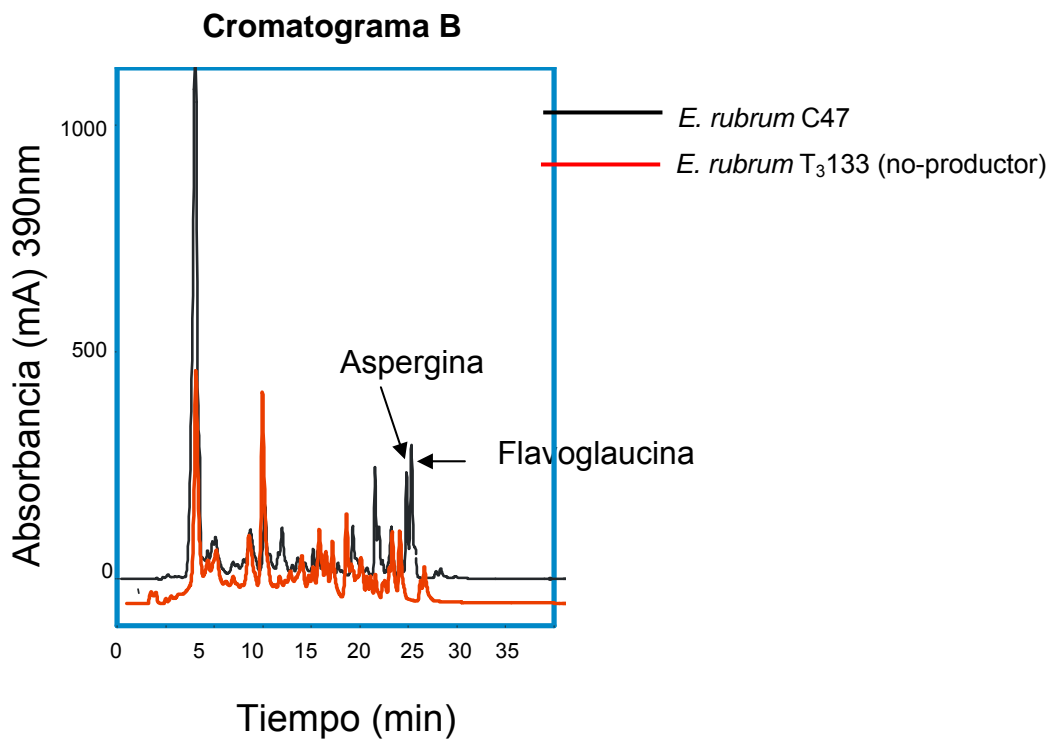
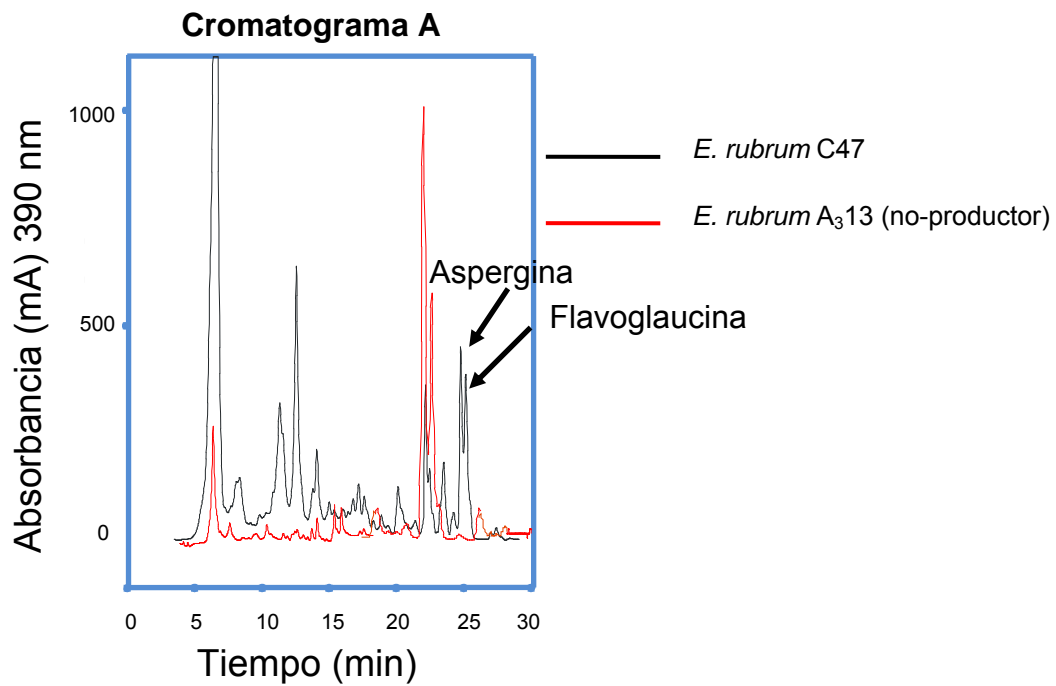
tal y como se detalla en el punto 3.13.1 de Materiales y Métodos y se analizaron las muestras en el HPLC analítico.

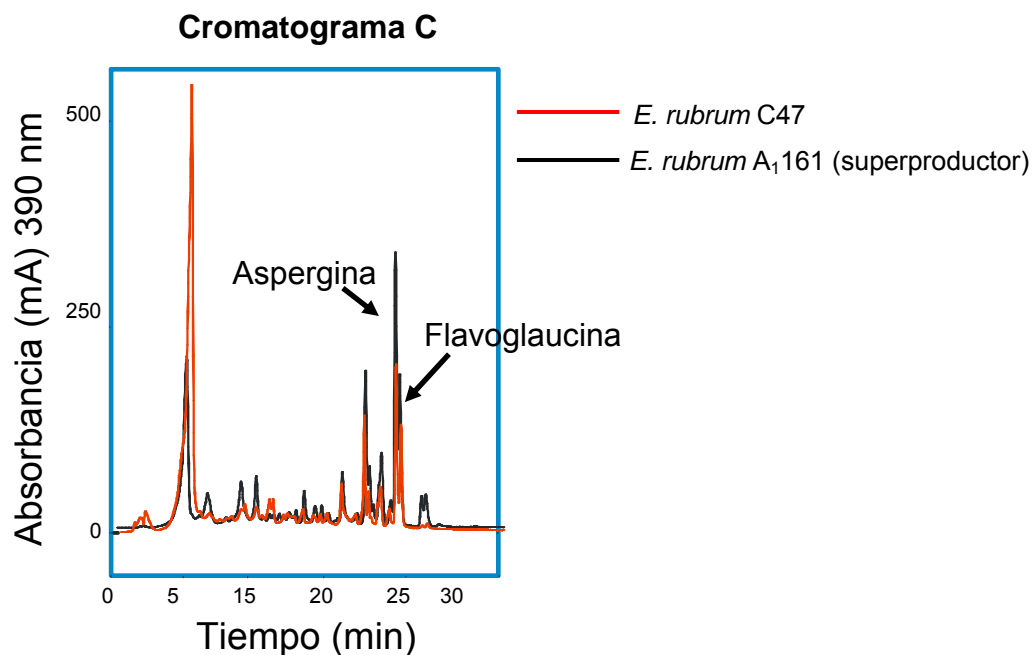
Con este método se determinó que de los diez mutantes no-productores preseleccionados, ocho eran realmente no-productores de sustancia acaricida: A<sub>3</sub>13, T<sub>3</sub>133, B<sub>1</sub>2, A<sub>5</sub>100, A<sub>2</sub>73, A<sub>2</sub>14, A<sub>4</sub>62 y A<sub>1</sub>84. Por otra parte se seleccionó como mutante superproductor el A<sub>1</sub>161 por ser el que mayor cantidad de flavoglaucina producía, aproximadamente tres veces más que la cepa parental *E. rubrum* C47 ( **cromatograma C, Figura 18**).

Tiempo (minutos)	% agua milli-Q	% acetonitrilo
0	70%	30%
20	10%	90%
35	10%	90%
40	70%	30%
45	70%	30%

**Tabla 6:** Condiciones cromatográficas del método empleado para determinar y cuantificar la producción de flavoglaucina.

En la **Figura 18** se muestran los cromatogramas de dos mutantes no-productores de flavoglaucina y aspergina (A<sub>3</sub>13, T<sub>3</sub>133) y del mutante superproductor A<sub>1</sub>161.





**Figura 14:** Comparación de los perfiles de elución, mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de los metabolitos secundarios producidos por la cepa parental *E. rubrum* C47, los mutantes no-productores de flavoglaucina (A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133) y el mutante superproductor (A<sub>1</sub>161) de dicha sustancia. En los cromatogramas A y B, respectivamente se comparan los perfiles de elución de los mutantes no-productores A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, en color rojo, y la cepa parental C47, en negro. En el cromatograma C se comparan la elución de la cepa parental C47, en color rojo frente al mutante superproductor A<sub>1</sub>161, en color negro.

## 4.2. Caracterización morfológica y genotípica de los mutantes no-productores de flavoglaucina.

Los mutantes no-productores seleccionados por TLC y HPLC presentaban algunas características morfológicas distintas a los de la cepa parental C47. Con el fin de determinar si estos mutantes pertenecían realmente a la especie *E. rubrum* o se trataba de hipotéticos contaminantes que hubieran aparecido en el proceso de selección se llevó a cabo su caracterización morfológica y genotípica.

El mutante superproductor de flavoglaucina, A<sub>1</sub>161, no se caracterizó ni morfológica ni genéticamente porque presentaba las características típicas de la especie *E. rubrum*. Únicamente se observó que este mutante tenía afectada su capacidad de esporulación, la cual era menor que la de la cepa parental.



### 4.2.1 Caracterización morfológica.

La clasificación taxonómica del género *Eurotium* se ha basado tradicionalmente en estudios morfológicos, que permiten su identificación por las características macroscópicas y microscópicas del micelio en condiciones controladas sobre determinados medios de cultivo (Pitt y Hocking, 1997 y Klich, 2002). A la vista del valor taxonómico de dichas características, decidimos utilizar estos criterios para caracterizar los diez mutantes no-productores de flavoglauca seleccionados.

Para ello se sembró tanto la cepa parental, *E. rubrum* C47, como los mutantes no-productores de flavoglauca y aspergina en placas de diferentes medios de cultivo, tales como CY20S, MEA, G25N y CYA. Los tres primeros fueron incubados a 25 °C durante 7 días y el último se incubó a 25 °C, 5 °C y 37 °C durante el mismo periodo de tiempo. Posteriormente se llevó a cabo la observación de diferentes parámetros en las colonias obtenidas en los distintos medios de cultivo: diámetro de las colonias, coloración de las esporas y del micelio, grado de esporulación, presencia de pigmentos y exudados, diámetro, textura superficial y coloración del reverso de la placa.

Según lo descrito por Pitt y Hocking (1997), la especie *E. rubrum* presenta las siguientes características en cada uno de los medios y condiciones de cultivo ensayadas.

- **CYA 25 °C:** Colonias de 10-20 mm de diámetro, planas, algodonosas, de color amarillo-naranja claro. Cleistotecios y conidióforos normalmente presentes pero poco formados. Reverso de color amarillo-naranja oscuro.
- **CYA 5 °C:** No crece.
- **CYA 37 °C:** No crece.
- **MEA 25 °C:** Colonias de 10-20 mm de diámetro, algunas veces de 5-8 mm. Sus características son semejantes a las obtenidas en medio CYA.
- **G25N 25 °C:** Colonias de 30-45 mm de diámetro, algodonosas, planas y con grupos de hifas que alcanzan la tapa de la placa de

Petri. Alta producción de cleistotecios que se desarrollan entre hifas de color naranja intenso. Moderada producción de conidios de color marrón que se desarrollan formando una lámina o capa por encima de los cleistotecios. Reverso de color amarillo a marrón-rojizo.

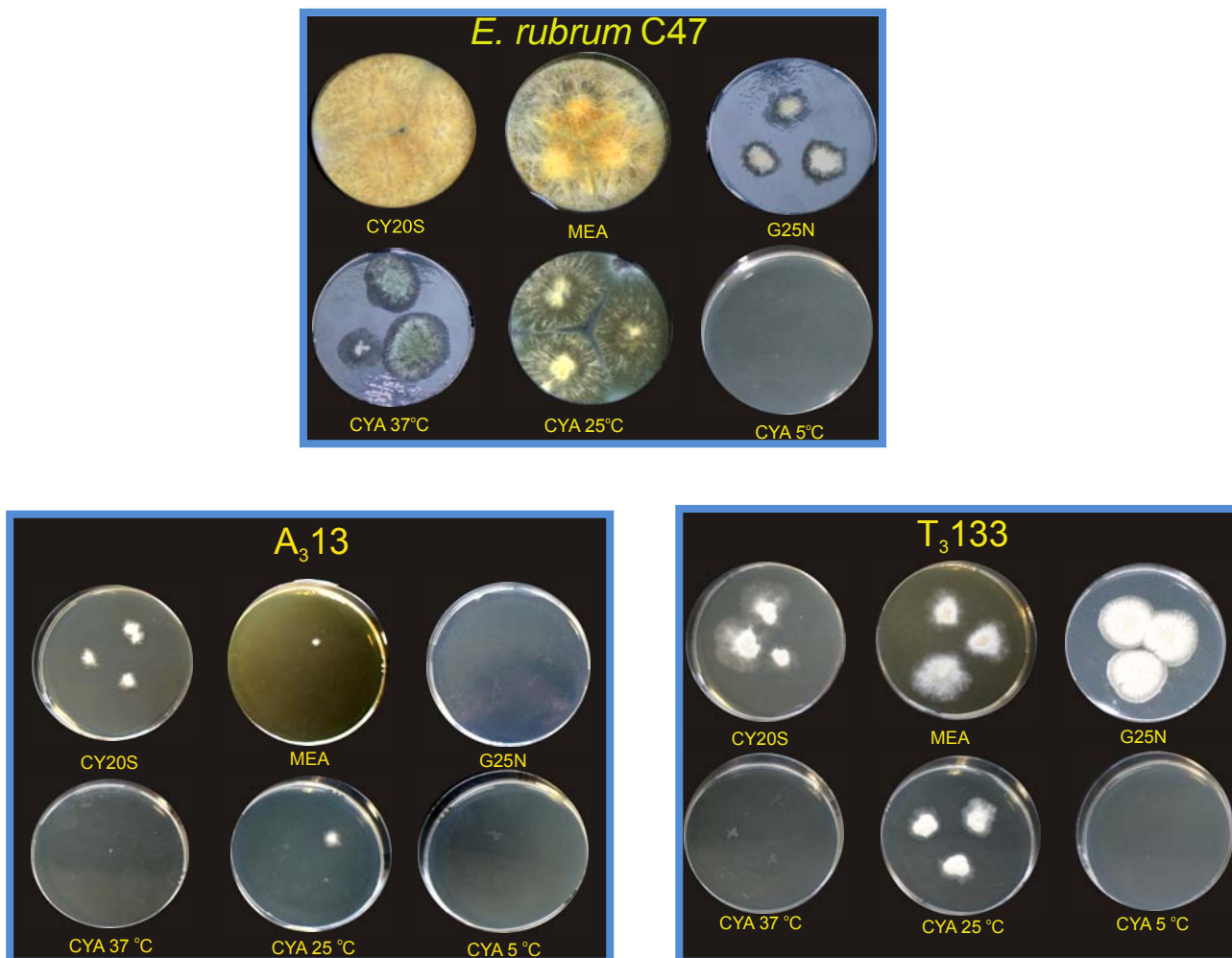
- **CY20S 25 °C:** Colonias de 35-60 mm de diámetro, planas, densas y aterciopeladas. Micelio de color amarillo en los márgenes que se va oscureciendo hacía el centro de la colonia hasta un color rojo intenso. Alta producción de cleistotecios de color amarillo que se encuentran cubiertos por otra capa de conidios de color verde-marrón oscuro. Reverso amarillo a rojizo.

Sin embargo, ni la cepa parental, *E. rubrum* C47, ni los mutantes no-productores de flavoglucina cumplieron todas las características descritas anteriormente. La principal diferencia observada en la cepa C47 respecto de las características especificadas en la clave de caracterización fue que en el medio de cultivo CYA incubado a 37 °C hubo crecimiento, mientras que lo esperado era que no lo hubiese. Además, el diámetro de las colonias obtenidas en el medio de cultivo G25N fue inferior al esperado. Estas diferencias no implican que dicha cepa no pertenezca a la especie *E. rubrum*, debido a que puede existir una cierta variabilidad de las características morfológicas en la determinación del género *Eurotium*. De hecho la pertenencia de la cepa C47 a la especie *E. rubrum* se había determinado previamente en INBIOTEC mediante criterios no solamente morfológicos, sino también mediante análisis de RAPD y secuenciación de ITS<sub>s</sub> (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006).

En el caso de los mutantes no-productores, la variabilidad respecto a las características esperadas fue mayor. Estos mutantes fueron obtenidos por mutación al azar lo que implica que además de presentar alterada la producción de flavoglucina pueden tener alguna otra mutación que afecte a las características morfológicas, por lo que en base a éstas no se pudo determinar con exactitud si pertenecían o no a la especie *E. rubrum*.

## Resultados y Discusión

En la **Figura 19** se muestra el crecimiento de la cepa parental *E. rubrum* C47 y dos de los mutantes no-productores de flavoglauцина A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133 analizados en los medios ensayados.



**Figura 19:** Características morfológicas de la cepa parental *Eurotium rubrum* C47 y de los mutantes no-productores de flavoglauцина, T<sub>3</sub>133 y A<sub>3</sub>13, en distintos medios y condiciones de cultivo.

Fotografías tomadas con una cámara Canon EOS 10D.

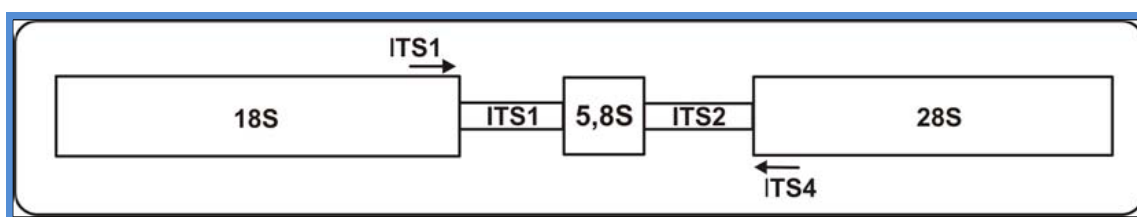
Para determinar fehacientemente si los mutantes no-productores seleccionados pertenecían a la especie *E. rubrum* se llevó a cabo su caracterización genotípica mediante secuenciación de los espaciadores intergénicos transcritos (ITS<sub>s</sub>) y del gen que codifica el ARN ribosomal 5,8S.

#### 4.2.2. Identificación genética por secuenciación de los ITSs.

La caracterización genotípica de los mutantes no-productores de flavoglauцина se llevó a cabo por amplificación y secuenciación del gen que codifica el ARN ribosomal 5,8S y las regiones intergénicas (ITS<sub>s</sub>) que se encuentran entre dicho gen y el 18S y 28S, respectivamente (**Figura 20**). La variabilidad de estas regiones se utiliza de forma convencional como criterio de diferenciación interespecífica tanto en hongos filamentosos como en levaduras (Tamura y *col.*, 2000; Boysen y *col.*, 2000; Villa-Carvajal y *col.*, 2004).

El ADN<sub>r</sub> nuclear en hongos filamentosos, está organizado generalmente en una unidad que se repite en tándem. Esta unidad incluye tres genes: 18S, 5,8S y 28S que están separados por dos espaciadores intergénicos, ITS1 e ITS2, (**Figura 20**). Por último, un tercer espaciador intergénico (IGS), que se ubica entre pares de secuencias repetidas en tándem, es muy variable y a diferencia de las ITS<sub>s</sub> no se transcribe (White y *col.*, 1990).

Las regiones espaciadoras (ITS e IGS) están poco conservadas y pueden ser amplificadas, parcial o totalmente utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 descritos en la **tabla 2** de Materiales y Métodos.



**Figura 20.** Representación esquemática de la región que codifica el ADN<sub>r</sub> en hongos filamentosos. Los rectángulos representan los genes ribosomales y los espaciadores intergénicos transcritos, ITS1 e ITS2. Las flechas representan la posición de los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 utilizados en la amplificación y secuenciación de la región intergénica 18S-28S. Modificado de Glass y Donaldson (1995).

La amplificación y secuenciación de la región intergénica 18S/28S de los mutantes no-productores, se realizó según se describe a continuación.

### A. Amplificación de la región intergénica 18S/28S.

- Se extrajo ADN total de los diez hipotéticos mutantes no-productores de flavoglucina tal y como se describe en el apartado 3.8.2. de Materiales y Métodos.

- Se preparó la mezcla de reacción de PCR de la siguiente forma en un volumen final de 50  $\mu$ L: H<sub>2</sub>O destilada estéril 29,8  $\mu$ L; tampón 10X para la GoTaq polimerasa 5  $\mu$ L; MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 7  $\mu$ L; dNTPs (2 mM cada uno) 2,5  $\mu$ L; GoTaq ADN polimerasa (5 U/mL) 0,5  $\mu$ L; Oligonucleótido ITS 1 (20  $\mu$ M) 0,6  $\mu$ L; Oligonucleótido ITS 4 (20  $\mu$ M) 0,6  $\mu$ L; ADN molde 4  $\mu$ L (160 ng).

- Los fragmentos de interés se amplificaron siguiendo las condiciones especificadas a continuación:

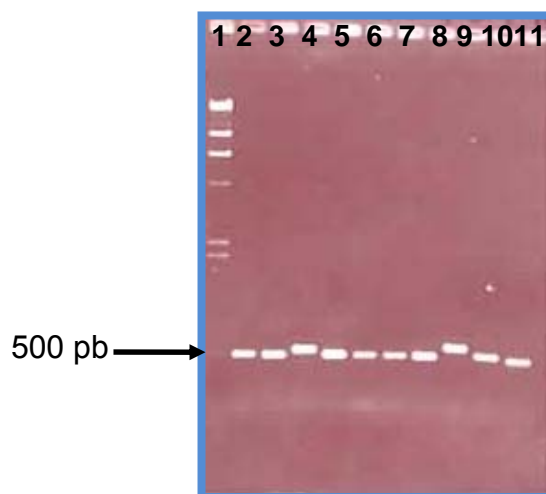
Desnaturalización		Amplificación		Elongación
inicial	Desnaturalización	Hibridación	Elongación	final
3 minutos	30 s	30 s	40s	10 min
96 °C	94	60 °C	72 °C	72 °C
1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo

**Tabla 7:** Programa de PCR utilizado para amplificar la secuencia intergénica 18S/28S.

- Con el fin de confirmar la amplificación del fragmento de ADN de aproximadamente 500 pb que comprende la región intergénica, se visualizaron los productos obtenidos en la reacción de amplificación en un gel de agarosa al 1% (p/v) (**Figura 21**).

- En todos los mutantes, excepto en dos, se amplificó un fragmento del tamaño esperado, aproximadamente de 500 pb. En dos de ellos se amplificó un fragmento algo mayor, lo cual puede deberse a que el número de repeticiones en tándem tanto de las regiones intergénicas transcritas (ITS) y no transcritas (IGS) sea mayor, tal y como ha sido descrito por Rooney y *col.* (2005) y Wendland y *col.* (1999). El número de repeticiones en tándem de dichas regiones puede variar de unas especies a otras, e incluso dentro de la misma especie. También puede

deberse a que en estas dos cepas la mutación mediante NTG haya alterado el número de dichas repeticiones o bien puede tratarse de posibles contaminantes.



**Figura 21:** Electroforesis del producto amplificado mediante PCR de la región intergénica 18S/28S de los mutantes no-productores de flavoglucina. **1.**  $\lambda$ -Hind III; **2.** A<sub>3</sub>13; **3.** A<sub>2</sub>73; **4.** A<sub>2</sub>14; **5.** B<sub>1</sub>2; **6.** A<sub>5</sub>100; **7.** T<sub>3</sub>133; **8.** A<sub>5</sub>84; **9.** A<sub>4</sub>62; **10.** A<sub>1</sub>84; **11.** A<sub>5</sub>87. El fragmento de 500 pb producto de la digestión del marcador de peso molecular  $\lambda$ -Hind III aparece señalado en la figura.

### B. Secuenciación de la región intergénica 18S/28S.

Una vez confirmada la amplificación de la región intergénica, se realizó la secuenciación de los fragmentos amplificados según el método descrito en el apartado 3.10.8. de Materiales y Métodos. Las secuencias génicas obtenidas a partir de los mutantes, se compararon con las existentes en las bases de datos, BLAST (NCBI). Los resultados obtenidos permitieron identificar al menos el género al que pertenecían los mutantes no-productores de flavoglucina. Estos resultados se muestran en la siguiente tabla:

Mutante	Especie	% Identidad
A <sub>3</sub> 13	<i>Eurotium rubrum</i>	100%
B <sub>1</sub> 2	<i>Eurotium rubrum</i>	100%
T <sub>3</sub> 133	<i>Eurotium rubrum</i>	100%
A <sub>5</sub> 100	<i>Eurotium rubrum</i>	100%
A <sub>2</sub> 73	<i>Chaetomium funicula</i>	100%
A <sub>2</sub> 14	<i>Mucor</i>	100%
A <sub>4</sub> 62	<i>Alternaria</i>	100%
A <sub>1</sub> 84	<i>Epicoccum</i>	100%
A <sub>5</sub> 84	<i>Eurotium rubrum</i>	100%
A <sub>5</sub> 87	<i>Eurotium rubrum</i>	100%

**Tabla 8:** Porcentaje de identidad de la secuencia de la región intergénica 18S/28S de los mutantes no-productores de flavoglaucaína con la de especies presentes en las bases de datos.

---

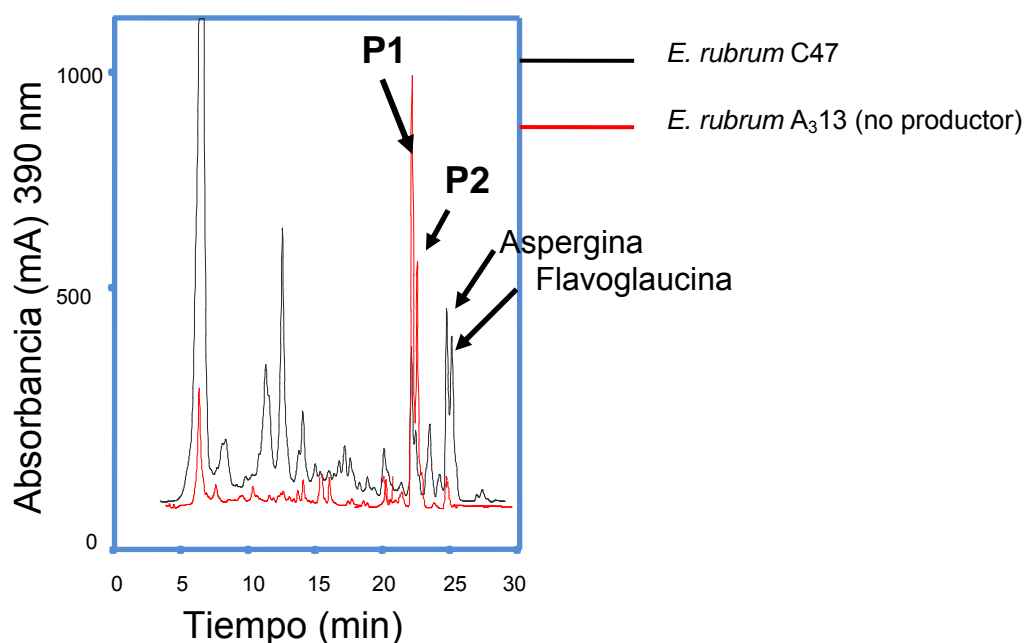
Como se muestra en la **Tabla 8**, de los diez mutantes no-productores de flavoglaucaína preseleccionados, seis pertenecían a la especie *E. rubrum* mientras que los otros cuatro se correspondían a otros géneros como *Chaetomium*, *Mucor*, *Alternaria* y *Epicoccum* y eran por tanto contaminantes aparecidos durante el proceso de obtención y selección de mutantes.

De los seis mutantes pertenecientes a la especie *E. rubrum*, dos de ellos, A<sub>5</sub>84 y A<sub>5</sub>87, fueron descartados porque al ser analizados mediante HPLC analítico se observó que producían sustancia acaricida en baja cantidad, por lo que no estaban completamente bloqueados en la biosíntesis.

De los cuatro mutantes restantes, A<sub>3</sub>13, T<sub>3</sub>133, B<sub>1</sub>2 y A<sub>5</sub>100, se descartó también el mutante B<sub>1</sub>2 porque crecía y esporulaba muy mal y el mutante A<sub>5</sub>100 por ser inestable. Tras varias rondas de crecimiento se observó que este último mutante era capaz nuevamente de producir sustancia acaricida, lo que demuestra la reversión de la mutación introducida en su genoma. Por tanto seleccionamos como mutantes no-productores de flavoglaucaína el A<sub>3</sub>13 y el T<sub>3</sub>133, para ser utilizados en experimentos posteriores.

### 4.3 Purificación y caracterización de posibles intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina en *E. rubrum* C47.

Al analizar por HPLC los mutantes no-productores de flavoglaucina observamos que el mutante A<sub>3</sub>13 acumulaba dos compuestos, que denominamos P1 y P2, con un espectro y tiempo de retención distinto a la flavoglaucina y aspergina, tal y como se muestra en el cromatograma de la **Figura 22**. Estos compuestos no se acumulan en la cepa parental, lo que nos llevó a pensar que este mutante podría tener afectado un gen implicado en la transformación de estos compuestos en flavoglaucina. Dicha mutación impediría la síntesis de flavoglaucina provocando la acumulación de los compuestos precursores de dicha sustancia. Por ello consideramos que los compuestos P1 y P2 podrían ser intermediarios de la ruta de biosíntesis de la flavoglaucina o al menos pertenecer a la misma familia que este compuesto. Por ello, nos planteamos purificar y caracterizar dichos compuestos a partir del mutante no productor *E. rubrum* A<sub>3</sub>13.

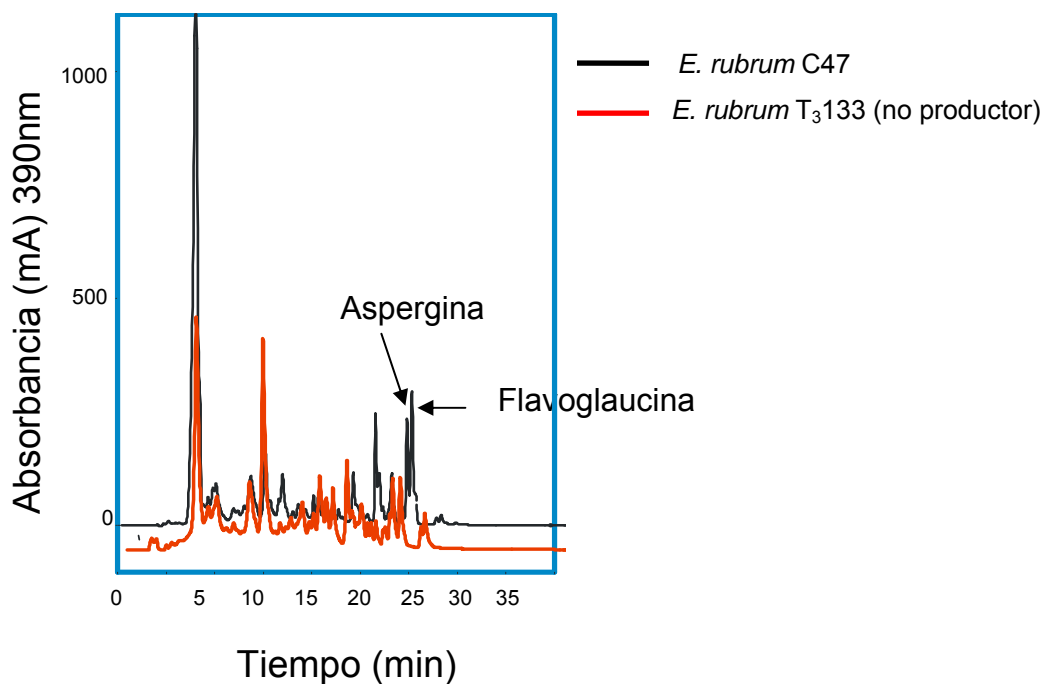


**Figura 22:** Cromatograma en el que se muestran los compuestos P1 y P2 acumulados en el mutante *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 no productor de flavoglaucina.



## Resultados y Discusión

Por otro lado el mutante *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 no producía flavoglauцина ni aspergina, pero tampoco acumulaba los compuestos P1, ni P2 (**Figura 23**), lo que podría indicar que este mutante presenta una mutación en un gen de la ruta biosintética de la flavoglauцина distinto al que se ve afectado en la cepa *E. rubrum* A<sub>3</sub>13.



**Figura 23:** Perfil de elución, mediante cromatografía líquida (HPLC) de los metabolitos secundarios producidos por el mutante no productor de flavoglauцина *E. rubrum* T<sub>3</sub>133. En este cromatograma se observa que el mutante T<sub>3</sub>133 no acumula los compuestos P1 y P2.

La extracción y purificación de los compuestos P1 y P2 se realizó a partir de un cultivo en medio sólido de la cepa *E. rubrum* A<sub>3</sub>13, tal y como se detalla en el siguiente esquema:

1. Extracción con acetato de etilo
2. Cromatografía en fase normal-Sílica gel.
3. Cromatografía de filtración en gel.
4. HPLC semipreparativo (Columna LiChrospher 100 RP-18, 10  $\mu$ m).
5. HPLC analítico (Columna LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu$ m).

### **4.3.1 Extracción y purificación de los posibles intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavoglaucaína a partir del micelio del mutante no productor *E. rubrum* A<sub>3</sub>13.**

Algunos autores proponen el uso de medios de cultivo complejos para la producción de metabolitos secundarios (Yoshimura y *col.*, 1975). Sin embargo los medios de cultivo de composición definida permiten controlar cuantitativa y cualitativamente la producción de dichos metabolitos. En estudios previos se determinó que la producción de flavoglaucaína tiene lugar en condiciones óptimas en el medio sólido CY20SA/CY20SBHI (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006). Por ello este medio fue elegido para extraer y purificar los compuestos P1 y P2. Se inocularon 50 placas de 90 mm de diámetro de CY20SA o CY20S-BHI con 100 µL de una suspensión de esporas del mutante A<sub>3</sub>13 y se cultivaron a 28 °C durante 14 días. El micelio obtenido de las placas se sometió a una serie de extracciones con acetato de etilo, tal y como se describe en el apartado 3.13.1 de Materiales y Métodos, obteniéndose una fase orgánica de color amarillo. Esta se llevó a sequedad y se resuspendió en el menor volumen posible de diclorometano: metanol (4:1) sin comprometer su solubilidad.

#### **4.3.1.1. Cromatografía en columna de sílica gel.**

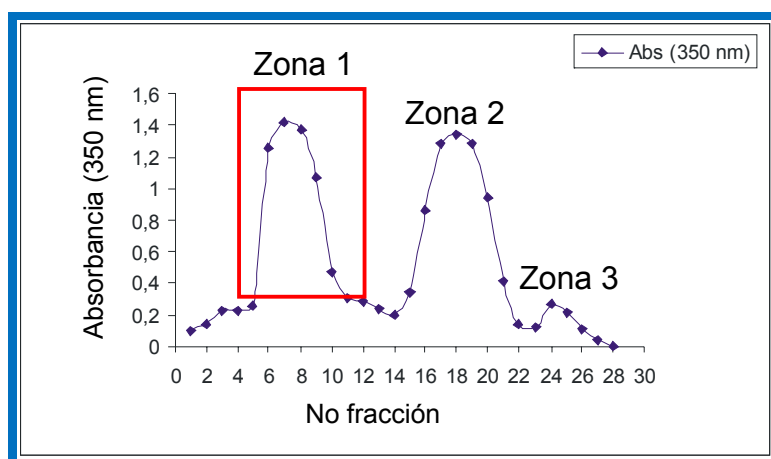
El extracto obtenido en la etapa anterior se sometió a un primer fraccionamiento en una columna de interacción hidrofóbica de sílica gel (Sigma) de 80 x 4 cm, previamente equilibrada con diclorometano. Este método nos permitió obtener dos fracciones distintas según la polaridad de los compuestos incluidos en ellas. La primera de las fracciones se obtuvo mediante la elución de los compuestos retenidos en la columna con diclorometano 100% y la segunda por elución con diclorometano-metanol en proporción 1:9. El análisis mediante HPLC analítico de ambas fracciones determinó que los compuestos de interés, P1 y P2, se encontraban en la fracción 1, la cual presentaba un color amarillo anaranjado.

### 4.3.1.2. Columna de filtración en gel.

La primera de las fracciones obtenida de la columna de sílica gel se llevó a sequedad y se resuspendió en el menor volumen posible de acetona sin comprometer su solubilidad. La muestra se cargó en una columna de filtración en gel Biogel S-X3 (Sigma) de 120 x 1,5 cm, previamente equilibrada con acetona. Esta columna se emplea en procesos de purificación de compuestos de naturaleza hidrofóbica de hasta 2000 daltons de peso molecular.

Se recogieron fracciones de 1 ml y se llevó a cabo un seguimiento espectrofotométrico a 350 nm obteniéndose los espectros de absorción que se muestran en la **Figura 24**. El espectro de absorción obtenido de cada una de las fracciones nos permitió agruparlas en tres zonas, cada una de las cuales presenta un máximo de absorción a 350 nm.

Las fracciones incluidas en una misma zona se mezclaron obteniéndose tres muestras denominadas zona1, zona 2 y zona 3. Estas se analizaron mediante HPLC analítico y se determinó que los compuestos de interés se concentraban en la zona 1, marcada en rojo en la **Figura 24**. Por ello, esta muestra se llevó a sequedad, se resuspendió en el menor volumen posible de metanol sin comprometer su solubilidad y posteriormente se sometió a la siguiente etapa de purificación.



**Figura 24.** Perfil de absorción de las fracciones obtenidas a partir de la cromatografía de filtración en gel. La zona 1, marcada en rojo, es la que contiene los compuestos P1 y P2 de interés.

---

#### 4.3.1.3. Cromatografía de alta resolución.

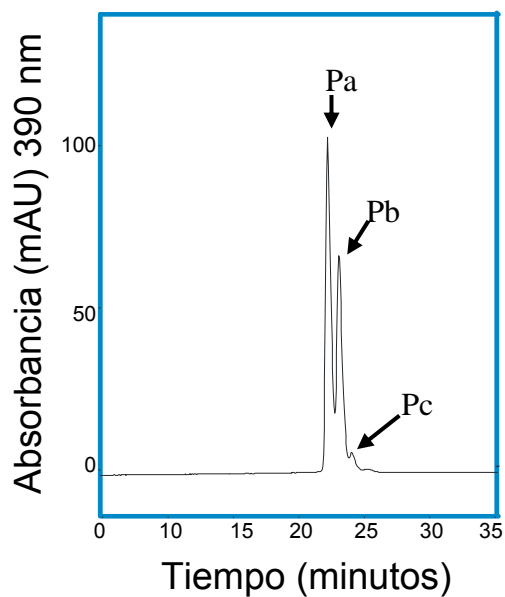
##### A. HPLC semipreparativo.

La muestra correspondiente a la zona 1 se cargó en una columna LiChrospher 100 RP-18 10  $\mu\text{m}$  montada en un equipo de HPLC semipreparativo y se eluyeron los distintos compuestos en un gradiente lineal de acetonitrilo según el método cromatográfico que se muestra en la **Tabla 9**:

Tiempo (minutos)	% Agua milli-Q	% Acetonitrilo
0	50%	50%
8	30%	70%
12	30%	70%
16	10%	90%
22	10%	90%
25	50%	50%
35	50%	50%

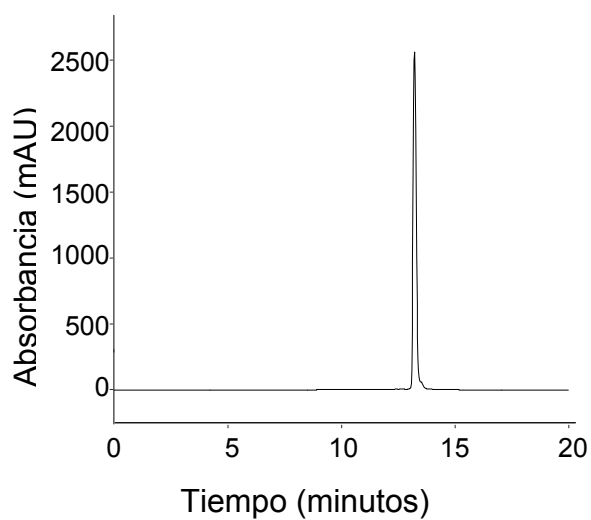
**Tabla 9:** Método cromatográfico empleado para purificar los compuestos P1 y P2 en HPLC semipreparativo.

Bajo estas condiciones cromatográficas, se consiguieron resolver varios picos cromatográficos a los que denominamos Pa, Pb y Pc, tal y como se muestra en el cromatograma de la **Figura 25**. Se recogieron cada uno de ellos por separado y posteriormente se comprobó, mediante HPLC analítico, la pureza de los mismos. Así se comprobó que ninguno de estos picos se correspondía con los compuestos de interés totalmente puros, P1 y P2, por lo que se realizó una segunda ronda de purificación de cada uno de los picos obtenidos utilizando el mismo método cromatográfico. En esta segunda ronda de purificación se consiguió obtener, a partir del pico Pa, el compuesto P1 de interés totalmente puro (**Figura 26**).



**Figura 25:** Perfil de elución en HPLC semipreparativo de la zona 1 obtenida a partir de la columna de filtración en gel. Cada uno de los picos Pa, Pb y Pc poseían mezclados los picos de interés P1 y P2 en distintas concentraciones.

---



**Figura 26:** Perfil de elución en HPLC analítico del compuesto P1 puro obtenido en una segunda ronda de purificación a partir del pico Pa.

---

El compuesto P2 no pudo obtenerse totalmente puro por este método, por lo que se llevó a cabo su purificación mediante HPLC analítico.

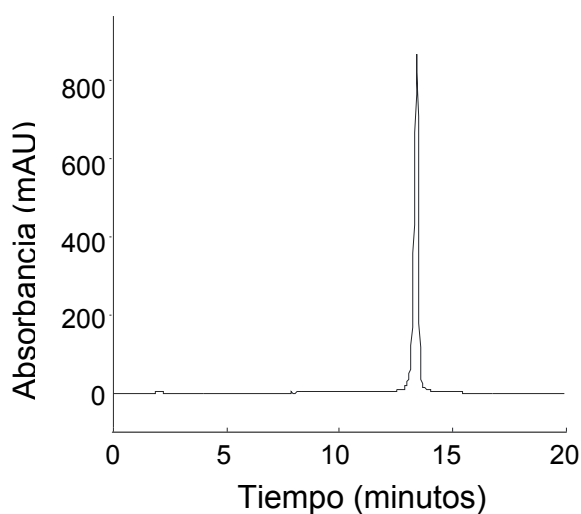
**B. HPLC analítico.**

Con el fin de purificar a homogeneidad el compuesto de interés P2, cada una de las muestras semipuras obtenidas en la segunda ronda de purificación en el HPLC semipreparativo se inyectó en el HPLC analítico. Se utilizó una columna LiChrospher 100 RP-18, 5  $\mu\text{m}$  y los compuestos de interés se eluyeron en un gradiente lineal de acetonitrilo, en el cual los compuestos de interés eluyen a un alto porcentaje de solvente. Para ello se siguió el método descrito en la siguiente tabla:

Tiempo (minutos)	% Agua milli-Q	% Acetonitrilo
0	50%	50%
10	10%	90%
12	10%	90%
15	70%	30%
20	70%	30%

**Tabla 10:** Método cromatográfico empleado para purificar el compuesto P2 en HPLC analítico.

Con este método se consiguió obtener el compuesto P2 totalmente puro, tal y como se muestra en la **Figura 27**.



**Figura 27:** Perfil de elución en HPLC analítico del compuesto P2 puro.

Una vez obtenida suficiente cantidad de los compuestos P1 y P2 puros se concentraron mediante liofilización y se caracterizó su estructura molecular mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

### **4.3.2. Elucidación de la estructura molecular de los compuestos P1 y P2.**

Con el fin de obtener una mayor información de la estructura molecular de los compuestos P1 y P2 se llevó a cabo su caracterización química con la colaboración del Dr. Ángel Rumbero de la Universidad Autónoma de Madrid.

#### **A. Espectrometría de masas.**

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). Mediante esta técnica se pueden identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto o determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto.

A partir de los resultados obtenidos con esta técnica se concluyó que la masa molecular del compuesto P1 es 300 y la masa molecular del compuesto P2 es 298.

#### **B. Estudio de Resonancia Magnética Nuclear.**

La resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos. Mediante esta técnica se puede obtener información estructural o química de una molécula.

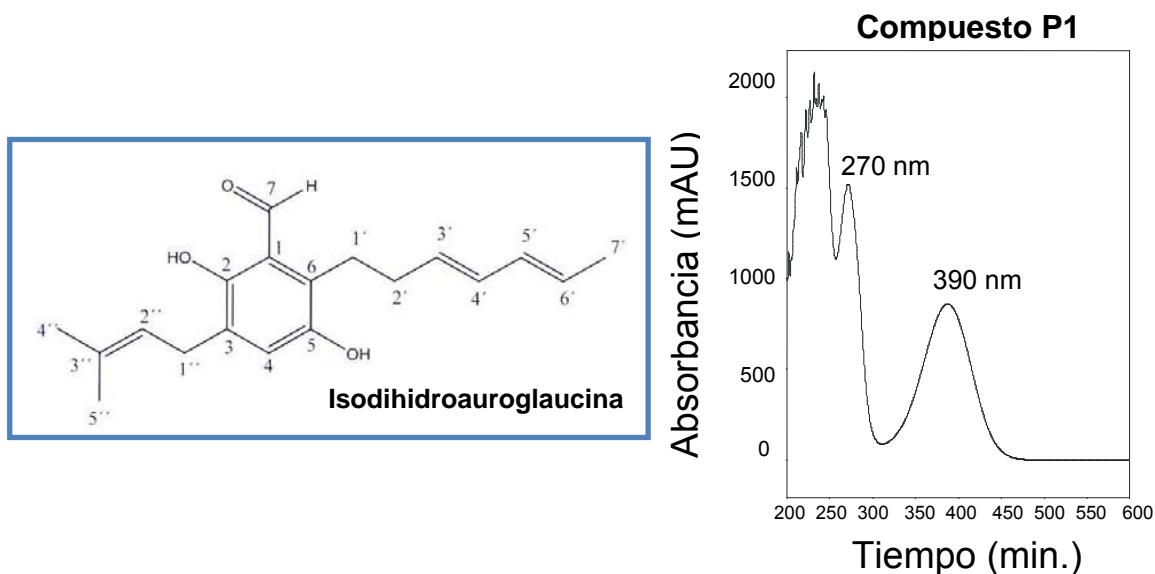
Los desplazamientos químicos de protones ( $\delta_H$ ) y de carbono ( $\delta_C$ ) de los compuestos P1 y P2 se obtuvieron mediante análisis de RMN- $H^1$  (Resonancia magnética nuclear de protones), HMBC (correlación de enlace múltiple nuclear que muestra acoplamientos  $J^2_{CH}$  y  $J^3_{CH}$ ) y HMQC (correlación cuántica múltiple heteronuclear, acoplamientos  $J^1_{CH}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 11**.

Compuesto P1			Compuesto P2		
No	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$	No	$\delta_c$	$\delta_H$
1	117.33 C		1	117.02 C	
2	155.64 C		2	155.42 C	
3	128.82 C		3	130.65 C	
4	126.09 CH	7.02 s	4	125.19 CH	7.02 s
5	145.48 C		5	145.09 C	
6	127.45 C		6	124.07 C	
7	195.46 CH	10.26 s	7	196.06 CH	10.34 s
1'	24.09 CH <sub>2</sub>	3.02 (t, J = 8.0 Hz)	1'	120.69 CH	6.69 (d, J= 15.7 Hz)
2'	34.25 CH <sub>2</sub>	2.37 (dt, J= 15.2, 8.0 Hz)	2'	139.63 CH	6.53 (dd, J= 15.2, 9.6 Hz)
3'	129.60 CH	5.60 m	3'	129.00 CH	6.50 m
4'	131.87 CH	6.08 m	4'	136.26 CH	6.50 m
5'	131.20 CH	6.03 m	5'	131.25 CH	6.20 m
6'	128.20 CH	5.64 m	6'	132.75 CH	5.90 (dq, J= 15.7, 6.8 Hz)
7'	18.05 CH <sub>3</sub>	1.77 (d, J= 6.8 Hz)	7'	18.46 CH <sub>3</sub>	1.87 (d, J= 6.8 Hz)
1''	27.16 CH <sub>2</sub>	3.32 (d, J= 7.2 Hz)	1''	27.30 CH <sub>2</sub>	3.36 (d, J= 7.2 Hz)
2''	121.31 CH	5.32 (t, J= 7.2 Hz)	2''	120.97 CH	5.34 (t, J= 7.2 Hz)
3''	133.68 C		3''	134.09 C	
4''	25.81 CH <sub>3</sub>	1.79 s	4''	25.80 CH <sub>3</sub>	1.81 s
5''	17.81 CH <sub>3</sub>	1.74 s	5''	17.80 CH <sub>3</sub>	1.75 s
OH		11.95 s	OH		11.85 s

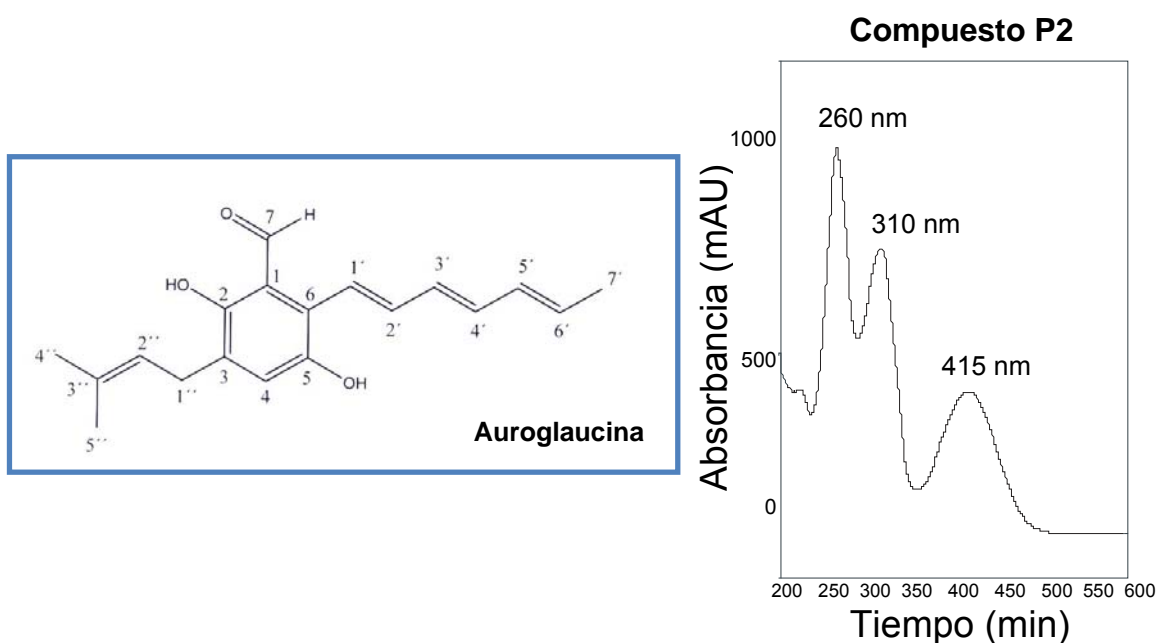
**Tabla 11:** Datos de RMN-H<sup>1</sup> y RMN-C<sup>13</sup> de los compuestos P1 y P2. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm; s: singlete, d: doblete, t: triplete, m: multiplete; Constantes de acoplamiento (J) en Hz. El número de carbono e hidrógeno es el marcado en la estructura química de los compuestos mencionados (**Figuras 28 y 29**).

Con los datos obtenidos por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear se pudo determinar la estructura química de los compuestos de interés P1 y P2 (**Figuras 28 y 29**). Estas estructuras se identificaron como isodihidroauroglaucina cuya fórmula molecular es C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> y auroglaucina (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>), respectivamente (**Figuras 28 y 29**).





**Figura 28.** Estructura química de la isodihidroauroglaucaína (compuesto P1) y espectro de absorción. La numeración corresponde al número de cada átomo de carbono asignado para los desplazamientos químicos (Tabla 11).



**Figura 29:** Estructura química de la auroglaucaína (pico P2) y espectro de absorción. La numeración corresponde al número de carbono asignado para los desplazamientos químicos (Tabla 11).

Ambos compuestos poseen una estructura molecular semejante a la flavoglaucina, por lo que se confirma que estos compuestos pertenecen a la misma familia que este metabolito y podrían por lo tanto ser sintetizados por la misma ruta metabólica.

### 4.3.3. Ensayos de actividad acaricida.

En estudios anteriores realizados en INBIOTEC se determinó que la flavoglaucina era un compuesto con actividad acaricida (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006). En el presente estudio se han purificado y caracterizado otras dos sustancias, auroglaucina e isodihidroauroglaucina, que presentan una estructura molecular de tipo policétido semejante a la flavoglaucina (**Figura 2**), lo que nos hizo pensar que estos compuestos también podrían tener actividad acaricida.

Por ello y con el fin de determinar si estas dos moléculas presentaban actividad acaricida se llevaron a cabo ensayos “in vitro” por un lado con micelio del mutante no productor de flavoglaucina, *E. rubrum* A<sub>3</sub>13, que acumula ambas sustancias, y por otro lado, con distintas concentraciones de las sustancias purificadas.

#### A. Ensayos con micelio fúngico.

Diferentes estudios han demostrado que los ácaros pueden reproducirse y sobrevivir alimentándose de hongos principalmente de especies de *Penicillium*, *Eurotium* y *Aspergillus* (Sinha y mills, 1969; Okabe y Oconor, 2001; Bolaños y col., 1991). En base a esta premisa se llevaron a cabo ensayos en los que se determinó la supervivencia de ácaros cuando su única fuente de alimento era el micelio de la cepa *E. rubrum* A<sub>3</sub>13, la cual no produce flavoglaucina pero sí isodihidroauroglaucina y auroglaucina.

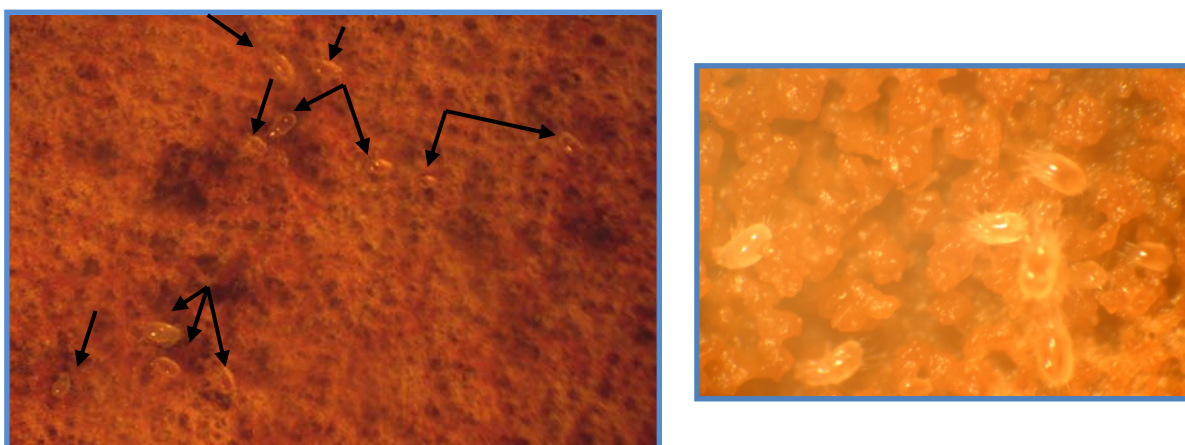
Para ello se sembraron 3 placas de Petri de 50 mm de medio de cultivo de producción (CY20SA/CY20SBHI) con 100  $\mu$ L de una suspensión de esporas del mutante A<sub>3</sub>13 y se incubaron 14 días a 28 °C. Tal y como se indica en el apartado 3.14.1a de Materiales y Métodos, se colocó un disco de papel de filtro entre el medio de cultivo y el inóculo del hongo con el fin de que los ácaros sólo se alimentasen del micelio fúngico y no del medio de cultivo, ya que este posee

## Resultados y Discusión

---

extracto de carne y cloruro sódico, compuestos semejantes al alimento natural del jamón.

Una vez que los cultivos fúngicos se encontraban bien crecidos, se inocularon con 30 ácaros y se incubaron en condiciones óptimas de temperatura y humedad para el mantenimiento de los mismos durante 21 días, tiempo estimado de actuación de la flavoglaucina (Ortiz, J. F., Tesis doctoral, 2006). Posteriormente se llevó a cabo el seguimiento del estado de los ácaros durante este tiempo, observándose la existencia de huevos, estadios larvarios, así como la supervivencia, proliferación y movilidad de los ácaros. Transcurridos los primeros 14 días ya se observó un aumento del número de huevos e individuos, los cuales se alimentaban del micelio formando numerosas cavernas en el mismo (**Figura 30**). No se observó una mortalidad significativa de los ácaros, lo que nos permitió concluir, en un primer momento, que los compuestos producidos por la cepa *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 no tenían actividad acaricida, en las mismas condiciones experimentales en que se demostró la toxicidad de la flavoglaucina producida por la cepa parental.



---

**Figura 30:** Proliferación de ácaros sobre el micelio del mutante A<sub>3</sub>13 de *E. rubrum* después de 14 días de incubación. Las flechas negras señalan los distintos ácaros presentes.

---

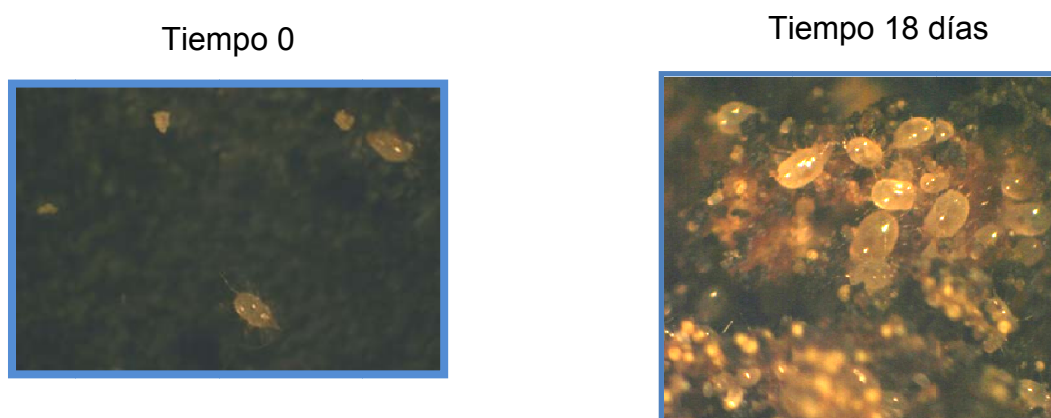
### **B. Ensayo con los compuestos purificados.**

Tras los resultados del experimento anterior, pensamos que el micelio podía no contener suficiente cantidad de auroglaucina e isodihidroauroglaucina como para tener efecto acaricida. Por ello decidimos impregnar placas de

alimento para ácaros con isodihidroauroglaucina y auroglaucina purificadas. Cada compuesto se ensayó por triplicado y utilizando distintas concentraciones, tal y como se describe en el apartado 3.14.1.b de Materiales y Métodos. Se impregnaron 100 mg de alimento para ácaros con distintas concentraciones de auroglaucina e isodihidroauroglaucina (50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 500  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) disueltas en metanol. Posteriormente se evaporó el metanol y se rehumidificó el alimento en una cámara de vacío que contenía agua.

Con el fin de descartar que el metanol tuviese por si mismo algún efecto acaricida se utilizaron como control tres placas de alimento para ácaros impregnado con metanol y tratadas del mismo modo que en el caso anterior.

Tanto las placas impregnadas con los compuestos de interés, como las placas control, se inocularon con 30 ácaros y se llevó a cabo un seguimiento del estado de los ácaros durante 21 días. A los dieciocho días de incubación ya se observaba una elevada proliferación de ácaros y baja mortalidad, por lo que determinamos que la auroglaucina y la isodihidroauroglaucina a las concentraciones utilizadas no tenían actividad acaricida. A modo de ejemplo en la **Figura 31** se muestran imágenes del momento de inoculación de los ácaros (tiempo cero) en la placa impregnada con isodihidroauroglaucina y el aumento del número de ellos transcurridos 18 días de la inoculación.



**Figura 31:** Ejemplo de proliferación de ácaros sobre extracto de levadura y germen de trigo impregnado con isodihidroauroglaucina a tiempo cero y después de 18 días de incubación.

Una vez purificados y caracterizados dos compuestos posibles intermediarios de la ruta de biosíntesis de la flavoglaucina (auroglaucina e isodihidroauroglaucina) y obtenidos dos mutantes no-productores de

flavoglaucina (A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133), nos planteamos caracterizar la ruta de biosíntesis de dicha sustancia.

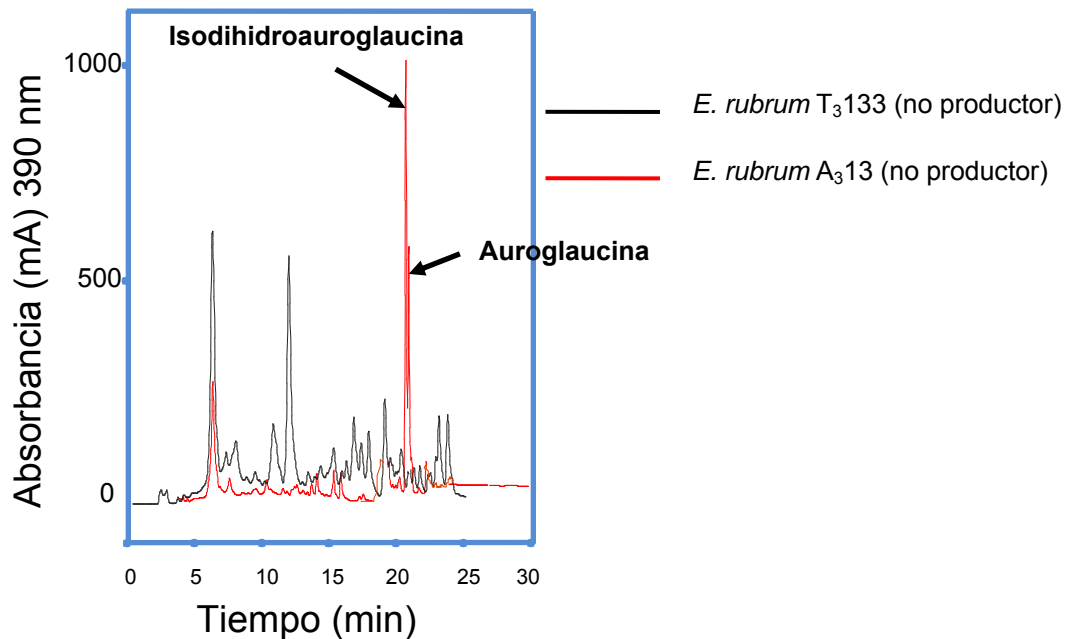
### 4.4. Caracterización genética de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina.

Como primer paso para caracterizar los genes implicados en la síntesis de flavoglaucina se diseñó una hipotética ruta biosintética en base a la información disponible sobre la naturaleza química de la flavoglaucina y sus posibles intermediarios. Además se pusieron a punto herramientas básicas de biología molecular para el género *Eurotium*.

#### 4.4.1. Hipotética ruta biosintética de la flavoglaucina.

Dado que en la bibliografía no existen datos sobre el genoma de *E. rubrum* y por consiguiente, tampoco sobre los genes implicados en la biosíntesis de flavoglaucina, en primer lugar nos planteamos diseñar una hipotética ruta de biosíntesis de flavoglaucina. Para ello nos basamos en las publicaciones de biosíntesis de metabolitos secundarios con estructura molecular semejante a la flavoglaucina en otros hongos y en la propia estructura química de la flavoglaucina y sus posibles intermediarios, la isodihidroauroglaucina y la auroglaucina.

Como se ha explicado previamente, mediante el proceso de mutagénesis al azar con nitrosoguanidina se obtuvieron dos mutantes no productores de flavoglaucina, denominados A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, que presentaban algunas diferencias, tanto en los metabolitos secundarios que producían como en la cantidad producida (**Figura 32**). El mutante A<sub>3</sub>13 produce y acumula dos compuestos, auroglaucina e isodihidroauroglaucina, los cuales no son producidos por el mutante T<sub>3</sub>133, pero sí por la cepa parental C47. Esto nos llevó a pensar que podían tener mutaciones en distintos genes de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina.



**Figura 32:** Comparación de los perfiles de elución, mediante cromatografía líquida (HPLC) de los metabolitos secundarios producidos por los mutantes no productores de flavoglaucina *E. rubrum* A<sub>3</sub>13, en color rojo y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133, en color negro.

Con el fin de confirmar si los mutantes A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133 tenían mutaciones en genes distintos de la ruta biosintética, se llevó a cabo una complementación de ambos mutantes mediante un proceso de fusión de protoplastos en presencia de polietilenglicol. Este compuesto favorece la unión de protoplastos por interacción hidrofóbica entre sus membranas y facilita el intercambio de ADN entre ambas cepas (Crueger y *col.*, 1989; López-Nieto y *col.*, 1980 y Taiz y *col.*, 2006).

Para ello en un primer momento se optimizó el proceso de obtención de protoplastos de *E. rubrum* tal y como se explica en el apartado 4.6.2. Así, se obtuvieron protoplastos de los mutantes T<sub>3</sub>133 y A<sub>3</sub>13 y se llevó a cabo su fusión mediada por el agente aglutinante polietilenglicol (PEG 6000), el cual se dejó actuar durante tres horas a 4 °C. Posteriormente se sembraron 100 µL de diluciones seriadas de la mezcla de protoplastos en placas de Petri con el medio de crecimiento y mantenimiento de *Eurotium*, CY20S y se incubaron a 28 °C durante 5-7 días de forma que se obtuvieran colonias aisladas.

Con el fin de descartar que el PEG tuviese algún efecto sobre la síntesis de flavoglaucina se sometieron 100 µL de la solución de protoplastos de cada una de

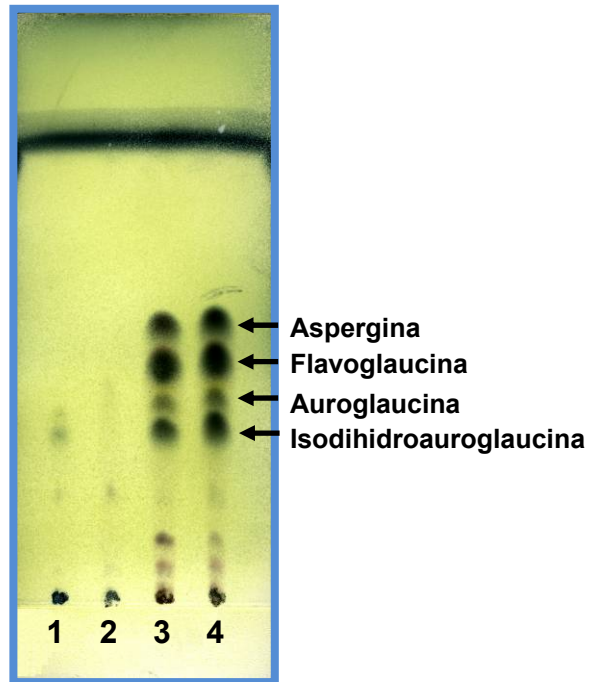
## Resultados y Discusión

---

las cepas mutantes a la acción del PEG y posteriormente se analizó la producción de flavoglucina del micelio regenerado.

Para analizar la producción de flavoglucina, se seleccionaron diferentes colonias al azar de las cepas A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, tratadas por separado con PEG y de colonias resultantes de la fusión de protoplastos de ambos mutantes. Dichas colonias se sembraron en el medio de producción de flavoglucina, CY20SA/CY20SBHI y se incubaron durante 14 días a 28 °C. Posteriormente se analizaron las distintas colonias mediante cromatografía de capa fina (TLC). Se comprobó que los cultivos de cepas procedentes de la fusión de protoplastos A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133 eran capaces de producir flavoglucina, mientras que los mutantes tratados individualmente con PEG seguían sin producirla.

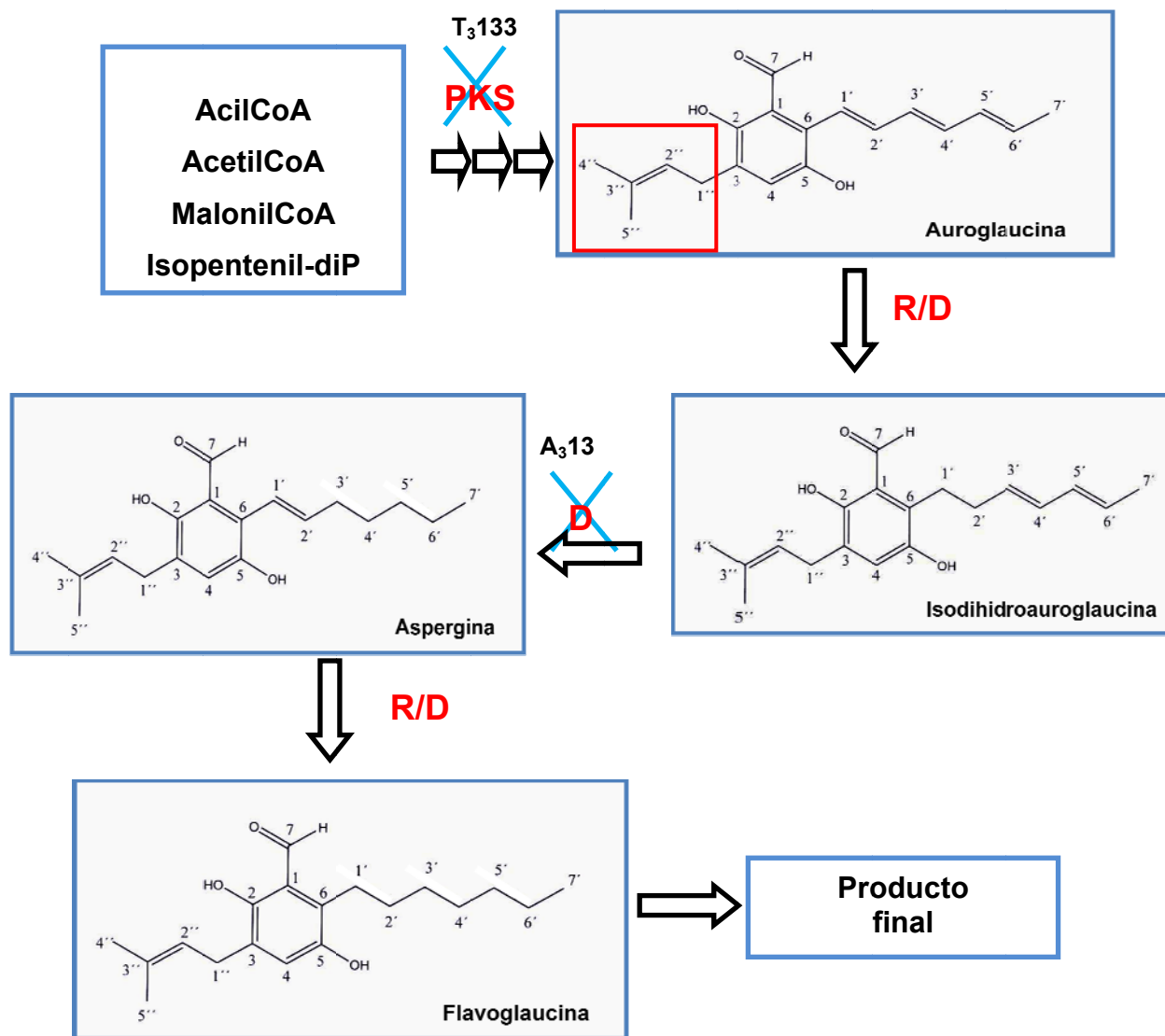
En la **Figura 33** se muestra el análisis mediante TLC de la producción de flavoglucina por una de las colonias obtenidas de la fusión de protoplastos de los mutantes A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133 y del micelio obtenido a partir de la regeneración de los protoplastos tratados con PEG de cada uno de ellos. Como se observa en dicha figura, cuando se fusionan los protoplastos de ambos mutantes se produce una complementación de las mutaciones presentes en el genoma de cada uno de ellos, de forma que la cepa resultante de la fusión adquiere la capacidad de producir flavoglucina. Este resultado nos confirmó que ambos mutantes poseían mutaciones en genes diferentes de la ruta de biosíntesis de flavoglucina.



**Figura 33:** Producción de flavoglucina por transformantes regenerados a partir de protoplastos fusionados de los mutantes no productores de flavoglucina, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133. **Carril 1:** *E. rubrum* A<sub>3</sub>13; **Carril 2:** *E. rubrum* T<sub>3</sub>133; **Carril 3:** Fusión de protoplastos de *E. rubrum* A<sub>3</sub>13/T<sub>3</sub>133; **Carril 4:** *E. rubrum* C47.

En base a estos resultados y a los datos aportados por la bibliografía existente diseñamos una hipotética ruta de biosíntesis de la flavoglucina (**Figura 34**).





**Figura 34:** Hipotética ruta biosintética de la flavoglaucina. Las siglas PKS corresponden a policétidosintasa, R a reductasa y D a desaturasa. El gen que estaría mutado en cada una de las cepas aparece marcado mediante un aspa azul en la figura, de forma que el mutante T<sub>3</sub>133 tendría una mutación en el gen que codificaría la policétidosintasa y el mutante A<sub>3</sub>13 el gen que codificaría la desaturasa.

Autores como Birch y *col.* (1967); Turner (1971); Cattel y *col.* (1973); O'Hagan (1991) y (1995) y Simpson (1995) describieron que la producción de metabolitos secundarios con estructura policétido en hongos se produce a partir de la condensación de moléculas de acetato o malonato y que su biosíntesis está relacionada con la síntesis de ácidos grasos. La presencia en las moléculas de estos compuestos de una unidad de cinco átomos de carbono, ramificada unida al anillo aromático sugiere que puede derivar de una unidad isoprenoide (Isopentenil

difosfato, encuadrado en rojo en la figura) tal y como describe Cardillo y *col.*, (1977) y Podojil y *col.*, (1979). Por otro lado, autores como Hopwood y Sherman (1990); Katz y Donadio (1993) y Martín y *col.* (2000) describen que a pesar de la gran diversidad de moléculas de estructura policétido que existen, estas poseen un mecanismo común de biosíntesis. En base a estos trabajos y dado que la flavoglaucina, la aspergina, la isodihidroauroglaucina y la auroglaucina son policétidos pensamos que podrían ser sintetizadas por una ruta de biosíntesis común similar a la de otros metabolitos con la misma naturaleza química.

Por otra parte autores como Bingle y *col.* (1999) y Schümann y *col.* (2006) describen en hongos a la policétidosintasa de tipo I como la enzima multifuncional implicada en el ensamblaje del esqueleto carbonado de estos compuestos. Dichas enzimas están codificadas por un único gen y son semejantes a las sintasas de ácidos grasos (FAS). Por tanto, pensamos que esta enzima estaría también implicada en las primeras etapas de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina. Además la formación del anillo aromático mediante ciclación del policétido lineal (aromatización) es bien conocida en hongos, por ejemplo en la biosíntesis del ácido 6-metilsalicílico.

En INBIOTEC, se han identificado cuatro metabolitos secundarios con estructura policétido producidas por *E. rubrum* C47. Dichas moléculas sólo se diferencian entre sí en el número de dobles enlaces de la cadena lateral (**Figura 34**) y dado que partimos de la hipótesis de que estos compuestos se sintetizan a partir de la misma ruta de biosíntesis que la flavoglaucina, pensamos que el mutante *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 no produce flavoglaucina, aspergina, isodihidroauroglaucina, ni auroglaucina (**Figuras 32 y 35A**), por lo que podría tener mutado uno de los genes implicados en las etapas tempranas de biosíntesis de flavoglaucina, el cual podría codificar una policétidosintasa (**Figura 34**), la cual participaría en la condensación de moléculas de malonato o acetato para sintetizar una de estas cuatro moléculas (auroglaucina) a partir de la cual se sintetizarían las demás.

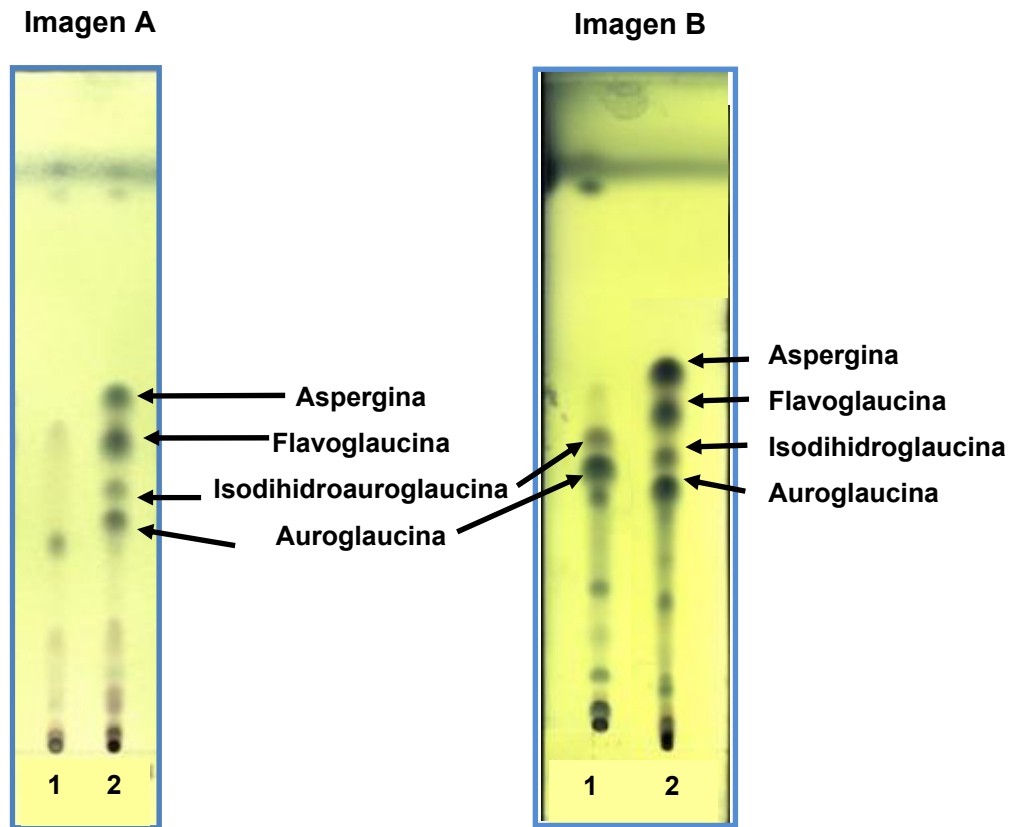
Una vez formada una de las moléculas, las demás probablemente se forman a partir de ella mediante reacciones de saturación o reducción. En primer lugar descartamos la posibilidad de que fuese una oxidación debido a que el que pensamos que es el producto final (flavoglaucina) está saturado y a que es más

## Resultados y Discusión

---

probable que se dé una reacción de reducción que de oxidación porque el gasto de energía celular es menor. Además, el mutante A<sub>3</sub>13 no produce flavoglauцина ni aspergina pero sí produce y acumula isodihidroauroglauцина y auroglauцина (**Figuras 32 y 35B**), por lo que pensamos que la acumulación de auroglauцина e isodihidroauroglauцина en *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 podría deberse a que la cepa tuviese una mutación en un gen implicado en la transformación de la isodihidroauroglauцина/ auroglauцина en flavoglauцина/ aspergina y no al contrario, lo cual nos confirmaría que la reacción estaría catalizada por una enzima con actividad reductasa o desaturasa. Por ello, determinamos que la primera molécula de estructura policétido sintetizada sería la auroglauцина y que a partir de ella mediante reacciones de reducción/desaturación se sintetizaría sucesivamente, la isodihidroauroglauцина, aspergina y flavoglauцина, la cual parece ser el producto final de la ruta de biosíntesis.

Por otro lado, pensamos que lo más probable es que dicha reacción fuese llevada a cabo por una desaturasa, ya que algunos autores como Sakai y Kajiwara (2003) describen proteínas de este tipo como las responsables de reducción de ácidos grasos, moléculas de estructura química semejante a policétidos.



**Figura 35:** Metabolitos secundarios producidos por *E. rubrum* y separados mediante cromatografía en capa fina (TLC). **Imagen A;** Carril 1: Mutante *E. rubrum* T<sub>3</sub>133. Carril 2: Cepa parental *E. rubrum* C47. **Imagen B;** Carril 1: Mutante *E. rubrum* A<sub>3</sub>13. Carril 2: Cepa parental *E. rubrum* C47.

Posteriormente y como paso previo para localizar los distintos genes implicados en la ruta de biosíntesis de flavoglaucina se optimizó el proceso de transformación en *E. rubrum* y se construyó una biblioteca génómica de *E. rubrum* C47 en el vector derivado del fago Lambda DASH II (Stratagene).

#### 4.4.2. Optimización del proceso de transformación de *E. rubrum*.

Las técnicas de genética molecular están aún poco desarrolladas en hongos del género *Eurotium*. La puesta a punto de un sistema de transformación eficiente de este hongo es importante como herramienta básica en el estudio de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios. En nuestro caso, la transformación de los mutantes *E. rubrum* no productores de flavoglaucina con el ADN procedente de un banco genómico de la cepa silvestre,

## Resultados y Discusión

---

C47, nos permitirá identificar por complementación los posibles genes implicados en la ruta de biosíntesis de la flavoglauцина.

En la bibliografía existente no hay métodos de transformación descritos para *E. rubrum*, por lo que nos basamos en métodos de transformación, desarrollados fundamentalmente en *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen y col., 1978). Estos constan principalmente de tres etapas:

- a) Preparación de protoplastos mediante hidrólisis enzimática de la pared celular de micelio joven. Las preparaciones enzimáticas utilizadas habitualmente son mezclas comerciales de enzimas líticas producidas por el hongo *Trichoderma harzianum*.
- b) Transformación de los protoplastos con el ADN plasmídico en presencia de iones calcio. Tras el periodo inicial de exposición, la entrada del ADN se favorece añadiendo altas concentraciones de polietilenglicol (PEG 6000) a la mezcla de transformación. El polietilenglicol facilita la unión de los protoplastos por interacción hidrofóbica entre sus membranas, quedando el ADN atrapado y facilitándose así su entrada.
- c) Regeneración de protoplastos y selección de transformantes.

Para la regeneración de protoplastos es necesario mantener condiciones isoosmóticas entre el medio de cultivo y el interior del protoplasto hasta que se regenere su pared celular.

La selección de transformantes se lleva a cabo en base a la capacidad de resistencia frente a un marcador de selección introducido previamente. Para ello se llevó a cabo un estudio preliminar con el fin de determinar la concentración basal de resistencia de la cepa a transformar a distintos compuestos selectivos.

Los tres parámetros críticos del proceso de transformación son la mezcla enzimática, el estabilizador osmótico en el que se mantienen estables los protoplastos y las características del propio microorganismo. Por ello, en este trabajo se desarrollaron y optimizaron los siguientes parámetros que afectan a la transformación:

a) Lisis controlada de la pared celular. El método más ampliamente utilizado para la preparación de protoplastos es la digestión de la pared celular con enzimas líticas. Para ello se han probado mezclas enzimáticas muy diferentes con el fin de conseguir una eficiente liberación de los protoplastos de diversas especies fúngicas (Fincham, 1989). En la obtención de protoplastos de *E. rubrum*, se probaron dos preparaciones enzimáticas diferentes, por separado y combinadas, y se optimizó la concentración y el tiempo de incubación con cada una de ellas. En las distintas condiciones ensayadas (**Tabla 12**) los mejores resultados se obtuvieron con la acción combinada durante 3 horas de incubación a 28 °C de enzimas líticas de *T. harzianum* (10 mg/mL) y β-glucoronidasa de *Helix pomatia* (1000 unidades/mL).

En la siguiente tabla se muestran las condiciones ensayadas para la obtención de protoplastos y la eficiencia obtenida:

Mezcla enzimática	Concentración de enzimas	Protoplastos obtenidos (nº protoplastos/mL)
Enzimas líticas de <i>Trichoderma harzianum</i> (1-4horas)	5 mg/mL	Baja eficiencia
	10 mg/mL	
Enzimas líticas de <i>Trichoderma harzianum</i> (90 minutos)+β-glucoronidasa (90 minutos)	5+1000U/mL	1,0x10 <sup>8</sup>
	10+1000U/mL	2,7x10 <sup>8</sup>

**Tabla 12:** Enzimas empleadas para la obtención de protoplastos de *E. rubrum*. El recuento de los protoplastos se realizó con cámara Thoma.

b) Estabilizadores osmóticos. Este es otro de los componentes esenciales necesario para mantener la estabilidad de los protoplastos una vez han sido desprovistos de la pared celular. Las sales inorgánicas han sido descritas como buenos estabilizadores osmóticos en las preparaciones de protoplastos de diversas especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Cantoral y col., 1987; Díez y col., 1987; Ballance y Turner, 1985). Con el propósito de seleccionar un estabilizador osmótico óptimo para *E. rubrum* se ensayaron el cloruro potásico a una concentración de 0,6 M y el sorbitol 1 M y se observó que la estabilidad y liberación de protoplastos era mayor en KCl, ya que el sorbitol impedía de alguna manera la formación de protoplastos.

## Resultados y Discusión

---

Además se determinó que la adición de  $\text{MgSO}_4$  0,1 M a la mezcla lítica permitía una buena formación de protoplastos, aunque se observó que en presencia de una alta concentración de  $\text{MgSO}_4$  los protoplastos flotaban y se dificultaba su posterior lavado y recuperación. En base a estos resultados en posteriores experimentos se obtuvieron los protoplastos en tampón TPP suplementado con  $\text{KCl}$  0,5 M +  $\text{MgSO}_4$  0,1 M y la solución KCM con  $\text{KCl}$  0,6 M, como estabilizador osmótico.

- c) Medios de cultivo para la regeneración de los protoplastos. Una vez obtenidos los protoplastos se determinó su capacidad de regeneración en distintos medios de cultivo: SDA-sacarosa, Czapek-sorbitol, CMM y CY20S y MMT (**Figura 36**). Se constató que se obtenía una buena tasa de regeneración de los protoplastos en todos los medios ensayados, sin que se observaran diferencias significativas entre los mismos. Sin embargo se observó que, cuando se adicionaba al medio de cultivo un determinado antibiótico de selección, las características morfológicas de *E. rubrum* variaba según el medio de cultivo utilizado. Por ello se estableció un medio de cultivo óptimo según el antibiótico empleado para seleccionar los transformantes. De este modo se utilizaron los medios CMM, CY20S y MMT cuando los antibióticos utilizados fueron fleomicina, geneticina y aureobasidina, respectivamente.



---

**Figura 36:** Regeneración de protoplastos en los medios de cultivo Czapek-sorbitol, MMT, CMM, SDA-sacarosa y CY20S.

---

d) Marcadores de selección.

En la bibliografía existente no hay información sobre marcadores de selección funcionales en *E. rubrum*, por ello inicialmente se probaron marcadores, funcionales en otros hongos.

En la siguiente tabla se resumen los datos relativos a los distintos plásmidos, genes de resistencia, medios de cultivo y rango de concentraciones ensayadas para cada marcador en la selección de transformantes de las cepas *E. rubrum* C47, *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133.

Cepa	Plásmidos	Marcadores de selección	Concentración de selección	Medio de cultivo
<i>E. rubrum</i> C47	p3SR2 ( <i>amdS</i> )	Acetamida (utilización)	0-100 mM	MMT+acetamida
		Acrilamida (utilización)	0-100 mM	MMT+acrilamida
	pULJL43 ( <i>ble</i> )	Fleomicina	Muy variable	CMM
	pAMPF21 ( <i>ble</i> )	Fleomicina		
	pAURfleo1 y 2 ( <i>ble</i> )	Fleomicina		
	pALGEN3 ( <i>nptII</i> )	Geneticina	0-80 µg/mL	CY20S
	pAUR316 ( <i>aur<sup>R</sup></i> )	Aureobasidina	0-4 µg/mL	MMT
pAURgen ( <i>nptII</i> )	Geneticina	0-80 µg/mL	CY20S	
<i>E. rubrum</i> A <sub>3</sub> 13	pAUR316 ( <i>aur<sup>R</sup></i> )	Aureobasidina	0-5 µg/mL	MMT
	pAURgen ( <i>nptII</i> )	Geneticina	0-50 µg/mL	CY20S
<i>E. rubrum</i> T <sub>3</sub> 133	pAUR316 ( <i>aur<sup>R</sup></i> )	Aureobasidina	0-3 µg/mL	MMT
	pAURgen ( <i>nptII</i> )	Geneticina	0-60 µg/mL	CY20S

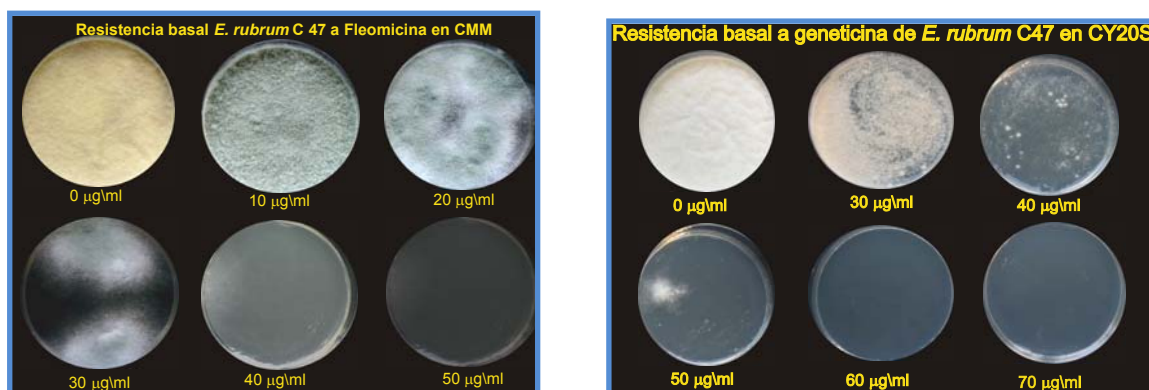
**Tabla 13:** Resumen de los distintos parámetros optimizados y marcadores de selección ensayados en la transformación de las cepas de *E. rubrum* C47, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133.

En un primer estudio se ensayaron los plásmidos p3SR2 (Limón y col., 1998), pULJL43 (Barredo y col., 1990) y pALGEN3 (Rodríguez y col., 2004), los cuales contienen como marcadores de selección los genes *amdS*, *ble* y *npt II*, respectivamente (apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos). Los genes *ble* y *npt II* confieren la capacidad de resistencia frente a fleomicina y geneticina, respectivamente. Por su parte el gen *amdS* confiere al hospedador la capacidad de utilizar la acetamida y la acrilamida como fuente de nitrógeno.



## Resultados y Discusión

Para evaluar el posible uso de estos marcadores en *E. rubrum* C47 realizamos en un primer momento un estudio para determinar el nivel basal de resistencia de la cepa C47 sin transformar frente a los antibióticos fleomicina y geneticina. Se determinó el crecimiento de dicha cepa en los medios de cultivo CMM y CY20S con un rango de concentraciones de fleomicina entre 0 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y de geneticina entre 0 y 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como se puede ver en la **Figura 37**, *E. rubrum* C47 no crece en placas de cultivo suplementadas con 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fleomicina o con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina. Por tanto, los genes *ble* y *nptII* pueden ser utilizados como marcadores de selección de transformantes en *E. rubrum* C47 utilizando las concentraciones de antibiótico citadas anteriormente.



**Figura 37:** Resistencia basal de la cepa *E. rubrum* C47 a concentraciones crecientes de fleomicina (0, 10, 20, 30, 40 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y geneticina (0, 30, 40, 50, 60 y 70  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el medio de cultivo CMM y CY20S respectivamente.

Por lo que respecta al gen *amdS*, este codifica una acetamidasa que confiere a los transformantes de una cepa defectiva en este gen, la capacidad de utilizar acetamida y acrilamida como única fuente de nitrógeno.

Con el fin de determinar si el gen *amdS* podía ser utilizado como marcador de selección de transformantes en *E. rubrum* se analizó inicialmente la capacidad de la cepa C47 para utilizar acetamida y acrilamida como fuente de nitrógeno. Para ello se sustituyó el sulfato amónico del medio de cultivo MMT por cada uno de estos compuestos de forma independiente, en un rango de concentraciones de 0 a 100 mM. Los resultados obtenidos demostraron que

*E. rubrum* C47 posee una actividad acetamidasa que la permite utilizar la acetamida como fuente de nitrógeno, lo que descarta el uso del gen *amdS* como marcador de selección en esta cepa, y por lo tanto al plásmido p3SR2 (**Tabla 13**) como vector de clonación para *E. rubrum* C47.

Sin embargo cuando se utilizó la acrilamida como fuente de nitrógeno *E. rubrum* no fue capaz de utilizarla a bajas concentraciones, por ello se pensó en un primer momento que este marcador de selección podía ser funcional en dicho hongo. Con el fin de comprobar este hecho se llevaron a cabo varias transformaciones en las que se utilizaron distintas preparaciones de protoplastos de *E. rubrum* C47 y se suplementó el medio de cultivo con distintas concentraciones de acrilamida, pero en ninguna de ellas se consiguió obtener transformantes. Este resultado puede ser debido bien a que no se ha producido la transformación, o bien a que el plásmido p3SR2 no se ha integrado en el genoma o bien a que el gen *amdS* no es funcional en *E. rubrum*.

Por otro lado se probaron plásmidos de replicación autónoma funcionales en otros hongos, los cuales tienen mayor eficiencia de transformación que los integrativos (Ruíz-Díez, 2002). Además estos plásmidos serán de utilidad en futuros experimentos de complementación de los mutantes no-productores de flavoglucina (T<sub>3</sub>133 y A<sub>3</sub>13) ya que nos permitirían, rescatando el plásmido conocer la secuencia del gen responsable de la complementación clonado en el mismo.

Los plásmidos de replicación autónoma utilizados fueron pAMPF21 (Fierro y col., 1996), pAUR316 (Shimizu y col., 2006) y sus derivados pAURfleo1, pAURfleo2, pAURgen (A. Gómez, comunicación personal, apartado 3.2.2 de Materiales y Métodos). Todos ellos poseen la región AMA1 de *Aspergillus nidulans*, lo que les confiere la capacidad de replicarse autónomamente en hongos (Gems y col., 1991). Además los plásmidos pAMPF21, pAURfleo1, pAURfleo2 poseen el gen *ble* como marcador de selección y el plásmido pAURgen posee el gen *nptII*, marcadores de selección que anteriormente se había determinado que eran funcionales en la cepa *E. rubrum* C47.

## Resultados y Discusión

---

Por su parte el plásmido pAUR316 posee como marcador el gen *aur* que confiere resistencia frente al antibiótico aureobasidina. Con el fin de determinar si la cepa de *E. rubrum* C47 es sensible a dicho antibiótico y por lo tanto el marcador *aur* puede ser utilizado para la selección de transformantes se realizó un estudio preliminar para determinar la sensibilidad de la cepa de *E. rubrum* C47 sin transformar frente a un rango de antibiótico de 0-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se comprobó que esta cepa no es capaz de crecer en presencia de una concentración de aureobasidina por encima de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 38**), lo que permite utilizar el gen de *aur* como marcador de selección de transformantes.



---

**Figura 38:** Resistencia basal de la cepa *E. rubrum* C47 a concentraciones crecientes de aureobasidina (0, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en medio mínimo de *Trichoderma* (MMT).

---

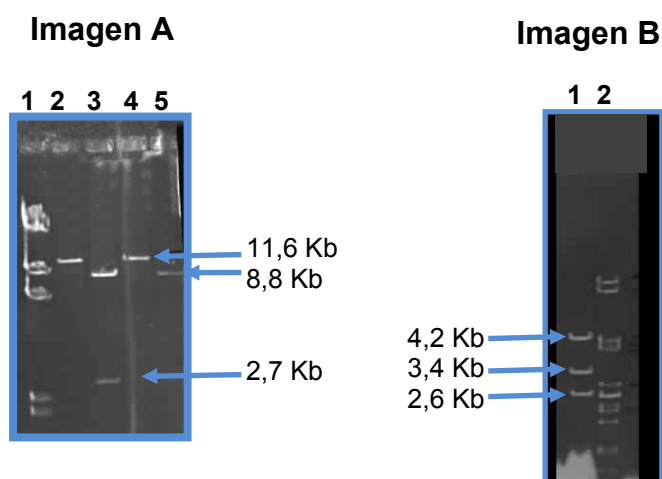
Una vez determinado que los marcadores de selección *ble*, *nptII* y *aur* eran funcionales en la cepa C47, se llevó a cabo la transformación de protoplastos de dicha cepa con los plásmidos pAURfleo1, pAURfleo2, pAURgen y pAUR316 y se observó la aparición de colonias resistentes a fleomicina, a geneticina y a aureobasidina, respectivamente. Los transformantes mantenían dicha resistencia tras varias rondas de crecimiento en presencia del antibiótico adecuado, excepto en el caso de la fleomicina. Cuando se utilizó este antibiótico como marcador de selección se observó que existía mucha variabilidad en la concentración necesaria para seleccionar los transformantes, por lo que se descartaron los plásmidos pULJL43, pAMPF21, pAURfleo1 y pAURfleo2 como vectores de clonación para *E. rubrum*.

Por otro lado y con el fin de determinar si las colonias resistentes a aureobasidina y geneticina obtenidas en los experimentos de transformación con pAUR316 y pAURgen eran verdaderos transformantes y que dichos plásmidos se mantenían de forma autónoma en *E. rubrum* se llevó a cabo el siguiente proceso:

En la bibliografía existente no se han descrito métodos precisos de extracción de ADN plasmídico en hongos, por lo que en primer lugar se extrajo el ADN total de tres posibles transformantes seleccionados al azar; dos de ellos con el plásmido pAUR316 y otro con el plásmido pAURgen.

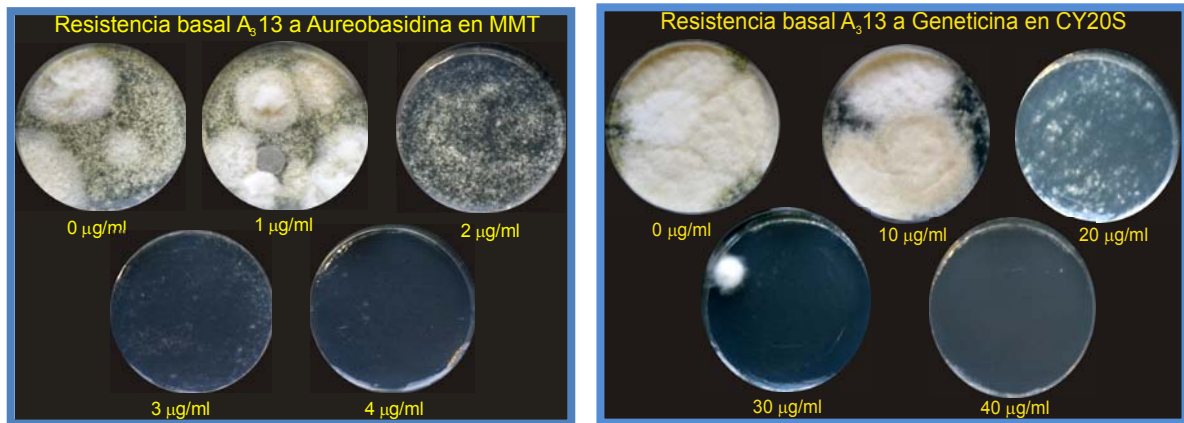
Para comprobar si el ADN total extraído de los hipotéticos transformantes de *Eurotium* se encontraba ADN plasmídico libre, se transformó la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  con 1  $\mu$ L de dicho ADN. Posteriormente se seleccionaron clones positivos de cada transformación y se extrajo el plásmido mediante el método descrito en el apartado 3.7.2 de Materiales y Métodos.

Una vez obtenido el ADN plasmídico se digirieron 3  $\mu$ L de pAUR316 con *Bam*HI y con *Bam*HI-SacI y 3  $\mu$ L del plásmido pAURgen con *Pst*I y se observó que el perfil de restricción de ambos plásmidos coincidía con el perfil de bandas esperado (**Figura 39**). En vista de estos resultados, se determinó que ambos plásmidos no habían sufrido reorganizaciones y eran capaces de mantenerse de forma autónoma en la cepa de *E. rubrum* C47.

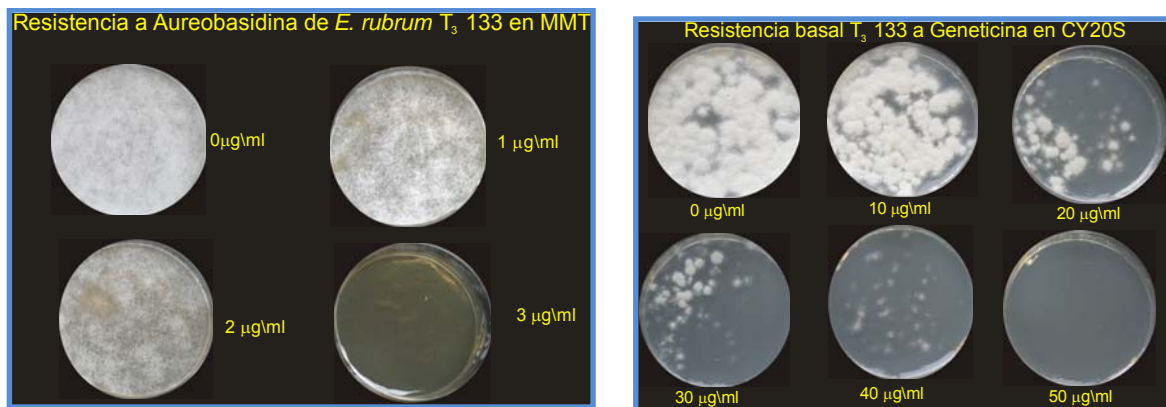


**Figura 39:** Perfil de restricción de los plásmidos de replicación autónoma pAUR316 y pAURgen obtenidos tras la transformación de *E. coli* con el ADN total de hipotéticos transformantes de *E. rubrum*. **Imagen A:** 1; Marcador de peso molecular  $\lambda$ -Hind III, 2; Transformante 1 pAUR316 digerido con BamHI, 3; Transformante 1 pAUR316 digerido con BamHI y SacI, 4; Transformante 2 pAUR316 digerido con BamHI y 5; Transformante 2 pAUR316 digerido con BamHI y SacI. **Imagen B:** 1; Marcador de peso molecular  $\lambda$ -Pst I y 2; Transformante 1 pAURgen<sup>R</sup> digerido con Pst I.

Una vez optimizadas las condiciones de transformación en la cepa *E. rubrum* C47 se comprobó si dichas condiciones eran también válidas para transformar las cepas no productoras de flavoglucina *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133. Se comprobó que los marcadores de selección funcionales en la cepa *E. rubrum* C47 eran también funcionales en dichos mutantes, si bien se observaron pequeñas diferencias en el nivel basal de resistencia frente a la geneticina y a la aureobasidina, de forma que la cepa de *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 no es capaz de crecer a una concentración de 5  $\mu$ g/mL de aureobasidina y 50  $\mu$ g/mL de geneticina o superiores (**Figura 40**), mientras que *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 es incapaz de crecer a concentraciones de 60  $\mu$ g/mL de geneticina y 3  $\mu$ g/mL de aureobasidina o superiores (**Figura 41**).



**Figura 40:** Resistencia basal de la cepa de *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 a concentraciones crecientes de aureobasidina (0, 1, 3 y 4 µg/mL) y geneticina (0, 10, 20, 30 y 40 µg /mL) en el medio de cultivo MMT y CY20S respectivamente.



**Figura 41:** Resistencia basal de la cepa de *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 a concentraciones crecientes de aureobasidina (0, 1 y 3 µg/mL) y geneticina (0, 10, 20, 30, 40 y 50 µg/mL) en el medio de cultivo MMT y CY20S respectivamente.

En base a estos resultados, finalmente se determinó que los plásmidos funcionales y las condiciones de selección en las cepas de *E. rubrum* C47, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133 son los descritos en la siguiente tabla:

Cepa	Plásmidos	Marcadores de selección	Concentración de selección	Medio de cultivo
<i>E. rubrum</i> C47	pAURgen <sup>R</sup> ( <i>npfII</i> )	Geneticina	80 µg/mL	CY20S
	pAUR316 ( <i>aur</i> <sup>R</sup> )	Aureobasidina	4 µg/mL	MMT
<i>E. rubrum</i> A <sub>3</sub> 13	pAURgen <sup>R</sup> ( <i>npfII</i> )	Geneticina	50 µg/mL	CY20S
	pAUR316 ( <i>aur</i> <sup>R</sup> )	Aureobasidina	5 µg/mL	MMT
<i>E. rubrum</i> T <sub>3</sub> 133	pAURgen <sup>R</sup> ( <i>npfII</i> )	Geneticina	60 µg/mL	CY20S
	pAUR316 ( <i>aur</i> <sup>R</sup> )	Aureobasidina	3 µg/mL	MMT

**Tabla 14:** Resumen de los distintos parámetros utilizados para transformar las cepas de *E. rubrum* C47, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133.

### 4.4.3. Construcción de una biblioteca genómica de *E. rubrum* C47 en el vector λ-DASH II.

Como paso previo a la clonación de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de flavoglauцина se llevó a cabo la construcción de una biblioteca genómica de *E. rubrum* C47 en el vector derivado del fago Lambda DASH II (Stratagene, apartado 3.2.1 de Materiales y Métodos).

La capacidad de clonación del vector fágico λ- DASH II es de fragmentos de ADN de 15 a 23 Kb. Este tamaño parece en principio suficiente para que un fragmento de ADN clonado en este vector contenga la agrupación génica completa implicada en la biosíntesis de flavoglauцина o al menos los genes completos que codifican para las hipotéticas policétidosintasa y desaturasa (**Figura 34**).

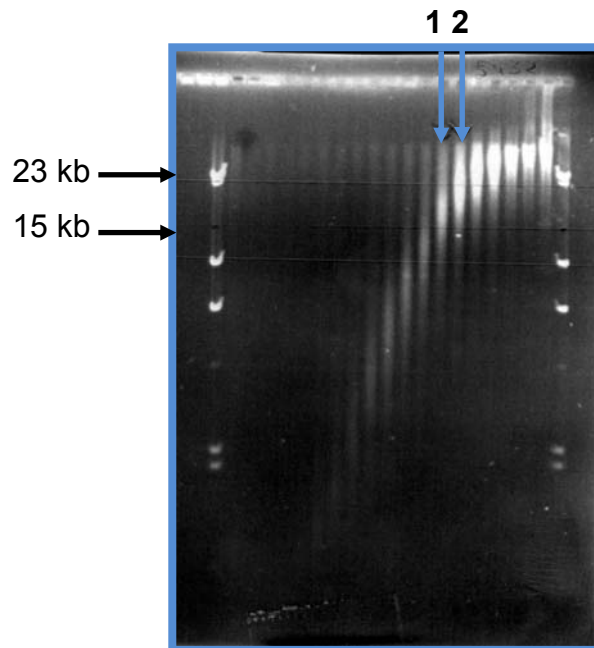
En primer lugar se obtuvo el ADN total de la cepa C47 de *E. rubrum* mediante el método descrito en el apartado 3.8.1 de Materiales y Métodos. Posteriormente, y con el fin de obtener fragmentos del tamaño admitido por el vector, se utilizó la enzima *Sau3AI* que deja extremos cohesivos compatibles con los generados por la enzima *BamHI* entre los dos brazos del fago. Para determinar la concentración óptima de enzima necesaria para obtener fragmentos de ADN con un tamaño de 15-23 Kb se llevó a cabo la digestión parcial de 1 µg de ADN total de *E. rubrum* C47 con un rango de concentraciones de *Sau3AI* entre 0,05 y 0,2 unidades de enzima/µg de ADN. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0,4% y se determinó que la concentración óptima de enzima necesaria para obtener



fragmentos de ADN del tamaño de interés era de 0.15 unidades de enzima/ $\mu\text{g}$  de ADN.

Con estas condiciones se llevó a cabo la digestión parcial de 50  $\mu\text{g}$  de ADN de *E. rubrum* C47. Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron en función de su tamaño por medio de un gradiente de sacarosa, según se describe en el apartado 3.10.2 de Materiales y Métodos.

Las distintas fracciones del gradiente se visualizaron en un gel de agarosa al 0,4% y se identificaron aquellas que contenían mayoritariamente los fragmentos de 15-23 Kb (**Figura 42**). Las fracciones elegidas se precipitaron tal y como se indica en el apartado 3.10.2 de Materiales y Métodos y se resuspendieron en 10  $\mu\text{L}$  de agua milli-Q, como paso previo a la ligación con el vector fágico.



**Figura 42:** Fracciones del gradiente de sacarosa mediante el que se obtuvo la separación de los fragmentos de ADN de *E.rubrum* C47 resultantes de la digestión parcial con *Sau3A*I.

Las fracciones marcadas en la figura son las que contienen mayoritariamente fragmentos de ADN de 15 a 23 kb, tamaño determinado a partir del marcador de peso molecular utilizado,  $\lambda$ -*Hind* III.

Los fragmentos de ADN obtenidos y purificados mediante el gradiente de sacarosa se ligaron entre los brazos del vector, predigerido con *Bam*HI. Para ello se utilizaron cantidades equimoleculares de ADN fúngico y de vector, incubándose la reacción durante 12 h a 15 °C. Finalmente, se utilizó el sistema comercial de



## Resultados y Discusión

---

Stratagene (“Lambda DASH<sup>®</sup> II/*Bam* HI Vector Kit”) para empaquetar el ADN producto de la ligación y formar las partículas fágicas viables.

Posteriormente se tituló la biblioteca genómica, determinando el número de fagos recombinantes obtenidos después del proceso de encapsidación *in vitro*. Para ello se prepararon células de la cepa *E. coli* XL1-Blue MRA P2 tal y como se describe en el apartado 3.5.1 de Materiales y Métodos y se infectaron siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.5.2a.

El título de la genoteca se calculó de acuerdo a la fórmula:

Título (pfu/mL) = n° de placas de lisis (pfu) x Factor de dilución/volumen plaqueado (mL).

De esta forma se determinó que el título de la genoteca era  $2,9 \times 10^6$  pfu/mL.

Para calcular la probabilidad de que, con dicho título, la biblioteca genómica contuviese el genoma completo de *E. rubrum* C47, se utilizó la fórmula descrita por Clarke y Carbon, (1976).

$$N = \ln(1-P) / [\ln(1-t/T)]$$

Donde **N** es el número total de clones necesarios para que la probabilidad de tener clonado un gen o fragmento de ADN sea igual a P; **P** es la probabilidad de que un determinado gen se encuentre representado en la biblioteca genómica (generalmente se utiliza 0,99); **t** es el tamaño medio del inserto en Kb. En nuestro caso el tamaño medio utilizado para la construcción de la biblioteca genómica fue de 19 Kb y **T** es el tamaño total del genoma en Kb.

El tamaño exacto del genoma de *E. rubrum* no se conoce, pero el de hongos filamentosos similares pertenecientes al grupo Ascomycetes y cuyo genoma completo ha sido secuenciado, oscila entre 30-40 Mb (Fungal Genetics Stock Center Web Site). Si consideramos que el tamaño del genoma de *E. rubrum* es de aproximadamente 40 Mb, al menos 9.700 clones serían necesarios para que la biblioteca genómica fuera representativa del genoma completo de *E. rubrum* C47. Como el título de nuestra genoteca fue de  $2,9 \times 10^6$  pfu/mL, consideramos que es altamente representativa.

#### 4.4.4. Búsqueda de posibles desaturasas y policétidosintasas implicadas en la ruta de biosíntesis de flavoglaucina.

Con el fin de localizar en la biblioteca genómica de la cepa C47 las secuencias génicas que codifiquen hipotéticas desaturasas y policétidosintasas se diseñaron oligonucleótidos degenerados en base a la información disponible sobre estos genes en la bibliografía existente y en las bases de datos, de forma que se pudieran amplificar fragmentos de ADN a partir del genoma de *E. rubrum* para ser utilizados como sondas que permitieran la localización de los genes completos en la biblioteca genómica.

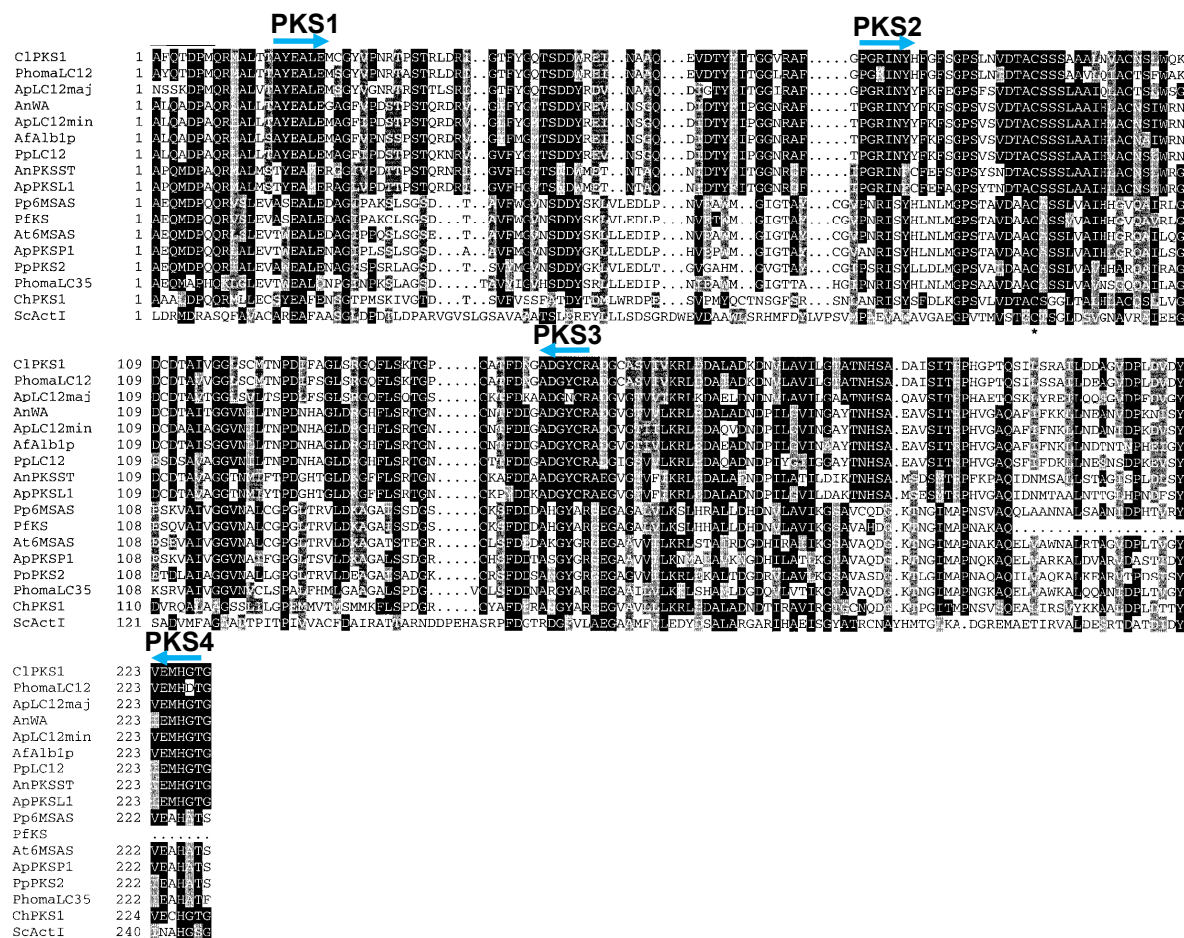
##### a) Diseño de oligonucleótidos degenerados.

Para el diseño de los oligonucleótidos degenerados nos basamos en el hecho de que las desaturasas y las policétidosintasas son proteínas con dominios altamente conservados (Schümann y Hertweck, 2006; Linnemannstöns y col, 2002; Bingle y col., 1999; Sakai y Kajiwara, 2003; Meesapyodsuk y col, 2007 y Sakuradani y col, 1999).

Por otro lado también tomamos como referencia la frecuencia del uso de codones de *E. rubrum*, la cual se calculó a partir de la proteína de *E. rubrum*, manitol-1-fosfato deshidrogenasa y la secuencia parcial del dominio conservado del citocromo b, existentes en la base de datos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la frecuencia del uso de codones de especies como *Eurotium herbariorum* y *Aspergillus sp*, próximas filogenéticamente a *E. rubrum*, ([www.kazusa.or.jp/codon](http://www.kazusa.or.jp/codon)).

En el caso de las policétidosintasas, para el diseño de los oligonucleótidos degenerados se tuvieron en cuenta las secuencias y dominios conservados de policétidosintasas fúngicas descritos por Bingle y col., (1999).

Los dominios conservados PKS1, PKS2, PKS3 y PKS4 fueron los elegidos para el diseño de los oligonucleótidos degenerados (**Figura 43**).



**Figura 43:** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de policétidosintasas fúngicas. **C1PKS1:** *Colletotrichum lagenarium* PKS1 (Takano y col., 1995); **Phoma LC12:** Producto de PCR LC1/2c *Phoma sp.*C2932; **ApLC12maj:** producto de PCR *Aspergillus parasiticus*; **AnWA:** *A. nidulans* WA (Mayorga y Timberlake, 1992); **ApLC12min:** Producto de PCR de *A. parasiticus*; **AfAlb1p:** *A. fumigatus* Alb1p (Tsai y col., 1998); **PpLC12:** Producto de PCR *Penicillium patulum*; **AnPKSST:** *A. nidulans* pksST (Yu y Leonard, 1995); **ApPKSL1:** *A. parasiticus* pksL1 (Feng y Leonard, 1995); **Pp6MSAS:** *P. patulum* (Beck y col., 1990); **PfkS:** *P. freii* PfkS (Nicolaisen y col., 1997); **At6MSAS:** *A. terreus* MSAS/pksM (Pažoutová y col., 1997); **ApPKSP1:** *A. parasiticus* pksP1 (Feng y Leonard, 1998); **PpPKS2:** *P. patulum* PKS2; **ChPKS1:** *Cochliobolus heterostrophus* PKS1 (Yang y col., 1996) y **ScActI:** ActI-Orf1 de *Streptomyces coelicolor* (Fernández-Moreno y col., 1992). En azul se muestran los dominios conservados utilizados para el diseño de oligonucleótidos degenerados.

En la **Tabla 15** se detallan las secuencias de los dominios conservados de las policétidosintasas fúngicas a partir de los cuales se diseñaron los oligonucleótidos degenerados y las secuencias nucleotídicas de cada uno de ellos.

Dominio conservado	Secuencia de aminoácidos (5'-3')	Oligonucleótido degenerado	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
PKS1	AYEALE	PKS1	5'-GCYTAYGARGCYTTIGA-3'
PKS2	PGRINY	PKS2	5'-CCYGGYCGYATYAAYTA-3'
PKS3	ADGYCRA	PKS3	5'-RGCRCGRCARTARCCRTCRCG-3'
PKS4	EMHGTTG	PKS4	5'-RCCRGTRCCRAGCATYTC-3'

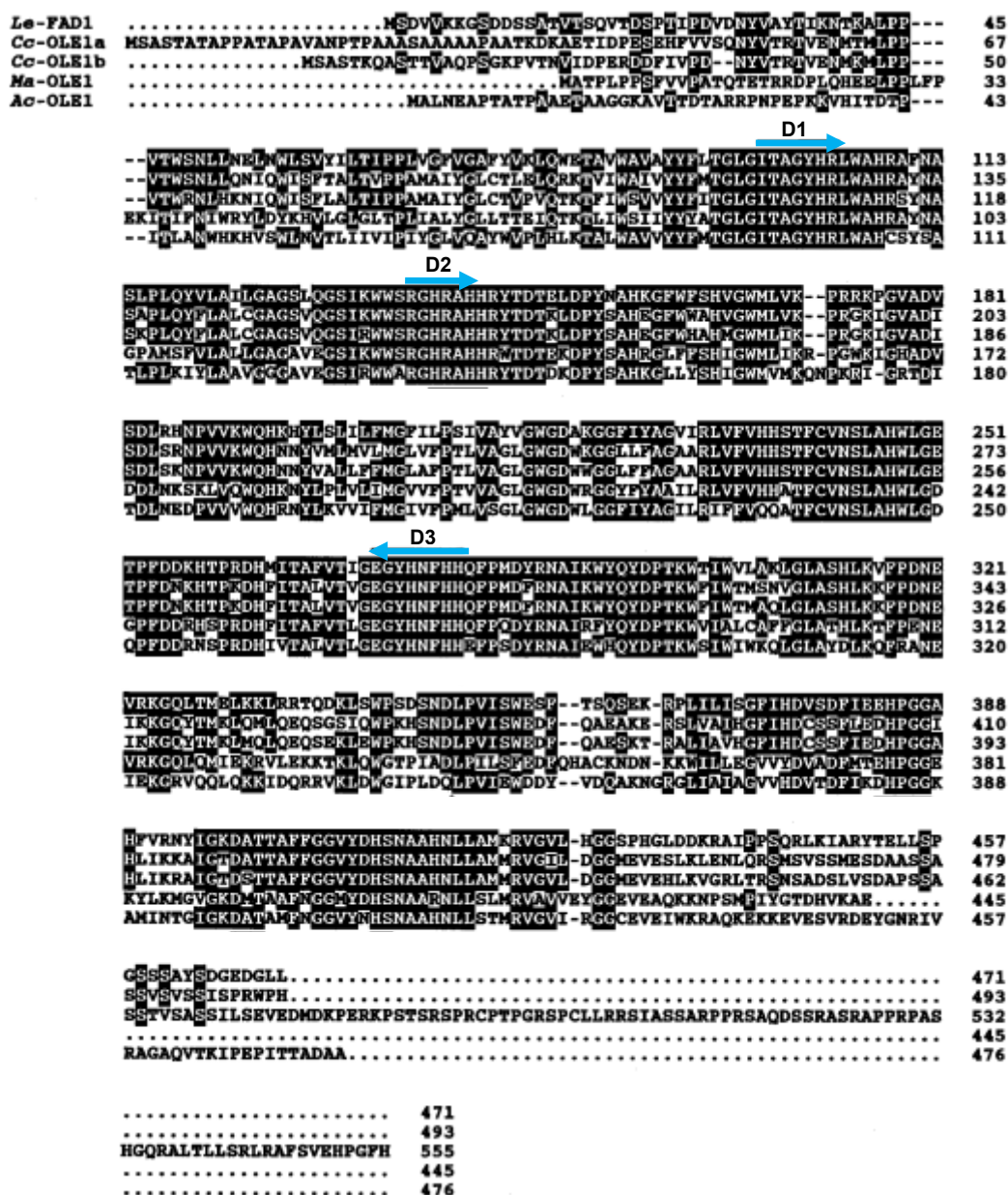
**Tabla 15:** Detalle de la secuencia de aminoácidos de los dominios conservados de policétidosintasas de hongos: PKS1, PKS2, PKS3 y PKS4 y la secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos degenerados diseñados para cada uno de los dominios. La I se corresponde con Inosina, Y con una pirimidina (C o T) y R con una purina A o G.

Teniendo en cuenta las secuencias conservadas que se muestran en la **Figura 43** se estimó que los fragmentos de ADN amplificados con la combinación de las distintas parejas de los oligonucleótidos degenerados sería de aproximadamente:

- PKS1-PKS3: 440 pb.
- PKS1-PKS4: 640 pb.
- PKS2-PKS3: 250 pb.
- PKS2-PKS4: 470 pb.

Del mismo modo que en el caso de las policétidosintasas, para el diseño de los oligonucleótidos degenerados que amplificasen genes codificantes de posibles desaturasas, se tomó como referencia el uso de codones de *E. rubrum*, *Eurotium herbariorum* y *Aspergillus sp.* y las zonas conservadas de desaturasas que participan en la síntesis de ácidos grasos (Sakai y Kajiwara, 2003) debido a que estos compuestos poseen una estructura molecular semejante a la flavoglaucina.

En la **Figura 44** se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de distintas desaturasas de ácidos grasos de hongos, así como los dominios conservados, D1, D2 y D3 elegidos para diseñar los oligonucleótidos degenerados.



**Figura 44:** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de desaturasas de ácidos grasos fúngicas. **Le-FAD1**:  $\Delta 9$ -desaturasa de *L. edodes*  $\Delta 9$ -desaturasa; **Cc-OLE1a**:  $\Delta 9$ -desaturasa de *C. curvans* CBS 570; **Cc-OLE1b**:  $\Delta 9$ -desaturasa de *C. curvans* ATCC 20509; **Ma-OLE1**:  $\Delta 9$ -desaturasa de *M. alpina* y **Ac-OLE1**:  $\Delta 9$ -desaturasa de *Ajellomyces capsulatus*. En azul se muestran los dominios conservados utilizados para diseñar los oligonucleótidos degenerados.

Según estos datos se estimó que los fragmentos de ADN amplificados con la combinación de las distintas parejas de los oligonucleótidos degenerados para amplificar secuencias de posibles desaturasas sería de aproximadamente:

- D1-D3 de 720 pb.

- D2-D3 de 570 pb.

En la siguiente tabla se detallan las secuencias de los dominios conservados de las desaturasas de ácidos grasos de hongos y los oligonucleótidos degenerados diseñados para cada uno de los dominios.

Dominio conservado	Secuencia de aminoácidos (5'-3')	Oligonucleótido degenerado	Secuencia de nucleótidos (5'-3')
DES1	ITAGYHR	D1	5'-ATHACIGCIGGITAYCAYMG-3'
DES2	HHR(Y/W)TDT	D2	5'-CAYCAYMGITRIACIGAYAC-3'
DES3	HH(F/Y)NH(Y/W)GE	D3	5'-TGRTGRWARTTRTGIYAICCYTC-3'

**Tabla 16:** Resumen de la secuencia de aminoácidos de los dominios conservados de policétidosintasas de hongos: DES1, DES2 y DES3 y la secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos degenerados diseñados para cada uno de los dominios. La I se corresponde con Inosina; Y con una pirimidina (C o T); R con una purina A o G; H con A, C o T; M con A o C y w con A o T.

Una vez diseñados los oligonucleótidos degenerados, estos se utilizaron para amplificar por PCR fragmentos correspondientes a posibles desaturasas y policétidosintasas a partir del ADN genómico de *E. rubrum* C47.

**b) Amplificación y clonación de las posibles policétidosintasas y desaturasas en el vector pGEM-T Easy.**

Con el fin de amplificar los fragmentos correspondientes a posibles policétidosintasas y desaturasas, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando la mezcla de reacción detallada en la **Tabla 17**. Como control se realizaron reacciones utilizando cada una de las parejas de oligonucleótidos ensayas pero sin añadir ADN molde.



## Resultados y Discusión

Solución	Concentración final
ADN total <i>E. rubrum</i>	200 ng ADN total
Cebadores (18-24 pb)	0,6 µM
GoTaqADN polymerase (Sigma)	0,5 unidades
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTPs	0,2 µM
Opti-prime 10Xbuffer 3 <sup>(1)</sup>	1X
Perfec Match®DNA polymerase enhancer <sup>(3)</sup>	0,5 U
Master Mix™50XBuffer <sup>(2)</sup>	1X
Milli-Q	Hasta completar 50 µL

**Tabla 17:** Mezcla de la reacción de PCR utilizada para amplificar las secuencias de las hipotéticas desaturasas y policétidosintasas a partir del ADN total de *E. rubrum* C47.

<sup>(1)</sup> Opti-prime 10Xbuffer 3 (Stratagene): 100 mM Tris-HCl (pH 8,3); 35 mM MgCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl.

<sup>(2)</sup> Master Mix™50XBuffer (Stratagene): 20 mM Tris-HCl (pH 8); 250 mM EDTA.

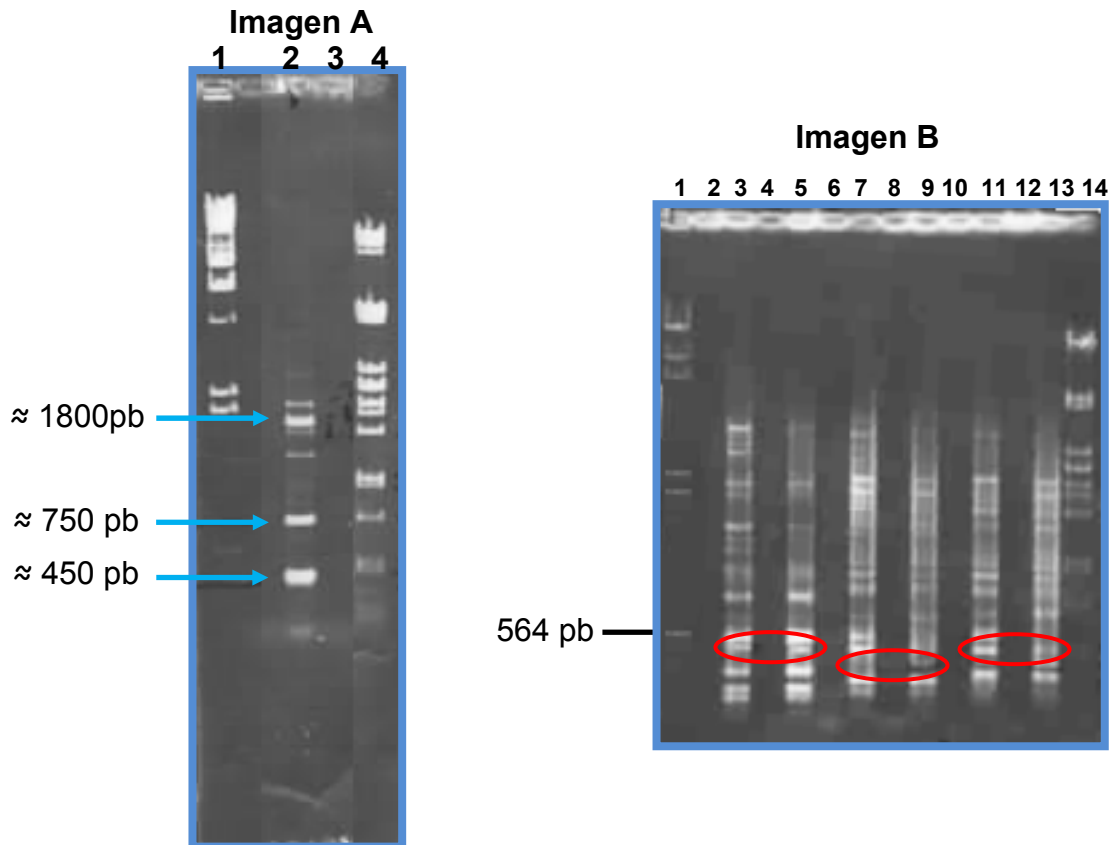
<sup>(3)</sup> Perfec Match®DNA polymerase enhancer (Stratagene, no se conoce su composición).

El programa de PCR utilizado se detalla en la siguiente tabla:

Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C	3 minutos	1
<b>Alineamiento</b>	55 °C	2 minutos	1
<b>Extensión</b>	72 °C	1,5 minutos	25
<b>Desnaturalización</b>	94 °C	1 minuto	
<b>Alineamiento</b>	55 °C	1 minuto	
<b>Extensión final</b>	72 °C	8 minutos	1

**Tabla 18:** Programa de PCR utilizado para amplificar con oligonucleótidos degenerados las secuencias de las hipotéticas desaturasas y policétidosintasas de *E. rubrum* C47.

Los fragmentos de ADN obtenidos de las reacciones de amplificación se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,5% y se observó que se obtenían varios fragmentos de ADN de distinto tamaño tanto en el caso de las desaturasas (**Figura 45A**) como en el de las policétidosintasas (**Figura 45B**).



**Figura 45: Imagen A;** Separación de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR a partir del ADN total de la cepa *E. rubrum* C47 utilizando los oligonucleótidos degenerados D2 y D3 con homología a hipotéticas desaturasas. Donde **1:**  $\lambda$ - *Hind*III (1  $\mu$ g); **2:** Fragmentos de ADN obtenido utilizando los oligonucleótidos DES1 y DES2; **3:** Reacción control (sin ADN) **4:**  $\lambda$ - *Pst*I (1  $\mu$ g). **Imagen B;** **1:**  $\lambda$ - *Hind*III (1  $\mu$ g); **2 y 4:** Reacciones control (sin ADN) para los oligonucleótidos PKS2 y PKS4; **3 y 5:** Fragmentos de ADN obtenido utilizando los oligonucleótidos PKS2 y PKS4; **6 y 8:** Reacciones control (sin ADN) para los oligonucleótidos PKS2 y PKS3; **7 y 9:** Fragmentos de ADN obtenido utilizando los oligonucleótidos PKS2 y PKS3; **10 y 12:** Reacciones control (sin ADN) para los oligonucleótidos PKS1 y PKS3; **11 y 13:** Fragmentos de ADN obtenido utilizando los oligonucleótidos PKS1 y PKS3 **14:**  $\lambda$ - *Pst*I (1  $\mu$ g)

En el caso de las hipotéticas desaturasas, cuando se utilizaron los oligonucleótidos degenerados D1-D3 se observó que se obtenía amplificación de fragmentos en la reacción control. Con el fin de evitar la amplificación inespecífica se modificaron diferentes parámetros de la reacción de PCR pero no se consiguieron mejores resultados, por lo que en un principio descartamos el uso de esta pareja de oligonucleótidos.

Cuando se utilizó la pareja de oligonucleótidos D2-D3 se observó amplificación de fragmentos de distinto tamaño en la reacción con ADN de



*E. rubrum* C47, mientras que en la reacción control el resultado era negativo. Los fragmentos mayoritarios tenían un tamaño de 1800pb, 750 pb y 450 pb aproximadamente (**Figura 45A**). El tamaño estimado del fragmento a amplificar con la pareja de oligonucleótidos D2-D3 es de aproximadamente 570 pb.

Para determinar si alguno fragmento de los obtenidos en la amplificación correspondía a secuencias homologas a desaturasas, estos se clonaron de forma independiente en el vector pGEM-T Easy (Promega). Para ello, cada uno de los fragmentos de interés se extrajeron a partir de un gel de agarosa utilizando el kit “GFX™ PCR ADN and Gel Band Purification Kit” (Amersham-Biosciences) y posteriormente se clonó cada uno de ellos en el plásmido pGEM-T Easy siguiendo las indicaciones del fabricante.

En el caso de las hipotéticas policétidosintasas, se observó amplificación de numerosos fragmentos de distinto tamaño en las reacciones con cada una de las parejas de oligonucleótidos ensayados, mientras que en las reacciones control no se produjo amplificación. En este caso no se pudo aislar cada uno de los fragmentos para clonarlos individualmente en el vector pGEM-T Easy, debido a las numerosas bandas obtenidas (**Figura 45B**). Por este motivo se utilizó la mezcla de PCR como producto para la reacción de ligación en el plásmido pGEM-T Easy.

Como se puede observar marcado en rojo en la **Figura 45B** los fragmentos amplificados con las distintas parejas de oligonucleótidos se corresponden, con los tamaños esperados para cada una de las parejas.

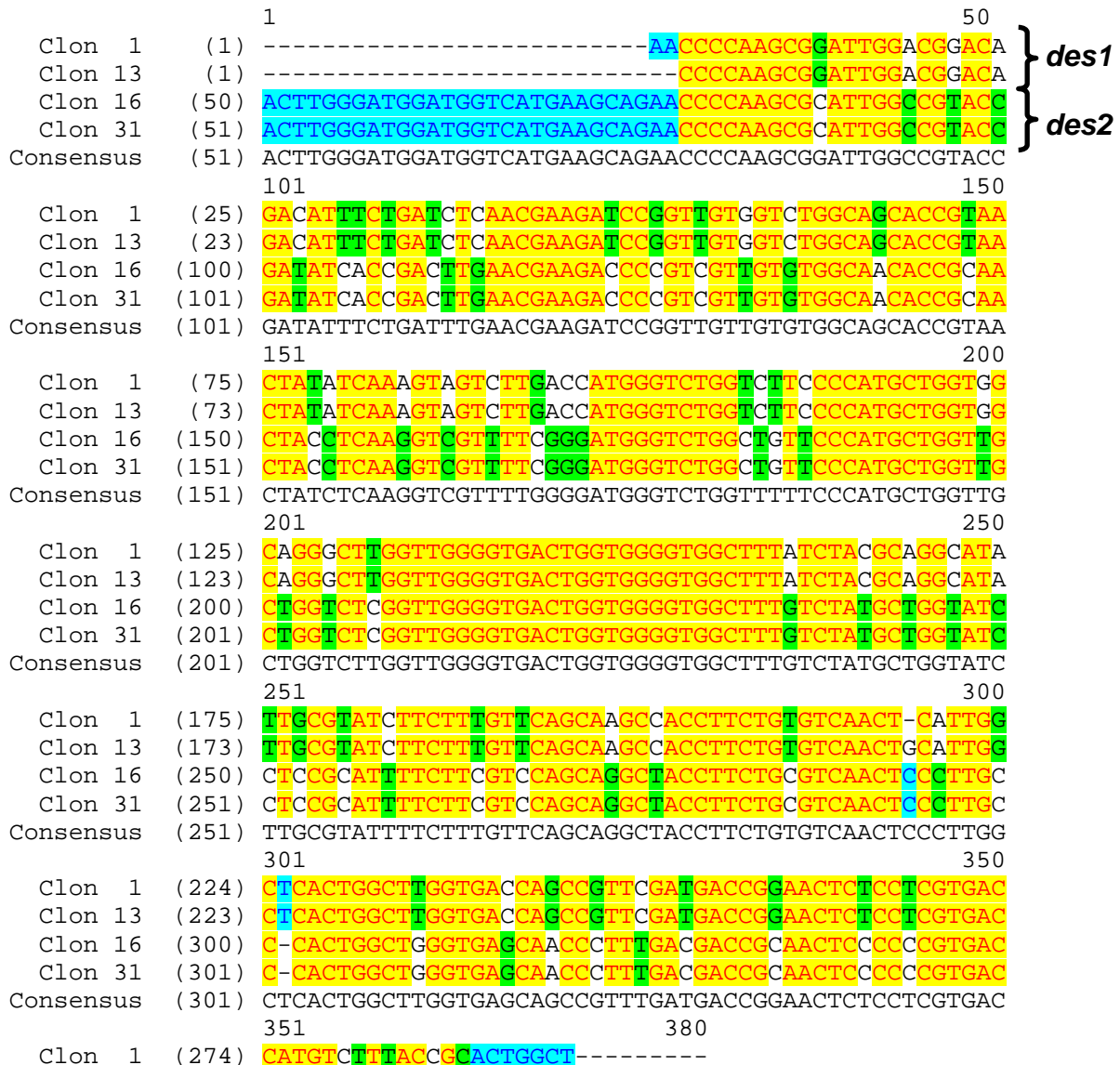
### **c) Análisis de los transformantes en pGEM-T Easy.**

Con el fin de caracterizar los fragmentos presuntamente correspondientes a desaturasas clonados en el vector pGEM-T Easy se obtuvo el ADN plasmídico de doce transformantes portadores de cada uno de los fragmentos y se digirieron con la enzima *EcoRI*, la cual libera el inserto del plásmido. Se visualizó el producto de la digestión en un gel de agarosa al 0,7% y se seleccionó un clon portador de cada uno de los fragmentos.

Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de cada uno de ellos utilizando los oligonucleótidos universales M13-R/M13-F o T7/SP6.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) y se comprobó que los fragmentos que presentaba un alto grado de identidad con las secuencias de desaturasas eran los que poseían un tamaño de 450 pb aproximadamente, señalado en la **Figura 45A**. Este tamaño es semejante al esperado para la pareja de oligonucleótidos degenerados utilizada (D2-D3). Las secuencias obtenidas de los fragmentos de 1800pb y 750 pb no presentaron homología con secuencias de desaturasas.

Las secuencias génicas que presentaban homología con desaturasas se alinearon y compararon entre sí observándose que en *E. rubrum* C47 existen al menos dos genes diferentes que codifican posibles desaturasas, los cuales se denominaron *des1* y *des2* (**Figura 46**).



## Resultados y Discusión

Clon 13	(273)	CATGTCCTTTACCGCACTGGCTACTCTGGGC
Clon 16	(349)	CATGTCATCACTGA-----
Clon 31	(350)	CATGTCATCACTGA-----
Consensus	(351)	CATGTGTTTACTGCACTGGCT

**Figura 46:** Alineamiento de las secuencias génicas que codifican dos posibles desaturasas (*des1* y *des2*) amplificadas a partir del genoma de *E.rubrum* C47.

En el caso de las hipotéticas policétidosintasas, con el fin de identificar aquellos clones que contenían los fragmentos con tamaños semejantes a los esperados (PKS1-PKS3 $\approx$ 440 pb, PKS1-PKS4 $\approx$ 640 pb, PKS2-PKS3 $\approx$ 250 pb y PKS2-PKS4 $\approx$ 470 pb) se obtuvo el ADN plasmídico de distintos clones positivos seleccionados al azar y se digirieron con la enzima *EcoRI* observándose que existían pequeñas variaciones en el tamaño del inserto que portaban. Por ello, se secuenciaron varios clones que portaban insertos de tamaños semejantes a los esperados. La comparación de las secuencias obtenidas con las presentes en la base de datos permitió comprobar que los fragmentos de aproximadamente 340 pb, amplificados con los oligonucleótidos PKS2-PKS3 y de aproximadamente 550 pb amplificados con PKS2 y PKS4, presentaban un alto grado de identidad con policétidosintasas. En ambos casos el tamaño fue semejante al esperado.

Por otro lado, ninguno de los clones analizados con inserto PKS1-PKS3 y PKS1-PKS4 tuvo similitud con las policétidosintasas existentes en las bases de datos.

La comparación de las secuencias amplificadas a partir del genoma de *E. rubrum* que presentaban homología con policétidosintasas permitió comprobar que en esta cepa existen al menos dos genes diferentes que podrían codificar para estas enzimas, los cuales se denominaron *pks1* y *pks2* (**Figura 47**).

		251		300	
Clon 31	(1)	-----		CAGCA	← <i>pks2</i>
Clon 45	(251)	GTCGTAAGCATTGCAGTTTCTGCAAGCCAAATTGGTTAGTTAGTCTGCA			
Clon 10	(188)	GTCGAAAGCATTGCAGTTTCTGCAAGCCAAGTTGGTTAGTTAGTCTGCA			} <i>pks1</i>
Clon 8	(29)	GTCGAAAGCATTGCAGTTTCTGCAAGCCAAGTTGGTTAGTTAGTCTGCA			
Clon 6	(205)	GTCGAAAGCATTGCAGTTTCTGCAAGCCAAGTTGGTTAGTTAGTCTGCA			
Consensus	(251)	GTCGAAAGCATTGCAGTTTCTGCAAGCCAAGTTGGTTAGTTAGTCTGCA			
		301		350	
Clon 31	(6)	CTTGCATCCATGCTTACAGTTACCAAGTCTGCCTGAGGAAATGGCCATT			
Clon 45	(301)	CATCTACCTAATCTGGGAGCTGTACCTTTTGGAGTCAGAAAATGGCCTCG			
Clon 10	(238)	CATCTACCTAATCTGGGAGCTGTACCTTTTGGAGTCAGAAAATGGCCTCG			
Clon 8	(79)	CATCTACCTAATCTGGGAGCTGTACCTTTTGGAGTCAGAAAATGGCCTCG			
Clon 6	(255)	CATCTACCTAATCTGGGAGCTGTACCTTTTGGAGTCAGAAAATGGCCTCG			

Consensus	(301)	CATCTACCTAATCTGGGAGCTGTACCTTTTGTGAGTCAGAAAATGGCCTCG	351	400
Clon 31	(56)	GCAGAGACCGGC AAAACCGTCCGAGTTTGTGAGGACGTTGACGCCCCCG		
Clon 45	(351)	GTCCAACCCAGAAAACTGTCCGGGCTCGTCAAGATAATTGACACCTCCAG		
Clon 10	(288)	GTCCAACCCAGAAA GACTGTCCGGGCTCGTCAAGATAATTGACACCTCCAG		
Clon 8	(129)	GTCCAACCCGAAAACTGTCCGGGCTCGTCAAGATAATTGACACCTCCAG		
Clon 6	(305)	GTCCAACCCAGAAAACTGTCCGGGCTCGTCAAGATAATTGACACCTCCAG		
Consensus	(351)	GTCCAACCCAGAAAACTGTCCGGGCTCGTCAAGATAATTGACACCTCCAG	401	450
Clon 31	(106)	CGATGACCATATCGGCATTCGCGCTCCACAGCGTTGTGCAAGCGATCTGG		
Clon 45	(401)	CCAAAGCCGTATCGCATTCACCACGCCACAAGTATGTGCAAGCAGTTTCA		
Clon 10	(338)	CCAAAGCCGTATCGCATT-----		
Clon 8	(179)	CCAAAGCCGTATCGCATTCACCACGCCACAAGTATGTGCAAGCAGTTTCA		
Clon 6	(355)	CCAAAGCCGTATCGCATTCACCACGCCACAAGTATGTGCAAGCAGTTTCA		
Consensus	(401)	CCAAAGCCGTATCGCATTCACCACGCCACAAGTATGTGCAAGCAGTTTCA		

**Figura 47:** Alineamiento de las secuencias génicas de posibles policétidosintas amplificadas a partir del genoma de *E. rubrum* C47.

**d) Rastreo de genes que codifican posibles desaturasas y policétidosintas en la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47.**

Con el fin de localizar los genes que codifican las hipotéticas policétidosintas y desaturasas en la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47, se llevó a cabo el rastreo, mediante PCR, de la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47 construida en el vector λ-DASH II, tal y como se describe en el apartado 3.10.7 de Materiales y Métodos. Para ello, en primer lugar se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicos para cada uno de los fragmentos obtenidos con anterioridad de los genes *des1*, *des2*, *pks1* y *pks2* obtenidas anteriormente. Los distintos oligonucleótidos se denominaron DES1A-DES1B para el gen *des1*, DES2A-DES2B para el gen *des2*, PKS1A-PKS1B para el gen *pks1* y PKS2A-PKS2B para el gen *pks2*. El tamaño de los fragmentos amplificados con cada una de las distintas parejas de oligonucleótidos específicos sería de:

- DES1A-DES1B de 349 pb.
- DES2A-DES2B de 360 pb.
- PKS1A-PKS1B de 368 pb.
- PKS2A-PKS2B de 239 pb.

## Resultados y Discusión

Con estos oligonucleótidos específicos se llevó a cabo el rastreo de los genes de interés mediante PCR, para la cual se utilizó la mezcla de reacción y el programa que se describen en las **Tablas 19 y 20**, respectivamente:

Solución	Concentración final
ADN total <i>E. rubrum</i>	200 ng ADN total
Cebadores (18-24 pb)	0,6 $\mu$ M
GoTaqADN polymerase (Sigma)	0,5 unidades
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM
dNTPs	0,2 $\mu$ M
10Xbuffer	1X
Milli-Q	Hasta completar 50 $\mu$ L

**Tabla 19:** Mezcla de la reacción de PCR utilizada para rastrear la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47 construida en el vector  $\lambda$ -Dash II.

Segmento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
<b>Desnaturalización inicial</b>	95 °C	2 minutos	1
<b>Desnaturalización</b>	95 °C	30 segundos	25
<b>Alineamiento</b>	60 °C	30 segundos	
<b>Extensión</b>	72 °C	30 segundos	
<b>Extensión final</b>	72 °C	7 minutos	1

**Tabla 20:** Programa de PCR utilizado para rastrear la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47- $\lambda$  DASH II.

De este modo, se seleccionaron dos clones positivos ( $\lambda$ -1 y  $\lambda$ -13) para el gen *des1*, dos ( $\lambda$ -16 y  $\lambda$ -31) para el gen *des2* y tres ( $\lambda$ -23,  $\lambda$ -30 y  $\lambda$ -34) para el gen *pks1*. En el caso del gen *pks2* no se obtuvo ningún clon positivo posiblemente porque la secuencia a amplificar por PKS2A y PKS2B no se encuentra completa en un único fago.

#### 4.4.5 Análisis de los clones seleccionados mediante Southern blot.

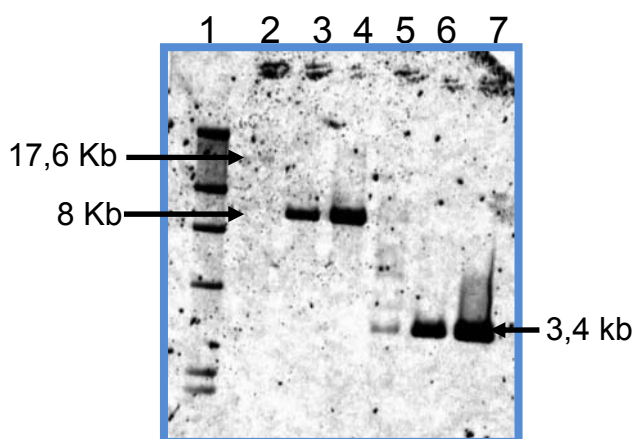
Los fagos seleccionados se analizaron mediante hibridación (Southern blot) con el propósito de confirmar que contenían las secuencias de los genes *pks1*, *des1* y *des2*. Para ello se obtuvo el ADN de los distintos fagos y se digirió de forma independiente con *Bam*HI y *Bgl*II. Estas enzimas de restricción nos permiten subclonar el fragmento portador del gen de interés en los plásmidos pAUR316 y pAURgen<sup>R</sup>, los cuales poseen un único punto de corte para dichas enzimas.

Paralelamente se digirió el ADN total de *E. rubrum* C47 con las mismas enzimas para utilizarlo como control positivo.

Los fragmentos obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 0,5% y posteriormente se llevó a cabo la hibridación mediante el protocolo descrito en el apartado 3.11 de Materiales y Métodos. La sonda utilizada en cada caso fue el fragmento amplificado a partir del ADN total de la cepa *E. rubrum* C47 con los oligonucleótidos PKS1A-PKS1B para el gen *pks1*, DES1A-DES1B para el gen *des1* y DES2A-DES2B para el gen *des2*.

En el caso de los fagos  $\lambda$ -1 y  $\lambda$ -13, que contendrían, al menos parcialmente, el gen *des1*, se obtuvo un fragmento *Bam*HI de aproximadamente 8 Kb que hibridaba con la sonda específica correspondiente a ese gen. En ambos fagos la hibridación fue igualmente positiva en un fragmento *Bgl*II de aproximadamente 3,4 Kb (**Figura 48**). Según los datos publicados sobre desaturasas de ácidos grasos en hongos, estas poseen un tamaño de 1 a 2 Kb, aproximadamente (Sakai y col, 2003). El fragmento de ADN donde se produce señal positiva de hibridación, tanto si  $\lambda$ -1 y  $\lambda$ -13 se digieren con *Bam*HI como con *Bgl*II, es superior a 2 Kb. Por ello es probable que el gen *des1* esté completo en los dos fagos analizados.

Dado que los fragmentos de los fagos  $\lambda$ -1 y  $\lambda$ -13 que presuntamente contienen el gen *des1* son iguales se seleccionó uno de ellos,  $\lambda$ -13DES1 para posteriores experimentos.



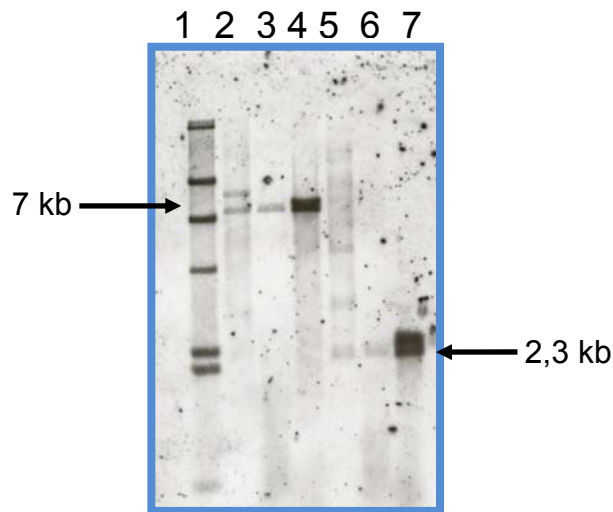
---

**Figura 48:** Análisis mediante Southern blot de los fagos  $\lambda$ -1 y  $\lambda$ -13 portadores del gen *des1*. El ADN fue digerido con *Bam*HI o *Bgl*II e hibridado con una sonda marcada con digoxigenina. **Carril 1:**  $\lambda$ -*Hind*III; **Carril 2:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bam*HI; **Carril 3:**  $\lambda$ -1 *des1* *Bam*HI; **Carril 4:**  $\lambda$ -13 *des1* *Bam*HI; **Carril 5:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bgl*II; **Carril 6:**  $\lambda$ -1 *des1* *Bgl*II y **Carril 7:**  $\lambda$ -13 *des1* *Bgl*II.

---

En el caso del gen *des 2* se llevó a cabo el análisis de los fagos aislados  $\lambda$ -16 y  $\lambda$ -31, para lo que se utilizó como sonda un fragmento de ADN de 360 pb amplificado mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos DES2A y DES2B. En la **Figura 49** se puede observar que la señal de hibridación para este gen se obtuvo en un fragmento de 7 kb aproximadamente cuando se digirió el ADN con *Bam*HI y en uno de 2,3 kb aproximadamente cuando el ADN se digirió con *Bgl*II. En el fago  $\lambda$ -31 se obtuvieron dos señales de hibridación, lo cual puede ser debido bien a que el fago no fue aislado completamente y existía mezcla de ADN de más de un fago, o bien a que el ADN se había digerido parcialmente. Hay que señalar que en el caso del control con ADN genómico de la cepa C47 también se producen dos señales de hibridación, por lo que lo más probable es que se hubiera producido una digestión parcial.

Igual que en el caso anterior se confirmó que el fago  $\lambda$ -16 contenía la secuencia del gen *des2*, siendo probable que contuviese el gen completo porque los fragmentos que presentan señal de hibridación tienen un tamaño superior a 2 kb.



**Figura 49:** Análisis mediante Southern blot de los fagos  $\lambda$ -16 y  $\lambda$ -31 portadores del gen *des2* de las posibles desaturasas. El ADN fue digerido con *Bam*HI o *Bgl*II e hibridado con una sonda marcada con digoxigenina. **Carril 1:**  $\lambda$ - *Hind* III; **Carril 2:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bam*HI; **Carril 3:**  $\lambda$ -16 *des2* *Bam*HI; **Carril 4:**  $\lambda$ -31 *des2* *Bam*HI; **Carril 5:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bgl*II; **Carril 6:**  $\lambda$ -16 *des2* *Bgl*II; **Carril 7:**  $\lambda$ -31 *des2* *Bgl*II.

De la misma forma se llevó a cabo el análisis de los fragmentos portadores de posibles genes codificantes de policétidosintasas. En el caso del gen *pks1* se analizaron por Southern-blot los fagos  $\lambda$ -23,  $\lambda$ -30 y  $\lambda$ -34. Para ello se utilizó como sonda un fragmento de 368 pb amplificado mediante PCR con los oligonucleótidos PKS1A y PKS1B. En los tres fagos analizados se producía señal de hibridación en un fragmento *Bam*HI de 15,6 Kb aproximadamente, mientras que cuando el ADN se digirió con *Bgl*II la señal de hibridación se obtuvo en un fragmento de 11,9 Kb (**Figura 50**). Mediante este análisis se confirmó que los tres fagos contienen la secuencia del gen *pks1* en el mismo fragmento de ADN, por lo que para posteriores experimentos se seleccionó el fago  $\lambda$ -30PKS1.

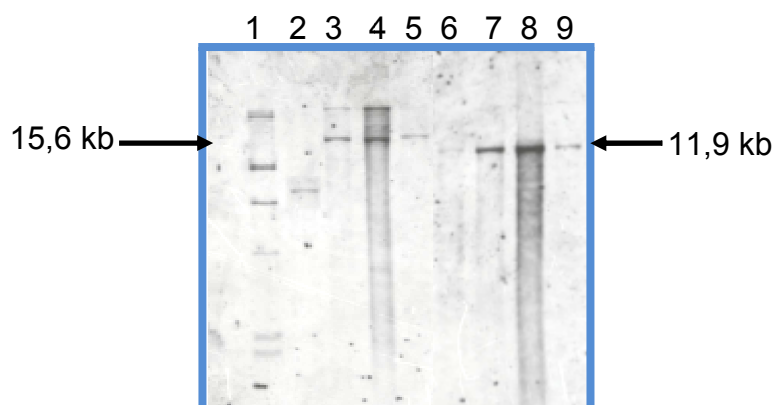
Los genes que codifican policétidosintasas pueden tener un tamaño que puede variar entre 6 y 10 Kb (Bingle y *col*, 1998; Weissman y *col*, 2005). En los fagos analizados para el gen *pks1*, la señal de hibridación se produjo en fragmentos de ADN superiores a 10 kb, por lo que pensamos que es probable que el gen *pks1* esté completo en dichos fagos.



## Resultados y Discusión

---

Dado que los tres fagos contenían el gen *pk*s1 en el mismo fragmento de ADN se seleccionó el fago  $\lambda$ -30PKS1 para posteriores experimentos.



---

**Figura 50:** Análisis mediante Southern blot de los fagos  $\lambda$ -23,  $\lambda$ -30 y  $\lambda$ -34 portadores del gen *pk*s1. El ADN fue digerido con *Bam*HI o *Bgl*II e hibridado con una sonda marcada con digoxigenina. **Carril 1:**  $\lambda$ -*Hind* III; **Carril 2:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bam*HI; **Carril 3:**  $\lambda$ -23 *pk*s1 *Bam*HI; **Carril 4:**  $\lambda$ -30 *pk*s1 *Bam*HI; **Carril 5:**  $\lambda$ -34 *pk*s1 *Bam*HI; **Carril 6:** ADN<sub>T</sub> *E. rubrum* C47 *Bgl*II; **Carril 7:**  $\lambda$ -23 *pk*s1 *Bgl*II; **Carril 8:**  $\lambda$ -30 *pk*s1 *Bgl*II; **Carril 9:**  $\lambda$ -34 *pk*s1 *Bgl*II.

---

Una vez determinado el tamaño de los fragmentos de ADN que presuntamente contienen los genes *pk*s1, *des*1 y *des*2, estos se clonaron en los plásmidos de replicación autónoma pAUR316 y pAURgen<sup>R</sup> previamente digeridos con *Bam*HI. Para ello se extrajo el ADN de los fagos seleccionados según el método descrito en el apartado 3.9.2 de Materiales y Métodos. Este se digirió con *Bam*HI y *Bgl*II (enzima que deja extremos cohesivos compatibles con *Bam*HI) y los fragmentos obtenidos de forma independiente con los plásmidos digeridos con *Bam*HI.

Los productos de las ligaciones se transformaron en las cepas *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* SURE, la cual posee mecanismos que impiden la reorganización de fragmentos de gran tamaño. Sin embargo no se obtuvieron transformantes en esta última cepa. Los transformantes obtenidos en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos DES1A/DES1B para el gen *des*1, DES2A/DES2B para el gen *des*2 y PKS1A/PKS1B para el gen de *pk*s1.

De esta forma se identificaron los plásmidos pAUR316*des*1*Bam*HI, pAUR316*des*1*Bgl*II, pAURg*des*1*Bam*HI y pAURg*des*1*Bgl*II para el gen *des*1, pAUR316*des*2*Bam*HI y pAURg*des*2*Bam*HI para el gen *des*2 y

pAUR316*pks1Bam*HI y pAURgen*pks1Bg*II, para el gen *pks1*. Con el fin de determinar si los genes *des1*, *des2* y *pks1* estaban o no completos se obtuvo el ADN de cada uno de ellos y se secuenciaron los extremos de los insertos que portan utilizando los oligonucleótidos pAUR316 sense y pAUR316 antisense o pAUR-R (**Tabla 2** de Materiales y Métodos). La secuencia obtenida de cada uno de los clones se comparó con las secuencias existentes en las bases de datos y se observó que el fragmento *Bam*HI que contenía el gen *pks1* clonado en el plásmido pAUR316 presentaba en uno de sus extremos un alto grado de identidad con policétidosintasas existentes en las bases de datos, por lo que se concluyó que dicho fragmento no contenía este gen completo y por ello se descartó para los experimentos de complementación de los mutantes no-productores de flavoglauцина.

Los demás plásmidos analizados: pAUR316*des1Bam*HI, pAURgen*des1Bam*HI, pAUR316*des1Bg*II, pAURgen*des1Bg*II, pAUR316*des2Bam*HI, pAURgen*des2Bam*HI portadores respectivamente de los fragmentos *Bam*HI-*des1*, *Bg*II-*des1*, *Bam*HI-*des2*, *Bg*II-*des2* y *Bg*II-*pks1* parecen sin embargo albergar los genes de interés completos, puesto que en ningún caso la secuencia de los extremos de los respectivos insertos presentó identidad con dichos genes.

#### **4.4.6 Complementación de los mutantes no productores de flavoglauцина.**

Con el fin de determinar si los genes aislados de la biblioteca genómica de *E. rubrum* C47 por su similitud con desaturasas y policétidosintasas forman parte de la ruta de biosíntesis de flavoglauцина se intentó complementar los mutantes no-productores de flavoglauцина, *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133.

En base a la hipotética ruta biosintética representada en la **Figura 34** el mutante *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 podría tener una mutación en el gen de la hipotética desaturasa, mientras que la mutación de *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 podría afectar al gen codificante de la posible policétidosintasa. Por ello se decidió complementar *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 con los plásmidos pAUR316*des1Bam*HI, pAURgen*des1Bam*HI, pAUR316*des1Bg*II, pAURgen*des1Bg*II portadores de los genes *des1* y

## Resultados y Discusión

---

pAUR316*des2Bam*HI, pAURgen*des2Bam*HI, portadores de los genes *des2* y *E. rubrum* T<sub>3</sub>133 con el plásmido pAURgen*pks1Bgl*II portador del gen *pks1*.

Para ello se obtuvieron protoplastos de ambos mutantes y se transformaron con los plásmidos pAUR316*des1Bam*HI, pAURgen*des1Bam*HI, pAUR316*des1Bgl*II, pAURgen*des1Bgl*II y pAUR316*des2Bam*HI, pAURgen*des2Bam*HI, (*E. rubrum* A<sub>3</sub>13) y con pAURgen*pks1Bgl*II (*E. rubrum* T<sub>3</sub>133).

Paralelamente se utilizaron como control protoplastos de ambos mutantes sin transformar con el fin de comprobar la viabilidad de los protoplastos y protoplastos de ambas cepas transformados con los vectores pAUR316 y pAURgen con el fin de comprobar la eficacia de la transformación.

Las transformaciones se sembraron en las condiciones apropiadas para cada plásmido (**Tabla 14**), de forma que para el plásmido pAUR316 se utilizó el medio de cultivo MMT suplementado con aureobasidina a una concentración de 5 µg/mL cuando se transformaron protoplastos de *E. rubrum* A<sub>3</sub>13. Mientras que cuando la transformación se realizó con el plásmido pAURgen se utilizó el medio de CY20S suplementado con geneticina a una concentración de 50 µg/mL para *E. rubrum* A<sub>3</sub>13 y a una concentración de 60 µg/mL para *E. rubrum* T<sub>3</sub>133. Las placas se incubaron durante 5-7 días a 28 °C. Como control adicional se sembraron protoplastos sin transformar en placas de medio CY20S o MMT no suplementadas y suplementadas con los antibióticos de selección en cada caso y así se comprobó la capacidad de regeneración de los protoplastos y se descartó la aparición de resistentes espontáneos al antibiótico utilizado.

Se observó una buena regeneración de los protoplastos sin transformar en ausencia de antibiótico, mientras que en presencia del antibiótico no existía crecimiento. Por otro lado sólo se obtuvieron transformantes de los vectores pAUR316 y pAURgen, pero no de los plásmidos portadores de los genes de interés. Las transformaciones se repitieron varias veces utilizando distintas preparaciones de protoplastos y ensayando distintas concentraciones de ADN, pero en ninguna de ellas se obtuvieron transformantes portadores de los genes de interés. Esto podría deberse a que el tamaño de los clones portadores de los genes

es demasiado grande y se sobrepasa la capacidad de introducción de ADN exógeno en *E. rubrum*.

En experimentos futuros se podrían poner a punto otras técnicas de transformación mediante las cuales se puede introducir moléculas de ADN de mayor tamaño como podría ser la electroporación o la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Bundock y col., 1995; De Groot y col., 1998).

### **4.5. Desarrollo de un sistema de control biológico de las plagas de ácaros en jamones.**

La contaminación masiva de los jamones y cecinas por ácaros supone cuantiosas pérdidas económicas en las industrias chacineras, por lo que pensamos que resultaría interesante el desarrollo de un sistema de control biológico de la infestación por ácaros, mediante la implantación de la cepa productora de flavoglucina, *E. rubrum* C47 o de cepas superproductoras (*E. rubrum* A<sub>1</sub>161) en la superficie de los jamones. Estos microorganismos forman parte de la microbiota natural del jamón y la cecina lo que favorecería que las características organolépticas del producto final no se viesan alteradas.

#### **A. Ensayo de inoculación en condiciones naturales.**

Para llevar a cabo el ensayo de inoculación de *E. rubrum* en condiciones naturales se pensó utilizar en un primer momento la cepa superproductora de flavoglucina, *E. rubrum* A<sub>1</sub>161. Posteriormente, debido al elevado número de esporas requerido para el desarrollo del ensayo se decidió utilizar la cepa de *E. rubrum* C47, porque la cepa A<sub>1</sub>161 presentaba menor capacidad de esporulación.

Con el fin de optimizar un método de aplicación e implantación de la cepa de *E. rubrum* C47 en condiciones naturales, se llevó a cabo un ensayo de inoculación del hongo en un secadero natural de una empresa de la provincia de León.

El ensayo de inoculación se llevó a cabo en condiciones naturales durante el primer semestre del año, ya que en esta época normalmente se produce un aumento en la proliferación de ácaros en las industrias chacineras debido a las condiciones óptimas de temperatura y humedad.

## Resultados y Discusión

---

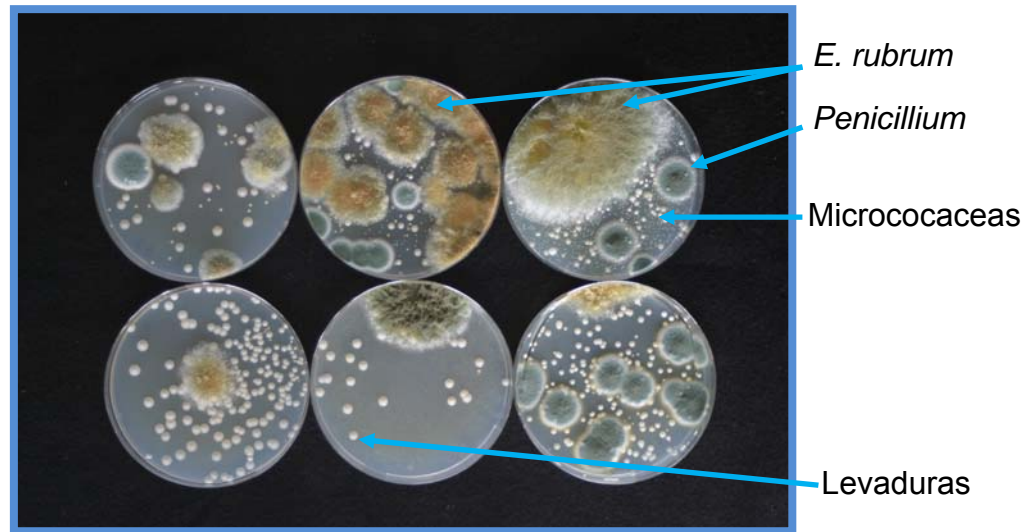
En el ensayo se utilizaron un total de 294 jamones representativos de las distintas variedades comercializadas por la empresa. Para cada tipo se utilizaron como control jamones no inoculados.

Las esporas del hongo se aplicaron a una concentración de  $1-3 \times 10^9$  esporas/mL sobre los jamones mediante dos técnicas: nebulización e inmersión, siguiendo el método descrito en el apartado 3.14.2.2. de Materiales y Métodos.

Dos meses después de la inoculación se realizó un examen visual, mediante el cual se observó la presencia/ausencia de hongos y/o ácaros en la superficie de los jamones tratados. En líneas generales se observó que en los jamones tratados existía una baja implantación fúngica, con manchas dispersas en la cara interna del jamón y que dicha implantación era prácticamente nula en los jamones sometidos al tratamiento de inmersión.

Se recogieron muestras de los hongos que habían crecido en la superficie de cada uno de los jamones de zonas al azar, mediante frotis con un bastoncillo estéril y siembra directa en medio de cultivo Power tal y como se describe en el apartado 3.14.2.2.c de Materiales y Métodos, para determinar la microbiota que se había desarrollado sobre los jamones. Se identificaron hongos fundamentalmente de dos tipos: unos que formaban colonias de color verdoso que correspondían a las características descritas para el género *Penicillium* y otros que formaban colonias de color anaranjado que se identificaron como *Eurotium* mediante ensayo visual. Además aparecieron, en algunos casos de forma mayoritaria, otro tipo de colonias de color blanquecino cuya observación al microscopio permitió identificar como levaduras y bacterias micrococáceas. Todos estos microorganismos se han descrito como integrantes naturales de la microbiota natural de embutidos por autores como Nuñez y col., (1998); Rodríguez y col., (1994).

En la **Figura 51** se muestran ejemplos representativos de cada uno de estos microorganismos.



**Figura 51.** Placas de medio en las que se aprecia el crecimiento de los microorganismos aislados de los jamones en estudio. Las colonias de color verdoso son hongos del género *Penicillium* y las de color anaranjado del género *Eurotium*. Las colonias blancas de mayor tamaño se identificaron como levaduras y las de menor tamaño como bacterias micrococaceas.

Por otro lado se observó que el índice de grasa de los jamones parecía influir en la implantación del hongo, puesto que en aquellos con mayor porcentaje de grasa el hongo prácticamente no se implanta.

La casi nula implantación fúngica en jamones tratados mediante inmersión, junto con la gran cantidad de esporas que necesita y la necesidad de más mano de obra para aplicarlo, hace que dicho método sea inviable económica y técnicamente a nivel industrial.

En cuanto a la nebulización se concluyó que podría ser un sistema eficiente, debido al bajo volumen de esporas requerido, el cual fue 7 veces inferior que en el proceso de inmersión. Además esta técnica casi no deja residuos líquidos y la mano de obra requerida para llevarlo a cabo es mínima. Sin embargo quedó patente la necesidad de optimizarlo, con el fin de conseguir una mayor implantación del hongo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el secadero natural y los inconvenientes encontrados, se llegó a la conclusión de que las condiciones no eran las más adecuadas para la inoculación e implantación del hongo sobre los

jamones, por lo que se intentó optimizar un método de implantación del hongo en cámaras con condiciones controladas.

### **B. Ensayos en condiciones controladas**

Estos ensayos se llevaron a cabo tal y como se indica en el apartado 3.14.2.1. de Materiales y Métodos.

Se realizó un primer ensayo de inoculación de la cepa de *E. rubrum* C47 sobre la superficie del jamón, en el laboratorio, con el objeto de optimizar las condiciones necesarias para la implantación del hongo.

Se trataron 20 jamones suministrados por la empresa colaboradora en el proyecto, los cuales tenían distinto porcentaje de grasa y grado de curación.

Los jamones se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (18 °C) y humedad (70-80%) durante el mínimo tiempo posible para que el hongo se implantase, y posteriormente se pasaron al secadero natural para continuar su procesamiento normal. Así se pretendía que cuando los jamones pasasen al secadero natural ya tuviesen implantado el hongo acaricida y pudieran llevar a cabo su función de prevención de la infestación por ácaros.

Dado que se había determinado previamente que la nebulización era el método más efectivo se llevó a cabo la inoculación de los jamones mediante pulverización manual tal y como se indica en el apartado 3.14.2.1. de Materiales y Métodos.

Tras el tratamiento se observó periódicamente la evolución de los jamones. Diez días después de la administración de la primera dosis de esporas, se tomaron muestras de los hongos que habían crecido en la superficie de los jamones mediante frotis con un bastoncillo estéril y siembra directa en medio de cultivo Power.

Los datos obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Características de los jamones	Implantación
Alta Grasa Alta Curación (AA)	Implantación baja y desigual Levaduras y <i>Eurotium</i>
Alta Grasa Baja Curación (AB)	Implantación media Levaduras y <i>Eurotium</i>
Baja Grasa Alta Curación (BA)	Implantación baja Levaduras y <i>Eurotium</i>
Baja Grasa Baja Curación (BB)	Buena implantación, uniforme Levaduras y <i>Eurotium</i>

**Tabla 21:** Implantación de *E. rubrum* C47 y microbiota existente en los jamones, transcurridos 10 días de la inoculación en condiciones controladas.

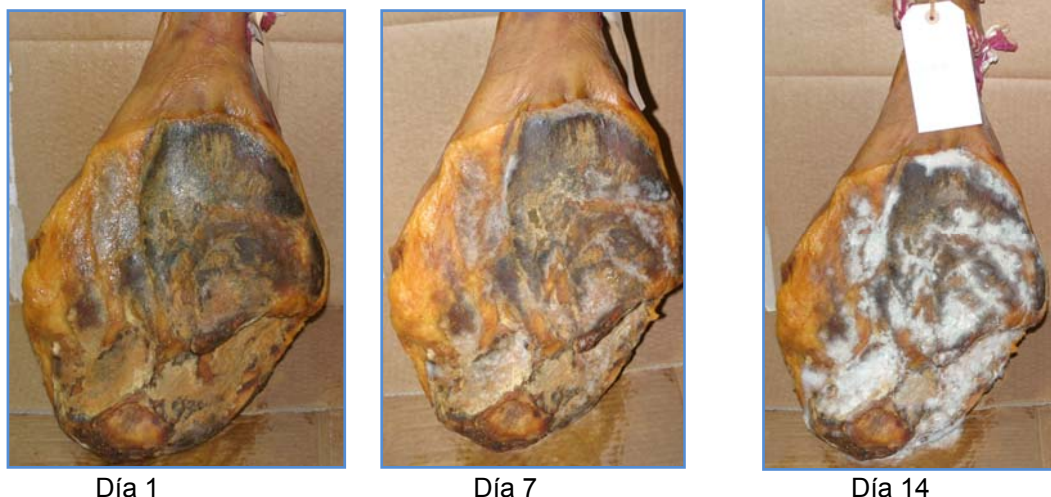
Se constató que el único hongo que se desarrollaba sobre los jamones era *Eurotium*. Sin embargo su implantación era desigual y dependía del tipo de jamón, de forma que en los jamones con bajo porcentaje de grasa existía una implantación mayor y más uniforme que en jamones con alta grasa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de inoculación en condiciones controladas y con los descritos anteriormente por Ortiz, J. F. (Tesis Doctoral, 2006).

Además se puso de manifiesto que el grado de curación de los jamones, y por lo tanto su índice de humedad, también era un factor, aún más determinante que la grasa, para la implantación de *E. rubrum*. Esta es mayor cuanto mayor es el índice de humedad, es decir en los jamones poco curados, lo cual contrasta con lo postulado anteriormente por otros autores como Rodríguez, (1995) y Laich y col., (2001), los cuales describen que la microbiota natural dominante en jamones cuando la actividad de agua es baja (últimas etapas de curado) es *Aspergillus* y *Eurotium*. Estos resultados pueden ser debidos a que en nuestro ensayo la microbiota no se desarrolló de forma natural, sino artificialmente por inoculación de un elevado número de esporas de *E. rubrum*. En condiciones naturales la esporulación de *E. rubrum* es mayor al final del proceso de curado, ya que este es un hongo relativamente xerófilo.

En las **Figuras 52 y 53** se muestran, por una parte la evolución de los jamones tras el tratamiento y por otra las diferencias de implantación observadas según el tipo de jamón.



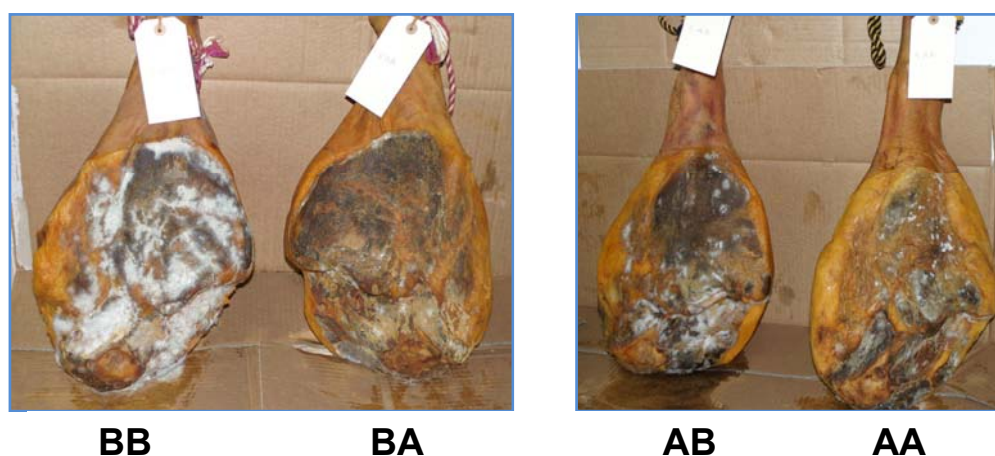
### Jamón BB



**Figura 52:** Evolución de la implantación de *E. rubrum* sobre los jamones tratados en condiciones controladas. Se muestra un jamón del tipo BB (baja grasa y baja curación), que fueron las condiciones en las que mejor resultados se obtuvieron.

---

### 14 días después de la inoculación:



**Figura 53:** Diferencias de implantación de *E. rubrum*, 14 días después de la inoculación, en los jamones de tipo BB, BA, AB y AA utilizados en el ensayo.

---

Transcurridos 20 días tras la inoculación de los jamones, estos fueron trasladados al secadero natural de la empresa colaboradora, donde se llevó a cabo un seguimiento durante seis meses de la evolución del hongo sobre la superficie de los jamones y de la presencia de ácaros en los mismos.

Se evaluó el estado de los jamones en el secadero natural y se comprobó que las diferencias de implantación entre los distintos tipos de jamón eran menos

apreciables, aunque siguió siendo más importante en los jamones bajos en grasa y poco curados (BB). También se identificaron otros hongos de tipo *Penicillium*, pero el análisis en el laboratorio de las muestras recogidas sobre la superficie de los jamones demostró que *E. rubrum* era mayoritario (**Figura 54**).

Esto nos indicó que una vez colonizada la pieza por *E. rubrum* este fue capaz de mantenerse después de varios meses en el secadero sin ser desplazado por otros hongos de la microbiota natural de los jamones.



---

**Figura 54:** Estado de los jamones inoculados en el ensayo en condiciones controladas tras 6 meses en el secadero natural. Se apreció la presencia de *E. rubrum* sobre el jamón, con coloraciones que variaron entre el morado, anaranjado, amarillento y blanquecino.

---

Por otra parte se constató que otros jamones presentes en el secadero y que no se habían sometido a ningún tipo de tratamiento con *E. rubrum*, presentaban también un alto grado de colonización por el hongo (**Figura 55**), lo que podría ser debido al trasiego humano y de material entre las distintas zonas del secadero.

La distribución y tipología de los jamones colonizados pareció ser arbitraria, ya que jamones del mismo tipo, similar grado de curación e igual tiempo de permanencia en el secadero presentaban un índice de colonización desigual. Además, la proximidad física entre los jamones no favoreció la colonización, ya que junto a carros con jamones con un alto grado de implantación del hongo, se encontraban otros en los que este no se había implantado.

Esto sugiere que se había conseguido introducir en el secadero la cepa de *E. rubrum* utilizada en los ensayos, posiblemente como consecuencia de los tratamientos de nebulización que se habían llevado a cabo en condiciones naturales. Sin embargo su implantación desigual y aleatoria sugiere que hay

factores aún desconocidos que intervienen en la colonización de los jamones por el hongo.



---

**Figura 55:** Jamones no tratados y situados en distintas zonas del secadero, que presentaron un alto grado de colonización por *E. rubrum*.

---

Respecto a la respuesta de los jamones a la infestación por ácaros, en un primer intento no fue posible obtener ningún dato concluyente ya que no se apreció una presencia significativa de los mismos en el secadero durante los primeros meses de presencia de los jamones inoculados en el secadero.

Con la proliferación de ácaros al principio del verano, transcurridos seis meses desde la inoculación, se observó que los jamones tratados y que habían sido colonizados por *E. rubrum*, estaban fuertemente infestados. Igualmente, la presencia de ácaros era importante en otros jamones del secadero, independientemente de que estuvieran o no colonizados por *Eurotium*. Estos datos nos indicaron que la implantación de *E. rubrum* en los jamones no protege a estos de la infestación masiva por ácaros. Lo cual puede ser debido a que el efecto acaricida ejercido por el hongo es un efecto acumulativo, produciéndose la muerte de los ácaros tras un consumo del hongo continuado en el tiempo. Cuando se produce una infestación masiva, en la que la población de ácaros se multiplica de forma muy rápida en un corto periodo de tiempo, la actividad acaricida del hongo

no sería lo suficientemente drástica como para reducir de forma significativa la población de ácaros.

A pesar de que no fue posible obtener un control totalmente efectivo de la proliferación de los ácaros sobre los jamones, este ensayo nos permitió determinar que la inoculación de los jamones con *E. rubrum* en condiciones de temperatura y humedad controladas favorece la implantación del hongo respecto a los resultados obtenidos en el secadero natural. Sin embargo esta implantación no es homogénea, siendo determinante el tipo de jamón tratado. El factor más importante es el grado de humedad, lo cual depende del tiempo de curación del jamón.

Las principales conclusiones obtenidas de este ensayo de implantación industrial son:

- Se consiguió implantar con éxito la cepa *E. rubrum* C47 en jamones inoculados en condiciones controladas de temperatura y humedad. Además se observó implantación en jamones no tratados que se encontraban en el secadero natural. Sin embargo la implantación no fue homogénea y dependió, entre otros factores, del tipo de jamón, especialmente de su porcentaje de grasa y de su tiempo de curación.
- La implantación del hongo no fue capaz de proteger a los jamones de una infestación masiva de ácaros, posiblemente porque los ácaros se multiplicaron antes de que la sustancia acaricida producida por *E. rubrum* C47 tuviese efecto.

Un control biológico efectivo de los ácaros por *E. rubrum* requeriría mejorar la implantación del hongo en los jamones y sobre todo aumentar la producción de la sustancia acaricida.

La implantación del hongo se podría mejorar realizando un análisis y control más exhaustivo de los distintos parámetros físicos implicados en la maduración de los jamones. Por otro lado y con el fin de aumentar la producción de flavoglucina mediante mutagénesis dirigida sería interesante la caracterización de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de flavoglucina.





## 5. DISCUSIÓN GENERAL

---





En estudios anteriores realizados en INBIOTEC, se determinó que la cepa *E. rubrum* C47, aislada de la cecina, inmovilizaba y causaba la muerte de los ácaros (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006). Este resultado coincidía con los obtenidos en los estudios sobre la infestación y métodos de control de los ácaros en el salami y el jamón curado realizados por Rota (1972) y Arnau y Guerrero (1995). Se comprobó que el efecto acaricida se debía a la flavoglaucina, compuesto identificado anteriormente en el extracto crudo de micelio de *Aspergillus repens* (*Eurotium repens*) (Podojil y col., 1979). Dicho compuesto presentaba además actividad tóxica frente a *Artemia salina* y antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006).

Con el fin de estudiar la ruta de biosíntesis de flavoglaucina y desarrollar un método para el control biológico de los ácaros en el jamón y la cecina, sin que ello afecte a las características organolépticas del producto final, el primer objetivo que se planteó en este trabajo de investigación fue la obtención de cepas afectadas en la producción de flavoglaucina. Para ello la cepa *E. rubrum* C47 fue sometida a un proceso de mutagénesis con nitrosoguanidina, compuesto mediante el cual se pueden obtener un gran número de mutantes con una tasa de mortalidad intermedia (Diaz Minguéz y col., 1988). Posteriormente, mediante la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) se realizó un primer análisis que nos permitió seleccionar de forma rápida los mutantes no-productores y superproductores de flavoglaucina.

La producción de flavoglaucina en ambos tipos de mutantes se determinó posteriormente por HPLC, confirmándose la obtención de dos mutantes no-productores, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, y un mutante superproductor, A<sub>1</sub>161, el cual produce aproximadamente tres veces más flavoglaucina que la cepa parental

En los análisis por TLC y HPLC analítico de los mutantes no-productores, A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, se observó que existían diferencias en cuanto a la naturaleza y a la cantidad de los metabolitos secundarios producidos por cada uno de ellos. Esto sugiere que estas dos cepas tienen mutaciones que afectan a genes diferentes de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina. Este hecho se confirmó por la complementación de ambas mutaciones en cepas productoras de flavoglaucina obtenidas como resultado de la fusión de protoplastos de A<sub>3</sub>13 y

T<sub>3</sub>133. Además se observó que el mutante no-productor, A<sub>3</sub>13, acumulaba dos compuestos que pensamos podrían ser posibles precursores de la flavoglaucina. Estos fueron purificados y caracterizados mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, determinándose que se trataba de la isodihidroauroglaucina y la auroglaucina. Ambos compuestos han sido descritos como metabolitos secundarios producidos por las especies *Aspergillus insuetus*, *A. calidoustus* y *E. amstelodami* (Gregory J. Slack y col., 2009). Tanto la isodihidroauroglaucina como la auroglaucina presentan una estructura molecular semejante a la de la flavoglaucina y a la aspergina, lo que implica que podrían ser intermediarios de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina. Mediante ensayos in vitro con diferentes concentraciones de ambos compuestos se determinó, sin embargo, que ninguno de ellos presenta actividad acaricida.

El segundo de los objetivos de este trabajo de investigación, que tenía por objeto la caracterización de los genes implicados en la ruta de biosíntesis de flavoglaucina tiene interés desde el punto de vista biotecnológico porque dicha identificación podría permitir la obtención de cepas superproductoras de sustancia acaricida mediante técnicas de mutagénesis dirigida. Esta técnica nos permitiría obtener mutantes que sólo presenten afectada la producción de flavoglaucina, porque mediante las técnicas de mutación al azar se pueden producir varias mutaciones a la vez. En el caso del mutante superproductor de flavoglaucina, *E. rubrum* A<sub>1</sub>161, además de presentar alteraciones en la producción de flavoglaucina presenta una disminución de su capacidad de esporulación, lo que le hace ser incompatible para su aplicación e implantación en los jamones.

Como paso previo a la identificación y caracterización de los genes biosintéticos diseñamos una hipotética ruta de biosíntesis de flavoglaucina, basándonos en estudios previos sobre la síntesis de otros metabolitos secundarios con estructura policetídica y en el hecho de que los mutantes no-productores presentaban diferencias en cuanto a los metabolitos secundarios producidos.

Uno de estos mutantes, T<sub>3</sub>133 no produce flavoglaucina, aspergina, isodihidroglaucina y auroglaucina por lo que pensamos que podía tener una mutación en uno de los genes implicados en las etapas tempranas de la ruta biosintética. Puesto que autores como Bingle y *col.*, (1999) y Schümann y *col.*, (2006) describen a la policétidosintasa como la enzima implicada en este tipo de reacciones, posiblemente este mutante tenga una mutación en un gen que codifique una policétidosintasa.

Por otro lado, el mutante A<sub>3</sub>13 no produce flavoglaucina, ni aspergina, pero acumula auroglaucina e isodihidroauroglaucina, los cuales, como hemos dicho anteriormente, poseen una estructura química semejante a la flavoglaucina y podrían ser intermediarios de su formación. Teniendo en cuenta estos datos proponemos que este mutante podría tener una mutación en uno de los genes implicado en las etapas tardías de la ruta de biosíntesis de flavoglaucina. Dicha mutación podría ser en un gen que codificase una desaturasa, ya que algunos autores como Sakai y Kajiwara, (2003) describen enzimas de este tipo como las responsables de la reducción de ácidos grasos, compuestos con estructura semejante a la de los policétidos.

Una vez determinados los posibles tipos de genes implicados en la ruta de biosíntesis se procedió a la localización y aislamiento de cada uno de ellos a partir de la biblioteca genómica de la cepa *E. rubrum* C47 construida en el fago  $\lambda$ -DASH II. Para ello, y dado que no poseíamos ninguna información sobre la secuencia del genoma de *E. rubrum*, se diseñaron oligonucleótidos degenerados que permitieran amplificar fragmentos de las hipotéticas desaturasa y policétidosintasa. Dicho diseño se realizó teniendo en cuenta la frecuencia del uso de codones en *E. rubrum* y en especies próximas filogenéticamente y las secuencias de los dominios conservados de policétidosintasas y desaturasas en otros hongos, tal y como describen autores como Schümann y Hertweck, (2006); Linnemannstöns y *col.*, (2002); Bingle y *col.*, (1999); Sakai y Kajiwara, (2003); Meesapyodsuk y *col.*, (2007) y Sakuradani y *col.*, (1999).

El tercero y último de los objetivos de este trabajo de investigación fue el desarrollo de un sistema de control biológico de la infestación de jamones por

ácaros, mediante la implantación de la cepa productora de flavoglucina, *E. rubrum* C47 en condiciones controladas y naturales. La cepa *E. rubrum* C47, forma parte de la flora fúngica que predomina en jamones y cecinas, por lo que, es una cepa que en principio puede desarrollarse fácilmente y con idoneidad bajo las condiciones medio-ambientales en las que se elaboran estos embutidos. Además, al ser un microorganismo que forma parte de la flora natural del jamón y de la cecina es previsible que su implantación en dichos productos no afecte a las características organolépticas del producto final.

En un primer momento se pensó en utilizar la cepa superproductora de flavoglucina, *E. rubrum* A<sub>1</sub>161, para los ensayos de implantación del hongo en jamones, pero se descartó finalmente al comprobar que tenía disminuida su capacidad de esporulación, lo que era incompatible con las condiciones fijadas para conseguir una implantación efectiva de la cepa en los jamones, que requeriría una elevada concentración de esporas.

Los resultados obtenidos en estos ensayos sugieren en primer lugar que el índice de grasa de los jamones parece influir en la implantación del hongo, puesto que en aquellos más grasos la implantación es prácticamente nula. La producción del compuesto acaricida *in situ* posiblemente puede verse afectada por la composición porcentual de grasa que presentan estos productos. Este hecho ya se había constatado en estudios anteriores (Ortiz, J. F., Tesis Doctoral, 2006), que determinaron que la producción de flavoglucina y aspergina disminuía en base a la cantidad de grasa existente, debido en parte a que el crecimiento fúngico es más lento y escaso.

Por otro lado, mediante ensayos de inoculación de esporas de *E. rubrum* C47 en condiciones controladas de temperatura y humedad se ha conseguido implantar con éxito el hongo en jamones. Además se ha observado implantación de la cepa en jamones no tratados que se encontraban en el secadero natural después del traslado allí de los jamones inoculados con el hongo. Sin embargo la implantación no es homogénea y parece depender, entre otros factores, del tipo de jamón, especialmente de su porcentaje de grasa y de su tiempo de curación.

Sin embargo se ha constatado que la implantación del hongo no es capaz de proteger suficientemente a los jamones de una infestación masiva de ácaros, posiblemente porque los ácaros se multiplican antes de que la sustancia acaricida producida por *E. rubrum* tenga efecto y/o porque la cantidad de la misma producida *in situ* sobre los jamones no sea suficiente para provocar una mortalidad significativa de los ácaros.

Nuestros resultados permiten concluir que un control biológico efectivo de los ácaros por *E. rubrum* requeriría mejorar, por una parte, la implantación del hongo en los jamones, de forma que esta sea más rápida y homogénea y sobre todo implementar la producción de la sustancia acaricida. Para ello sería de ayuda tener un mayor conocimiento y control de los distintos parámetros físicos implicados en la maduración de los jamones y de los genes implicados en la biosíntesis de flavoglucina.



## 4. CONCLUSIONES

---





1. Mediante mutagénesis con nitrosoguanidina de la cepa *E. rubrum* C47 se ha obtenido el mutante A<sub>1</sub>161 y los mutantes A<sub>3</sub>13 y T<sub>3</sub>133, superproductor y no-productores, respectivamente de la sustancia acaricida, flavoglaucina.

2. Se han purificado dos compuestos químicos de naturaleza hidrofóbica a partir del mutante no productor de flavoglaucina, *E. rubrum* A<sub>3</sub>13. Su análisis mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear permitió identificarlos como isodihidroauroglaucina y auroglaucina.

3. La estructura molecular de la isodihidroauroglaucina y la auroglaucina es semejante a la flavoglaucina, por lo que podrían ser posibles precursores de su síntesis y presentar actividad acaricida. Sin embargo, se determinó que dichos compuestos a una concentración de 500 µg/µL no muestran dicha actividad.

4. Se ha optimizado un método de transformación de protoplastos eficiente en *E. rubrum*, utilizando los vectores de replicación autónoma, pAUR316 y pAUR316gen. Así mismo se ha determinado que la geneticina y la aureobasidina pueden utilizarse como marcadores de selección eficaces en *E. rubrum*.

5. Se han localizado en el genoma de *E. rubrum* los genes *des1* y *des2*, que codifican posibles desaturasas y el gen *pks1*, que codifica una posible policétidosintasa, con el fin de determinar su posible implicación en la biosíntesis de flavoglaucina.

6. La implantación de *E. rubrum* en jamones no es homogénea, siendo determinante el sistema de inoculación, el control de temperatura y humedad, el porcentaje de grasa y el grado de humedad y curación del jamón

7. En las condiciones utilizadas el tiempo requerido para la implantación competitiva del hongo frente a la microbiota residente no permiten garantizar el desarrollo de *Eurotium* antes de que se produzca una infestación masiva de ácaros.

## Conclusiones

---

8. Un control biológico efectivo de los ácaros por *E. rubrum* requeriría mejorar la implantación del hongo en los jamones y sobre todo incrementar la producción de la sustancia acaricida, flavoglaucina.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

---



**A**

- Arlian, L.G.** 1992. Water balance and humidity requirements of house dust mites. *Exp. Appl. Acarol.* 16: 15-35.
- Armentia, A.; Fernández, A.; Pérez-Santos, C.; De La Fuente, R.; Sánchez, P.; Sánchez, F.; Méndez, J. y Stolle, R.** 1994. Occupational allergy to mites in salty ham, chorizo and cheese. *Allergol. Et Immunopathol.* 22 (4): 152-154.
- Arnau, J.; Hugas, M. y Monfort, J.M.** 1987. El jamón curado: aspectos técnicos. Centro de Tecnología de la Carne (IRTA)(eds). Girona.
- Arnau, J. y Guerrero, L.** 1995. Physical methods of controlling mites in dry-cured ham. *Fleischwirtschaft.* 74 (12): 1311-1313.
- Arnau, J.; Guerrero, L.; Gou P. y Monfort, JM.** 2001. Tecnología, Microbiología y principales problemas tecnológicos del jamón curado. 1177-1204. En: *Enciclopedia de la carne y lo productos cárnicos.* Martín-Macias (eds). Madrid.
- Austin, B.; Hall, R.M. y Tyler, B.M.** 1990. Optimized vectors and selection for transformation of *Neurospora crassa* and *Aspergillus nidulans* to bleomycin and phleomycin resistance. *Gene* 93, 157– 162.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moor, D.D.; Seidman, J.G. y Smith, J.A.** 1987. *Current Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons.

**B**

- Balance, D. J. y Turner, G.** 1985. Gene cloning in *Aspergillus nidulans*: Isolation of the isocitrate lyase gene (*acuD*). *Mol. Gen. Genet.* 202: 271-275.
- Barredo, J. L.** 1990. Análisis de una región del genoma de *Penicillium chrysogenum* que contiene los genes *pcbC* y *penDE*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Beck, J.; Ripka, S.; Siegner, A.; Schiltz, E. y Schweizer, E.** 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*-its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur. J. Biochem.* 192:487–498.
- Benny, G.L. y Kimbrough, J.W.** 1980. A synopsis of the orders and families of the Plectomyctes with keys to genera. *Mycotaxonomy.* 12:1-91.

- Benz, G.** 1987. Integrated pest management in material protection, storage and food industry. 31-69. En: Protection intégrée: quo vadis? "Parasitis 86". Delucchi, V (eds). Suiza.
- Berdy, J.** 2000. Bioactive natural product database (BNPD). Szensor Management consulting Com, Budapest.
- Bingle, L. E. H.; Simpson, T. J. y Lazarus, C. M.** 1999. Ketosynthase Domain Probes Identify Two Subclasses of Fungal Polyketide Synthase Genes. *Fungal Genetics and Biology* 26: 209-223.
- Birch, A.J.** 1967. "Biosynthesis of polyketides and related compound. *Science* 156: 202-206.
- Bolaños, A.E.; Mendoza-Zamora, C. y Resendiz-García B.** 1991. Identificación y control de ácaros contaminantes en cultivos de hongos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 9 (1): 14-15.
- Boysen, M.E.; Jacobsson, K.G. y Schnurer, J.** 2000. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* Group Associated with Spoiled Animal Feed. *Appl Environ Microbiol* 66:1523–1526.
- Bret, B.L.; Larson, L.L.; Schoonover, J.R.; Sparks, T.C. y Thompson, G.D.** 1997. Biological properties of spinosad. *Down to Earth*. 52 (1): 6-13.
- Bronswijk, J.E. y Van, M.H.** 1981. House dust biology for allergist, acarologist and mycologist. Ed. JEMH. Van Bronswijk, NIB, Zeist, The Netherlands, Zoelmand.
- Bundock, P.; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A. y Hooykaas, P.J.J.** 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO J\_ournal*. 14(13): 3206-3214.

## C

- Cantoral, J.M.; Díez, B.; Barredo, J.L.; Alvarez, E. y Martín, J.F.** 1987. Hight frequency transformation of *Penicillium chrysogenum*. *Bio/technology* 5: 494-497.
- Cardillo, R.; Fuganti, C.; Ghiringhelli, D.; Grasselli, P. y Gatti, G.** 1977. Patern of incorporation of leucine samples asymetrically labelled with <sup>13</sup>C in the isopropyl unit into the C<sub>5</sub>-isoprenoid units of echinuline and flavoglaucina. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*474.

- Carrascosa, A.V. y Cornejo, I.** 1991. Characterization of Micrococaceae strains selected as potential starter cultures to Spanish dry-cured hams processes. 2. Slow process. *Fleischwirtsch.* 71: 1187-1188.
- Cattel, L.; Grove, J. F. y Shaw, D.** 1973. New metabolic products of *Aspergillus flavus*. Part. III. Biosynthesis of asperentin. *J. Chem. Soc., Perkin I*, 2626.
- Cenis, J.L.** 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplifications. *Nucleic Acids Res.* 20: 2380.
- Chamman y Hall.** 1999. Dictionary of nature products. Chapman and Hall dictionaries on CD-ROM.
- Clarke, L. y Carbon, J.** 1976. A colony bank containing synthetic Col E1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.
- Crueger, W.; Crueger, A.** 1989. *yA* textbook of industrial microbiology, 2 edición, Sunderland: Sinauer Associates. ISBN 10: 0878931317.

## D

- De Groot, M.J.A.; Bundock, P.; Hooykass, P.J.J. y Beijersbergen.** 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology.* 16: 839-842.
- Díaz Mínguez, J.M.; Iturriaga, E.A. y Eslava, A.P.** 1988. Efecto de la cafeína sobre las lesiones inducidas por la nitrosoguanidina y luz ultravioleta en *Phycomyces blakesleeanus*. *An. Aula Dei.* 19 (1-2): 219-229.
- Díez, B.; Alvarez, E.; Cantoral, J.M.; Barredo, J.L. y Martín, J.F.** 1987. Selection and characterization of *pyrG* mutants of *Penicillium chrysogenum* lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase and complementation by the *pyr4* gene of *Neurospora crassa*. *Current Genet.* 12: 277-282.
- Dusbabek, F.** 1975. Population structure and dynamics of the house dust mite *Dematophagoides farinae* (Acarina: Pyroglyphidae) in Czechoslovakia. *Folia Parasitol.* 22: 219-231.

## E

- Eriksson, O. E. y D. L. Hawksworth.** 1998. Outline of the Ascomycetes. *Systema Ascomycetum.* 16:83-296.

- Escudero, M. y López, A.** 2001. Etología aplicada al control de las plagas de ácaros del jamón. 49-118. Junta de Andalucía (eds). Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.
- Estrada, P.A.; Sánchez, A.C.; Castillo-Hernández, J.A. y Gutiérrez-Galindo, J.F.** 1981. *Tyroborus lini* (Oudemans, 1924) como ácaro contaminante de alimentos. Rev Ibér. Parasit. 41(3): 435-445.
- Evans-Walter, D.; Krantz, J. y Lindquist, E.** 1996. Acari. The mites. Entomology, University of Queensland, Australia.

### **F**

- Fain, A. y Herin, A.** 1978. La prélarve chez les Astigmatés (Acari). Acarología. 20: 566-571.
- Feinberg, AP. y Vogelstein, B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132 (1)**: 6-13.
- Feng, G. H. y Leonard, T. J.** 1995. Characterisation of the polyketide synthase gene (*pksL1*) required for aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. J. Bacteriol. 177, 6246–6254.
- Feng, G. H. y Leonard, T. J.** 1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans* Appl. Environ. Microbiol. 64: 2275-2277.
- Fernández, J.** 1997. La cecina: elaboración, calidad y control de calidad. 143-151. En: Productos cárnicos y lácteos. Aspectos tecnológicos, sanitarios y legislación. González, A. Otero, R. Rodríguez y J. J. Sanz (eds). Universidad de León. León.
- Fernández-Moreno, M.A.; Martínez, E.; Boto, L.; Hopwood, D.A. y Malpartida, F.** 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. J.Biol.Chem. 267: 19278-19290.
- Fierro, F.; Kosalkova, K.; Gutiérrez, S. y Martin, J.F.** 1996. Autonomously replicating plasmids carrying the *AMA1* region in *Penicillium chrisogenum*. Curr. Genet. 29: 482-489.
- Fincham, J. R. S.** 1989. Transfrmtion in fungi. Microbiol. Rev. **53**: 148-170.



**Fischer, E.** 1897. Plectascineae. 290-320. In: Die natürlichen Pflanzenfamilie. Engler A, Prantl K (eds). Wilhelm Engelmann, Leipzig.

**Flores, J.; Lorenzo, P. y Catalá, F.** 1989. Eliminación de los ácaros del jamón mediante tratamiento con gases. 321-333. Centro de Tecnología de la Carne (IRTA) (eds). Valencia.

## G

**García, M.F.; Llorens, C.J.M.; Costa, C.J. y Ferragut, P.F.** 1991. Ácaros de las plantas cultivadas y su control biológico. 166. Pisa ediciones. Valencia.

**García, I.; Díez, V. y Zumalacárregui, J.M.** 1997. Changes in proteins during the ripening of Spanish drief beef "Cecina". Meat Science. 46 (4): 379-385.

**Garcia, N.** 2004. Efforts to control mites on Iberiam ham by physical methods. Exp. Appl. Acarol. 32: 41-50.

**Gems, D.; Johnston, I.L. y Clutterbuck, A.J.** 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. Gene 98:61-67.

**George, C.L.** 1982. An introduction to culturing free-living Astigmatid mites. 7. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Slough Laboratory.

**Glass, N.L. y Donaldson, G.C.** 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol. 61(4): 1323-1330.

**Grazia, L.; Romano, P.; Bagni, A.; Roggiani, D. y Guglielmi, D.** 1986. The roles of moulds in the ripening process of salami. Food Microbiology. 3(1): 19-25.

**Griffiths, D.A.** 1966. Nutrition as a factor influencing hypopus formation in the *Acarus siro* species complex (Acarina, Acaridae). J Stored Prod Res. 7: 325-340.

**Guerrero, L. y Arnau, J.** 1995. Dry cured hams. Chemical methods to control mites. Fleischwirtschaft. 75(4): 449-450.

**Guinelli, I.** 1950. Le conserve di carne. Parma.

**Gutierrez, S.; Díez, B.; Montenegro, E. y Martín, J.F.** 1991. Characterization of the *Cephalosporium acreminium pcbAB* gene encoding  $\alpha$ -aminoadipyl-cysteiny-valine syntetase, a large multidomain peptide syntetase: Linkage to the *pcbC* gene as a cluster of early cephalosporin biosynthetic genes and evidence of multiple functional domains. J. Bacteriol. 173:2354-2365.

### H

- Hammen, Van der.** 1980. Glossary of acarological terminology. Vol 1 General terminology. Dr. W. Junk B. V. (Publisers). The Hage.
- Hananhan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol. 166(4): 557- 80.
- Hart, B.J. y Witehead, L.** 1990. Ecology of house dust mites in Oxfordshire. Clin. Exp. Allergy. 20: 203-209.
- Higgins, D.G.; Bleasby, A.J. y Fuchs, R.** 1991. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. CABIOS, vol 8: 189-191
- Hiisaar, K.; Metspalu, L. y Kuusik, A.** 2001. An estimation of influences evoked by some natural insecticides on greenhouse pest-insects and mites. En: Practice oriented results on the use plant extracts and pheromones in pest control. Proceedings of the International Workshop. 24-25 January 2001. Estonia.
- Hinnen, A.; Hicks, J. B. y Fink, G. R.** 1978. Transformation of yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 75: 1929-1933.
- Hopwood, D.A. y Sherman, D. H.** 1990. Molecular Genetics of polyketides and its comparision to fatty acid biosynthesis . Annual Review Genet. , 24: 37-66.
- Huerta, T.; Sanchís, V.; Hernández, J. y Hernández, E.** 1987. Mycroflora of dry-salted Spanish hams. Microbiologie-Aliments. Nutrition. 5 (3): 247-252.
- Huerta, T.; Querol, A. y Hernández, J.** 1988. Yeast of dry-cured hams: quantitative and qualitative aspects. Microbiologie-Aliments. Nutrition. 6: 227-231.
- Hugas, M.; Arnau, J. y Roca, M.** 1987. Estudio de la evolución microbiana y de los parámetros fisicoquímicos en el jamón curado, influencia de varios conservadores comerciales en la flora microbiana y en los parámetros físico-químicos.17-46. En: El jamón curado: aspectos técnicos IRTA. Arnau J, Hugas M y Monfort JM (eds). Girona.
- Hugas, M. y Arnau, J.** 1987. Encuesta sobre el proceso de fabricación del jamón curado. En: El jamón curado: aspectos técnicos IRTA. Arnau J, Hugas M, Montfort JM (eds). Girona.
- Hughes, A.M.** 1976. The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture. Fhisherries and Food (eds). Her Majesty's Stationary Office. London.

**Hynes, M.J.; Corrick, C.M. y King, J.A.** 1983. Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutants. *Mol Cell Biol* 3 : 1430-1439.

## I

**Inoue, H.; Nojima, H. y Okayama, H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 96 (1): 23-28.

**Ishaaya, I.; De Cock, A. y Degheele, D.** 1994. Piriproxifén, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol*. 87: 1185-1189.

## J

**Jorrín, J.** 2001. Modelos de lucha frente a los ácaros en el jamón curado. *Eurocarne*. 100: 69-74.

**Jorrín, J.; Magallanes, M. y Vargas, P.** 2001. Etiología de la peste por ácaros en el jamón curado. *Eurocarne*. 99: 39-44.

## K

**Katz, L., y Donatio, S.** 1993. Polyketide synthesis: Prospects for hybrid antibiotics. *Annu.Rev. Microbiol*. 47, 875-912.

**Kinsella, J.E. y Hwang, D.H.** 1976. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 8(2): 191-228.

**Klich, M.A.** 2002. Identification of common *Aspergillus* species. United States Department of Agriculture ARS. Southern Regional Reserch Center. New Orleans, Louisiana USA. (eds). Utrecht, The Netherlands.

**Komblas, K.N. y Hunter, R.C.** 1986. BCPC Conf. Pests Dis. 3: 907-914.

**Kraus, W.** 1995. Biologically active ingredients. Azadirachtin and other triterpenoids. 35-73. En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H VHC (eds). Weinheim.

**Kuwahara, Y.** 1991. Pheromone studies on Astigmatid mites-alarm, aggregation and sex. Vol. 1: 43-52. En: *Modern Acarology*. Dusbábek F and Bukva V (eds). Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv. The Hague.

### L

- Laich, F.S.** 2001. Caracterización de la micoflora superficial de la cecina y la elaboración de un cultivo iniciador de *Penicillium nalgiovense* con cepas no productoras de penicilina. Tesis doctoral. Universidad de León. León-España.
- Lamarck**, 1815. arachnid. (n.d.). *Online Etymology Dictionary*. Retrieved October 21, 2009, from Dictionary.com website: <http://dictionary.reference.com/browse/arachnid>.
- Larche-Mochel, M.; Doignon, J. y Dakkali-Hassani, M.H.** 1993 A clinical case concerning a producer of Bayonne Ham: Allergy to acarids. Arch. MAI Prof. Med. Trav. Secur. Soc. 54: 437-438.
- Leistner, L.** 1987. Alimentos madurados con hongos. Fleischwirtschaft 1: 38-44.
- Limón, M. C.; Pintor-Toro, J.A. y Benítez, T.** 1998. Increased Antifungal Activity of *Trichoderma harzianum* Transformant That Overexpress a 33-kDa Chitinase. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, CSIC.
- Linnemannstöns, P.; Schulte, J.; Prado, M.M.; Proctor, R.H.; Avalos, J. y Tudzynski, B.** 2002. The polyketide synthase gene *pks4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. Fungal Genetics and Biology 37: 134-148.
- López-Nieto, M. J.; Garcia-Acha, I. y Martin, J. F.** 1980. Penicillin production by recombinant strains of *Penicillium chrysogenum* obtained by fusion of protoplasts, p. 57-61. In C. Vezina and K. Singh (ed.), Advances in biotechnology. Vol III. Fermentation products. Pergamon Press, Ltd., Toronto. Genetics and Biology 37: 134-148.
- Lücke, F.K.** 1986. Microbiological processes in the manufacture of dry sausage and raw hams. Fleischwirtschaft. 66: 1505-1509.

### M

- Malik, A.N.; McLean, P.M.; Roberts, A.; Barnett, P.S.; Demaine A.G.; Banga, J.P. y McGregor A.M.** 1990. A simple high yield method for the preparation of lambda gt10 DNA suitable for subcloning, amplification and direct sequencing. Nucleic Acids Res. 18(13): 4031-4032.

- Marazza, V. y Persiani, G.** 1959. Azione delle basse temperature su acari infestanti gli alimenti di origine animale. Atti Società Italiana delle Scienze Veterinarie, XIII, 383.
- Martín, J.F.; Gutiérrez, S. y Aparicio, J.F.** 2000. Secondary Metabolites. Encyclopedia of Microbiology, Volume 4.
- Mayorga, M.E. y Timberlake, W.E.** (1992) The developmentally regulated *Aspergillus nidulans* *wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. Mol. Gen. Genet. 235, 205–212.
- McClymont, P.D.** 1983. Reproductive success of the mite *Acarus sirio* L. on stored Cheddar cheese of different ages. J Stor Produc Res. 19: 97-104.
- Meesapyodsuk, D.; Reed, D.W.; Covello, P.S. y Qiu, X.** 2007. Primary Structure, Regioselectivity, and Evolution of the Membrane-bound Fatty acid Desaturase of *Claviceps purpurea*. The Journal of Biological Chemistry 282: 20191- 20199.
- Miller, J.** 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Monte, E.; Villanueva, J.R. y Domínguez, A.** 1986. Fungal profiles of Spanish country-cured hams. Int J Food Microbiol. 3: 355-359.

## N

- Navarrete, I.; Sánchez-López, J.; Calero, R. y Gómez-Nieves, J.M.** 2000. Control de artrópodos en el jamón curado. Colección Alimex (eds). Junta de Extremadura.
- Nazar, M.; Ali, M.; Fatima, T. y Gubler, C.J.** 1984. Toxicity of flavoglucina from *Aspergillus chevalieri* in rabbits. Toxicol Lett. 23(2): 233-7.
- Nicolasein, M.; Frisvad, J.C. y Rossen, L.** 1997. A *Penicillium freii* gene that is highly similar to the  $\beta$ -keto-acyl synthase domain of polyketide synthase genes from other fungi. Lett Appl. Microbiol. 25: 197-201.
- Núñez, F.** 1995. Flora fúngica en el jamón ibérico y su importancia tecnológica y sanitaria. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Cáceres-España.
- Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A.** 1996a. Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. Int J Food Microbiol. 29: 271-280.

**Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Córdoba, J.J.; Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A.** 1996b. Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *Int J Food Microbiol.* 32: 185-197.

**Núñez, F.; Rodríguez, M.M.; Aranda, E.; Martín, A.; Díaz, C.M. y Bermúdez, E.** 1998. Influencia de la población fúngica en la maduración del jamón. *Eurocarne.* 70: 39-51.

### O

**O'Hagan, D.** 1991. *The Polyketide Metabolites.* Ellis Horwood, London.

**O'Hagan, D.** 1995. Biosynthesis of fatty acid and poliketide metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 12: 1-32.

**Okabe, K. y Oconor, B.M.** 2001. A method for both mass and individual rearing of fungivorous astigmatid mites (Acari). *Exp Appl Acarol.* 25: 493-504.

**Ortiz, J.F.** 2006. Caracterización de las especies del género *Eurotium* con actividad acaricida e identificación de la molécula activa. Tesis Doctoral. Universidad de León.

### P

**Pazoutova, S.; Linka, M.; Storkova, S. y Schwab, H.** 1997. Poliketide synthase gene *pksM* from *Aspergillus terreus* expressed during growth phase. *Folia Microbiol.* 43: 419-430.

**Perrucci, S.** 1995. Acaricidal activity of some essential oils and their constituents against *Tyrophagus longior*, a mite of stored food. *J. Food Protec.* 58: 560-563.

**Pitt, J.I.** 1973. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species: novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycologia.* 65: 1135-1157.

**Pitt, J.I. y Hocking, A.D.** 1985. *Fungi and food spoilage.* Academic Press. Sidney, Australia.

**Pitt, J.I. y Hocking, A.D.** 1997. *Fungi and food spoilage.* 347-362. Blackie Academic & Professional. London.

**Podojil, M.; Sedmera, P.; Vokoun, J.; Betina, V.; Barathova, H.; Durackova, Z.; Horakova, K. y Nemeč, P.** 1979 *Eurotium (Aspergillus) repens* metabolites and their biological activity. *Folia Microbiol.* 23(6): 438- 43.

**Q**

**Quilico, A.; Panizzi, L. y Mugnaini, E.** 1949. Structure of flavoglucina and auroglucin. *Nature*. 164: 26.

**R**

**Rabie, C.J.; Steyn, M. y Schalkwyk.** 1977. New species of *Aspergillus* producing sterigmatocystin. *App Environmen Microbiol*. 33(5):1023-1025.

**Raper, K.B. y Fennell, D.I.** 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.

**Rembold, H.** 1995. Insects. Biological effects of neem and their modes of action. Growth and metamorphoses. 177-192. En: *The Neem Tree*. Schmutterer, H VHC (eds). Weinheim.

**Rivard, I.** 1961. Influence of temperature and humidity on longevity, fecundity and rate of increase of the mite *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Acarina: Acaridae) reared on mold cultures. *Can J Zool*. 39: 869-876.

**Rodríguez, M.** 1995. Evaluación tecnológica y sanitaria de las micrococáceas en la maduración del jamón de cerdo ibérico. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.

**Rodríguez, M.; Martín, A. y Núñez, F.** 2001. Población microbiana del jamón ibérico y su contribución en la maduración. Cultivos iniciadores. 343-366. En: *Tecnología del jamón ibérico*. J. Ventanas (coordinador). Editorial Mundi-Prensa, Madrid.

**Rodríguez, M.; Núñez, F.; Córdoba, J.J.; Sanabria, C.; Bermúdez, M.E. y Asensio, M.A.** 1994. Characterization of *Staphylococcus spp.*, and *Micrococcus spp.* isolated from Iberian ham throughout the ripening process. *Int J Food Microbiol*. 24: 329-335.

**Rodríguez-Sáiz, M.; Lembo M.; Bertetti L.; Muraca R.; Velasco J.; Malcangi A.; De la Fuente J.L. y Barredo J.L.** 2004. Strain improvement for cephalosporin production by *Acremonium chrysogenum* using geneticin as a suitable transformation marker. *FEMS Microbiology Letters* 235:43-49.

**RohMid.** 1996. Technical information bulletin. RH-0345, turf and ornamental insecticida. RohMid LLC, Philadelphia, PA.

- Rojas, F.J.; Jodral, M.; Gosalvez, F. y Pozo, R.** 1991. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 13: 249-256.
- Rooney, A.P. y Ward, T.J.** 2004. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. Microbial Genomics and Bioprocessing Research Unit, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Peoria. 102 (14): 5084-5089.
- Rota, P.** 1972. Gli acari infestanti i formaggi e i salumi in stagionatura. 201-218. Atti 1° Simp. La Difusa Antiparassitaria nelle Industrie Alimentarie e la Protezione degli Alimenti. Piacenza.
- Ruiz-Diez, B.** 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology.* 92: 189-195

## S

- Sakai, H. y Kajiwara, S.** 2003. A estearoyl-CoA-specific  $\Delta^9$  Fatty Acid Desaturase from the Basidiomycete *Lentinula edodes*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 2431-2437.
- Sakuradani, E., Kobayashi, M. y Shimizu, S.** 1999.  $\Delta^9$ - Fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing fungus. *Eur. J. Biochem.* 260: 208-216.
- Sakuradani, E., Kobayashi, M., Ashicari, T. y Shimizu, S.** 1999. Identification of  $\Delta^{12}$ -fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* y the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* 261: 812-820.
- Salgado, V.L.** 1997. The modes of action of spinosad and other insect control products. *Down to Earth*, 52 (1): 35-43.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, L.J.** 2000. Técnicas de cultivo y control de ácaros de alimentos. Trabajo de grado. Universidad de Extremadura. Cáceres.
- Sánchez, L.J.** 2002. Control de ácaros contaminantes del jamón Ibérico. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Cáceres.



- Sánchez, R.I. y Castañera, P.** 2001. Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. *J. Stored Product. Res.* 37: 93-101.
- Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A.R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(12): 5463-7.
- Schroeder, H.W. y Helton, W.H.** 1975. Production of sterigmatocystin by some species of the genus *Aspergillus* and its toxicity to chicken embryos. *App Microbiol.* 30(4): 589-591.
- Schümann, J. y Hertweck, C.** 2006. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes. *Journal of Biotechnology* 124: 690-703.
- Seitz, E.W.** 1990. Microbial and enzymeinduced flavors in dairy foods. *J Dairy Sci* 73:3664-369 1.
- Shimizu, T.; Kinoshita, H. y Nihira, T..** 2006. Development of transformation system in *Monascus purpureus* using an autonomous replication vector with aureobasidin A resistance gene. *Biotechnol. Lett.* 28:115-120.
- Simpson, T.J.** 1995. Polyketide biosynthesis. *Chem. Ind.* 407-411.
- Sinha, R.N. y Mills, J.T.** 1969. Feeding and reproduction of the grain mite and the mushroom mite on some species of *Penicillium*. *Journal of Economic Entomology.* 61 (6): 1548-1552.
- Slack, G.J.; Puniani, E.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. y Miller, J.D.** 1999. Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycological research* 113 (2009) 480-490.
- Sokolov, L.B.; Alekseeva, L.E.; Kol'bach, V.O.; Kuznetsova, N.A. y Nyn', V.S.** 1971. Study of the chemical composition of aspergin- ametabolite from *Aspergillus* sp. *Antibiotiki.* 16(6): 504-510.
- Sonenshine, D.E.** 1984. Pheromones of acari and their potential use in control strategies. 99-107. En: *Acarology VI.* Vol. 1. Griffiths, D. A. & Bowman, C. E (eds.). Ilis Horwood Limited. Chichester.
- Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (3): 503-517.

**Specht, C.A.; DiRusso, C.C.; Novotny, C.P. y Ullrich, R.C.** 1982. A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal Biochem.* 1;119(1):158–163.

### **T**

**Takano, Y.; Kubo, Y.; Shimizu, K.; Mise, K.; Okuno, T. y Furusawa, I.** 1995. Structural analysis of *PKS1*, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 162–167.

**Taiz, Li. y Zeiger, E.** 2006. *Plant Physiology*, 4ª edición edición, Sunderland, USA: Sinauer Associates, Inc.. ISBN 978-0-87893-856-8l.

**Tamura, M.; Kawahara, K. y Sugiyama, J.** 2000. Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the Trichocomaceae (Eurotiales). 357-372. In: Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Samson y Pitt (eds). Harwood Academic. Australia.

**Tsai, H.F.; Chang, Y.C.; Washburn, R.G.; Wheeler, M.H. y Kwon-Chung, K.J.** 1998. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigates*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.* 180: 3031-3038.

**Tautz, D. y Renz, M.** 1983. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. *Anal Biochem.* Jul 1;132(1):14–19

**Thom, C. y Raper, K.B.** 1941. The *Aspergillus glaucus* group. U.S. Dep. Agric. Misc. Pub. 426: 1-46.

**Turner, W.B.** 1971. Fungal metabolites. Vol. 15. Poliketides, 445-476. Academic Press, Londres. Reino Unido.

**Turner, W.B. y Aldridg, D.C.** 1983. Fungal metabolites II. Academic Press, London.

### **V**

**Vaiman, D.** 2002. Agar plug/serial dilution approach for rapid PCR screening of phage libraries. *Biotechniques.* 33 (4): 764-766.

**Ventanas, J.; Ruiz, J. y Córdoba, JJ.** 2001. El jamón curado de cerdo ibérico: descripción del proceso tradicional de elaboración. En: Tecnología del jamón ibérico. J. Ventanas (coordinador). Editorial Mundi-Prensa. Madrid.

**Villa-Carvajal, M.; Coque, J.J.R.; Alvarez-Rodriguez, M.L.; Uruburu, F. y Belloch, C.** 2004. Polyphasic identification of yeasts isolated from bark of cork oak during the manufacturing process of cork stoppers. *FEMS Yeast Res* 4: 745–750.

## W

**Walzl, M.G.** 1992. Ultrastructure of the reproductive system of the house dust mites *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari, Pyroglyphidae) with remarkson spermatogenesis and oogenesis. *Exp. Appl. Acarol.* 16: 85-116.

**Weissman, K.J. y Leadlay, P.F.** 2005. Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature reviews microbiology.* 3: 925-936.

**Wendland, J.; Pöhlmann, R.; Dietrich, F.; Steiner, S.; Mohr, C. y Philippsen, P.** 1999. Compact organization of rRNA genes in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Curr Genet.* 35: 618-625.

**White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.B. y Taylor, J.W.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322. In: *PCR protocols. A guide to methods and applications.* Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). Academic Press. San Diego.

**Wilkin, D.R.** 1979. The control of mites in cheese stores. *Recent Advances in Acarology.* 1: 221-229.

**Witalinski, W. y Walzl, M.G.** 1995. Reproductive systems in selected acaridid mites (Acaridida). 698. En: *The Acari, Physiological and Ecological Aspects of Acari-Host Relationships.* Kropczynska D, Boczek J & Tomczyk A (eds). Dabor, Warszawa.

## Y

**Yang, G.; Rose, M.S.; Turgeon, B.G. y Yoder, O.C.** 1996. A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *Plant Cell* 8:2139–2150.

**Yoshimura, M.; Yamanaka, S.; Mitsugi, K. y Hirose, Y.** 1975. Production of *Monascus*- pigment in a submerged culture. *Agr. Bol. Chem.,* 39 (9): 1789-1795.

**Yu, J.-H. y Leonard, T.J.** 1995. Sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus nidulans* requires a novel type I polyketide synthase. *J. Bacteriol.* 177: 4792-4800.

### **Z**

**Zhou, C.; Yang, Y. y Jong, A.Y.** 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* 8 (2): 172-173.

**Zumalacárregui, J.M. y Díez, F.V.A.** 2001. Cecina y Tasajo. 1162-1175. En: *Enciclopedia de la Carne.* Martín y Macías (eds). Madrid.