

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Cento de Investigación en Biotecnología Aplicada



Herramientas para el mejoramiento genético de *S. violaceusniger* YCED-9 enfocadas a la producción de metabolitos secundarios

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN TECNOLOGÍA AVANZADA
P R E S E N T A

Andrea Mariano Matías

DIRECTORES DE TESIS:
M. en B. Angel Eduardo Absalón Constantino
Dr. Sergio Rubén Trejo Estrada

Octubre del 2009



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

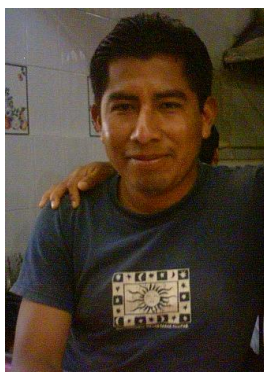
En la Ciudad de TLAXCALA el día 24 del mes Agosto del año 2009, el (la) que suscribe ANDREA MARIANO MATIAS alumno (a) del Programa de MAESTRIA EN TECNOLOGÍA AVANZADA con número de registro B051001, adscrito a POSGRADO EN TECNOLOGÍA AVANZADA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de M. en B ANGEL EDUARDO ABSALÓN CONSTANTINO y cede los derechos del trabajo intitulado Herramientas para el mejoramiento genético de *S violaceusniger* YCED-9 enfocadas a la producción de metabolitos secundarios., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ANDADOR 2 PONIENTE, No 59-I, RINCÓN DE SAN APARICIO PUEBLA. C.P. 72920, TEL.:(01 22 2) 2 66 26 11. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Biol. ANDREA MARIANO MATÍAS

Nombre y firma

A mi hermano, Fermín



Porque morir por el pueblo es vivir, vives en
nuestros puños, nuestro grito, nuestra lucha,
que fue tuya.

Agradecimientos

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de la beca número **202477**

Quiero agradecer sinceramente a Angel por haberme adoptado cuando quedé desamparada, por la confianza que depositó en mi cuando yo no tenía ni idea de lo que iba hacer, por su interés, tiempo y sobre todo por su paciencia a lo largo de todos estos años. De antemano le agradezco la confianza en mí para realizar el siguiente proyecto que iniciamos. Porque aún tengo muchas cosas que aprender de ti, gracias.

También deseo agradecer al Dr. Miguel Angel Villalobos por haberme dado la beca institucional. Al Dr Armando Mejía Álvarez por haberme dejado trabajar en su laboratorio y por haber revisado mi tesis. A la Dra. Diana por haber estado en mis seminarios de tesis.

A mis amigas Pily, Caty, Gaby y Elda por animarme en los momentos de tristeza cuando no salía nada.

A mis hermanos por apoyarme en todo momento principalmente a For y Fer. A For por la confianza que siempre ha depositado en mi y porque estoy segura que me seguirá apoyando en las decisiones que tome. Y a Fer por haberme animado y convencido cuando yo ya no quería saber nada de la maestría. Por haberme financiado cuando se me termino la beca. Por haber estado en cada momento de mi vida, por ser un ejemplo de dignidad, bondad y justicia.

Abstract

The objective in the present work was to design molecular tools that later can be applied for the identification of genes involved in the biosynthesis of guanidylfungin by *S. violaceusniger* YCED-9. For it, different experimental strategies were explored. The first strategy consisted of looking for a transformation method that could be applied to the strain under study. For which different techniques from transformation were explored. In the first place by means of Intergeneric conjugation, in this experiment different temperatures from incubation were proven (an interval from 50 to 65) to induce the germination of the spores and to inhibit the possible system of present restriction in the strain. By means of this method were not obtained transforming. Another of the used method was the electroporation in this method explored the different parameters key, as the applied voltage, spores fresh and germinated. Nevertheless, electroporation transformation attempts failed. It is, why I choose to explore other methods like the biolistic, in this case also the parameters were analyzed as the distance of the firing, the DNA concentration and the time of growth. With this method profit the obtaining of transforming with plasmid of autonomous replication and plasmid of integration. The varied parameters if they are very important since them obtained greater number to the 9 cm when the DNA agreement was greater.

Other strategy consisted in to amplify by means of PCR sequences of DNA of genes involved in the guanidylfungin biosynthesis. For this they were used primers designed by Ayuso-Sacido, which amplify of form specifies an acyl tranferasa (AT), a present enzyme dominion PKS I. The result is a 1200 sequence pb later an analysis was made of sequence 3 vectors, to which I denominate pAYU5, pAYU10, and pAYU11 which turned out to be different. One was that pAYU5 and pAYU10 presented/displayed a greater percentage of similarity to PKS I of pimarinic, amphotericin and nystatin, whereas pAYU11 presents/displays greater percentage of similarity to composed of the type ansamycin.

Also were designed primers to amplify transporting protein sequence, nevertheless, even though that was obtained amplified from the awaited size the

analysis of the sequences showed to sequences similar to PKS type I and to the dominion polymerase alpha III of different species from *Streptomyces*.

Also were designed primers to amplify by means of iPCR not known sequences that were located in the terminal ends of the sequence pAYU5. Nevertheless, difficulties appeared and concrete results could not be obtained.

In spite of all the difficulties that appeared throughout this work profit to obtain a method of reproducible transformation and also a sequence that possibly belong to a gene of PKS I of guanidylfungin.

RESUMEN

El objetivo en el presente trabajo fue diseñar herramientas moleculares que posteriormente puedan ser aplicadas para la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina por *S. violaceusniger* YCED-9. Para ello, se exploraron diferentes estrategias experimentales. La primera estrategia consistió en buscar un método de transformación que pudiera ser aplicada a la cepa bajo estudio. Para lo cual se exploraron diferentes técnicas de transformación. En primer lugar mediante conjugación, en este experimento se probaron diferentes temperaturas de incubación (un intervalo de 50 a 65°C) para inducir la germinación de las esporas e inhibir el posible sistema de restricción presente en la cepa. Sin embargo, no se obtuvieron transformantes. Otro de los métodos utilizados fue la electroporación, explorándose diferentes parámetros clave, como son el voltaje aplicado, esporas frescas, esporas frescas y germinadas. Sin lograrse obtener transformantes. Es por eso, que se optó por explorar otros métodos como la biobalística, en este caso también se analizaron los parámetros clave como la distancia del disparo, la concentración de ADN y el tiempo de crecimiento. Con este método se logró la obtención de transformantes con un plásmido de replicación autónoma y con un plásmido de integración. Se encontró que los parámetros variados si son muy importantes ya que se obtuvieron mayor número a los 9 cm cuando la concentración de ADN fue mayor.

Por otro lado, mediante PCR se amplificaron secuencias de ADN de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina. Para esto se utilizaron "primers" previamente diseñados por Ayuso-Sacido, los cuales amplifican de forma específica una acil transferasa (AT), un dominio presente en enzimas PKS I. El resultado es una secuencia de 1200 pb. Posteriormente se hizo un análisis de secuencia 3 clonas, a las que se denominó pAYU5, pAYU10, y pAYU11 las cuales resultaron ser diferentes. Se encontró que pAYU5 y pAYU10 presentaron un mayor porcentaje de similitud a PKS I de pimarcina, anfotericina y nistatina, mientras que pAYU11 presenta mayor porcentaje de similitud a compuestos del tipo ansa.

También, se diseñaron primers para amplificar secuencia de proteínas transportadoras, sin embargo, a pesar que se obtuvieron amplificadas del tamaño

esperado el análisis de las secuencias mostró secuencias parecidas a PKS tipo I y al dominio alfa de polimerasa III de diferentes especie de *Streptomyces*

También se diseñaron "primers" para amplificar mediante PCRi secuencias desconocidas que estuvieran situadas en los extremos terminales de la secuencia pAYU5. Sin embargo, se presentaron dificultades y no se pudieron obtener resultados concretos.

A pesar de todas las dificultades que se presentaron a lo largo de este trabajo se logro obtener un método de transformación reproducible y también una secuencia que posiblemente pertenece a un gen de PKS I de guanidilfungina.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Aspectos generales de los actinomicetos	3
2.2 Características e importancia del género <i>Streptomyces</i>	4
2.3 Características génicas del género <i>Streptomyces</i>	7
2.3.1 Características de los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios.	9
2.4 Generalidades de los metabolitos secundarios de <i>Streptomyces</i>	10
2.5.1 Clasificación de metabolitos secundarios	12
2.6 Policétidos	12
2.6.1 Tipos de PKS	13
2.6.2 Clasificación de policétidos	14
2.6.3 Mecanismo de las reacciones de las PKS	16
2.6.3.1 Mecanismo de las reacciones de PKS tipo I	16
2.6.3.2 Mecanismo de las reacciones de las PKS tipo II	18
2.6.3.3 Mecanismo de las reacciones de PKS tipo III	19
2.7 Antifúngicos	20
2.8 Antecedentes del trabajo	22
2.8.1 <i>S. violacesuniger</i> YCED-9	23
2.8.2 Guanidilfungina	24
2.8.3 Estructura de guanidilfungina	25
2.9 Herramientas moleculares aplicadas al estudio de los actinomicetos	27
2.9.1 Sistemas de transformación aplicados a <i>Streptomyces</i>	28
2.9.1.1 Transformación por biobalística	31
2.9.2 Características de plásmidos utilizados para la	32

transformación de *Streptomyces*

3 JUSTIFICACIÓN	34
4 OBJETIVOS	36
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
6 MATERIAL Y MÉTODOS	39
6.1 Microorganismos	40
6.1.1 Condiciones de cultivo de microorganismos	40
6.1.2 Conservación de microorganismos	40
6.2 Medios de cultivo	40
6.2.1 Medios de cultivo para <i>S. violaceusniger</i> YCED-9	40
6.2.2 Medios de cultivo para <i>Fusarium oxysporum</i>	42
6.2.3 Medios de cultivo para <i>E coli</i>	42
6.3 Antibióticos y suplementos	43
6.4 Obtención de ADN	44
6.4.1 Minipreparaciones de plásmidos	44
6.4.2 Mega Preparaciones de plásmidos	44
6.4.3 Purificación de ADN	45
6.4.3.1 Eliminación de ARN de las muestras de ADN	45
6.4.4 Eliminación de proteínas de las muestras de ADN	45
6.4.5 Aislamiento de ADN total de <i>S. violaceusniger</i>	46
6.4.7 Cuantificación de ADN	47
6.5 Reacción en cadena de la ADN polimerasa	47
6.5.1 Oligonucleotidos para PCR	48
6.5.2 Condiciones de reacción y amplificación	48
6.5.3 PCR inverso	49
6.6 Clonación de productos de PCR	51
6.6.1 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	51
6.6.2 Reacción de ligación	51

6.6.3 Plásmidos utilizados para la clonación de productos de PCR	52
6.6.4 Plásmidos utilizados para la transformación de <i>S. violaceusniger</i>	54
6.5 Separación de fragmentos de ADN por electroforesis	54
6.7 Transformación de <i>E coli</i>	55
6.7.1 Transformación de <i>E. coli</i> mediante el método de cloruro de calcio	55
6.7.2 Transformación de <i>E coli</i> mediante electroporación	56
6.8 Extracción de guanidilfungina A de <i>S. violaceusniger</i>	57
6.8.1 Fermentación	57
6.8.2 Extracción de guanidilfungina	57
6.9 Bioensayos de inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> por la guanidilfungina de <i>S. violaceusniger</i>	58
6.10 Transformación de <i>S. violaceusniger</i> YCED-9	58
6.10.1 Transformación de <i>S violaceusniger</i> por conjugación	58
6.10.2 Transformación de <i>S violaceusniger</i> por electroporación	59
6.10.3 Transformación de <i>S violaceusniger</i> por biobalística	60
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
7.1 Transformación de <i>S violaceusniger</i> YCED-9	63
7.1.1 Transformación de <i>S. violaceusniger</i> por conjugación	63
7.1.2 Transformación de <i>S. violaceusniger</i> por electroporación	65
7.1.3 Transformación de <i>S. violaceusniger</i> por biobalística	67
7.2 Amplificación de productos de PCR	70
7.3 Análisis de secuencias de PKS amplificadas por PCR	73
7.4 Amplificación de proteínas transportadoras de <i>S. violaceusniger</i>	75
7.5 Amplificación de secuencias mediante PCR inverso	82
7.6 Bioensayos de inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> por la guanidilfungina de <i>S. violaceusniger</i>	85

8 CONCLUSIONES	87
9 PERSPECTIVAS	88
10 BIBLIOGRAFÍA	89

Abreviaturas

ACP	Proteína transportadora de grupos acilo
<i>Amp</i>^R	gen de resistencia a ampicilina
<i>Apra</i>^R	gen de resistencia a apramicina
AT	aciltransferasa
<i>clp</i>^R	gen de resistencia a cloranfenicol
DH	dehidratasa
EDTA	ácido etilendiamino tetra acetico
ER	enoilreductasa
FAS	sintasa de ácidos grasos
IPTG	isopropil tio β -D-galactósido
X- Gal	5 bromo, 4 cloro, 3 indol β -D Galactosido
PM	Peso molecular
pb	Pares de base
kb	kilo bases (1kb=1000pb)
rpm	revoluciones por minuto
dH₂O	H ₂ O desionizada
min	Minutos
s	segundos
KR	cetorreductasa
KS	cetosintetasa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PKS	policétido sintetasa
TE	tioesterasa
<i>tsr</i>^R	gen de resistencia a triostrepton

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias del género *Streptomyces* tienen como hábitat principal el suelo, y se caracterizan por presentar dos atributos inusuales, uno de ellos es su complejo ciclo de vida y el otro es su habilidad de producir un gran número de metabolitos secundarios (Hopwood, 2004b).

Desde el punto de vista biotecnológico el género *Streptomyces* posee un interés muy particular, debido a que alrededor de dos tercios de los antibióticos producidos industrialmente son sintetizados por miembros de este género. La diversidad funcional de los compuestos sintetizados es amplia ya que se pueden encontrar con actividad antibacterial, inmunosupresores, promotores de crecimiento, anticancerígenos, antihelmínticos, herbicidas, fungicidas, entre muchos otros (Hopwood, 2004b, Hopwood, 2003).

En base a su estructura química los metabolitos secundarios pueden clasificarse en familias y muchos de los compuestos más utilizados y estudiados son sintetizados por las enzimas multifuncionales denominadas policétido sintetasas (PKS) (Thompson, *et al.* 2002).

Los polienos son un grupo de metabolitos secundarios sintetizados por PKS y están considerados entre los compuestos de mayor tamaño, son ampliamente usados en el campo de la medicina, industria y agricultura. A este grupo pertenecen algunos antifúngicos de los más usados para el control de infecciones micóticas como la amfotericina, nistatina, pimaricina (Weissman *et al.* 2005, Vanden *et al.* 2003).

Debido al difícil control de las enfermedades micóticas y su alta resistencia a los antibióticos empleados se ha manifestado la necesidad de buscar alternativas más seguras, biodegradables y con un costo de producción menor.

Con este propósito se ha iniciado la búsqueda de nuevos antifúngicos que cumplan con los requisitos mencionados. Uno de los antifúngicos que representa una alternativa es la guanidilfungina, cuya actividad está dirigida hacia hongos fitopatógenos de plantas. Sin embargo, de forma general los antifúngicos presentan propiedades de insolubilidad en agua y alta toxicidad, es por eso que las exploraciones actuales se han enfocado hacia la identificación y análisis de los clusters de genes que participan en la biosíntesis de los metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Debido a que se ha mostrado que su conocimiento representa una herramienta muy interesante para la construcción de compuestos con mayor espectro de actividad, mayores niveles de producción, menores niveles de toxicidad, y que represente a una mejora en la economía

Es por eso, que en este trabajo se planteó la obtención de diferentes herramientas moleculares que posteriormente puedan ser utilizadas para la identificación de los genes que participan en la biosíntesis de guanidilfungina de *Streptomyces violaceusniger* YCED-9.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos generales de los actinomicetos

Las bacterias Gram-positivas constituyen dos ramas principales: los organismos con bajo porcentaje de G+C en su genoma, tales como los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* y los organismos con alto porcentaje de guaninas y citocinas en su genoma como los actinomicetos (Kieser *et al.* 2000).

Los actinomicetos pertenecen al orden de los *Actinomycetales* (Lechevalier 1981), es un grupo microbiano que presenta una diversidad considerable desde formas bacilares hasta formas filamentosas ramificadas a modo de esporulación compleja.

La palabra actinomiceto deriva del griego *aktis* que significa rayo y *miktis* que significa hongo, debido a las primeras observaciones morfológicas que se realizaron. Aunque los actinomicetos y los hongos tienen diferencias fundamentales en la estructura celular interna y composición de la pared, presentan morfológicas y patrones de crecimiento muy similares, es por esto que inicialmente se les consideró como un grupo intermediario entre bacterias y hongos. Sin embargo, están clasificados como bacterias, debido a que presentan una pared celular compuesta por peptidoglicanos y no por quitina o celulosa como en los hongos, el diámetro de sus hifas es de alrededor de 0.7 μm , son sensibles a los antibióticos, y son resistentes a los antifúngicos.

La mayoría de los actinomicetos son saprófitos de vida libre y tienen como hábitat natural el suelo, donde juegan un papel muy importante en la renovación de la materia orgánica y el ciclo del carbono (Zenova *et al.* 2003). Debido a que participan en procesos de degradación de compuestos orgánicos como celulosa y quitina. Aunque, por otro lado también son responsables de una gran variedad de enfermedades tanto en animales como en plantas.

Otra característica de los actinomicetos es la presencia de sistemas complejos tanto bioquímicos como genéticos, que le han permitido a esta clase de microorganismos tener mecanismos especiales de adaptación a ambientes extremos, como salinos y alcalinos (Jiang *et al.* 2006), así como también le han dado la capacidad de producir una amplia variedad de metabolitos (Osada, 2001). Es el grupo microbiano más prolífico en cuanto a la producción de antibióticos y de los actinomicetos aislados el 95% de las cepas pertenecen al género *Streptomyces*.

2.2. Características e importancia del género *Streptomyces*.

El género *Streptomyces* se encuentra entre las bacterias más complejas, puede ser definido por sus características genéticas y quimiotaxonomías, tales como las secuencias de RNA ribosomal 16S, composición de la pared celular, patrones de lípidos y ácidos grasos (Nedal, 2007).

Entre las características más importantes de las bacterias que pertenecen al género *Streptomyces*, se encuentran, que son microorganismos que tienen como hábitat principal el suelo, su crecimiento está acoplado con la producción abundante de enzimas hidrolíticas extracelulares, son los responsables del olor a tierra mojada del suelo y su ciclo de vida es muy diferente al del resto de las bacterias (Figura 1).

Se presenta en forma de un crecimiento hifal que se desarrolla apicalmente y se ramifica, estas hifas invaden el sustrato formando el micelio vegetativo, el cual es muy importante ya que da la oportunidad de tener acceso a nutrientes en áreas difíciles de explorar y posteriormente su ramificación genera el micelio aéreo (Manteca *et al.* 2005), el cual también es de suma importancia ya que a partir de este micelio se originan las esporas.

La formación de esporas inicia cuando ocurre la diferenciación de puntas aseptadas, (ceptos de hasta 100 μm de longitud), las cuales pueden contener muchas decenas de copias del genoma, posteriormente el crecimiento de dichos compartimentos se detiene, las paredes crecen y los compartimentos experimentan separación múltiple, generando una cadena de preesporas unigenómicas, las membranas celulares de los compartimentos de la preesporas experimentan un engrosamiento y se vuelven esféricas, dando origen a las estructuras denominadas esporas, las cuales suelen acumular pigmentos (Charter y Chandra, 2006).

Las esporas de *Streptomyces* no son resistentes a altas temperaturas, sin embargo, pueden sobrevivir a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes y agua, facilitan una rápida colonización de nuevas áreas, ya que pueden sobrevivir por largos periodos, y permiten la dispersión por animales, viento, y agua. Aunque son pocas las especies que se ha observado, también tienen la capacidad de esporular en cultivo líquido (Nikolova *et al.* 2006-2007, Charter y Chandra 2006, Karagouni *et al.*, 1993, Mayfield *et al.* 1972).

El interés por conocer los genes que participan en los procesos de diferenciación del complejo ciclo de vida de los microorganismos de este género

(Figura 1), surge desde estudios tempranos cuando se dan las primeras identificaciones de variantes morfológicas, las cuales se caracterizaban por falta de crecimiento aéreo o colonias con morfología aberrante, sin embargo, su estado genético no podía ser interpretado, no obstante, esta situación cambio cuando se aislaron las primeras mutantes *blt* (defectivas en la formación de micelio aéreo (calvas) y posteriormente, las mutantes *whi* (defectivas en la formación de esporas) de *S. coelicolor* y actualmente se cuenta con un gran número de investigaciones donde se han dado a conocer genes que participan en la regulación del desarrollo y se ha mostrado que muchas de estas mutantes están afectadas en genes de regulación.



Figura 1. Muestra el ciclo de vida de *Streptomyces*.

Otra característica del género *Streptomyces* es su capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos muy interesantes en el área de la biotecnología, y es debido a esta peculiaridad, por lo que han llamado mucho la atención, ya que los compuestos producidos presentan un amplio rango de actividad y por lo tanto, son usados como antibióticos, inmunosupresores, agentes anticancerígenos,

promotores de crecimiento, antihelmínticos, herbicidas, antifúngicos etc. (*Kieser et al.* 2000, *Christova et al.* 1995, *Demain,* 2002).

Se ha estimado que las especies de *Streptomyces* producen más del 50% del total de los 12000 antibióticos microbianos conocidos hasta 2000, otro 11% es producido por otros actinomicetos (*Christova et al.* 1995, *Kieser et al.* 2000, *Demain,* 2002.).

Mediante modelación matemática se ha estimado que del total de los metabolitos secundarios producidos por el género *Streptomyces*, tan sólo, se ha reportado el 3% (*Watve et al.,* 2001).

Por otra parte, también se ha reportado la secreción de un amplio rango de enzimas hidrolíticas extracelulares de interés comercial (*Borodina, et al.* 2005).

2.3. Características genéticas del género *Streptomyces*

Una propiedad típica del ADN genómico de *Streptomyces* es el alto porcentaje de G+C contenido en su ADN, esta característica es de gran importancia para la identificación de genes ya que hace inevitable que los codones ricos en GC, tengan mayor posibilidad de ser usados, se ha observado que en 9 de cada 10 codones la tercera posición es una G o una C (*Bibb et al.,* 1984; *Ishikawa y Hotta,* 1999).

La caracterización de diferentes cepas de *Streptomyces* ha revelado la presencia de un cromosoma lineal, de un tamaño alrededor de 8 Mb, con repetidas invertidas terminales y proteínas covalentemente unidas a la región terminal 5' de los extremos cromosomales (*Chen,* 1996; *Kolsto,* 1997). Este tamaño cromosómico es grande comparado con las bacterias mejor conocidas como *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Estas características hacen del cromosoma de *Streptomyces* único en estructura y tamaño (*Omura et al.* 2001). Se piensa, que su gran tamaño puede deberse a la presencia de regiones no codificantes (*Robinson et al.,* 1981), repeticiones de DNA en tándem (*Shrempf,* 1985), duplicaciones de genes con la misma función aparente (*Ohnuki et al.* 1985, *Tohyama et al.,* 1987).

Se ha propuesto que la diversidad metabólica y complejidad en procesos celulares de este género de bacterias se debe a su genoma extremadamente grande.

La secuenciación de genomas completos de organismos como *S. coelicolor* (Bentley *et al.*, 2002), *S. avermitilis* (Ikeda *et al.*, 2003) y *S. griceus* (Ohnishi *et al.* 2008), ha permitido tener un conocimiento un poco más amplio sobre las características genéticas del género. En la tabla 1 se presenta una relación comparativa entre los difentes genomas secuenciados de *Streptomyces*.

Aunque también se ha reportado la secuenciación genómica de *S. scabies* desde el 2007 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_scabies/). No se ha publicado la secuencia completa. Sólo se ha dado a conocer su tamaño, el cual ocupa una secuencia de 10,148,695 pb, con un 71.45% de C+G.

Tabla 1. Características de los cromosomas secuenciados del género *Streptomyces*

Especie	Cromosoma	Longitud (pb)	Contenido de G+C (%)	*ORFs	Genes del metabolismo secundario	Referencia
<i>S. coelicolor</i>	Lineal	8,667,507	72.1	7,825	20 grupos	Bentley <i>et al.</i> 2002
<i>S. avermitilis</i>	Lineal	9,025,608	70.7	7,574	30 grupos	Ikeda <i>et al.</i> 2003
<i>S. griceus</i>	Lineal	8,545,929	72.2	7,138	34 grupos	Ohnishi <i>et al.</i> 2008

*ORFs: marcos de lectura abiertos

La información arrojada a partir del análisis de los organismos secuenciados ha mostrado que la distribución de genes en el genoma presenta un cierto patrón de distribución, se ha visto que los genes que resultan esenciales (genes implicados en la división celular, en la replicación de ADN, transcripción, traducción y biosíntesis de aminoácidos) se encuentran en el centro del cromosoma, mientras que los genes codificantes para funciones como la síntesis de metabolitos

secundarios, se encuentran en los brazos cromosomales (Redenbahr *et al.* 1996, Bentley *et al.*, 2002).

2.3.1. Características de los grupos de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundario.

Los genes que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios representan un alto porcentaje del genoma y debido a esto se han mapeado algunos grupos de genes que participan en la biosíntesis. Los cuales a diferencia de los genes del metabolismo primario se han caracterizado por estar ordenados en regiones continuas definidas. Lo importante de esta organización es que permite la detección y aislamiento de rutas biosintéticas completas.

Los grupos de genes típicamente están compuestos por hasta docenas de genes requeridos para la síntesis de un metabolito específico. El cual contiene genes para el ensamblamiento de la cadena, modificaciones y regulación. Esto se puede observar en la figura 2 donde se presenta la organización de algunos grupos de genes secuenciados que codifican para metabolitos con actividad antifúngica y en la tabla 2 se presenta un resumen de sus características.

Tabla 2. Características de metabolitos secundarios con actividad antifúngica

Metabolito	Productor	Tamaño y No de genes	Referencia
Nistatina	<i>S. nuorsei</i>	123 kb con 22 ORFs	Brautaset <i>et al.</i> 2000
Amfotericina	<i>S. nodosus</i>	113 kb con 17 ORFs	Caffrey, 2001
Pimaricina	<i>S. natalensis</i>	110 kb con 16 ORFs	Aparicio <i>et al.</i> , 1999
Candidicina	<i>S. griceus</i>	250 kb con 16 ORFs	Campelo y Gil, 2002

El análisis de los diversos “cluster” de genes para la biosíntesis de antibióticos ha mostrado la presencia de genes de resistencia asociados a los “cluster” de biosíntesis (Mendez y Salas, 2001, Sletta *et al.*, 2005). En los cluster

aquí mostrados se puede observar la presencia de proteínas transportadoras del tipo ABC.

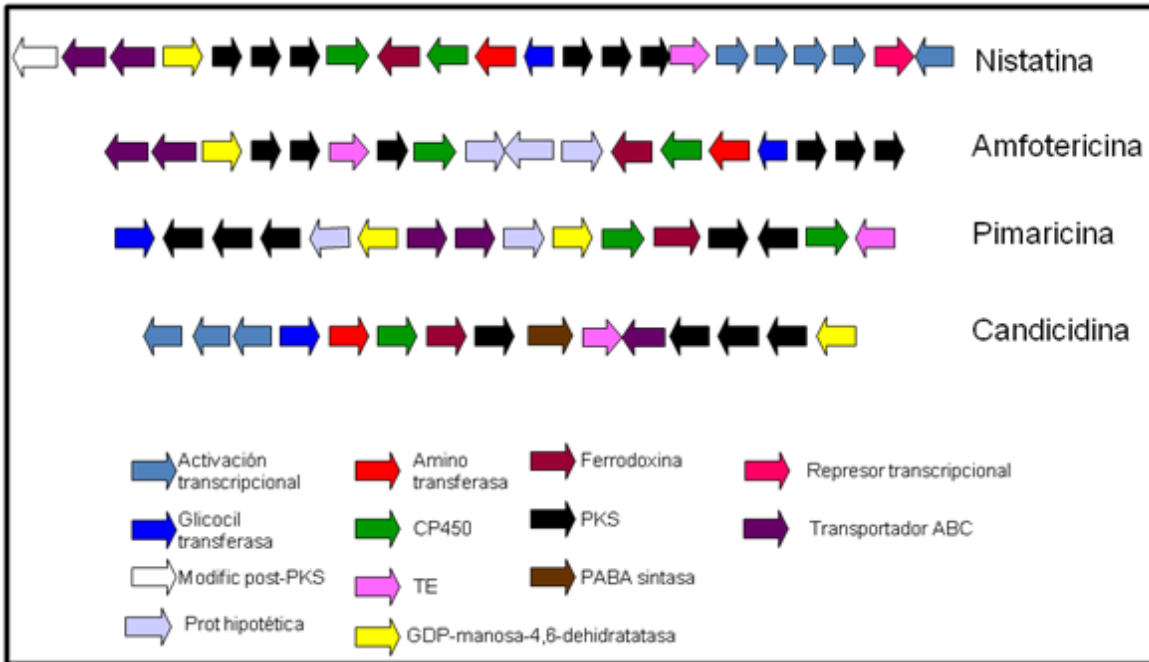


Figura 2. Muestra la organización de genes que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

2.4. Generalidades de los metabolitos secundarios de *Streptomyces*

Se les ha denominado metabolitos secundarios a los compuestos que presentan gran diversidad estructural y que no son indispensables para el crecimiento y reproducción del organismo que los produce.

Se ha observado que a pesar de la gran diversidad, los metabolitos secundarios presentan características comunes. En el cuadro 1 se describen las principales características compartidas (Vining, 1992).

Cuadro 1. Características de los metabolitos secundarios

- La especificidad de la cepa productora. Un organismo dado usualmente produce un grupo de compuestos que pertenecen a la misma clase.
- La variabilidad de estructuras químicas y actividades biológicas.
- Su síntesis en la etapa final del crecimiento exponencial y durante la fase estacionaria, a partir de intermediarios del metabolismo primario y mediante rutas biosintéticas largas.
- El control fisiológico de su producción como respuesta a factores ambientales
- La agrupación de los genes implicados en la biosíntesis de dichos metabolitos en forma de "clusters" en un solo sitio en el cromosoma, asociados a genes reguladores de su expresión.

Una característica importante de los microorganismos productores de antibióticos es la de haber desarrollado varios mecanismos para su protección frente a la acción tóxica de los antibióticos sintetizados endógenamente.

Los principales mecanismos son los siguientes: Mediante modificaciones en la estructura del antibiótico al interior de la célula, la modificación de los sitios de acción y el flujo activo de moléculas de antibióticos (Higgins, 2001, Sletta *et al.* 2005)

El último mecanismo a menudo emplea el sistema de transportes ABC. (Higgins, 2001). Se pueden distinguir tres tipos de ABC-transportadores (Méndez y Salas, 1998): los transportadores ABC Tipo I, II y III.

Los transportadores ABC Tipo I están constituidos por dos genes, uno de los cuales codifica el componente hidrofílico y el otro codifica el componente hidrofóbico. En el caso de los ABC-transportadores Tipo II sólo existe un gen responsable de codificar

el componente hidrofílico y no existe un componente de unión a membrana citoplasmática. Por último los ABC-transportadores Tipo III, igual que en el caso anterior solamente poseen un gen que es responsable de codificar los dos componentes del sistema, hidrofílico e hidrofóbico (Higgs, 2001, Sletta *et al.* 2005).

2.5.1. Clasificación de metabolitos secundarios

En base a su estructura química los metabolitos secundarios se clasifican en:

Peptídico: son compuestos formados por cadenas de aminoácidos sintetizadas en su mayoría mediante péptido sintetasas independientes de ribosomas, que sufren modificaciones postraduccionales y procesamientos proteolíticos que dan lugar a estructuras muy diversas. En este grupo se encuentran los antibióticos β -lactámicos.

Aminoglucósidos: son aminoazúcares unidos a un aminociclitol. En este grupo se encuentran la kanamicina, estreptomicina, higromicina, gentamicina.

Nucleósidos: son compuestos que por su estructura química actúan como análogos de los nucleósidos que componen a los ácidos nucleicos.

Policétidos: son compuestos con una gran diversidad estructural y que son sintetizados por las enzimas denominadas policétido sintetasas, en este grupo se engloban compuestos como la actinorrudina, anfotericina, pimaricina, nistatina etc.

2.6. Policétidos

Los antibióticos policétidos son sustancias sintetizadas por actinomicetos principalmente, aunque también son sintetizadas por hongos y plantas. La biosíntesis inicia con la construcción de una cadena carbonada originada por la condensación de unidades de ácidos carboxílicos. Las unidades de construcción pueden ser variadas, de acetato, propionato, butirato, donde cada unidad se ensambla de tal forma que proporciona dos átomos de carbono a la estructura final.

Una característica de esta familia es la presencia de un carbono- β en el grupo ceto; algunos grupos ceto son reducidos a hidroxilos, o son eliminados por decarboxilación. Durante el proceso de condensación. Finalmente la cadena policetónica, sufre ciclación y modificaciones post- PKS. El mecanismo de acción de estas enzimas es muy similar al de las sintasas de ácidos grasos de cadena larga como se puede observar en la figura 3 (Hopwood, 2004a, Hopwood y Sherman, 1990).

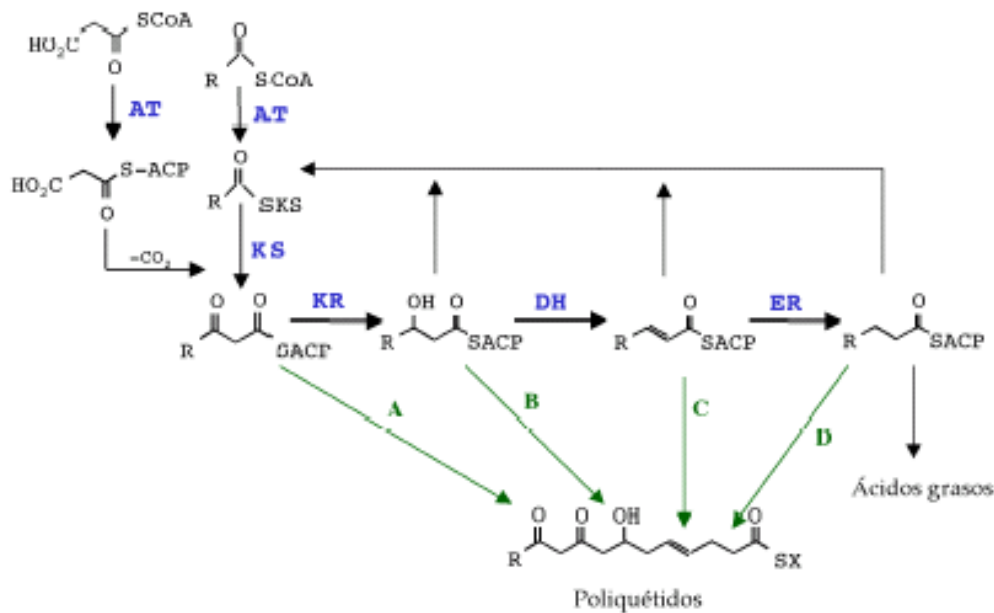


Figura 3. Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y policétidos. Las letras A, B, C y D se corresponden con los distintos grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica (Hopwood, 2004a).

2.6.1. Tipos de PKS

Las PKSs Tipo I están integradas por varias proteínas multifuncionales, cada una presenta diferentes dominios catalíticos colocados en el orden preciso en que van ser utilizados para la elongación de la cadena policetónica (Cortés *et al.*, 1990; Donadio y Hutchinson, 1991; Aparicio *et al.*, 1996).

Las PKS Tipo II está formado por un complejo multienzimático formado por varias proteínas que van a actuar de forma reiterada para originar la cadena policetónica, y hay un tercer tipo denominado PKS Tipo III que son un grupo de proteínas homodiméricas un poco diferentes a las PKS Tipo I y Tipo II, dentro de este grupo se ubica a la superfamilia de las chalconas sintasas (CHSs). Las PKS Tipo III se encuentran difundidos principalmente en plantas (Moore *et al.*, 2001; Izumikawa *et al.*, 2003, Saxena *et al.*, 2003).

2.6.2. Clasificación de policétidos

Los policétidos son una familia de antibióticos a la que pertenecen un gran número de compuestos con amplia diversidad de estructuras químicas y con amplio espectro de actividad.

Policétidos aromáticos: En este grupo se encuentran compuestos policétidos que presentan un anillo aromático en su estructura química. Son compuestos con estructuras químicas muy diversas, pero todos ellos están sintetizados por PKS Tipo II. Algunos ejemplos de policétidos aromáticos son: actinorrodina de *S. coelicolor* y urdanimicina de *S. fradiae* (Hranueli *et al.* 2003).

Policétidos poliéteres: se trata de moléculas lineales formadas a partir de una unidad iniciadora acetato por condensación de unidades metilmalonato o etilmilmalonato. Igual que los macrólidos, los poliéteres son sintetizados por PKS Tipo I. La monencina A de *S. cinnamonensis* es un representante de este grupo.

Macrólidos: se caracterizan por presentar en su estructura un anillo macrocíclico cerrado por lactonización originado al ciclarse la cadena policetónica correspondiente (Omura y Tanaka, 1984). Son sintetizadas por PKS Tipo I y se pueden clasificar en:

Macrólidos no polienos: Estos compuestos se caracterizan por carecer de dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico, pero presentan grupos metilo e hidroxilo. El primer macrólido no polieno identificado fue la picromicina, y uno de los más conocidos es la eritromicina, otros no polienos son la escopafungina,

nifimicina, copiamicina, neocopiomicina, guanidilfungina A y B, azalomicina, amicina etc. (Nacayama *et al.* 2002, Takesako y Beppu, 1985)

Macrólidos polienos: se caracterizan por la presencia de dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico, presentar un azúcar unido al anillo macrocíclico por un enlace glicosídico a un carbono con un grupo hidroxilo adyacente. El número de átomos de carbono que constituyen el anillo macrocíclico varía de 20 a 44 átomos, el cual es superior al número de átomos de carbono del anillo macrocíclico de los macrólidos no polienos. La actividad biocida de los macrólidos polienos suele ser fungicida; estos compuestos se unen con cierta especificidad al ergosterol presente en la membrana de los hongos, haciéndola permeable y alterando el movimiento de iones a través de ella, lo que afecta a los potenciales de membrana, y conduce finalmente a la muerte celular (Seco *et al.* 2004, Campelo y Gil, 2002, Caffy *et al.* 2001, Brautaset *et al.* 2000, Aparicio *et al.* 1999).

En la siguiente tabla se enlistan algunos de los antibióticos polienos mejor conocidos:

Tabla 3. Algunos antibióticos poliénicos mejor conocidos (Seco *et al.* 2004, Campelo y Gil, 2002, Caffy *et al.* 2001, Brautaset *et al.* 2000, Aparicio *et al.* 1999).

Macrólido polieno	No de dobles enlaces conjugados	Microorganismo productor	Genes de la PKS
Nistatina	4 (tetraeno)	<i>S. noursei</i>	<i>nys</i>
Pimaricina	4 (tetraeno)	<i>S. natalensis</i>	<i>pim</i>
Rimicidina y CE-108	4 (tetraeno)	<i>S. diastaticus</i> var. 108	<i>rim</i>
Anfotericina B	7 (heptaeno)	<i>S. nodosus</i>	<i>amp</i>
Candidicina	7 (heptaeno)	<i>S. griseus</i>	<i>can</i>

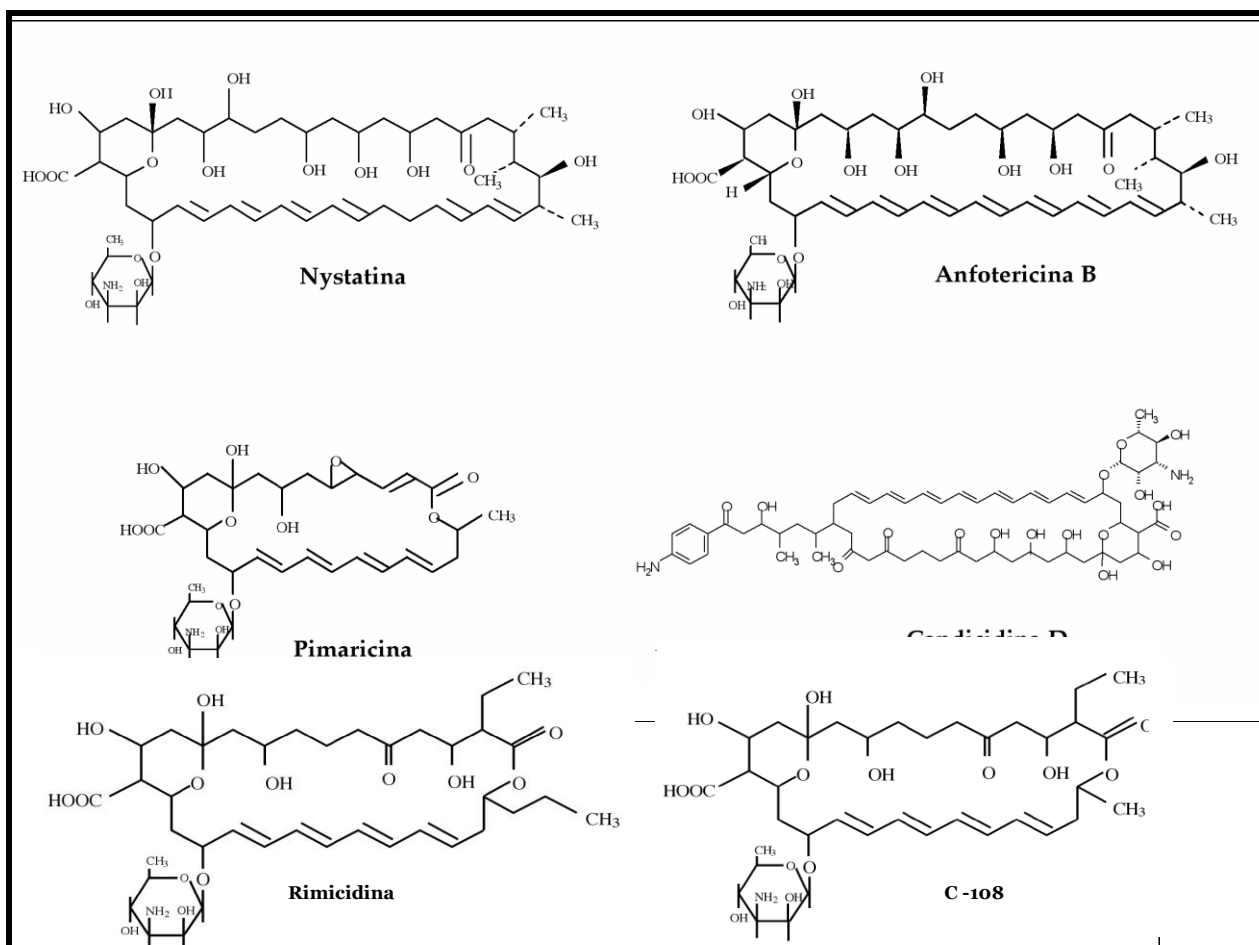


Figura 4. Estructuras de macrólidos polienos (Seco *et al.* 2004, Campelo y Gil, 2002, Caffy *et al.* 2001, Brautaset *et al.* 2000, Aparicio *et al.* 1999).

2.6.3. Mecanismos de las reacciones de PKS

2.6.3.1. Mecanismos de las reacciones de PKS tipo I

Las poliketido sintetasas PKS tipo I son enzimas multifuncionales de gran tamaño, a menudo mayor de 300 KDa. Estos enzimas sintetizan policétidos macrocíclicos tales como los antibióticos eritromicina, rifamicina, anfotericina, nistatina, pimaricina, candicidina etc.

Los complejos multienzimáticos de los PKS tipo I contienen múltiples sitios activos separados, denominados dominios catalíticos los cuales participan secuencialmente y una sola vez en el proceso, de tal manera que existen tantos dominios catalíticos como módulos de elongación son necesarios para constituir la

cadena policetónica. Los dominios catalíticos base mínimos necesario para que lleve a cabo la biosíntesis de la cadena policétonica son KS, AT y ACP, mientras que la presencia de los dominios catalíticos KR, DH y ER, va a depender del grado de reducción de la cadena en formación. De tal forma, se originarán grupos hidroxilo cuando el dominio de reducción presente sea KR y DH, y grupos C-C reducidos cuando estén presente los tres dominios funcionales. Si no se encuentra presente ninguno de los dominios catalíticos de reducción mencionados lo que aparece en la cadena son grupos ceto. El orden de los dominios catalíticos dentro de cada módulo es: KS, AT, (DH, ER, KR cuando existen) y ACP (Hopwood, 2004^a, Donadio *et al.* 1991.).

Para el inicio de la biosíntesis, se requiere de un polipéptido que al menos, este formado por el modulo de carga, ya que es el encargado de tomar la unidad iniciadora de la ruta biosintética. El modulo de carga puede presentar naturaleza muy diversa. Por ejemplo para la nistatina está constituido por los dominios: KS, AT, DH y ACP.

Las unidades iniciadoras son variables, pero las más comunes son acetyl-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA y sus homólogos dicarboxil, malonil-CoA, metilmalonil-CoA, y etilmalonil-CoA, sin embargo, en el análisis de diferentes rutas biosintéticas se ha observado que tanto el acetyl-CoA, como la propionil-CoA son las principales unidades de inicio utilizadas por las policétido sintetasas.

El resto de PKS encargadas de la elongación de la cadena presentan tamaños variables según el número de módulo de elongación presente.

Como unidades de extensión más comunes están la malonil-CoA, metilmalonil-CoA, acetatos, propionatos o butiratos provenientes de la descarboxilación de sus correspondientes ácidos dicarboxílicos: malonato, metilmalonato y etilmalonato respectivamente (Gil *et al.*, 1985).

Posterior a la condensación entre la unidad iniciadora y la unidad elongadora, el residuo policetónico originado es transferido por el dominio catalítico AT al dominio catalítico ACP. Este residuo policetónico previamente puede haber

sufrido algún tipo de reducción mediante la presencia de los dominios funcionales KR, DH y ER.

A medida que se van incorporando unidades de elongación mediante la acción de los diferentes polipéptidos funcionales que constituyen la PKS Tipo I, se va formando la cadena policetónica que finalmente será liberada del complejo multienzimático. La PKS que participa en el último módulo de elongación generalmente presenta en el extremo C terminal un dominio tioesterasa (TE), dominio encargado de hidrolizar el enlace entre la cadena policetónica formada y el brazo de 4-fosfopantoteína del último dominio ACP. A continuación, la cadena policetónica se cicla y podrá sufrir las modificaciones post-PKS correspondiente mediante la acción de las citocromo-P450 y las transferasas que dan lugar a la estructura final de la molécula. (Pfeifer *et al.* 2001, Moore, *et al.* 2001, D Hranueli, *et al.* 2001, Seok K., *et al.* 2005).

Se han encontrado otras tioesterasas independientes de la PKS, cuya función es corregir los errores producidos durante el ensamblado de la cadena (Kotowska *et al.*, 2002).

2.6.3.2. Mecanismos de las reacciones de PKS tipo II

Las PKS tipo II están integradas por un conjunto de proteínas monofuncionales, las cuales canalizan la formación de compuestos a través de aromatización y ciclación, tales como doxorubicina y tetraciclinas (Hertweck, 2007).

Todas las PKSs Tipo II implicadas en la biosíntesis de policétidos aromáticos tienen una organización muy similar y se emplea en todos los pasos de la síntesis de modo reiterativo, en un proceso en el que los grupos β -carbonilo formados se dejan en su mayoría sin reducir.

En todas ellas están presentes un complejo enzimático denominado PKS mínima, el cual está formado por dos subunidades: $KS\alpha$, $KS\beta$ y ACP. La proteína $KS\alpha$ está implicada en la condensación y presenta los centros activos para las actividades KS y AT (Fernández-Moreno *et al.*, 1992). La proteína $KS\beta$ es homóloga a la $KS\alpha$ pero no presenta los sitios activos para las actividades KS y AT y parece ser que determina la longitud de la cadena policetónica (McDaniel *et al.*,

1993a y b), por lo que se le ha dado el nombre de factor determinante de la elongación (CLF); se ha determinado que es necesaria para la biosíntesis de la cadena policetónica ya que presenta una actividad decarboxilasa (Bisang *et al.*, 1999). La tercera proteína que forma parte de la PKS mínima es la proteína transportadora de grupos acilo (ACP). La actividad AT transfiere las diferentes unidades implicadas en el ensamblado de la cadena policetónica al grupo tiol del brazo de 4'-fosfopantoteína del ACP, y éste se encarga de aproximarlas al centro activo de la KS, para la condensación (Rawlings, 1995.).

La biosíntesis de la mayoría de los policétidos aromáticos comienza con acetato como unidad de inicio. La malónamida y propionato, también pueden ser utilizados, aunque su uso es menos frecuente.

Otras enzimas implicadas en la formación de los policétidos tipo II son la ketorreductasa (KR), que cataliza la ketorreducción de la cadena policetónica en formación; la aromatasas (ARO), que cataliza la aromatización de la cadena naciente y la ciclasa (CYC), implicada en la ciclación de la cadena policetónica. Estas últimas actividades, ARO y CYC, suelen aparecer juntas en una misma proteína (Zawada y Khosla, 1997).

2.6.3.3. Mecanismos de las reacciones de PKS tipo III

Estructural y mecánicamente las PKS tipo III son las más simples, ya que están formadas por homodímeros iterativos. Estas enzimas utilizan coenzima A (CoA) esteres de ácidos carboxílicos simples, en lugar de proteínas transportadoras de grupos acilo (ACP) para proporcionar el sustrato a sitios activos. Los homodímeros iterativos de PKS III poseen un solo sitio activo multifuncional. Donde cada monómero emplea este único sitio activo, el cual toma la unidad de inicio sobre una cisteína catalítica, donde se llevan a cabo múltiples reacciones de condensación decarboxilativas y modula la ciclación del producto policétido (Jez *et al.* 2000, Shen y Hutchinson, 1993).

Las proteínas PKS tipo III juegan un papel muy importante en diversas rutas biosintéticas de plantas. En bacterias se han identificados pocas enzimas del tipo III, una de ellas es la CHS bacteriana, de *S. griseus*, la cual ya ha sido

funcionalmente caracterizada. Es catalizada a partir de 5 moléculas de malonil CoA. Se han observado 2 características distintas a otras CHS. Una de ellas es que forman 2 anillos de 6 C utilizando diferentes mecanismos intramoleculares de ciclación. EL segundo aspecto inusual de las reacciones es la condensación de 5 unidades de acetato, en lugar de 3 como se da usualmente (Funa *et al.* 2002).

2.7. Antifúngicos

Bajo la denominación de antifúngicos o antimicóticos se incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura, origen, espectro, vía de administración, su toxicidad, sus mecanismos de acción, (Carrillo, *et al.* 1999).

La clasificación más usada es la siguiente:

Tabla 4. Clasificación de antifúngicos. Tomado de Bossche y colaboradores en el 2001

Clase	Antifúngico	Sitio de acción
Polienos	Griseofulvina Amfotericina B Nistatina Natamicina	Inhibición del movimiento de los microtubulos. Funciona como una barrera en la membrana.
Azoles	Clotrimazol	Biosíntesis de ergosterol
Alilaminas	Terbinafina	Esaleno epoxidasa
Pirimidina	Flucitosina	Síntesis de DNA y RNA.

De los antimicóticos empleados actualmente, la clase de los azoles es la más grande y más usada. Se trata de moléculas sintéticas con estructuras químicas con anillos heteropentacíclicos, con dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno unidos por átomos de carbono a otros anillos aromáticos. Actúan sobre la célula fúngica impidiendo la síntesis del ergosterol, principal componente de la

membrana plasmática de los hongos, al inhibir la enzima lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P-450.

Sin embargo, es la clase de los polienos a la que pertenecen antibióticos con mayor espectro de actividad y de utilización única para algunas infecciones fúngicas invasoras, como la anfotericina (actualmente se usan sus derivados) (Catalán et al. 2006, Kadota *et al.* 2004).

Los antibióticos poliénicos son sustancias sintetizadas por diversas especies de *Streptomyces* que poseen una estructura constituida por un anillo macrólido de 26-38 átomos de carbono con polinsaturaciones y cerrado mediante un enlace éster o lactona interna. Este grupo comprende cerca de cien compuestos diferentes, que según el número de enlaces no saturados de la molécula se clasifican como epátenos o retráenos (siete o cuatro enlaces, respectivamente). En un lado de la cadena se sitúan los grupos hidroxilo que confieren a la molécula un carácter anfipático, característico de estos antifúngicos. Las sustancias más representativas de este grupo son la nistatina y la anfotericina B, aunque también se emplean otros como la hamicina y la pimaricina.

Estos compuestos son efectivos contra organismos eucarióticos, ya que estos organismos eucariotas presentan esteroides en sus membranas. Los antifúngicos polienos anfotericina B, candicidina, nistatina y pimaricina (natamicina) se han usado para tratamientos de infecciones superficiales de animales (Vanden *et al.* 2003).

Las alilamidas actúan inhibiendo la síntesis del ergosterol en un paso temprano de su biosíntesis. Inhiben a la enzima escualeno epoxidasa y como consecuencia se genera una reducción en la concentración de ergosterol y aumentan los niveles de escualeno y permeabilidad de la membrana. Lo cual lleva a un desequilibrio en la organización celular y a un decremento en el crecimiento fúngico.

Los compuestos activos que afectan a los ácidos nucleicos son denominados pirimidinas. Estos compuestos generalmente actúan inhibiendo el

metabolismo de la pirimidina por interferencia en la síntesis de RNA, DNA y proteína de la célula fúngica, como por ejemplo 5-fluorocitocina que actúa como análogo de citosina e inhibe la síntesis de ADN en el hongo.

2.8. Antecedentes del trabajo

Se ha propuesto que los miembros del grupo de microorganismos de *Streptomyces violaceusniger* son una fuente prometedora de nuevos metabolitos secundarios con diferentes actividades (antifúngicos y β -lactamas), también se han identificado metabolitos volátiles y es por eso que se han implementado métodos para el aislamiento e identificación de miembros de este grupo, uno de los métodos empleados para su aislamiento es mediante resistencia a fenol, ya que los miembros de este grupo son resistentes a este solvente (Hayakawa *et al.* 2004).

La identificación de las cepas que pertenecen a la especie *S. violaceusniger*, se ha hecho mediante el análisis de secuencias de rRNA 16S (Kumar *et al.*, 2007). Algunas cepas que se han clasificado dentro de la especie *S. violaceusniger* son:

S. violaceusniger G10 tiene capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos, principalmente *Fusarium oxysporum*, que causa la enfermedad de marchitamiento en plantas de plátano (Getha *et al.*, 2002).

S. violaceusniger HAL64, se caracteriza por producir como compuesto más abundante kosinostatina, este compuesto presenta actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias Gram positivas principalmente (El-Naggar, 2007). También se ha identificado la producción de antibióticos como el 2- metilisoborneol y geosmin (Saadoun *et al.* 1997). Estos investigadores encontraron que *S. violaceusniger* contiene plásmidos lineales de alto peso molecular, los que no fue posible identificar mediante métodos convencionales, por lo que usaron electroforesis en campo pulsado (sistema II CHEF-DRII), de tal forma lograron identificar uno de los plásmidos al que denominaron pIS2 con un tamaño de 115kb.

2.8.1. *S. violaceusniger* YCED9

Streptomyces violaceusniger cepa YCED9 fue aislada por Crawford y colaboradores en 1993, y se inició su estudio por su amplio potencial de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos en diferentes cultivos de plantas en bioensayos realizados *in vitro* e *in vivo*.

Posteriormente *Streptomyces violaceusniger* cepa YCED9 fue identificada como sinónimo de *Streptomyces hygrosopicus* cepa YCED9 (Chamberlain *et al.* 1999, Christova *et al.* 1995).

Streptomyces violaceusniger cepa YCED9 produce antibióticos con propiedades antifúngicas (Crawford *et al.* 1993, Trejo *et al.* 1998a, Trejo-estrada *et al.* 1998b), tiene la capacidad de crecer sobre sustratos lignocelulosos y además puede inducir el crecimiento de plantas como el césped. (Chamberlain *et al.* 1999). Los experimentos llevados a cabo por Trejo-Estrada y colaboradores para identificar los agentes de biocontrol producidos por esta cepa, muestran la producción de enzimas hidrolíticas quitinasas y β -1,3 glucanasas, y la producción de tres compuestos con actividad antifúngica: nigericina, geldamicina y guanidilfungina.

Nigericina: El antibiótico nigericina se agrupa dentro de los antibióticos poliéter y fue el primer poliéter ionoforo en ser descubierto (Figura 2a). El “cluster” de genes que participan en la biosíntesis de nigericina ya ha sido identificado en la cepa *Streptomyces* sp. DSM4137, aunque también es sintetizado por *S. higrosopicos* y *S. violaceusniger*. En el proceso de identificación se llevó a cabo la delección de los genes que participan la producción, lo que dio como resultado, abolición de la producción de nigericina y de un metabolito estrechamente relacionado, la abierixina (Harvey *et al.*, 2007)

Geldanamicina: La geldanamicina (figura 5b) es un antibiótico ansamicina, que tiene la habilidad de unirse a la proteína Hsp90, alterando su función. Debido a su unión a estas proteínas, la geldamicina posee potente actividad antitumoral y antiviral. Aunque su toxicidad y pobre solubilidad en agua han restringido su uso.

También tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos como *Pythium* y *Phytophthora*. Sin embargo, la identificación del grupo de genes que participa en la biosíntesis de geldanamicina ya fue identificado en *Streptomyces hygroscopicus* 17997 (Wei-Qing *et al.* 2006).

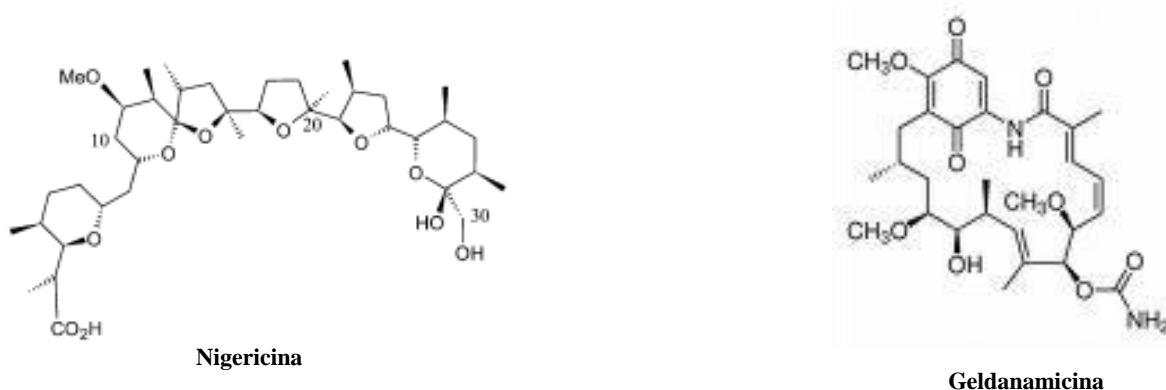


Figura 5.(a) Muestra la estructura de nigericina, mientras que la figura **(b)** muestra la estructura de geldanamicina, antibióticos producidos por *S. violaceusniger* YCED-9.

2.8.2. Guanidilfungina

La guanidilfungina fue identificada por primera vez en el micelio de la cepa No. 662 de *Streptomyces violaceusniger*, la cual fue aislada de los suelos de la ciudad de Sapporo, Hokkaido en Japón por Takesako y colaboradores en 1984.

La detección de la guanidilfungina se observó mediante bioensayos de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus*. Posteriormente los mismos autores y en el mismo año observaron la producción de este mismo compuesto en *Streptomyces hygroscopicus*.

En 1985 Takesako K y Beppu construyeron un derivado de la guanidilfungina, denominado demalonilmetilguanidil, el cual presentó una actividad mucho más alta que la guanidilfungina original.

Posterior a los estudios realizados por estos investigadores, las investigaciones sobre la guanidilfungina quedaron rezagadas y fue hasta 1998 que Trejo-Estrada y colaboradores encontraron que *Streptomyces violaceusniger* cepa

YCED-9, también tiene la capacidad de producir diferentes metabolitos secundarios como geldanamicina, nigericina y guanidilfungina

2.8.3. Estructura de la guanidilfungina

La estructura de la guanidilfungina fue confirmada mediante experimentos de resonancia magnética nuclear incorporando ^{13}C al acetato y propionato. Observaron la incorporación de 12 unidades de acetato y 9 de propionato a la molécula de guanidilfungina. Los acetatos fueron incorporados en 8 carbonos relacionados a grupos hidroxilo y a los carbonos C-17, C-13, C-39 y C-59, mientras que el propionato se incorporó en 4 carbonos relacionados a grupos hidroxil y 3 carbonos metilenos, y a los carbonos 1 y 5 (1985 Takesako K y Beppu)

La estructura de la guanidilfungina consiste de un anillo de lactona macrocíclico de 36 carbonos, un anillo hemiacetal intramolecular que involucra un grupo ceto en el C-17, un grupo hidroxil en el C-21 y un malonil monoéster en el C-23 o C-25 (1985 Takesako K y Beppu).

La incorporación de ^{13}C a unidades de acetato y propionato estableció el origen biosintético para muchos de los carbonos en la guanidilfungina. La posición de los ester malonato es incierta, otra característica es el disubstituido del grupo guanidina. La unidad de inicio en cada caso probablemente es un derivado de arginina vía descarboxilación y dominación oxidativa, pero esto no ha sido comprobado mediante experimentación (Moore y Hertweck, 2001).

Otra posibilidad es que la guanidilfungina probablemente deriva vía la ruta biosintética de los policétidos, como la azalomicina y los antibióticos poliéno macrólidos.

En base al tamaño del anillo de lactona y otras características estructurales la de guanidilfungina se ha clasificado como un macrólido no poliéno. Otros compuestos no polienos son la escopafungina, copiamicina, neocopiomicina, nifimicina y azalomicina, amicina etc. (Usuki *et al.* 2006) (Fig. 6).

Probablemente el sitio de acción de la guanidilfungina es el mismo sitio de actividad de la nifimicina ya que es el compuesto al que presenta una mayor relación estructural. Se ha observado que la nifimicina tiene su sitio de acción en la membrana al igual que los antifúngicos polienos como la anfoteriricina, sin embargo, a diferencia de esta última la nifimicina interrumpe la membrana plasmática por su interacción directa con fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, pero no con ergosterol como lo hace anfotericina (Usuki et al. 2006). Otra característica de la citotoxicidad inducida por nifimicina es la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), las cuales no son generadas cuando el tratamiento se da con anfotericina

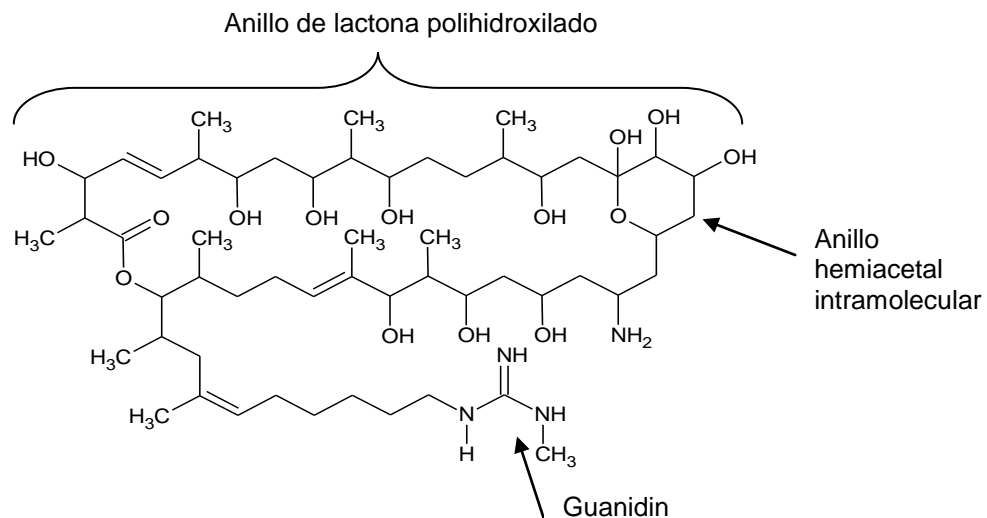
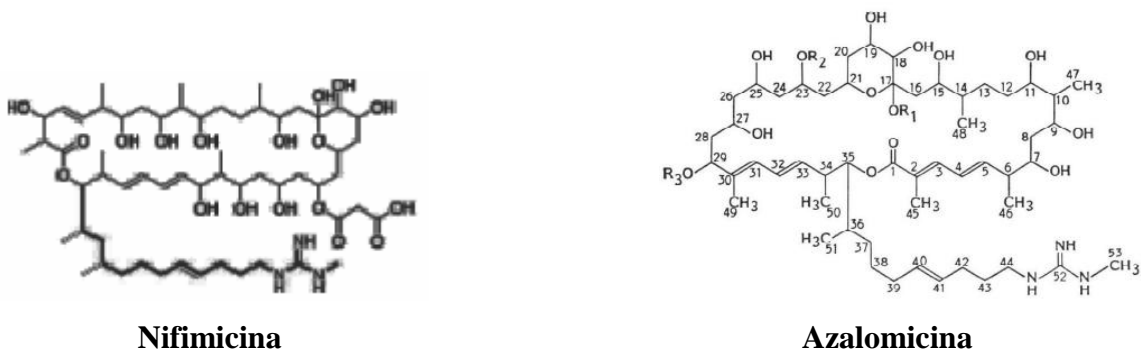
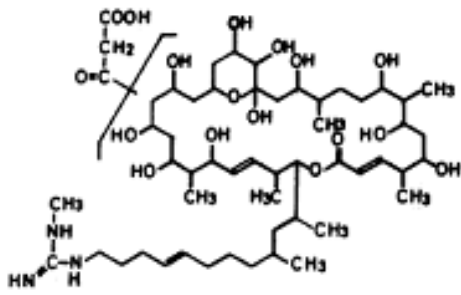
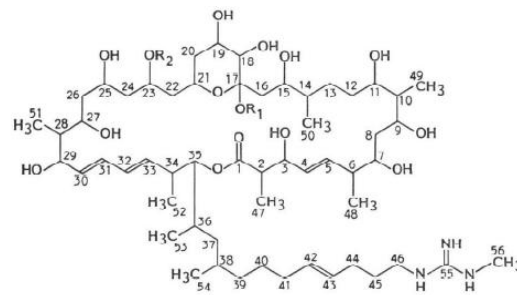


Figura 6. Estructura de la guanidilfungina A



**Copiamicina****Escopafungina****Figura 7.** Estructuras de compuestos no polienos parecidos a guanidilfungina

2.9. Herramientas moleculares aplicadas al estudio de los actinomicetos

Las primeras investigaciones realizadas a los actinomicetos se vieron limitadas a caracterizaciones morfológicas, culturales, fisiológicas y bioquímicas, mientras que los estudios genéticos se mantenían rezagados debido a la falta de herramientas moleculares que pudieran ser aplicadas.

La situación cambio en las últimas dos décadas, ya que una gran diversidad de investigaciones nos ha permitido entender los procesos genéticos en los ácidos nucleicos, de tal modo que ahora ya es posible llevar a cabo la manipulación biológica a nivel molecular. Todo esto trajo consigo una nueva dimensión al análisis de varios aspectos de la biología de los actinomicetos, y ha facilitado el desarrollo de cepas industriales mediante la producción de antibióticos o dando la capacidad de producir antibióticos nuevos. Pero aun así, debe señalarse que comparado con *E. coli*, la manipulación genética en *Streptomyces* tiene más límites debido a que usualmente son de crecimiento lento y los plásmidos recombinantes algunas veces son inestables (Chen X *et al* 2006, Hopwood, 2003, Thompson J. *et al.* 1980).

Los primeros trabajos realizados para lograr un conocimiento más amplio sobre la genética de *Streptomyces* fueron la obtención de mutantes auxotróficas, y la identificación de genes mediante mapeo clásico.

El primer grupo de genes identificado fue el de actinorrodina, en tal proceso se mapearon 7 clases fenotípicas de mutantes interrumpidas en la biosíntesis del antibiótico, más tarde con la aplicación de la clonación a los estudios de

Streptomyces a principios de los 80's se identifican enzimas, genes de resistencia y reguladores específicos de la biosíntesis (Hopwood, 2003, Rudd *et al.* 1979).

Tanto las mutaciones auxotróficas como las mutaciones de resistencia a antibióticos fueron de gran importancia para la identificación del mapa cromosomal de *S. coelicolor*, la descripción de un gran número de genes, la determinación de los loci *bld* y *whi*, tres grupos de genes para la biosíntesis de antibióticos, pero no fue suficiente para lograr un conocimiento más amplio que permitiera llevar a cabo procesos de manipulación de genes de forma tan específica.

Para 1992 ya podían ser aplicadas otras herramientas que permitieron ir más allá del mapeo de genes, como el análisis en gel de campo pulsátil, y la hibridación de genes clonados a fragmentos de restricción separados en el gel, la construcción de librerías ordenadas de genes en cósmicos y otros vectores de clonación. Así como la secuenciación de *S. coelicolor* (Kieser *et al.* 1992).

Todas las herramientas moleculares mencionadas anteriormente han facilitado el estudio de los genes de forma más específica, ya que se pueden generar mutaciones dirigidas por diferentes métodos, como por ejemplo la obtención de mutantes por "knockout" etc.

Sin embargo, muchas veces a pesar de que se cuenta con un gran número de herramientas moleculares que pueden ser aplicables al estudio de microorganismos de interés, los estudios se pueden ver limitados ya que la naturaleza propia del organismo bajo estudio, nos pone barreras que restringen las investigaciones como por ejemplo contar con un método de transformación que pueda ser aplicado al organismo bajo estudio.

2.9.1. Sistemas de transformación aplicados a *Streptomyces*

Por todas las características que presentan las bacterias del género *Streptomyces* es importante conocer la información genética fundamental de tales habilidades, y para ello es esencial desarrollar un sistema de transformación que permita la manipulación del material genético de interés en la cepa de estudio.

Aunque los sistemas de transformación para varias cepas de *Streptomyces* se han desarrollado desde 1980, aun no hay un protocolo universal que pueda ser aplicado a todas las bacterias del género, debido principalmente a las condiciones específicas de la cepa (Kawachi *et al.* 1997).

Existen tres vías principales mediante las cuales puede darse la transferencia de genes en bacterias: transducción, conjugación y transformación. Mediante estos procesos puede llevarse a cabo la transferencia de genes enteros, grupos de genes e incluso cromosomas enteros. También han podido realizar análisis genéticos y bioquímicos de las funciones bacterianas y establecer los principios de la estructura, función y regulación de genes.

La transducción es un método de transferencia de genes que ocurre en las bacterias de forma natural. La clave de este método es un bacteriófago, que infecta a una bacteria mediante su unión a la membrana e inyección de su ADN a la célula bacteriana. Esta vía implica dos mecanismos, diferentes por los cuales un bacteriófago puede transportar genes bacterianos de una célula a otra. El primer mecanismo es la transducción generalizada que permite la transferencia de casi cualquier gen bacteriano y el segundo mecanismo es la transducción especializada que puede operar solo sobre genes determinados (Walter y Rapley, 2000).

Otro de los mecanismos más utilizados es la conjugación interespecífica. La transferencia interespecífica de plásmidos de *E coli* a *Streptomyces* fue demostrada inicialmente por Mozodier y colaboradores en 1989.

De forma general el proceso consiste en transferir la información genética de una célula bacteriana a otra en un proceso que requiere contacto entre las células. Mediante esta vía una célula siempre dona la información genética a otra célula, a esta última se le ha denominado célula receptora. La célula donadora contiene plásmidos especiales llamados conjugativos y estos codifican para proteínas que forman una estructura especial superficial llamada pelo sexual, el cual se une a la célula receptora dando una especie de apareamiento. La célula donadora copia el plásmido conjugativo y simultáneamente transfiere la copia a la

célula receptora. Estos plásmidos conjugativos pueden contener genes extras, tales como genes de resistencia a antibióticos y otros genes de interés.

La tercera vía de transferencia de genes es la transformación; mecanismo por el cual el ADN libre se incorpora en una célula receptora y es dependiente de la capacidad de la célula receptora de exhibir competencia. Se han encontrado varias especies de procariontes que son transformables en condiciones naturales, sin embargo, no todas las bacterias pueden ser transformadas fácilmente. En la mayoría de los casos las células bajo estudio se tienen que hacer competentes mediante inducción artificial (Walter y Rapley, 2000).

La transformación puede llevarse a cabo por diferentes métodos, pero sin lugar a duda, los más utilizados en *Streptomyces* son la electroporación y la transformación de protoplastos.

Aunque la transformación de protoplastos se ha aplicado ampliamente a *Streptomyces* es uno de los métodos que requiere de mucho tiempo y cuidado para la preparación y se vuelve tedioso en la regeneración, por lo que muchas veces los resultados no son reproducibles y a menudo se obtiene una baja eficiencia (Pigac y Schrempf 1995, Shark *et al* 1991).

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, no existe un método de transformación que pueda ser aplicado a todas las cepas por lo que los métodos deben adaptarse. Como por ejemplo Kawachi y colaboradores desarrollaron un sistema de transformación mediante protoplastos donde agregaron un tratamiento de calentamiento a protoplastos y metilación del plásmido. De tal forma pudieron desarrollar un sistema de transformación para muchas cepas no transformables. Debido a que varias especies de *Streptomyces* poseen un sistema de restricción específico de metilación. (Kawachi *et al.* 1997).

S. hygrosopicus ATCC 29253, el cual no fue posible transformar por los métodos convencionales aplicados a *Streptomyces* como la conjugación, electroporación o transformación mediante protoplastos, es por eso que optaron por utilizar vectores a base de fagos temperados (Lomovskaya *et al.* 1997), o *S. hygrosopicus* Subs. *Yingchengensis* el cual no fue posible transformar con

plásmidos comúnmente utilizados para transformar *Streptomyces* y fue insensible a derivados de fagos de *Streptomyces* como Φ C31 o R4, por lo que optaron por analizar mutantes espontáneas o inducidas hasta obtener cepas transformables, deficientes en restricción, sensibles a fagos, y libres de un plásmido endógeno denominado pHZ5, el cual resultó ser incompatible con los plásmidos utilizados, derivados de pJ101, y derivados de pJV1, aunque cuando se trató de derivados de SCP2* los resultados de transformación continuaron siendo negativos, y obtuvieron una muy baja frecuencia de transformación cuando se trató de plásmidos bifuncionales aislados de la cepa silvestre y de *E coli* ET12567 (Qin *et al.* 1994).

A pesar de que existen varias restricciones que limitan la transformación de muchas especies de *Streptomyces* aun quedan métodos que podrían ser aplicados para la transformación y que aun no se han explorado, como por ejemplo la biobalística.

2.9.1.1. Transformación por biobalística

Lo expuesto anteriormente, da cabida a la exploración de métodos alternos como la biobalística, cuya técnica se ha usado en organismos difíciles de transformar, ya sea por que tienen barreras de restricción, o por la presencia de barreras estructurales como pared celular, este método ha sido empleado para la transformación de plantas principalmente, y en menor proporción se he aplicado a hongos, algas y bacterias (Smith *et al.* 1992).

La técnica de biobalística involucra la introducción de sustancias como ácidos nucleicos dentro de células o tejido intacto mediante el uso de micropoyectiles que son lanzados a alta velocidad. Las partículas pasan a través de la pared celular y membrana celular que son las principales barreras para que el ADN pueda entrar a la célula, sin embargo, también deben de ajustarse los parámetros de los diferentes tipos de células o tejidos para optimizar el proceso (Sanford 1988, Sanford *et al* 1993.).

Las características fundamentales que deben de considerarse son:

La aceleración de las micropartículas, la cual se genera por un “shock” que puede ser provocado por una explosión química, eléctrica, una descarga de aire comprimido o por un “shock” de helio, la presión generada mediante estos mecanismos hace que la membrana se rompa y permite que la energía liberada por el “shock” impulse a los microproyectiles cubiertos con ADN que están colocados sobre la membrana transportadora. Los microproyectiles son muy importantes, ya que deben de tener una superficie que pueda contener el ADN y por la otra superficie pueda recibir la energía del shock de gas. Las partículas más utilizadas son las de oro y las de tungsteno (Sanford 1988, Sanford *et al* 1993).

Son muy importantes también los parámetros biológicos, como por ejemplo el vector a utilizar debe de tener un gen reportero adecuado, el tamaño también debe ser considerados, promotor adecuado, la edad del cultivo como por ejemplo para *B megaterium* se obtiene una mayor eficiencia de transformación cuando el cultivo se encuentra en la fase logarítmica temprana, mientras que para *E. coli* no hay ninguna diferencia en ninguna de las fases de crecimiento y para *Saccharomyces cerevisiae* las células en fase estacionaria son más eficientes (Sanford 1988, Sanford *et al* 1993).

2.9.2. Características de plásmidos utilizados para la transformación de *Streptomyces*.

Para llevar a cabo la transformación de un organismo determinado se deben de tomar en cuenta diferentes características. Uno de los puntos más importantes en los cuales debemos poner atención es el tipo de plásmido a utilizar. Lo cual va a depender de los objetivos planteados. Ya que podemos encontrar plásmidos de replicación autónoma, plásmidos de integración y plásmidos que no tienen un origen de replicación para *Streptomyces*. Los últimos suelen utilizarse cuando se requiere generar una disrupción de un gen determinado y en experimentos de remplazamiento de una secuencia del cromosoma. Mientras que los plásmidos de replicación autónoma se utilizan con más frecuencia para complementación de mutaciones, incrementar el número de copias de los genes clonados y remplazamiento alélico (Bierman *et al.* 1992).

También es importante tomar en cuenta si los plásmidos son biofuncionales ya que este tipo de plásmidos facilitan su manipulación debido a que pueden introducirse en *E coli* y el análisis fenotípico puede hacerse cuando se introduce en *Streptomyces*.

Otros aspectos que hay que considerar para la selección del plásmidos son: la estabilidad de replicación en varios hospederos y la susceptibilidad a sistemas de restricción del hospedero, su habilidad de retener el ADN clonado sin causar delección o modificaciones. Los dos últimos puntos se refieren a plásmidos con alto número de copias, aunque los plásmidos con bajo número de copias son más estables, el rango de hospedero tiende a ser un gran problema (Tomich, 1988).

La incompatibilidad es otra de las características que se debe de tomar en cuenta para la selección de plásmidos ya que este problema se ha observado cuando se han utilizado algunos plásmidos bifuncionales (Tomich, 1988 y Bierman *et al.* 1992).

3.JUSTIFICACIÓN

La guanidilfungina es un metabolito secundario con actividad antifúngica capaz de inhibir el crecimiento de varios hongos fitopatógenos de plantas, cuya infección es la causa de pérdidas de diversos cultivos agrícolas. Dicha pérdida se manifiesta mediante la disminución en los niveles de producción, calidad del producto causando la disminución de su precio en el mercado y llevando de esta forma a grandes pérdidas económicas.

Por lo que es importante conocer el grupo de genes que participan en la biosíntesis de la guanidilfungina. Ya que este compuesto representa una alternativa como agente de control biológico de hongos fitopatógenos

Dado que se ha observado que el conocimiento de los genes que participan en la biosíntesis de los metabolitos secundarios facilita los estudios para el conocimiento de los genes reguladores de la biosíntesis, estos son de gran importancia para construir compuestos con mayor actividad, mayor producción y con menos costos de producción.

Es por eso que en este trabajo se plantea la generación de herramientas moleculares que posteriormente puedan ser utilizadas para la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina. Y que a largo plazo pueda construirse un antifúngico ideal, con amplio espectro, no tóxico, sin resistencia que pueda aplicarse por diferentes vías y con bajo costo de producción

4.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseño de algunas herramientas moleculares que puedan ser utilizadas para la identificación de genes involucradas en la biosíntesis de guanidilfungina de *Streptomyces violaceusniger* YCED-9

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estandarizar un método de transformación para *Streptomyces violaceusniger* YCED-9

Identificación de secuencias de ADN de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La guanidilfungina es un metabolito secundario que presenta actividad fungicida, pertenece al grupo de los polienos, y es obtenido de *Streptomyces violaceusniger*. Este compuesto tiene actividad contra hongos fitopatógenos de plantas, dicha actividad consiste en inhibir el crecimiento de estos organismos y de la cual se han construido análogos que le han conferido mayor actividad y solubilidad. Su uso está restringido dado que no se encuentra a nivel comercial, a pesar que representa una alternativa de control biológico.

Hoy en día se siguen realizando investigaciones dirigidas a encontrar agentes que ayuden a controlar las enfermedades causadas por múltiples hongos fitopatógenos. Sin contar aún con un compuesto o agente que controle efectivamente a estos microorganismos de amplia actividad, fácil propagación y amplia resistencia.

Es por eso que en este trabajo se plantea la obtención de herramientas moleculares que en trabajos posteriores puedan ser utilizadas para la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina y mediante dicho conocimiento puedan analizarse los genes responsables de la regulación de la expresión de este metabolito y mediante el conocimiento de estos construir un compuesto con mayor espectro de actividad, que sea un verdadero agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos.

6.MATERIAL Y MÉTODOS

6.1.Microorganismos

Escherichia coli XL1-Blue es la cepa que fue utilizada para la transformación y clonación de ADN plasmídico.

Escherichia coli SCS110. cepa utilizada para la transformación y clonación de ADN plasmídico cuando fue requerido para la transformación de *S violaceusniger*, ya que el ADN plasmídico obtenido de la cepa SCS 110 esta libre de metilación *Dam* o *Dcm*.

E. coli ET12567/pUZ8002. Esta cepa fue utilizada para la conjugación de *S violaceusniger* debido a que no puede metilar el ADN, además de que contiene el plásmido pUZ8002 que se caracteriza por permitir la movilización del ADN plasmídico que contenga un OriT, sin ser transferido durante el proceso

Streptomyces violaceusniger, de esta sepa se aisló el ADN utilizado, porque es en este microorganismo que se ha identificado el metabolito guanidilfungina.

6.1.1. Condiciones de cultivo de microorganismos

La cepa de *E. coli* XL1- Blue fue cultivada en el medio LB, a una temperatura de incubación de 37 °C cuando se querían colonias aisladas y con agitación a 250 rpm cuando se trató de medio líquido. Para selección de transformantes se adicionó al medio, el antibiótico según el plásmido utilizado.

S. violaceusniger es cultivada en medio TSB para la extracción de ADN, a una temperatura de incubación de 30 °C y 200 rpm, por 48 hrs, en medio SB para la purificación de guanidilfungina bajo las mismas condiciones pero ahora por 7 días.

6.1.2. Conservación de microorganismos

Las cepas de *E. coli* fueron conservadas en placas de Petri y en glicerol. Cuando se trató de tiempos cortos (hasta un mes) las cajas de Petri fueron sellas con parafilm y almacenadas a 4°. Para tiempos más largos (hasta 2 años) se conservó en glicerol al 20% a -20°.

Para la conservación de *S. violaceusniger* se recuperaron esporas de 12 días de crecimiento en medio sólido, posteriormente se centrifugaron a 11000 rpm por 15 min, se elimino el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en glicerol al 20 %. Finalmente se repartió 1ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se guardaron a -20°

6.2. Medios de cultivo

6.2.1. Medios de cultivo para *S violaceusniger* YECD-9.

Medio 1F. Este medio se utilizó para el crecimiento de *Streptomyces violaceusniger* en placa.

Pesar y licuar 100g de papa previamente cocida y mezclarla con las sales indicadas:

CaCl (20%)	9.5 ml
MgSO ₄ (5%)	2 ml
KNO ₃ (20%)	25 ml
K ₂ HPO ₄ (5%)	3 ml
NaCl (20%)	9.5 ml
dH ₂ O hasta	1000 ml

Ajustar el pH a 7.2 con NaOH

Para utilizarlo como medio sólido agregar 18g de agar.

Medio SB (Atlas *et al.* 1993). Este medio se utilizó para la producción guanidilfungina por *Streptomyces violaceusniger* YECED-9.

Glucosa	10 g
Extracto de carne	2 g
Extracto de levadura	2 g
Bacto-triptona	5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.01 g
dH ₂ O	1000 mL

pH= 7.2 antes de esterilizar

Medio TSB (tryptone soya broth). Este medio se utiliza cuando se requiere crecimiento masivo de *Streptomyces violaceusniger*, para la extracción de ADN total.

Peptona de caseina	17g
Peptona de soya	3g
Glucosa	2.5g
NaCl	5g
K ₂ HPO ₄	1g
d H ₂ O hasta	1000 ml

pH 7.2

Medio MS: Este medio fue utilizado para el crecimiento de *S violaceusniger* cuando se llevó a cabo el proceso de transformación por biobalística y para el crecimiento de *S coelicolor* cuando se llevó a cabo la conjugación.

Manitol	20g
Harina de soya	20g
Agar bacteriológico	20g
d H ₂ O hasta	1000mL

Este medio fue adicionado con sorbitol 0.75M cuando se utilizó para la transformación por biobalística, mientras que cuando se utilizó para la conjugación fue suplementado con MgCl₂ a una concentración final de 10mM

6.2.2. Medio de cultivo para *Fusarium oxysporum*.

Medio Dextrosa Papa Agar (PDA). Este medio se empleó para el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Se pesaron 39g del medio dextrosa papa agar y se disolvieron en 1000 ml de d H₂O.

6.2.3. Medios de cultivo para *E. coli*

Medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). Este medio de cultivo se utilizó de forma habitual para el crecimiento de *E. coli*. Su uso fue tanto de forma líquida como de forma sólida, cuya composición consiste de agregar:

Bacto-triptona	10 g
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
dH ₂ O hasta	1000 ml
pH=7.5 con NaOH	

Para su uso como medio sólido se agrega 20g de agar por litro.

Medio SOB (Hanahan 1983)

Bacto-triptona	20g
Extracto de levadura	5g
NaCl	0.5g
dH ₂ O Hasta	1000ml

pH=7.5 con NaOH

Después de esterilizar agregar 5 ml de una solución de MgCl 2M esterilizada por separado en autoclave.

Medio SOC (Hanahan 1983)

Es el mismo que el medio SOB, solo que después de esterilizar se agregan 20 ml por litro de una solución estéril de glucosa 1M más MgCl 2M.

6.3. Antibióticos y suplementos

Cuando se sembró una cepa transformada se adicionó un antibiótico de selección según el plásmido usado. Cuando se utilizó ampicilina (**amp**) siempre fue a una concentración de 100 µg/ml, Kanamicina (**km**) 25 µg/ml y cloranfenicol (clp) 25 µg/ml. Mientras que cuando se trato de apramicina (**apra**) vario la concentración dependiendo de la cepa utilizada. Para *E coli* 80 µg/ml, mientras que para *S coelicolor* 50 µg/ml y para *S violaceusniger* 4µg/ml. Y cuando se utilizó triostrepton (**thr**) la concentración fue de 30 µg/ml para *S. violaceusniger*

Cuando se clonaron fragmentos en los sitios de clonaje múltiple de plásmidos que contenían la subunidad α de la β -galactosidasa se agregó isopropil β D tiogalactosido (IPTG) como inductor de este gen, y 5 bromo, 4 cloro, 3 indolil β D galactosido (X-Gal) como sustrato. El X-Gal es sustrato de la β galactosidasa que lo convierte en un compuesto insoluble de color azul. El IPTG se agregó a una concentración final de 5 mM y el X-Gal a una concentración de 1.6 µg/mL (Sambrook y Russell, 2001).

6.4. Obtención de ADN

6.4.1. Mini Preparaciones de plásmidos

El protocolo Holmes y Quigley, (1981) ha sido utilizado para obtener ADN plasmídico en pequeñas cantidades y empleado para analizar los plásmidos recombinantes. Este método consiste en inocular 1 ml de medio LB (más el marcador de selección) con una colonia de *E. coli* XL1- Blue transformada, empleando un palillo estéril. El tubo es incubado a 37 °C y 250 rpm durante 12 horas, después de este tiempo las células se colectan por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min., eliminando el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 350 µl de STET¹, posteriormente se añadieron 20 µl de una solución de lisozima a una concentración de 10 mg/ml de agua quedando una concentración final de 500 µg/ml. Esta mezcla se agitó por 30 seg, pasado este tiempo se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 40 seg. Las proteínas, restos celulares, ADN cromosómico se precipitan inmediatamente por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min. y se elimina con un palillo estéril. El ADN plasmídico se precipitó con 40µL de acetato de sodio 3M pH= 5.2, más 600 µl de isopropanol. Se mezcló y mantuvo a temperatura ambiente durante 15 min. El ADN plasmídico se precipitó por centrifugación a 14000 rpm por 15 min y el precipitado se lavó con etanol al 70% . El precipitado se secó y resuspendió en 20 µl de TE² o dH₂O estéril.

6.4.2. Mega Preparaciones de plásmidos

Este método fue utilizado cuando se requirió ADN en grandes cantidades (Holmes y Quigley, 1981).

Consiste en inocular 100mL de medio LB, más el antibiótico de selección en un matraz erlenmeyer de 500mL con una colonia de *E. coli* XL1- Blue transformada. El matraz se incubaba a 37 °C y 250 rpm durante 12 horas. Las células se colectan por centrifugación a 4000rpm durante 10min. Se elimina el sobrenadante y la

¹ **STET**: EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa al 8% (p/v, Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y Tritón X-100 al 0.5% (v/v).

² **TE**: Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM pH 8.0

biomasa celular se resuspende del 6mL de STET, y la mezcla obtenida se reparte en tubos eppendorf en alícuotas de 350 μ L. A cada tubo se añaden 20 μ L de una solución de lisozima preparada a una concentración de 10 μ g/ml de agua para una concentración final de 500 μ g/ml.

Se mezclan durante 30 s y se incuban en un baño de agua hirviendo durante 40s e inmediatamente se centrifuga a 14000 rpm durante 15 min para precipitar proteínas, restos celulares y ADN cromosómico, lo cual se elimina con un palillo estéril. El ADN plamídico se precipita en 40 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 600 μ L de isopropanol. Se mezcla y mantiene a temperatura ambiente durante 15 min. El ADN plasmídico se precipita por centrifugación a 14000 rpm durante 15 min y el precipitado se lava con etanol al 70% (v/v). Cada alícuota de ADN plasmídico precipitado se resuspende en 100 μ L de TE. Las fracciones se colectan y se procede a eliminar el RNA y proteínas.

6.4.3.Purificación de ADN

6.4.3.1.Eliminación de ARN de las muestras de ADN

Para eliminar el ARN de las muestras se agregó una solución de ARNasa³ hasta alcanzar una concentración final de 10 μ g/mL y se mezcló. Se incubó a 37 °C durante 90 min. Se volvió a fenolizar, se precipita y seca como en la sección anterior. Ya en este paso se resuspende en dd H₂O.

6.4.4. Eliminación de proteínas de las muestras de ADN

Para la eliminación de proteínas se agrega un volumen de fenol-CIA^{4,5}, se mezcla por 3 min., y se centrifuga a 14000 rpm durante 7 min recuperándose la fase acuosa, ya que es la que contiene el ADN. Este paso se repitió 1 o 2 veces.

³ **Solución de ARNasa:** la ARNasa se disuelve en NaCl 15 mM y Tris-HCl 10Mm pH 7.5 a una concentración final de 10 mg/mL. La solución se coloca en un baño de agua hirviendo durante 15 min y se deja enfriar lentamente. Se guarda a -20 °C.

⁴ **Fenól neutro:** Se prepara mezclando 4 volúmenes de fenol ácido con un volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0. Se deja reposar por 24 hr y posteriormente se retira la fase acuosa y se agrega un volumen de Tris-HCl 1M pH 8.0.

⁵ **Fenol-CIA:** Mezclar volúmenes iguales de fenol neutro y CIA.

La fase acuosa del último tratamiento se mezcló con un volumen de CIA⁶, se agitó durante 3 min y se centrifugó durante 8 min a 14000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y el ADN se precipitó agregando 1/10 volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y se mantuvo a -20°C por al menos 2hr. Posteriormente el ADN se recuperó mediante centrifugación a 14000 rpm a 4 °C durante 15 min, y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 70%, posteriormente se secó y resuspendió en un volumen de TE o ddH₂O.

6.4.5. Aislamiento de ADN total de *S. violaceusniger*

El ADN extraído mediante este método fue usado como molde para la amplificación de fragmentos de ADN de PKS mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

El protocolo consiste en inocular un matraz de 500 mL que contenga 100 mL de medio TSB con 150 µL de un concentrado de esporas de *S. violaceusniger* y se dejó crecer por 2 días a 30° y 200 rpm.

El micelio se colectó por filtración a través de un papel filtro y se lavó de 3 a 4 veces con dH₂O estéril. Posteriormente se colocó en una caja de Petri desechable e inmediatamente se congeló y liofilizó. El micelio seco fue pulverizado en un mortero de porcelana estéril y posteriormente se repartió en tubos Eppendorf de 1.5 mL con 10 o 15 mg en cada uno.

A cada uno de los tubos se agregó 0.5 mL de solución de Hepes⁷ y se agitó suavemente con un vortex por 30s. Posteriormente se agregó 50 µL de SDS al 10% y se mezcló por inversión suavemente. La mezcla se incubó a 65 ° por 15 min.

Después de la incubación se agregó 0.5 mL de solución Tris-EDTA⁸ y se mezcló por inversión. Posteriormente se llevó a cabo la fenolización para eliminar las proteínas presentes.

⁶ **CIA:** se mezcla cloroforma y alcohol isoamílico en proporción 24:1

⁷ **Solución Hepes:** Hepes 10mM, Sacarosa 0.5mM y EDTA 20mM

⁸ **Solución Tris-EDTA:** Tris-HCl 50mM y EDTA 20mM.

El ADN se precipitó agregando un volumen 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN se recuperó por centrifugación y se lavó 2 veces con etanol al 70%. El ADN se seca a 50 °C. Posteriormente se resuspende en 0.5 mL de solución de TE. Finalmente se lleva a cabo una purificación adicional de ADN.

6.4.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se obtiene midiendo la absorbancia a 260 nm, tomando en cuenta que una unidad de absorbancia es igual a 50µg/ml de ADN y el factor de dilución, usando la siguiente formula:

$$\mu\text{g/ml de ADN} = \frac{(\text{abs } 260 \text{ nm})(50\mu\text{g/ml ADN})}{1\text{DO}}$$

6.5. Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)

Este método fue utilizado para amplificar secuencias de ADN de policétido sintetasas de *Streptomyces violaceusniger*.

La tecnica PCR es un procedimiento para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN. La cual se logra mediante un proceso cíclico. Los requerimientos esenciales para llevar a cabo esta técnica son: 1) Un ADN de doble cadena que actúe como molde, 2) dos cebadores que sirven como iniciadores de la síntesis, 3) una ADN polimerasa termoestable, que resista temperaturas mayores a 95 °C, como la polimerasa *Taq* de *Thermus aquaticus* y 4) los cuatro dNTPs, además de un buffer adecuado.

El procedimiento de la PCR es en tres pasos ciclicos: 1) la desnaturalización del ADN molde, para lo cual se somete a calentamiento hasta llegar alrededor de 93-95 °C, durante 5 minutos en el primer ciclo, y posteriormente 1 minuto en cada ciclo, para romper los puentes de hidrógeno que le confieren al ADN su estructura de doble hélice, 2) el segundo paso consiste en la hibridación de los cebadores con sus regiones específicas en el molde, y esta reacción se lleva entre los 40-60 °C. y en el paso 3) ocurre la síntesis del ADN mediante la ADN polimerasa

termoestable, típicamente entre los 70-75 °C. Para obtener ADN en grandes cantidades este procedimiento se repite de 25 a 30 ciclos.

6.5.1. Oligonucleótidos para PCR

Con el objetivo de amplificar secuencias de policétido sintetetasas de *Streptomyces violaceusniger* se emplearon cebadores previamente diseñados.

El par de indicadores K1F/M6R fue diseñado para amplificar de forma específica policétido sintetetasas tipo I, a partir de ADN cromosómico de actinomicetos (Ayuso y Genilloud 2004). Mientras que el par K51/AT1 fue diseñado para la identificación y caracterización de policétido sintetetasas de *Streptomyces caelestis* (Kakavas *et al.* 1997).

Tabla 5. Pares de oligos utilizados para amplificar secuencias de PKS tipo I

Oligonucleótidos	Secuencia	Referencia
K1F M6R	5' TSAAgTCSAACATCggBCA 3' 5' CGCAGGTTSCSGTACCAGTA 3'	Ayuso et al. 2004
K51 AT1	5' CggTSAAgTCSAACATCgg 3' 5' gCRATCTCRCCCTgCgARTg 3'	Kakavas <i>et al.</i> 1997.

6.5.2. Condiciones de reacción y amplificación

Para llevar a cabo la reacción, todos los componentes se homogenizaron mediante agitación a excepción del ADN y la enzima Taq DNA polimerasa. Posterior a la preparación de la mezcla de amplificación, esta se homogenizó y centrifugó a 14000 rpm por 10s.

La mezcla de reacción consistió en los siguientes componente y fuero agregados en el orden que se menciona a continuación:

H ₂ O	30.5µl
Tampón 10x	5µl
MgCl 50 mM	1.5µl
Mezcla de dNTP's	2µl
Cebador 1 (20 µM)	2.5µl
Cebador 2 (20 µM)	2.5µl
ADN	5µl
Taq ADN polimerasa (5U/µl)	1µl

Los reactivos utilizados para llevar a acabo las amplificaciones fueron de la marca Fermentas.

Posteriormente los tubos fueron colocados en un termociclador con las siguientes condiciones:

Desnaturalización	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	1 min (30 ciclos)
Hibridación	55 °C	1 min
Polimerización	72 °C	2 min
Polimerización	72 °C	10 min (después de 30 ciclos)

Las condiciones de amplificación variaron según la T_m de los primers utilizados.

6.5.3. PCR inverso

El PCR inverso es utilizado para amplificar secuencias desconocidas de ADN que flanquean una secuencia de ADN conocida. El desarrollo de esta técnica implica una digestión del ADN genómico con enzimas de restricción que producen fragmentos que llevan la secuencia de ADN conocida, posteriormente los fragmentos generados mediante la restricción son circularizados por ligación. En este caso primero se hizo una selección de enzimas que no cortaran la secuencia conocida y que generaran fragmentos pequeños. En todos los casos se utilizaron 4µg de ADN genómico de *S violaceusniger*, después de que ha transcurrido el

tiempo necesario para que la restricción se lleve a cabo, la enzima es desactivada incubando la reacción a 65⁰C y para la ligación se tomaron 2µg de ADN digerido, 1µl de ligasa, buffer de ligación 10X y el volumen de reacción final varió según el volumen de ADN utilizado. Las reacciones de ligación se dejaron incubando una noche a 4⁰C y posteriormente se llevó a cabo una purificación con el kit de Quiagen.

La reacción de amplificación fue la siguiente:

H ₂ O	34.75µl
DMSO	1.25µl
Tampón 10x	1µl
Mezcla de dNTP's	2µl
Cebador 1 (20 µM)	2.5µl
Cebador 2 (20 µM)	2.5µl
ADN	2.5µl
Taq ADN polimerasa (5U/µl)	0.5µl

El volumen de ADN molde varió según la concentración.

Desnaturalización	94 ⁰ C	5 min
Desnaturalización	94 ⁰ C	1 min (30 ciclos)
Hibridación	60 ⁰ C y 50 ⁰ C	1 min
Polimerización	68 ⁰ C	7 min
Polimerización	72 ⁰ C	10 min (después de 30 ciclos)

La temperatura de alineamiento varió según el par de nucleotidos utilizado. Cuando se amplificó con Ayu PimF1- Ayu PimF1 el alineamiento de "primer" ocurrió a 50⁰C y cuando la amplificación se hizo con Ayu PimF2- Ayu PimF2 fue a una temperatura de 60⁰C.

6.6. Clonación de productos de PCR

Los productos de amplificación fueron purificados y ligados a un vector plasmídico pGEM-T easy (Promega) o pJET 1.2 (Fermentas), ya que estos vectores están diseñados para clonar productos de PCR.

6.6.1. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo mediante el sistema de purificación Qiaex II de la marca Qiagen. Brevemente la técnica consiste en cortar el trozo del gel que contenga el fragmento de ADN de interés y se coloca en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se agregan 3 volúmenes de solución QX1 y 10 µL de QXII, esta solución contiene una resina a la cual se une el ADN. La mezcla se incubó a 50°C durante 10 minutos, verificando que el color de la solución sea amarillo, si presenta un color naranja, se agrega 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2. En este paso se permite que la agarosa se degrade y el ADN se una a la resina, posteriormente se centrifuga a 14 000 rpm durante 30 seg, el precipitado se lava con 500 µL de solución de QX1 y 2 veces con 500µL de solución P, en cada paso la resina con el ADN se recupera por centrifugación (14000 rpm/30seg). Después del último lavado, la resina se deja secar y finalmente el ADN se eluye con 20 µL de dH₂O y centrifugación a 14,000 rpm durante 1 min

6.6.2. Reacción de ligación

Cuando la ligación se llevó a cabo en pGEM-T easy se preparó la siguiente mezcla:

pGEM-T easy	1µl
Producto de PCR	3µl
Solución amortiguadora 2X	5µl
Enzima ADN ligasa T4	1µl

Esta mezcla se mantuvo a 4 °C durante aproximadamente 14 horas y posteriormente, el plásmido recombinante resultado de la ligación fue introducido en bacterias en *E.coli* cepa XL1- Blue mediante choque térmico como se describe en la sección 6.4.14. El medio de cultivo fue complementado con X-Gal e IPTG.

Con el objetivo de identificar las cepas que habían integrado el plásmido recombinante.

Cuando la clonación se llevó a cabo en pJET1.2 la mezcla de reacción fue la siguiente:

Buffer de reacción 2X	10 µl
Producto de PCR	1-2 µl
Enzima DNA blunting	1 µl
H ₂ O	17 µl

La mezcla se centrifuga por 3-5 s, y posteriormente se incubó a 70 °C por 5 min, transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió en hielo. Una vez obtenida la mezcla de reacción ADN con extremos romos se agregó el vector de clonación y la enzima de ligación:

pJET1.2	1 µl
Enzima ADN ligasa T4	1µl

La mezcla de ligación final se homogenizó y se incubó a temperatura ambiente por 5 min o hasta 30 min cuando se requiere mayor eficiencia.

Transcurrido el tiempo necesario de incubación para que la ligación se lleve a cabo, se tomaron 2µl del producto de ligación para transformar células de *E coli*-XL1 Blue mediante electroporación.

En ambos casos las colonias recombinantes fueron rastreadas mediante preparaciones rápidas. Los plásmidos que portaban el inserto de interés fueron purificados y digeridos con diferentes enzimas para identificar el fragmento amplificado y posteriormente fueron secuenciados y analizados con el programa informático en línea Blast.

6.6.3. Plásmidos utilizados para la clonación de productos de PCR.

El plásmido pGEM-T easy de Promega y está diseñado para la clonación de productos de PCR. Este plásmido tiene un tamaño aproximado de 3kb, está linealizado, además de que en sus extremos 3' terminal están agregadas timinas que facilitan la ligación de productos de PCR amplificados por la Taq polimerasa

que pega una adenina al extremo 3'. El diseño de este plásmido también previene la ligación de si mismo.

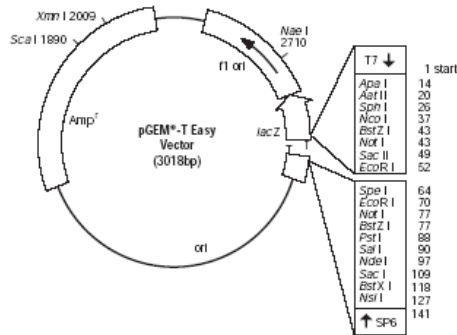


Figura 8. Este plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina, un origen replicación para *E.coli*, un fragmento del gen LacZ y un sitio de clonación múltiple.

Otro de los plásmidos utilizados para la clonación de productos de PCR fue pJET 1.2 de fermentans, el cual también esta diseñado para la clonación de productos de PCR y otros fragmentos de ADN con extremos cohesivos o romos, tiene un tamaño de 2974 kb y esta linealizado. Este plásmido se caracteriza por su sistema de selección ya que contiene un gen letal, el cual es interrumpido por el inserto de ADN ligado en el sitio de clonación, por lo que sólo las células que contengan el plásmido recombinante serán capaces de crecer.

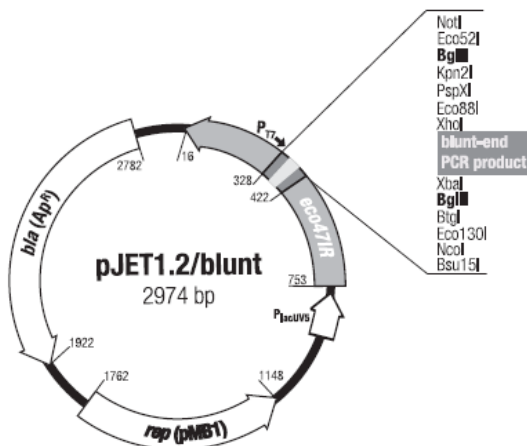


Figura 9. Este vector de clonación tiene un gen de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E coli*, un gen letal y un sitio de clonación múltiple.

6.6.4. Plásmidos utilizados para la transformación de *S violaceusniger*.

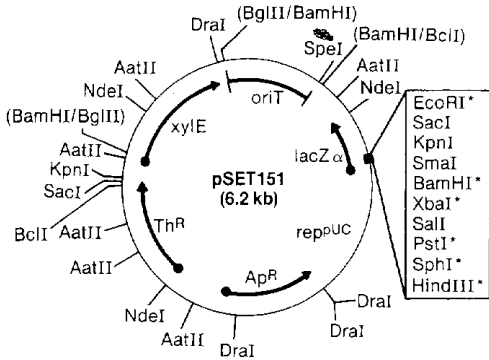
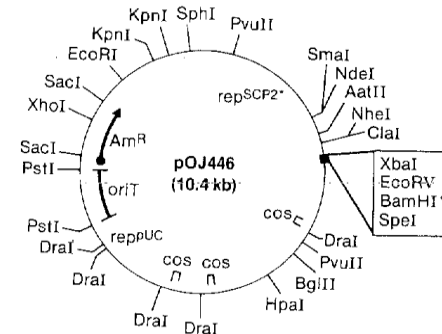


Figura 10. Plásmido utilizado para transformar *S violaceusniger*. pSET151 es un plásmido integrativo y puede conjugarse ya que tiene un origen de transferencia OriT, un origen de replicación para *E coli*, además de que tiene genes de resistencia a ampicilina para seleccionar las transformantes en *E coli* y un gen de resistencia a triostrepton para seleccionar transformantes en *Streptomyces*

Figura 11. Este plásmido es bifuncional, tiene un OriT y un gen de resistencia a apramicina con el cual se puede seleccionar tanto en *E coli* como en *Streptomyces*



6.5. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis

Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa a distintas concentraciones disueltos en TAE 1x dependiendo de los tamaños de ADN que se deseen separar. Para fragmentos pequeños menores a 200 pb se utilizaron concentraciones de 1.5 a 2 % mientras que para fragmentos de alto peso molecular se utilizaron concentraciones de agarosa al 0.3 %. El gel se colocó en una cámara de electroforesis y se cubre con TAE 1x. Las muestras se prepararon para la separación por electroforesis agregando 1/10 de tampón de carga antes de colocar en los pozillos. Como referencia de los pesos moleculares de los fragmentos separados se utilizaron marcadores de peso molecular: el ADN del fago

λ digerido con la enzima *HindIII* (genera fragmentos de tamaño 23,130; 9,416; 6,557; 4,361; 2, 322; 2,027; 564 y 125 pb) y ADN del fago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI* (genera fragmentos de tamaños de 24,756; 5,148; 4,973; 4,268; 2,027; 1,904; 1,709; 1,375; 947; 831 y 564 pb).

Después de la separación por electroforesis, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/mL para poder visualizar el ADN. Los geles se observaron bajo radiación UV mediante un transluminador GelDoc de la marca BioRad e integrado en una imagen digitalizada empleando el programa Quantity One.

6.7. Transformación de *E coli*.

6.7.1. Transformación de *E coli* mediante el método de CaCl_2

Preparación de células competentes de *E coli*

Para la preparación de células competentes bajo el método de CaCl_2 se siguió el protocolo descrito por Degert *et al.* (1979). El cual consiste en crecer un cultivo de *E.coli* en medio LB durante aproximadamente 12 horas, después de este tiempo se tomó 1 mL de cultivo y colocó en un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB y se dejaron crecer hasta alcanzar una D.O. de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Pasado este tiempo las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm por 5 min a 4 °C y se resuspendieron las células en 50 ml de de MgCl_2 0.1 M frío, posteriormente se incubó a 4 °C durante 30 min. y después de este tiempo se centrifugaron las células nuevamente a 5000 rpm bajo las mismas condiciones y resuspendieron en 2 ml de CaCl_2 0.1M frío. Finalmente las células se almacenaron -80°C hasta su uso.

Método de transformación

Para la transformación, se mezcla 100 μ l de células competentes de *E coli* con 1 μ l del plásmido recombinante (pGEM-T easy) resultado de la ligación, se dejan en hielo por 20 min y posteriormente se da el choque térmico por 45s a 42°C.

Después de este tiempo se pasan a hielo 3 min y se agrega 1 ml de caldo nutritivo LB, se incuban de 30-60 min a 37 °C a 200 rpm. Después de este tiempo se siembran en medio LB/IPTG/X-Gal

6.7.2.Transformación de *E coli* mediante electroporación

Preparación de células competentes de *E coli*

Inocular 50 ml de medio SOB contenidos en matraz de 250 ml con una colonia de *E. coli* aislada. Incubar de 12-14 horas a 37°C y 250 rpm.

Una alícuota de 1-5 ml del cultivo previo se utiliza para inocular 100 ml del mismo medio en un matraz de 500 ml. Incubar a las mismas condiciones el nuevo cultivo hasta alcanzar una D.O. de 0.4 a 600 nm. Cuando el cultivo ha alcanzado dicha densidad el cultivo se pasa a 4°C durante 20 o 25 min. A partir de este punto las células se mantienen a 4°C. Posteriormente las células se centrifugan de 5000 a 8000 rpm por 5 min. a 4°C. se retira el sobrenadante y las células se lavan con agua desionizada estéril fría. Centrifugar nuevamente bajo las condiciones ya mencionadas y lavar las células con glicerol al 10% frío. Centrifugar nuevamente y resuspender las células en 800µl de solución de GYT estéril y fría. Repartir en alícuotas de 55 µl y congelar inmediatamente en hielo seco más etanol. Mantener las células a -80°C hasta su uso.

Electroporación

Descongelar las células en un baño de agua-hielo, y mezclar 50µl de células con la solución del ADN. Una vez hecha la mezcla, mantener en hielo durante 3 minutos, y posteriormente se coloca en una cubeta de electroporación de 0.2 cm de separación de electrodo, previamente enfriada. La mezcla se electropora a 12500 volts/cm de separación de electrodo. Inmediatamente agregar un ml de medio SOC. El medio SOC con las células transformadas se incuban en un tubo en 1.5 ml a 37°C y 250 rpm durante un tiempo de 45 min y posteriormente se inocula una alícuota de la transformación en placas de medio SOB con el antibiótico de selección adecuado.

6.8.Extracción de Guanidilfungina A de *S violaceusniger* YCED-9

La extracción de guanidilfungina se efectuó de acuerdo al método descrito por Trejo-Estrada *et al.* (1998).

6.8.1.Fermentación

Para la fermentación se requirió cultivo líquido, el cual se colocó en matraces de 2800 L con 650 ml de medio SB. El inóculo utilizado consiste de una suspensión de esporas, obtenidas de cultivos de 12 días de *S violaceusniger* YCED-9 crecidas en medio 1F agar. El inóculo se adiciona a una concentración de 3×10^7 UFM por cada 100 ml de medio. Los cultivos se mantienen con agitación a 280 rpm a 28 °C durante 8 días.

6.8.2.Extracción de Guanidilfungina

Para la extracción de Guanidilfungina A se utilizaron cultivos de 8 días de crecimiento en medio SB. La purificación se inicia con la filtración del medio a través de papel filtro, el micelio retenido se seca a 50 °C. El filtrado se liofiliza y resuspende en 50 ml de dH₂O, posteriormente se extrae 3 veces con 1.5 volúmenes de n-butanol saturado con agua.

Las tres fracciones de n-butanol se lavan 2 veces con un volumen igual Na₂CO₃ (0.16M) y una vez con agua destilada. La fase orgánica se seca en un rotovaporador y los sólidos de extracción con n-butanol, se resuspenden en 50 ml de metanol absoluto, dando un precipitado amarillo el cual se separa por medio de centrifugación. El sobrenadante se seca en vacío y se resuspende en metanol al 20% toda la noche a 4°C. Después de este tiempo se observa un precipitado blanco, el cual se recupera por centrifugación. Posteriormente este precipitado se lava con agua fría y se solubiliza en un pequeño volumen de metanol-agua 7:3.

6.9. Bioensayos de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por la guanidilfungina de *Streptomyces violaceusniger*

Para los bioensayos se utilizó una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum*, obtenida de cultivos de 8 días de crecimiento en medio PDA e incubadas a 30 °C.

Las esporas se mezclaron con medio previamente temperado a 39°C hasta alcanzar una concentración de 10⁶ UFC y se vertieron 25 ml sobre la placa. Posteriormente con un horadador se realizaron incisiones en el agar, a una distancia de aproximadamente 5 cm uno de otro. A los positos formados con el horadador se agregaron 100 µl del producto de la extracción final. Una vez agregado el extracto final, la placa de bioensayo se mantiene a 4 °C durante 30 min, para permitir que los compuestos se difundan a través del medio. Después de este tiempo las placas se incuban durante 12 horas a 30 °C, transcurrido este tiempo se evalúan los halos de inhibición.

6.10. Transformación de *S. violaceusniger* YCED-9

6.10.1. Transformación de *S. violaceusniger* por conjugación

El uso de la conjugación de plásmidos móviles de *E. coli* a *Streptomyces* se ha incrementado aunque este método no es muy eficiente se ha utilizado ampliamente para el remplazamiento de genes, y complementación genética. Los plásmidos utilizados en esta técnica deben de tener un origen de transferencia de *E. coli* a *Streptomyces*, y los genes *tra* también son muy importantes.

El protocolo que se siguió en este trabajo es el descrito por Flett y colaboradores. Este método utilizan como cepa donadora *E. coli* ET12567/pUZ8002, esta cepa es ampliamente utilizada debido a que no puede metilar el ADN, un aspecto muy importante cuando se trata de microorganismos del género *Streptomyces*, ya que suelen tener un sistema de restricción muy fuerte, el plásmido pUZ8002 permite la movilización del ADN plásmidico que contenga un OriT, sin ser transferido durante el proceso como cepa receptora *S. violacesuniger*

y *S. coelicolor* como control ya que es una cepa con una alta eficiencia de transformación.

Como primer paso se requirió transformar mediante métodos ya descritos la cepa ET12567/pUZ8002 de *E coli* con los plásmidos a conjugar, en este caso fueron pOJ446 y pSET151. Posteriormente fue inoculada una colonia en un matraz de 250 mL con 50 mL de LB+km/Clp/apra y fue incubado a 37°C/250rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. Cuando el cultivo alcanza la densidad deseada fue centrifugado a 4000 rpm/ 5min. La biomasa se lavo 3 veces con LB y finalmente fue resuspendida en un volumen 1/10 del volumen original de LB.

Por otro lado fue necesario tener un “Stock” de esporas de *Streptomyces violaceusniger* y del control a una concentración de 10^8 y cada uno fue mezclado con 500µL de 2xYT⁹ e incubados a 50°C durante 10 min. Y se dejó enfriar. Posteriormente fueron mezclados 500µL de células de *E coli* con las esporas de *Streptomyces* previamente tratadas como se indicó anteriormente, la mezcla se agito suavemente por 60 s, después de este tiempo se centrifuga a 14000 rpm por 1-2 min. Se removieron 800µL de sobrenadante y las células se resuspendieron en el volumen restante, se inocularon 50µL de las células en cada placa de medio SFM y se incubaron a 30°C durante 14-16h. Posteriormente se agregó 1mL de agua conteniendo ácido nalidíxico (0.5mg/mL), más la cantidad adecuada del antibiótico de selección del plásmido en *Streptomyces*. Se deja que las placas se sequen, y posteriormente se continúa con la incubación a 30°C durante 4 o 5 días más.

6.10.2.Transformación de *S violaceusniger* por electroporación

Preparación de micelio

Para la transformación de *S. violaceusniger* por electroporación se utilizó un cultivo de 42 hrs de crecimiento. Después de este tiempo el cultivo se centrifuga a 5000 rpm/10min. La biomasa se lava 3 veces con agua desionizada estéril, y una

⁹ 2xYT: Bacto triptona 16, Extracto de levadura 10 y NaCl 5 (g/L)

vez con glicerol al 10%, posteriormente la biomasa se resuspendió en solución de GYT (Glicerol al 10%, bacto triptona 0.125% y extracto de levadura 0.125%) y se repartió en alícuotas de 60µL y se guardaron a – 80°C hasta su uso.

Electroporación

Para este procedimiento se tomaron las alícuotas necesarias del micelio previamente preparado y se descongelaron en hielo, se mezclaron con el ADN que se deseaba transformar, esta mezcla se incubó en hielo por 1min, y posteriormente se colocó en la cubeta de electroporación de 0.2 cm de separación de electrodo. La mezcla se electroporó a 1500, y 2000 volts. Después de electroporar se agrega 1 mL de medio R2L y posteriormente se agregaron 2 mL de R2L agarosa, esta mezcla se colocó en placas de medio S27M previamente preparadas y secadas por 2 hrs en campana. Las cajas se incubaron a 30° C y después de 14 Hrs se les agregó el antibiótico adecuado, posteriormente se prolongó la incubación por 8 días más.

6.10.3.Transformación de *S violaceusniger* YCED-9 mediante biobalística

Este proceso de transformación tiene como principio la utilización de micropartículas cubiertas con ADN que son liberadas a velocidades altas dentro de células y tejidos intactos.

Para llevar a cabo la transformación se utilizaron placas inoculadas con 6.5×10^6 UFC, a diferentes tiempos de crecimiento: 35, 37, 39, y 41 hrs., incubadas a 30°C. La transformación se llevó a cabo con 2 concentraciones de ADN 0.9 y 1.125 µg/µL, y fueron probadas todas las distancias disponibles en el equipo: 3, 6, 9, 12 cm, la presión fue constante 1100psi.

Preparación de los microproyectiles

Para 120 bombardeos fue necesario pesar 30 mg de micropartículas de tungsteno, las cuales fueron lavadas con 1mL de etanol al 70% mediante agitación vigorosa con vortex durante 5 min, posteriormente fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 min. A continuación se hicieron 4 lavados con agua destilada estéril, cada uno de ellos fue acompañado con agitación vigorosa durante 1 min e

incubados a temperatura ambiente por 1 min más. La recuperación de los microproyectiles en cada lavado fue mediante centrifugación (14000 rpm/5 seg), y el sobrenadante fue eliminado en cada uno de ellos. Finalmente las partículas fueron resuspendidas en 500µL de glicerol estéril al 50%. Las micropartículas pueden almacenarse a -20°C hasta por 2 semanas, sin embargo, el almacenamiento prolongado puede provocar oxidación de la superficie.

Revestimientos de micropartículas con ADN

Los microproyectiles previamente preparados se agitaron vigorosamente durante 5 min, para destruir los aglomerados. Se tomaron 50 µL y se mezclaron con 5 µL de ADN, 50 µL de CaCl₂ 2.5M y 20 µL de espermidina 0.1M, la agitación durante la mezcla fue importante, la cual fue prolonga por 3 min más. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente por 1 min. Las micropartículas se recuperaron mediante 1 “spin” de 2 seg, el sobrenadante fue descartado y se continuo con un lavado de etanol al 70% y otro con etanol absoluto (eliminado por decantación). Finalmente resuspender con los dedos y luego con vortex de 2 a 3 seg en 48 µL de etanol absoluto. Después del revestimiento las micropartículas se encontraran estables hasta por 12 hrs.

Bombardeo

Las membranas de ruptura fueron esterilizadas sumergiéndolas en isopropanol al 70% y las membranas de transporte con etanol a la misma concentración, posteriormente se secaron en una cámara de CaCl₂. Se colocaron 6µL de micropartículas previamente revestidas en las membranas de transporte, y se procedió a dar el disparo.

Se consideraron todas las distancias disponibles en el equipo (3,6,9,12 cm), mientras que la presión fue constante (1100 psi).

Después de que las cajas inoculadas fueron bombardeadas se incubaron hasta 16 hrs/30°C después de este tiempo se agregó el antibiótico, la incubación continuó por 15 días más.

7.Resultados y discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo son parte de una línea de investigación encaminada a la identificación del grupo de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina de *S violaceusniger* YCED-9. Existen muchas alternativas que podrían haberse elegido para lograr los objetivos planteados en esta investigación, sin embargo, los conocimientos sobre el microorganismo bajo estudio son nulos. Los últimos experimentos fueron los realizados por Trejo-Estrada y colaboradores en 1998. Ellos encontraron que produce compuestos con actividad antifúngica y enzimas hidrolíticas.

Pero si damos una revisión a las diferentes vías seguidas para lograr la identificación de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Streptomyces*, encontramos que se cual fuera la vía elegida, el primer paso a dar es, contar con un sistema de transformación reproducible.

Es por ello que se procedió a buscar un sistema de transformación estable que pudiera ser aplicado a *S violaceusniger* cepa YCED9.

7.1. Transformación de *S violaceusniger* YCED-9

La transformación de *S violaceusniger* YCED-9 se llevó a cabo bajo diferentes métodos, los cuales han sido previamente reportados como viables para diferentes especies de *Streptomyces*.

Como primeras alternativas se eligieron la electroporación y conjugación ya que estos dos métodos, son fáciles de aplicar y los resultados obtenidos se han reportado como reproducibles.

La tercera vía fue mediante biobalística, la cual no se ha reportado para el género *Streptomyces*, pero si se ha usado para organismos difíciles de transformar.

Los plásmidos utilizados para tal objetivo fueron: pOJ446 y pSET151. Descritos en material y métodos.

7.1.1. Transformación de *S violaceusniger* YCED-9 mediante conjugación.

La transformación se llevó a cabo como se describe en la sección 6.11 de material y métodos, sin embargo, mediante este método no se observó transformante alguna. Se descartaron fallas en el procedimiento ya que se observó crecimiento en los controles de viabilidad del microorganismo bajo estudio y para este experimento se utilizó un control adicional, se trata de *S coelicolor* modelo de estudio del género, del cual existen numerosos reporte de su exitosa transformación por conjugación (Flett *et al.*1997).

En la tabla 4 se observan los resultados de la transformación para *S coelicolor*, con pOJ446 y como se mencionó anteriormente este microorganismo fue utilizado como control, ya que puede ser transformado sin ningún problema mediante conjugación, y como se muestra los resultados fueron satisfactorios con los 2 plásmidos.

La eficiencia de transformación no pudo determinarse ya que el crecimiento fue en forma de césped.

Para comprobar que las colonias que crecieron en presencia del antibiótico de selección efectivamente habían incorporado el plásmido de interés a su sistema celular, se llevó a cabo la purificación de los plásmidos a partir de las colonias

transformantes, pero cuando se hizo la separación en un gel de agarosa no se observó ningún fragmento de ADN.

Considerando que el plásmido utilizado es de bajo número de copias, era posible que la concentración fuera insuficiente para poder ser observada en la electroforesis. Es por eso que se decidió concentrar la alícuota de 30 μ ADN a 4 μ y posteriormente fueron utilizados para transformar células competentes de *E. coli* XL1-Blue.

Se tomó una colonia transformante para la purificación de ADN, el cual fue digerido con diferentes enzimas de restricción. De tal forma se pudo comprobar que efectivamente se llevó a cabo la transferencia de plásmidos de *E. coli* ET12567/pUZ8002 a *S.coelicolor*.

La transformación de *S coelicolor* con pSET151, sólo puede comprobarse mediante hibridación con el plásmido o mediante amplificación del gen de resistencia a Thr, por PCR ya que es un plásmido de integración.

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Conjugación	conjugación	conjugación	Sin conjugar	Sin conjugar
Con pOJ446	Con pSET151	Sin/ plásmido	Sin/ plásmido	Sin/ plásmido
Apra [4 μ g/ μ L]	Thr [30 μ g/ μ L]	Sin antibiótico	Apra [4 μ g/ μ L] o Thr [30 μ g/ μ L]	Sin antibiótico
++++	++++	++++	----	++++

Tabla 4. Resultados de la transformación de *S coelicolor*

Cuando la transformación se llevó a cabo en *S violaceusniger* YCED-9 no se observaron resultados satisfactorios con ninguno de los dos plásmidos.

Esta ampliamente documentado que la conjugación es un método que puede resultar satisfactorio para transformar diferentes cepas de *Streptomyces*, sin embargo, la transferencia de plásmidos conjugativos entre diferentes especies puede ocurrir a baja frecuencia y algunas veces el ADN en la especie receptora puede sufrir modificaciones. (Kieser *et al.* 2002).

Los resultados sugieren que ni la transferencia de ADN no metilado, ni las temperaturas a las que fueron sometidas las esporas (un intervalo de 50 a 65 °C) no evade el sistema de restricción específico que opera en *S violaceusnige* YCED-

9. Ya que bajo todas las temperaturas experimentales los controles de viabilidad crecieron sin sufrir cambio alguno

Otra posibilidad, es que la estabilidad del origen de replicación del plásmido no es el más adecuado. Ya que se ha reportado que el origen de replicación juega un papel muy importante (Enríquez *et al.* 2006). Estos son factores que pudieron haber intervenido para que la transformación no se llevara a cabo.

Tabla 6. Resultados de la transformación de *S violaceusniger* YCED-9

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Conjugación	conjugación	conjugación	Sin conjugar	Sin conjugar
Con pOJ446	Con pSET151	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido
Apra [4µg/µL]	Thr [30µg/µL]	Sin antibiótico	Apra [4µg/µL] o Thr [30µg/µL]	Sin antibiótico
----	----	++++	----	++++

7.1.2. Transformación de *S violaceusniger* YCED-9 mediante electroporación.

Debido a los resultados no satisfactorios obtenidos por conjugación se decidió explorar protocolos alternativos.

La electroporación es un método eficiente y requiere de poco tiempo para su preparación. Representa una alternativa, ya que se ha utilizado para cepas previamente consideradas como no transformables (Pigac y Schrempf, 1995). Y ha sido aplicado a un amplio número de cepas de *Streptomyces*.

En este trabajo el proceso se llevó a cabo variando parámetros clave como son el voltaje aplicado, utilizando esporas frescas, esporas frescas germinadas, micelio, y el tiempo de aplicación de antibiótico, sin embargo, bajo ninguna variación fue posible obtener transformantes. Los resultados pueden ser observados en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la transformación mediante electroporación

Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3	Tratamiento 4	Tratamiento 5
Electroporadas	Electroporadas	Electroporadas	No electroporadas	No electroporadas
pOJ446 o pSET151	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido	Sin plásmido
Apra [4µg/µL] o Thr [30µg/µL]	Apra [4µg/µL] o Thr [30µg/µL]	Sin antibiótico	Apra [4µg/µL] o Thr [30µg/µL]	Sin antibiótico
---	---	++++	---	++++

En cada método de transformación se tuvieron controles para poder descartar posibles fallas del procedimiento. Y en la tabla de resultados podemos observar que los controles de viabilidad pueden crecer de forma normal sobre el medio de cultivo aun después de ser aplicada la descarga eléctrica.

A pesar de que se esperaba obtener transformantes por cualquiera de estos dos métodos, no es del todo injustificado no haber obtenido resultados satisfactorios por estas técnicas, sí tomamos en cuenta que varias especies de *Streptomyces* poseen un sistema de restricción específico de metilación. (Kawachi *et al.* 1997). Que el plásmido de replicación autónoma es de bajo número de copias y el origen de replicación no es el más adecuado.

Por otro lado hay que tomar en cuenta que algunas cepas de la misma especie también han sido difíciles de transformar como por ejemplo *S hygroscopicus*. La cual sólo logro ser transformada cuando se utilizaron fagos temperados (Lomovskaya *et al.* 1997) o *S hygroscopicus* Subs. *Yingchengensis* la cual sólo pudo transformarse cuando se tuvieron mutantes deficientes en restricción, sensibles a fagos, y libres de un plásmido endógeno denominado pHZ5 el cual resultó ser incompatible con los plásmidos utilizados para la transformación. Aunque cuando se trato de derivados de SCP2* los resultados de transformación continuaron siendo negativos, y obtuvieron una muy baja frecuencia de transformación cuando se trató de plásmidos bifuncionales aislado de la cepa silvestre y de *E coli* ET12567 (Qin *et al.* 1994).

7.1.3. Transformación de *S violaceusniger* YCED-9 mediante biobalística

La biobalística es un método de transformación aplicado a organismos difíciles de transformar principalmente plantas y en menor proporción a hongos y bacterias.

En base a los resultados insatisfactorios obtenidos por los métodos de conjugación y electroporación, y tomando en cuenta los antecedentes descritos se decidió transformar mediante biobalística. Para lo cual se llevaron a cabo diferentes experimentos donde se variaron los tiempos de crecimiento ya que este es un factor muy importante, dado que se ha reportado que para algunos microorganismo la eficiencia de transformación depende de este parámetro como por ejemplo para *B megaterium* se obtiene una mayor eficiencia de transformación cuando el cultivo se encuentra en la fase logarítmica temprana, mientras que para *E. coli* no hay ninguna diferencia en ninguna de las fases de crecimiento y para *Saccharomyces cerevisiae* las células en fase estacionaria son más eficientes (Sanford 1988, Sanford *et al* 1993).

También se variaron las distancias del disparo y la concentración de ADN. Estos dos parámetros resultaron ser importantes ya que como podemos ver en la tabla de resultados, para pOJ446 la distancia del disparo más adecuada fue de 9cm, debido a que es a esta distancia a la que se observaron mayor número de transformantes. Aunque también se observó transformación a la distancia de 6 cm el número de colonias fue menor

Con respecto a la concentración de ADN podemos observar que cuando se incremento la concentración, también se incremento el número de tranformantes como se observa en las tablas 8 y 9.

Aunque el número de transformantes para pOJ446 fue casi nulo, se puede explicar, ya que es un plásmido de replicación autónoma, que contiene el sitio de replicación del plásmido SCP2* de bajo número de copias.

Por otra parte podemos observar que de los tiempos de crecimiento probados para la transformación con el plásmido pOJ446 el más adecuado fue a las 37 hrs, debido a que es donde se observaron mayor número de transformantes,

aunque también se observaron transformantes cuando se utilizó una concentración de 1.125 µg/ µL, a las 39.

De los diferentes métodos probados para transformar *S. violaceusniger* YCED-9, fue sólo mediante biobalística donde se logró observar transformantes. Las transformantes sólo fueron comprobadas mediante selección con antibiótico.

Como ya se mencionó anteriormente el origen de replicación para el plásmido pOJ446 es de bajo número de copias, y por lo tanto, es un poco difícil de obtener suficiente ADN plasmídico.

Por otro lado se ha reportado que los vectores con bajo número de copias, como los derivados de SCP son más difíciles de aislar, que los multicopia o los fagos. Es por eso que para el análisis de ADN plasmídico de las clonas, se ha recomendado que en lugar de utilizar ADN plasmídico es más eficiente usar ADN total y mediante Southern blots identificar las clonas transformantes, otra alternativa es la amplificación del plásmido mediante PCR. Sin embargo, a pesar de que nuestras transformantes no pudieron comprobarse por ninguno de estos dos métodos, cabe mencionar que *S. violaceusniger* YCED-9 es una cepa altamente sensible al gen de resistencia presente en pOJ446.

Mediante bioensayos de inhibición de crecimiento de *S. violaceusniger* YCED-9 se comprobó que la concentración mínima inhibitoria es de 3 µg/ µL de apramicina. A esta concentración no se observa crecimiento alguno. En base a estos bioensayos se decidió tomar una concentración de 4µg/ µL para seleccionar las clonas transformantes.

Podemos pensar que el plásmido de replicación autónoma seleccionado para la transformación no fue el más adecuado ya que cuando el experimento de transformación se hizo con un plásmido de integración se observaron resultados totalmente diferentes.

Cuando la transformación se hizo con el plásmido de integración nos fue imposible contar el número de transformantes ya que el crecimiento se presentó en forma de césped en la parte central de la caja Petri. Sin embargo, en este caso tampoco fue posible comprobar por medio de PCR. Es importante mencionar que

se diseñaron primer para amplificar los genes de resistencia a triostrepton y apramicina con el objetivo de comprobar de una manera más precisa la transformación, sin embargo, no fue posible tener los primers a tiempo.

Tabla 8. Muestra los resultados obtenidos en el primer experimento de transformación con el plásmido de replicación autónoma

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pOJ446]1 0.9 µg/ µL	[pOJ446]2 1.125 µg/ µL
41hrs	3	--	--
	6	--	--
	9	--	--
	12	--	--

Tabla 9. Muestra los resultados obtenidos para el experimento 2 con el plásmido de replicación autónoma

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pOJ446]1 0.9 µg/ µL	[pOJ446]2 1.125 µg/ µL
39hrs	3	--	--
	6	--	5
	9	--	2
	12	--	--

Tabla 10. Resultados obtenidos para el experimento 3 con el plásmido de replicación autónoma

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pOJ446]1 0.9 µg/ µL	[pOJ446]2 1.125 µg/ µL
37hrs	3	--	--
	6	--	--
	9	2	16
	12	--	2

Tabla 11. Muestra los resultados obtenidos para el experimento 4 con el plásmido de replicación autónoma

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pOJ446]1 0.9 µg/ µL	[pOJ446]2 1.125 µg/ µL
35hrs	3	--	--
	6	--	--
	9	--	--
	12	--	--

Tabla 12. Resultados obtenidos de la transformación con el plásmido integrativo

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pSET151] 0.9 µg/ µL
35hrs	6	++++
	9	++++

Tabla 13. Resultados obtenidos de la transformación con el plásmido integrativo

Tiempo de crecimiento	Distancia (cm)	[pSET151] 0.9 µg/ µL
37hrs	6	++++
	9	++++

7.2. Amplificación de productos de PCR

Considerando las diferentes estrategias seguidas para la identificación de grupos de genes que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios del género *Streptomyces* y tomando en cuenta que todos los "cluster" de genes identificados se encuentran agrupados en un sólo sitio dentro del cromosoma se decidió buscar secuencias de ADN que formaran parte de genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina. Esta secuencia de ADN y el método de transformación abrirían una gama de posibles de métodos a utilizar en posteriores experimentos.

En base a la comparación estructural de la guanidilfungina con otros metabolitos secundarios que presentan la misma actividad antifúngica y que son sintetizados por enzimas policétido sintetizas tipo I, se propuso que la guanidilfungina presenta dentro de su cluster de genes, genes que codifican para policétido sintetasas por lo que se decidió amplificar secuencias de policétido sintetasas de *S. violaceusniger*, empleando "cluster" previamente reportados los cuales fueron utilizados para la amplificación por PCR de estas enzimas. Al realizar la amplificación por PCR se obtuvo una secuencia de 1200 pb, de un tamaño muy semejante al amplificado por Ayuso y colaboradores (figura 12), quienes obtuvieron fragmentos entre 1200 y 1400 pb de policétido sintetasas tipo I

Contar con un fragmento aislado de policétido sintetasa de guanidilfungina, es muy importante ya que es un elemento clave para rastrear los genes que participan en la biosíntesis del metabolito secundario bajo estudio, ya que se puede emplear como sonda para analizar una genoteca de *S. violaceusniger*, sería fácil identificar el resto de los genes ya que como se ha mencionado una característica del genoma de *Streptomyces* es que presenta los genes que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios agrupados en un solo sitio dentro del genoma .

Otra ventaja de contar con un fragmento de ADN de una policétido sintetasa de *S. violaceusniger*, es que nos da la oportunidad de emplear otras estrategias para la identificación de los genes de guanidilfungina ya que se podría utilizar como sonda para llevar a cabo una disrupción en la agrupación génica productora de este metabolito mediante recombinación homologa y ver si ejerce algún efecto sobre la biosíntesis de guanidilfungina. También nos permite llevar a cabo una técnica denominada caminado sobre el cromosoma, la cual nos da la posibilidad de identificar secuencias desconocidas a partir de una secuencia previamente identificada.

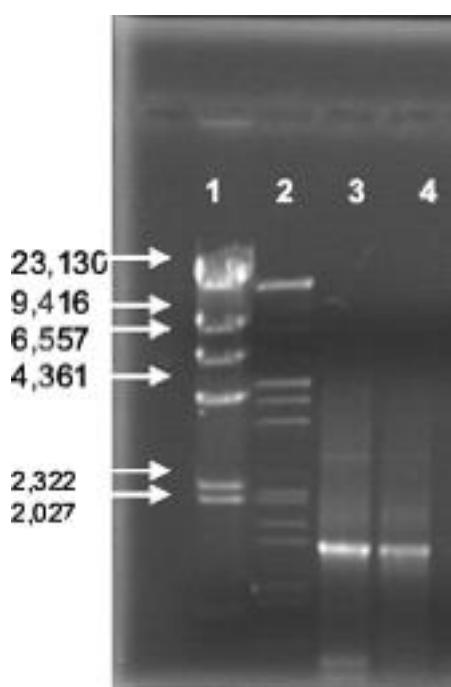


Figura 12. Gel de agarosa donde se muestra en el carril 1 y 2 los marcadores de peso molecular de λ Hind III y λ Hind/ III EcoR I respectivamente y en el carril 3 y 4 la amplificación de policétido sintetasa de *S. violaceusniger*

Posteriormente la secuencia amplificada fue ligada al vector pGEM-T Easy, y se transformó en *E.coli*, se hizo una “miniprep” para su purificación y posteriormente se seleccionaron 5 plásmidos, los cuales fueron analizados mediante enzimas de restricción para verificar que el fragmento amplificado efectivamente se había insertado en el plásmido recuperado (figura 13). Del análisis de restricción fueron seleccionadas tres clonas, las cuales se mandaron a secuenciar. En la figura 14 se pueden observar los plásmidos denominados pAYU5, pAYU10, y pAYU11. Plásmidos que fueron secuenciados.

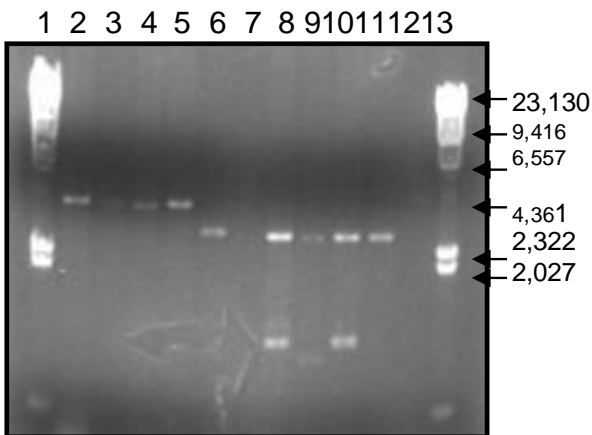


Figura 13. En esta electroforesis podemos observar la digestión con Sal I y EcoR I de los plásmidos aislados de las células de *E. coli* transformantes. En los carriles 2 al 4 se encuentra el plásmido transformante linealizado con Sal I, en el carril 5 el plásmido sin inserto, del carril 7 al 10 se encuentran los plásmidos que liberan el fragmento amplificado de 1200 pb esperado y en los carriles 1 y 13 marcadores de peso molecular λ Hind III.

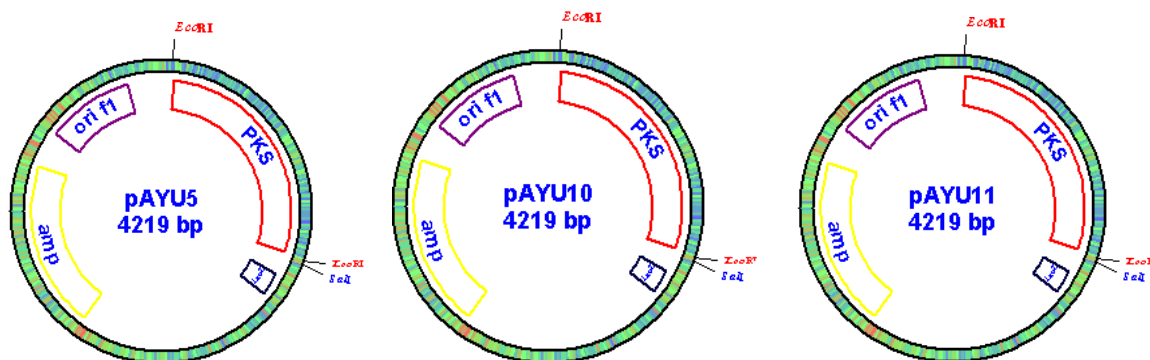


Figura 14. Se muestra los plásmidos pAYU secuenciados. En rojo se identifica la secuencia del fragmento amplificado mediante PCR de la PKS.

7.3. Análisis de secuencias amplificadas por PCR

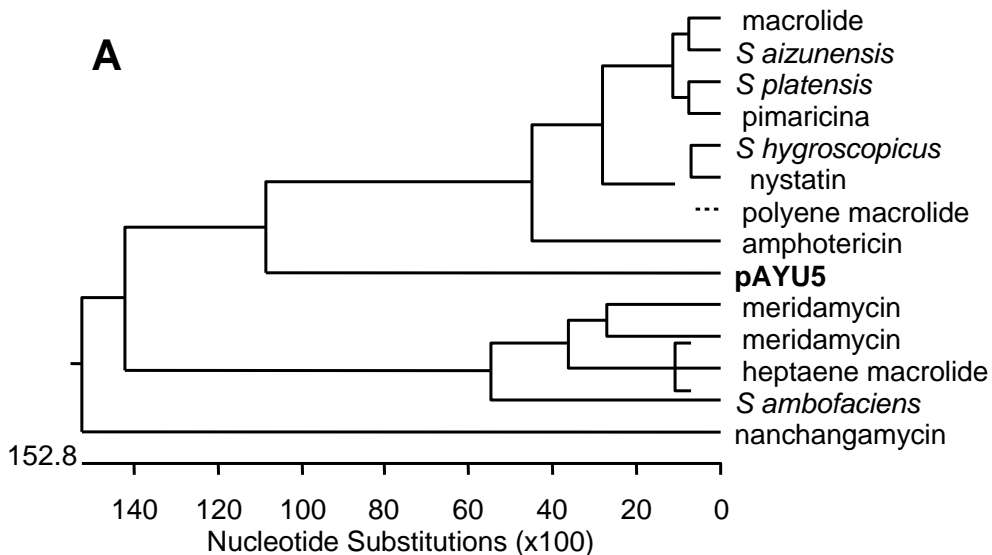
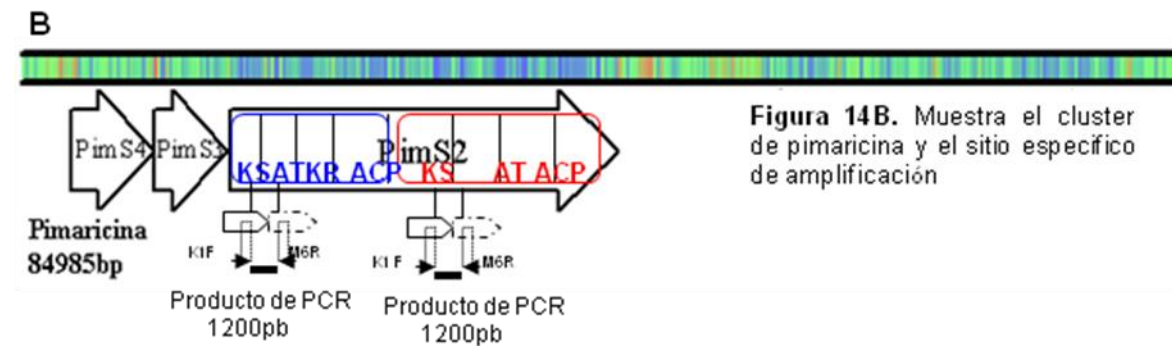
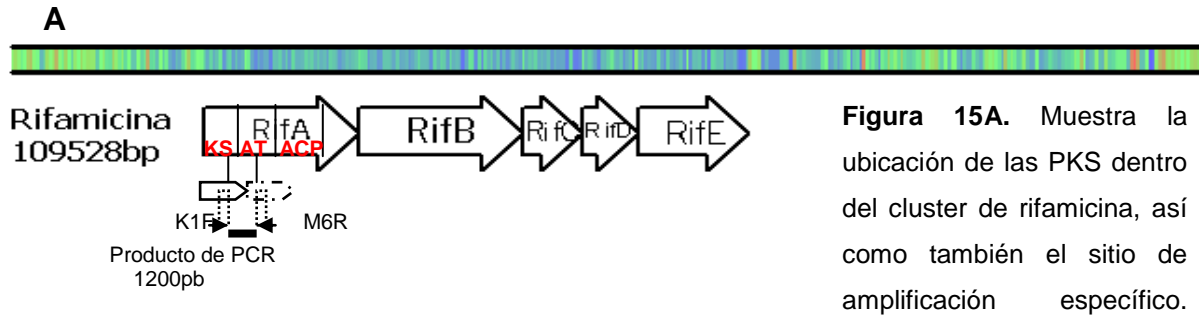
Cuando ya tuvimos la secuencia de nucleótidos de cada uno de los amplificadas se procedió a hacer el análisis de homologías usando el programa informático en línea Blast, el cual mostró tres secuencias diferentes. La secuencia contenida en pAYU11 presentó un 80% de identidad a diferentes compuestos del grupo de las ansamicinas, y con alta semejanza a la PKS del cluster de biosíntesis de geldanamicina, una ansamicina sintetizada por *S. violaceusniger*. El análisis también mostró un porcentaje de identidad a la proteína pimS0 de pimaricina. En el esquema de la figura 15A se puede observar el sitio de amplificación en la secuencia de rifamicina y en en la figura 16 C se encuentra el árbol filogenético donde se observa la relación de homología que guarda la secuencia pAYU11 con los diferentes compuestos del tipo ansamicina.

El fragmento clonado en el plásmido pAYU5 mostró mayor porcentaje de similitud a PKS de nistatina, anfotericina, y pimaricina (78%,76% y 82% respectivamente), por lo que suponemos que corresponde a un fragmento de la PKS que participa en la biosíntesis de guanidilfungina. Además de que presento un porcentaje de identidad a *pimS1*. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que estos 3 compuestos presentan características estructurales y funcionales semejantes a las de la guanidilfungina.

Mientras que la secuencia clonada en pAYU10 presentó un 72%, 78% y 70% de identidad a nistatina, anfotericina y pimaricina respectivamente, por lo que se puede concluir que las secuencias AYU10 y AYU5 son amplificadas de una misma PKS que participa en la biosíntesis de guanidilfungina, ya que las dos secuencias presentan un porcentaje de similitud con la PKS denominada *pimS2* de pimaricina pero corresponden a diferentes dominios de la enzima. Al igual que pAYU5 presenta un porcentaje de similitud a PimS1. En el esquema de la figura 15B se puede observar el sitio de amplificación en la secuencia de pimaricina.

También se hicieron árboles filogenéticos para ver la relación que guardan pAYU5 y pAYU10 con compuestos del tipo macrólido polienos como ya se

mencionó anteriormente. Podemos observar una similitud lo suficientemente alta que nos hace pensar que las dos secuencia corresponde a una PKS de guanidilfungina.



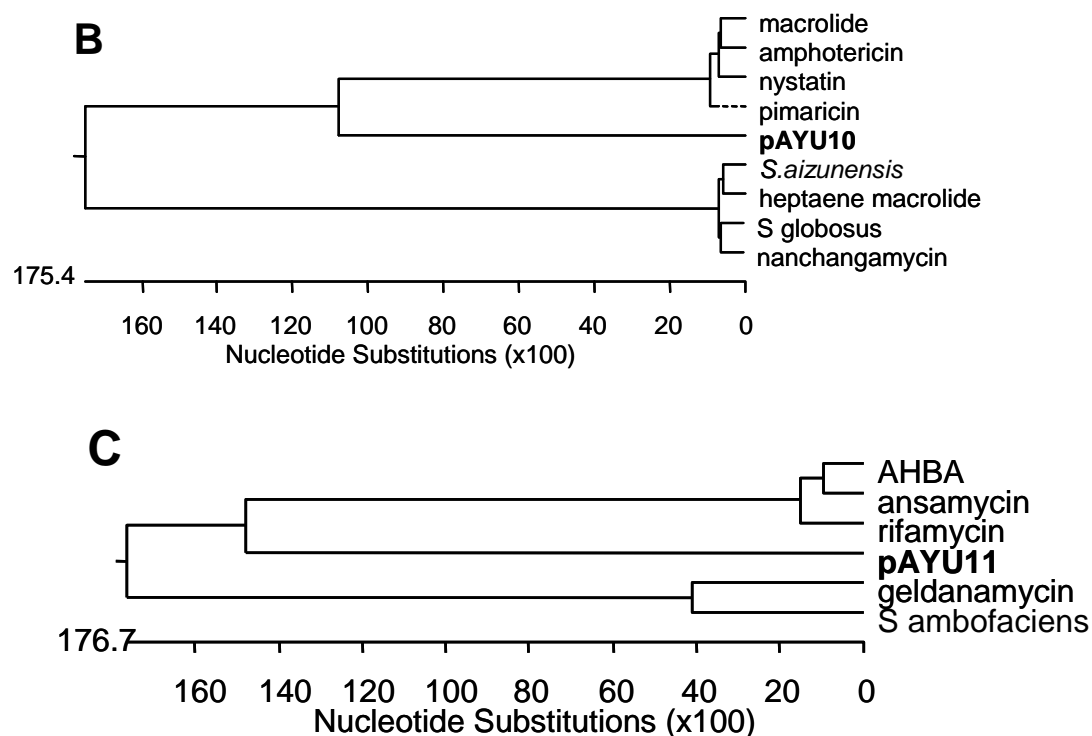


Figura 16. Muestra árboles filogenéticos de las secuencias amplificadas. En **A** y en **B** se muestra la relación de homología de la secuencia pAYU5 y pAYU10 respectivamente con diferentes macrólidos. Mientras que en **C** se observa la relación de homología de diferentes compuestos ansamicina con la secuencia pAYU11 obtenida de *S. violaceusniger*

7.4. Amplificación de proteínas transportadoras de *S. violaceusniger*

Muchos metabolitos secundarios son tóxicos al microorganismo que los produce. Las bacterias del género *Streptomyces* son los principales productores de metabolitos secundarios y no cuentan con un sistema de membranas interno que le permitan almacenar los metabolitos secundarios producidos, para que posteriormente salgan de la célula. Por lo que han desarrollado varios mecanismos para protegerse de las acciones tóxicas de los antibióticos sintetizados endógenamente.

La presencia de proteínas codificadas en el genoma que confieren resistencia al metabolito, y otras que se encargan de exportarlo, es uno de los mecanismos implementados. Aunque en la mayoría de los casos las dos funciones se

encuentran asociadas a una proteína transportadora que se encarga de conferir resistencia mediante la exportación activa del metabolito.

En los diferentes cluster de genes de biosíntesis se han encontrado genes que codifican para proteínas de resistencia/ exportación. Por lo que existe una alta posibilidad de que la localización de uno de estos genes facilite la identificación de otros genes involucrados en la biosíntesis del metabolito de interés.

Tomando en cuenta lo siguiente: 1) La guanidilfungina es un metabolito con actividad antifúngica. 2) Presenta una estructura parecida a la de polienos anfotericina, nistatina y pimaricina. 3) Los cluster de genes que participan en la biosíntesis de estos metabolitos secundarios ya se han secuenciado. 4) El análisis de estas secuencias ha mostrado la presencia de genes que codifican para proteínas transportadoras del tipo ABC y entre ellas presentan una alta similitud. Se decidió diseñar “primers” a partir de secuencias conservadas a nivel de secuencias de nucleótidos y de secuencia de aminoácidos de proteínas transportadoras tipo ABC de este grupo de polienos.

En la figura 10 se muestra el alineamiento de fragmentos de la secuencia de nucleótidos de las proteínas transportadoras denominadas AmphG, NysG, PimB y AmphH, NysH, PimA donde se identifican las secuencias seleccionadas como iniciadores para amplificar mediante PCR proteínas transportadoras en *S violaceusniger*.

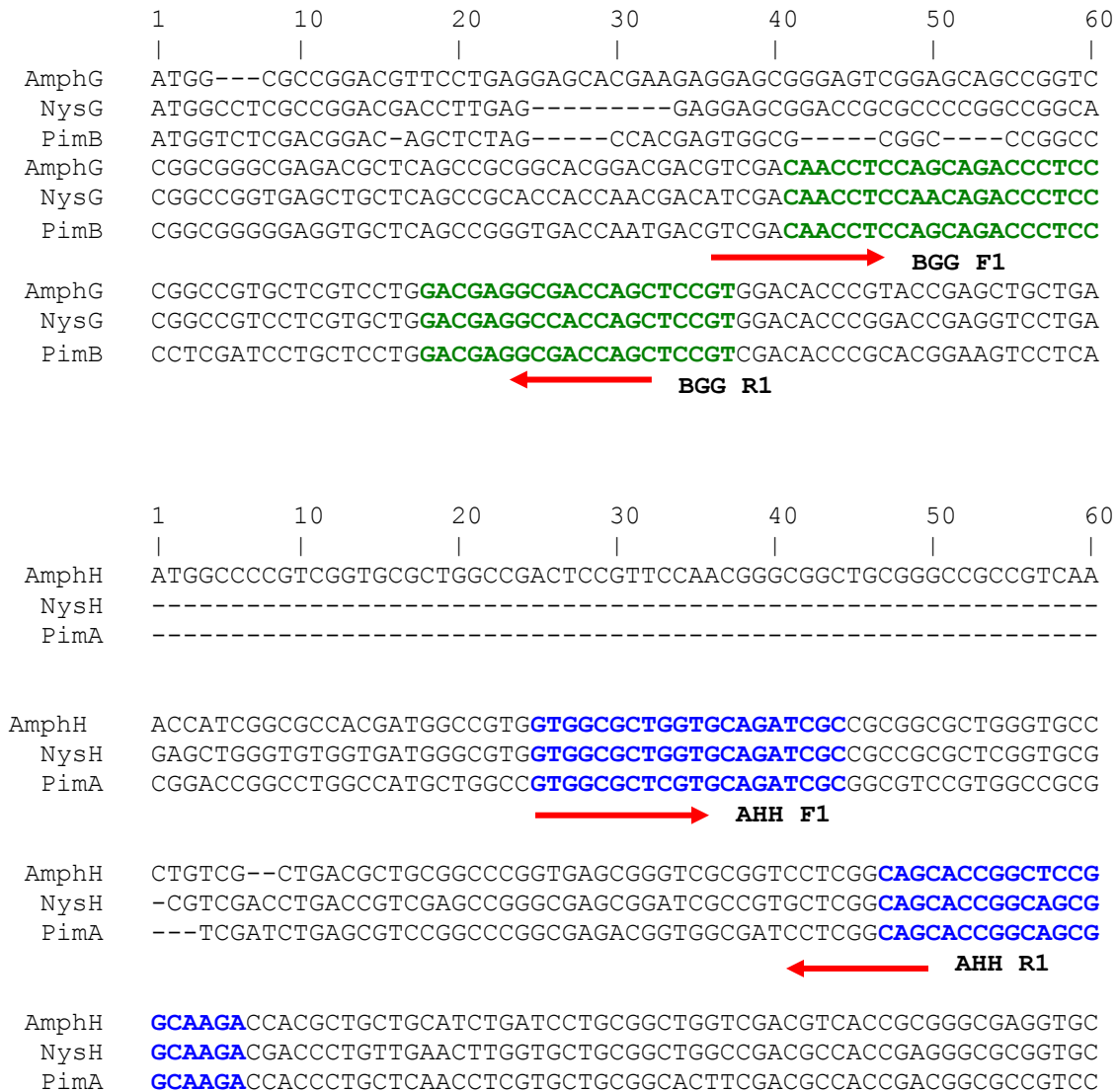
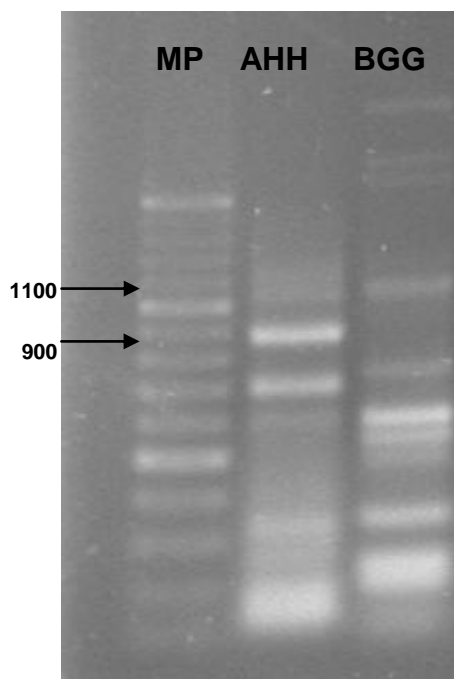


Figura 10. Del alineamiento de las secuencias de nucleótidos de proteínas de transporte, se muestra tan sólo el fragmento donde se localizan los iniciadores para la amplificación de proteínas transportadoras de *S. violaceusniger*. En verde se localizan los primers BGG F1 y BGG R1, en azul los primers AHH F1, AHH R1.

Figura 11. Geles de agarosa que muestran secuencias amplificadas con los pares de oligos AHH F1,AHHR1 y BGG F1, BGG R1



Los “primers” diseñados para este objetivo amplificarían una secuencia de 900 y de 1100 pb y a pesar de que no se observaron bandas específicas, si, se observan una bandas del tamaño estimado como se ve en la figura 11, por lo que se decidió purificar las bandas de interés a partir del gel de agarosa. Estos fragmentos fueron clonados como se observa en la figura 12 y 13 obteniéndose colonias transformadas con el plásmido de interés y se hacen análisis de restricción para verificar que el fragmento clonado sea el esperado como se observa en las figuras 15 y 16, sin embargo, cuando se mandaron a secuenciar los resultados obtenido no fueron los esperados ya que, ninguna de las secuencias presentó algún parecido a proteínas de transporte.

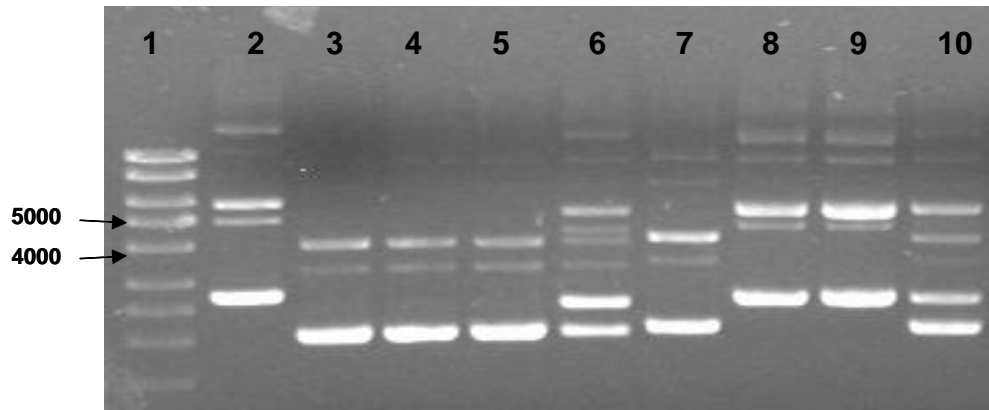


Figura 12. En este gel se muestran los plásmidos que llevan una secuencia de 900 pb la secuencia fue amplificada con los primer AHH. En los carriles 2, 8 y 9 se pueden observar los plásmidos del tamaño deseado.

El análisis de los plásmidos pAHH de 900 pb mostró alta similitud a secuencias de proteínas PKS tipo I. Las dos secuencias amplificadas tienen arriba del 90% de similitud a PKS de *S. hygrosopicus* subsp. *duamyceticus* strain JCM4427, 92% y 85% de PKS respectivamente de *S. hygrosopicus*.

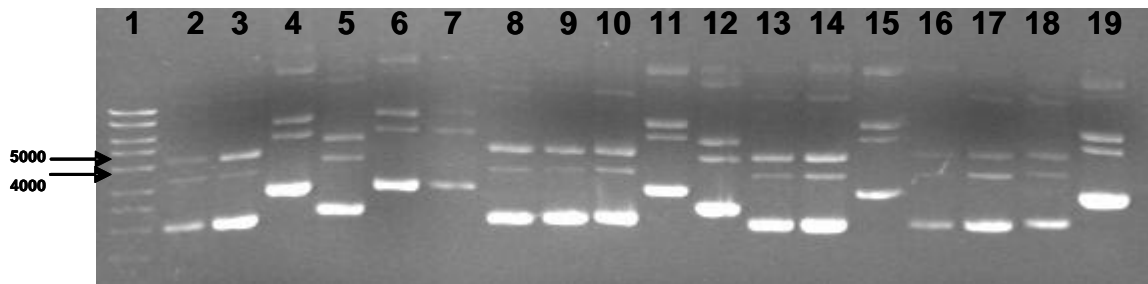


Figura 13. Selección de colonias transformadas por el plásmido pBGG que contienen un fragmento ligado de 1100. En el carril 1 esta el marcador de alto peso molecular de fermentans y en los siguientes carriles 4, 6, 7, 11, 15, 19 plásmidos que ligaron la secuencia de interés

Mientras que el análisis de las secuencias de los plásmidos pBGG 1 y 12 mostraron alto porcentaje de similitud de (85%) a secuencias de ADN polimerasa III dominio alfa de varias especies de *Streptomyces*, entre las que se encuentran *S. griseus*, *S. avermitilis* y *S. coelicolor*. El plásmido pBGG18 mostró mayor similitud (78%) a una amino transferasa de *S. avermitilis* MA-4680 y *S. coelicolor*. Lo cual es interesante ya que que dentro de la estructura de guanidilfungina precenta grupos amino, lo cual podría sugerir que esta secuencia podría estar involucrada en la biosíntesis de guanidilfungina.

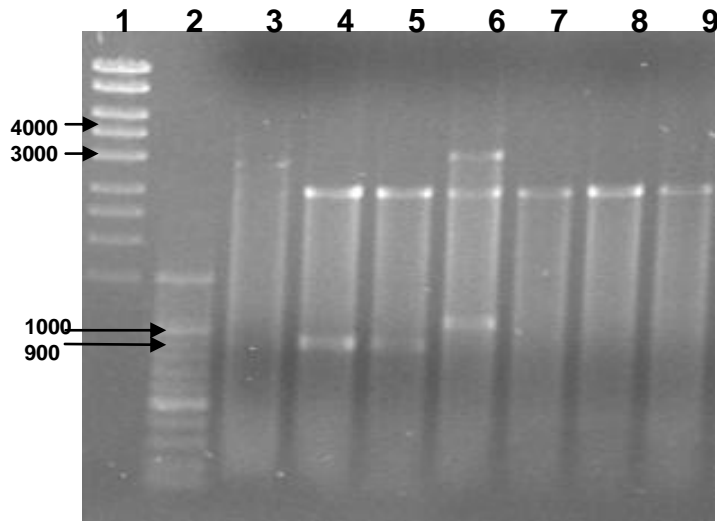
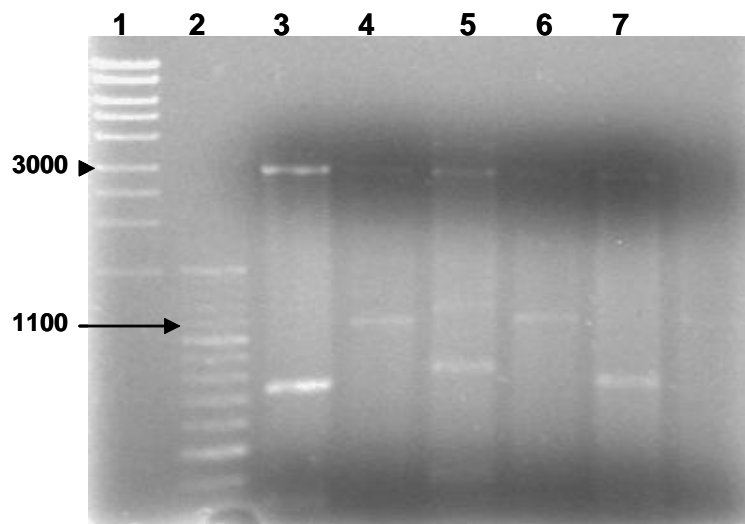


Figura 14. Se muestra el patrón de restricción generado con Not-Xba del los carriles 4 y 5 se identifican los plásmidos pAHH 8 y pAHH12 donde se libera el fragmento de 900pb. En el carril 6 pBGG1 con la secuencia de 1100 pb

Figura 16. En esta electroforesis se muestra los plásmidos recombinante, pBGG12 y pBGG18 digerido con Not y XbaI. Se muestran fragmentos liberados de 1100 pb, en los carriles 4 y 6.



Con respecto a los resultados obtenidos es importante mencionar que candicidina un metabolito secundario con actividad antifúngica y con una estructura más parecida al grupo de los polienos utilizados para diseñar "primer" como se muestra en la figura 4, presenta una organización de genes de exportación diferente de los genes involucrados en la exportación de pimarcina, anfotericina y nistatina, por ejemplo los genes relacionados con la exportación de metabolitos secundarios en este grupo de polienos se han encontrado como dímeros y cada proteína presenta un tamaño de 600 aa, mientras que en candicidina también se han identificado 2 genes que participan en la resistencia exportación y a los cuales se les ha denominado canRA y canRB. CanRA tien una longitud de 335 residuos de aa. Aunque sí presenta homología a las regiones C-terminal de las proteínas encontradas en anfotericina, nistatina y pimarcina. Se ha propuesto que las diferencias entre candicidina y los otros polienos mencionados se deben a la presencia de una estructura aromática dentro de condicidina.

Si consideramos lo mencionado anteriormente es posible que las proteínas transportadoras de guanidilfungina sean diferentes a las de este grupo a partir del cual se diseñaron los "primers", ya que la guanidilfungian presenta otras estructuras como el grupo amino, el anillo emiacetal intramolecular y en lugar de un anillo de

lactona con dobles enlaces conjugados presenta un anillo de lactona polihidroxilado.

Otra posibilidad que podría considerarse es el sitio de acción de la guanidilfungina, el cual no se conoce de forma precisa pero haciendo analogía con la nifimicina, un compuesto con mayor similitud estructural a guanidilfungina como se puede observar en la figura 6

Se ha encontrado que la nifimicina tiene su sitio de acción en la membrana al igual que los antifúngicos polienos como la anfotericina, sin embargo, a diferencia de este último compuesto, la nifimicina interrumpe la membrana plasmática por su interacción directa con fosfolípidos tales como fosfatidilcolina, pero no con ergosterol como lo hace anfotericina (Usuki et al. 2006). Otra característica de la citotoxicidad inducida por nifimicina es la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS), las cuales no son generadas cuando el tratamiento se da con anfotericina

7.5. Amplificación de secuencias mediante PCR inverso

Sin lugar a duda el “screening” de una biblioteca genómica utilizando como sonda una secuencia ADN conservada o característica, en muchos casos se ha utilizado una secuencia de ADN de PKS, azúcar etc. es la forma más utilizada y más fácil. Sin embargo, la construcción y “screening” de una biblioteca genómica lleva tiempo, el cual muchas veces esta limitado. Es por eso que se han implementado métodos alternos basados en PCR para aislar regiones que flanquean genes o secuencias conocidas.

Varios métodos basados en digestión con endonucleasas se han usado con frecuencia, entre los que se encuentran PCRi. Considerando el tiempo para llevar a cabo el trabajo y la secuencia previamente amplificada se decidió diseñar primer para aplicar por PCRi una secuencia más grande de la PKS identificada.

Los pares de “primers” denominados Ayu Pim F1, Ayu Pim R1 y Ayu Pim F2, Ayu Pim R2 fueron diseñados a partir de una secuencia conocida de *S violaceusniger* con el objetivo de amplificar secuencias desconocidas que

estuvieran acotando la secuencia ya identificada previamente y mediante PCR reverso llevar a cabo la amplificación.

```

TTgGGcCGAGTCGCATGCTCCCGCCgCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTTGAAGTCCAACATCGGTC
ACACCCAGGGCCGCGGGGCATGGCCGGTGTGATCAAGATGGTCCTGGCCATGCGCAACGACGGGGTG
← PimR2
CCGCGCACCCCTGCATGTGGACGAGCCGACCCCGCAGGTGGACTGGGCTCCGGCGCGGTGACGCTGGT
GACCGCGAACACGCGCTGGCCCCGAGGCCGAACGGGCACGCCGCGCGGCGGTGTCTCGTTCGGAGTCA
GCGGCACCAACGCGCACGTATCCTCGAAGCGGCACCACACGCAGAGACCACGACCGAATCCGCACCCA
CCGAGGGCGCGCTGCCGTGGGTCATCTCCGCACGCTCCGAGCCCGCGCTACGAGCACAAGCAGCGCAAT
PimF1
TGCGGCCTTCGCCGCCACCAGCGACCGGCATCCCGCCGACATCGGCTGGACCCTCGCCCAACACCGCG
CCGCGCTCGAACACCGGGCGGTGATCGTGGCCGCCGACCGGGACAcCTTCTGGCCGGACTGGACGCCA
TCGCCACCGGCGAACCCGCCCCCCACGTAGTCAGCGGAGTGGCCCCAAAGAACCGCCGTCCGGCGCGGT
CTTCGTCTTTTCAGGGCAGGGATCGCAGTGGGTcGGCATGGCCgCCNAA.
PimF2
    
```

Figura 18. Secuencia de nucleótidos de *S violaceusniger*, que codifica para un segmento de un gen de PKS. En azul se localizan los “primers” PimR1 y PimR2, en verde los primers PimF1, PimF2.

Para la reacción de PCR inverso se hizo una selección de enzimas que cortaran el ADN genómico en fragmentos pequeños pero que no tuvieran sitios de corte dentro de la secuencia conocida y en la figura 17 se muestra 2 de las enzimas seleccionadas.

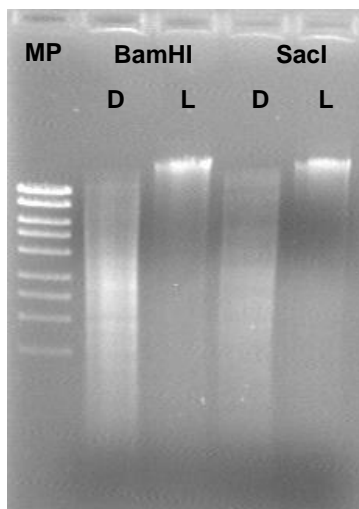


Figura 17. En este gel de agarosa se muestra la digestión total (BamHI D y SacI D) y ligación (BamHI L y SacI D) del ADN genómico de *S violaceusniger*

Cuando se hizo la reacción de ligación se observaron tanto fragmento de un tamaño no deseado (8000) como fragmento de entre 1000 a 4000 pb que eran los que nos interesaban. Y tomando en cuenta que el principio de esta técnica es obtener muchas copias de ADN a partir de una concentración mínima de ADN, sería suficiente contar con un fragmento de ADN ligado así mismo para poder llevar a cabo esta técnica de PCR. Por lo que se prosigió a seguir con el método.

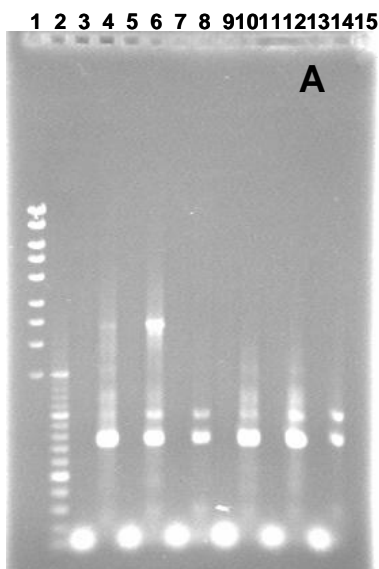
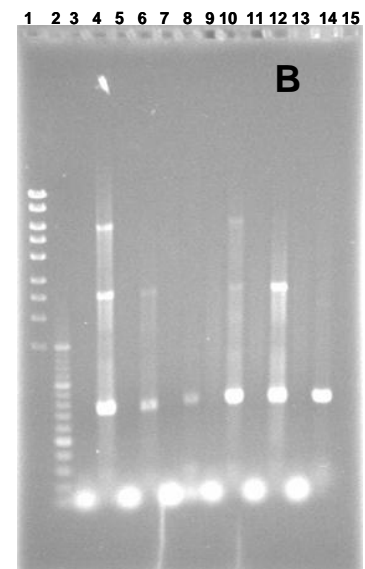


Figura 18. En la figura 18 **A** se muestra los resultados de la reacción de PCRi con los pares de “primers” Ayu Pim F1, Ayu Pim R1 y Ayu Pim F2, Ayu Pim R2 con ADN molde digerido con *SacI* sin ligar como control y ADN molde ligado y en la figura **B** se muestran las mismas reacciones solo que ahora el ADN molde fue digerido con la enzima *Bam HI*



En la figura 18 se muestran los resultados de PCRi usando los pares de “primer” Ayu Pim F1, Ayu Pim R1 y Ayu Pim F2, Ayu Pim R2, el “primer” par de oligos nos amplificó una secuencia que después nos sirvió como molde para llevar a cabo una segunda reacción de PCR con el segundo par de “primers” pero como obtuvimos más de un fragmento amplificado se purificó una banda del gel que nos sirvió como molde para la segunda reacción (segundo par de “primers”)

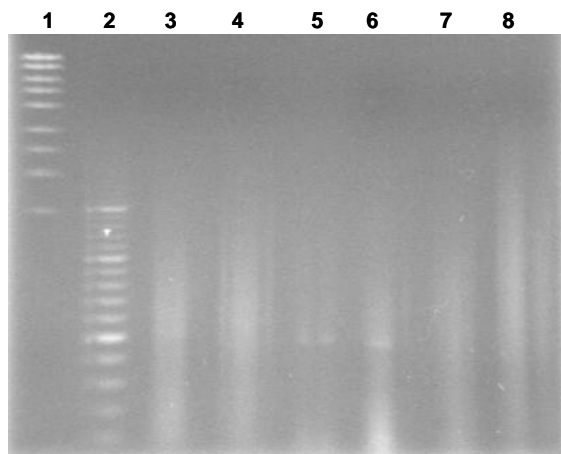


Figura 19. En este gel se muestra la segunda reacción de PCR utilizando como ADN molde una banda purificada con los “primers” Ayu Pim F1, Ayu Pim R1.

Cuando se utilizó como ADN molde el fragmento amplificado con Ayu Pim F1, Ayu Pim R1 el segundo par de “primers” no amplificó como se puede observar en la figura 19. Estos resultados originaron nuevos experimentos donde se utilizaron diferentes temperaturas de alineamiento, para el primer par de primers se utilizó una temperatura de alineamiento de 50°C, mientras que cuando se utilizó el segundo par de primers (Ayu Pim F2, Ayu Pim R2) se empleó una temperatura de alineamiento de 60 que fue a la temperatura a la que se observó amplificación cuando se llevó a cabo la reacción utilizando como ADN molde, ADN digerido y ligado directamente sin pasar por la amplificación con el “primer” par de “primers”, sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy similares, es decir no se observaron los resultados deseados. Lo que se podría hacer es checar de nuevo los primers y seleccionar unos que tengan T_m similares para que puedan amplificar con condiciones similares.

7.6. Bioensayos de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* por la guanidilfungina de *S. violaceusniger*

Una forma de confirmar que efectivamente se había extraído la guanidilfungina durante la aplicación del método reportado por Trejo-Estrada *et*

al.(1998). Se realizaron biensayos de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Observándose halos de inhibición a las 12 horas de crecimiento de *Fusarium oxysporum* (figura 18).

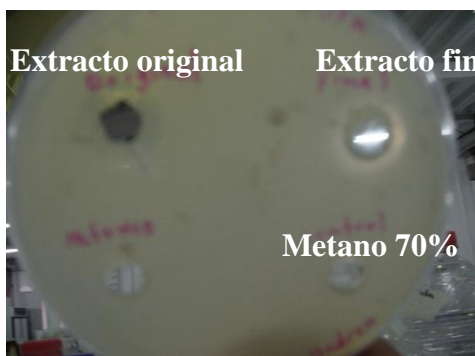


Figura 18. En esta figura podemos observar los halos de inhibición de *Fusarium oxysporum* provocados por la presencia de guanidilfungina. En el pozo 1 se agregó guanidilfungina tomado del extracto final, en el pozo 2 se observa el halo de inhibición provocado por el caldo liofilizado resuspendido en agua sin ningún proceso de extracción. En el pozo 3 el control metanol al 20% y en pozo 4 caldo liofilizado resuspendido en butanol.

8.CONCLUSIONES

- *Streptomyces violaceusniger* cepa YCED-9 puede ser transformado mediante el método de biobalística siendo las mejores condiciones de crecimiento para efectuar el disparo las 37 h y una concentración de ADN de 1.125 µg/µL, a una distancia de 9 cm. Mientras que los métodos de conjugación y electroporación resultaron no ser adecuados para la transformación de *S. violaceusniger*.
- El grupo de genes que participa en la biosíntesis de guanidilfungina presentan secuencias que posiblemente codifican para proteínas PKS tipo I.
- Posiblemente las proteínas de exportación presentes en guanidilfungina son diferentes a las de los polienos nistatina, amfotericina y pimarcina.

9.PERSPECTIVAS

Las diferentes herramientas moleculares obtenidas en este trabajo abren una amplia gama de posibilidades para lograr la identificación de los genes involucrados en la biosíntesis de guanidilfungina.

En primer lugar comprobar mediante PCR la transformación de *S violaceusniger* mediante biobalística.

Por otro lado ya se cuenta con los “primers” que permitirán la construcción de un plásmido para generar un “knockout” utilizando la secuencia de PKS conocida y analizar las mutantes obtenidas.

Analizar los “primers” para PCR inverso ya que sigue representando una alternativa que puede aplicarse para la amplificación de secuencias adjuntas a las de en este reporte descritas.

10. Bibliografía

Aghighi S., Shahidi B., Rawashdeh R., Batayneh S. y Saadoun I. (2004). First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against *Alternaria solani*, *Alternaria alternate*, *Fusarium solani*, *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Asian Journal of Plant Sciences*. **3**:463-471.

Antón, N., Mendes, M.V., Martín, J.F. y Aparicio, J.F. (2004). Identification of PimR as a Positive Regulator of Pimaricin Biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Journal of Bacteriology*. **186**:2567-2575.

Aparicio J.F., Colina A.J., Ceballos E., y Martín J.F. (1998). The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(15):10133-10239.

Aparicio J F, Molnár I, Schwecke T, König A., Haydock S F, Khaw L E., Staunton J y. Leadlay P F' (1996). Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: análisis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase. *Gene* 169: 9-16.

Atlas R. M. y L. C. Parks. (1993). Handbook of Microbiological Medica.

Ayuso-Sacido y Genilloud O. (2004). New PCR Primers for the Screening of NRPS and PKS-I Systems in Actinomycetes: Detection and Distribution of These Biosynthetic Gene Sequences in Major Taxonomic Groups. *Microbial Ecology*. 49:10-24.

Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno E T, Nagaraja R. y Schoner B. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*. 116:43-49.

Bisang C., Long P F , Cortes J , Westcott J, Crosby J, Anne-Lise Matharu., Cox R J, Simpson T J., Staunton J y Leadlay P F (1999). A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature Letter*. 401: 502-504.

Bentley S., Chater K. Cerdeño-Terraga A., Challis G. Thomson N., James K., Harris D., Quail M., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S., Chandra G., Chen C., Collins M., Cronin A., Chandra G., Chen C., Collins M., MCronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C., Kieser T., Lark L. Murphy L., Oliver K., O'Neil S. Rabinowitsch E., Rajandream M. Rutherford K., Rutter S., Seeger K., Saunders D. Sharp S., Squares R., Squares S. Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J. Barrell B., Parkhill y Hopwood (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417: 141-147.

Bossche H, Engelen M y Rochette. (2003). Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26:5-29.

Borodina I., Krabben P. y Nielsen J. (2005). Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research*. **15**:820-829.

Brautaset T., Sekurova N.O., Sletta H., Ellingsen T., Strom A., Valla S., y Zotchev B. S. (2000). Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chemistry and biology*. **7**:395-403.

Brautaset T. y Zotchev S. (2001). Cloning and sequencing of a polyene antibiotic biosynthetic gene cluster. *Qiagen News*. Issue **1**.

Bruheim P., Borgos S., Tsan P., Sletta H., Ellingsen T., Lancelin J. y Zotchev S. (2004). Chemical Diversity of Polyene Macrolides Produced by *Streptomyces noursei* ATCC 11455 and Recombinant Strain ERD44 with Genetically Altered Polyketide Synthase NysC. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**(11):4120-4129.

Caffrey P., Lynch S., Food E., Finnan S. y Oliylyk M. (2001). Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chemistry and Biology*. **8**:713-723.

Carrillo-Muñoz A., Péman J. y Gobernado M. (1999). Nuevos antifúngicos. Presente y futuro. *Revista Española de Quimioterapia*. **12**(3)

Catalán M y Montejo J. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinámica y farmacocinética. *Revista Iberoamericana Micología*. **23**:39-49.

Chamberlain K. y Crawford DL. (1999). In vitro and in vivo antagonism of pathogenic turfgrass fungi by *Streptomyces hygroscopicus* strains YCED9 and WYE53. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **23**:641-646.

Chater F. y Chandra G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *Federation of European Microbiological Societies. FEMS microbiology reviews* **30**:651-672.

Chen X., Mo H., Liu Y. y Xia F. (2006). Development of a multifunctional and efficient conjugal plasmid for use in *Streptomyces* spp. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. **70**:705-710.

Christova K., Sholeva Z y Chipeva. (1995). Application of molecular biological methods in taxonomy of genus *Streptomyces*. *Journal of culture collections*.**1**:3-10.

Cortes J., Haydock S. Roberts G. Bevitt D. y Leadlay P. (1990). An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature*. **348**(6297):176-178

Crawford DL, JL Lynch, JM Whipps y MA Ousley. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 3899–3905.

Cundliffe, E. (1978). Mechanism of resistance to thiostrepton in the producing-organism *Streptomyces azureus*. *Nature* **272**: 792-795.

Cundliffe, E. (1989). How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annual Review of Microbiology*. **43**: 207-233.

Degert y Ehrlich. (1979). Competent cells; CaCl₂ method, *E coli*, long protocol. *Gene*. **6**:23-28.

Demain, A.L., (2002). Prescription for an ailing pharmaceutical industry. *Nature Biotechnology*. **20**, 331.

Donadio, S. y C.R. Hutchinson (1991a). Cloning and characterization of the *Saccharopolyspora erythraea fdxA* encoding ferredoxin. *Gene*. **100**: 231-235.

Donadio S., Staver M., McAlpine J., Swanson S. and Katz L. (1991b). Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*.**252**:675-679.

EI-Naggar, M (2007). Kosinostatin, a Major Secondary Metabolite Isolated from the Culture Filtrate of *Streptomyces violaceusniger* Strain HAL64. *The Journal of Microbiology*. **45** (3):262-267.

Fernández-Moreno, M., Martínez E., Boto L., Hopwood D. y Malpartida F. (1992). Nucleotide sequence and deduced function of a set of co-transcribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *Journal Biology Chemistry*. **267**: 19278-19290.

Fernández-Moreno, M., Carbo L., Cuesta T., Vallin C. y Malpartida F. (1998). A Silent ABC Transporter Isolated from *Streptomyces rochei* F20 Induces Multidrug Resistance. *Journal of Bacteriology*. **180**(16): 4017–4023

Flett F., Mersinias V. y Smith C. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*. **155**:223-229.

Funa N. Ohnishi Y. Ebizuka Y. y Horinouchi S. (2002). Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis. *Biochemical Journal*. **367**:781-789

Garrity G. (2002). Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer-Verlag, New York.

Getha K. y Vikineswary. (2002). Antagonistic effects of *Streptomyces violacesuniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **28**:303-310.

Gil, J.A., Naharro G., Villanueva J., Martín J (1985). Characterization and regulation of p-aminobenzoic acid synthase from *Streptomyces griseus*. *Journal. General Microbiology*. **131**(6): 1279-1287.

Hayakawa, M. ,Y. Yoshida y Y. Iimura. (2004). Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 96, 973–981

Harvey B., Mironenko T., Sun Y., Hong H., Deng Z, Leadlay P., Weissman K., y Haydock S. (2007). Insights into Polyether Biosynthesis from Analysis of the Nigericin Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137. *Chemistry & Biology*. **14**:703–714.

Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. y Bechthold, A. (2007) Type II polyketide synthases: Gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural Product Reports*. **24**, 162-190.

Higgins, C. (2001). ABC transporters: physiology, structure and mechanism. Overview. *Research in Microbiology*. **152**:205-210.

Holmes D.S. y Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*. **114**:193-197.

Hood, D. W., R. Heidstra, U. K. Swoboda, y D. A. Hodgson. (1992). Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism-a review. *Gene*. **115**:5-12

Horinouchi, S., y T. Beppu. (1994). A-factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology*. **12**:859-64.

Hopwoon, D. (2004a). Cracking the polyketide code. *PlosBiology*. **2**. Issue 2:0166

Hopwoon, D. (2004b). Genomes full of promise,. *The Australian Society for Microbiology*.

Hopwoon, D. (2003). *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **30**:468-471.

Hopwood, D. y Sherman, D. (1990). Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review Genetics*, **24**:37-66.

Hopwood, D. y Merrick M. (1977). Genetics of Antibiotics Production. *Bacteriological Reviews*. **41**(3):595-635.

Hranueli D., Peric N., Borovicka B., Bogdan S., Cullum J., Waterman P. y Hunter I. (2001). Molecular biology polyketide biosynthesis. *Food technology and biotechnology*. **39** (3):203-213.

Hutchinson C.R. y Fujii (1995). Polyketide synthase gene manipulation: a structure function approach in engineering novel antibiotics. *Annual Review Microbiology*. **49**:201-238.

Ivanova, V., y Gushterova. (1997). Malonylniphimycin: macrolide antibiotic from *Streptomyces hygrosopicus* B-7: physico-chemical properties and structure elucidation. *The Journal of Antibiotic*. 50(11):965-969

Izumikawa M., y Shipley R. (2003). Expression and characterization of type III polyketide synthase 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene synthase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **30(8)**: 510-515.

Jez M. Austin B. Ferrer J. Bowman E. Schröder J. y Noel J. (2000). Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. *Chemistry and Biology*. **7**:919-930.

Kadota I., Hu Y., Packard K. y Rychnovsky D. (2004). Natural Product Synthesis Special Feature: A unified approach to polyene macrolides: Synthesis of candicin and nystatin polyols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101(33)**:11992-11995.

Kakavas J. S., Katz L y Stassi D. (1997). Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. *Journal of Bacteriology*. **179(23)**:7515-7522.

Kawachi R., Nihira T. y Yamada Y. (1997). Development of a transformation system in *Streptomyces virginiae*. *Actinomycetol*. **11(2)**:46-53.

Kieser H. Kieser T. H y Hopwood D.(1992). A combined genetic and physical map of the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriol*. **174**:5496-5507.

Kieser T., Bibb J. M., Buttner J. M., Chater F. K. y Hopwood D. A. (2000). General introduction to actinomycete biology. En *Practical Streptomyces Genetics*, pp. 1-42. The John Innes Foundation, Norwich, UK.

Kieser H. Kieser T. H y Hopwood D.(1992). A combined genetic and physical map of the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*. **174**:5496-5507.

Kinoshita, K., Pfeifer, B.A., Khosla y Kolsto A.B. (1997). Dynamic bacterial genome organization. *Molecular Microbiology*. **24**:241-248.

Kotowska, M., K. Pawlik K., Butler A., Cundliffe E., Takano E. y Kuczek K. (2002). Type II thioesterase from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. **148**: 1777-1783.

Kumar, Y., Aiemsun-ang, P., Ward, A. y Goodfellow, M. (2007). Diversity and geographical distribution of members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade detected by clade-specific PCR primers. *FEMS Microbiology Ecology* ..**62**:54–63.

Law D. (1997). Use of a simplified rapid size screen protocol for the detection of recombinant plasmids. En Elsevier Science, <http://www.elsevierscience.com/protocols/>.

Lemosvskaya N., Fonstein L., Ruan X., Stassi D., Katz L y Hutchinson R. (1997). Gene disruption and replacement in the rapamycin-producing *Streptomyces hygroscopicus* strain ATCC 29253. *Microbiology*. **143**: 875-883.

Lezhava A., Mizukami T., Kajitani T., Kameoka D., Redenbach M., Shinkawa H., Nimi O. y Kinashi H. (1995). Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *Journal of Bacteriology*. **177**:6942.

1. **McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., and Khosla, C (1993a).** Engineered biosynthesis of novel polyketides: manipulation and analysis of an aromatic polyketide synthase with unproven catalytic specificities. *Journal of the American Chemical Society*. **115**: 11671-11675.

McDaniel, R., Ebert-khosla S., Hopwood, D. A., y Khosla, C. (1993b). Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Sciences* **262**: 1546-1550.

Manteca A., Fernnandez M y Sanchez J.(2005). Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiology*. 5:51.

Martin J. F. y McDaniel L. (1975). Sequence of Biosynthesis of the Components of the Polyene Macrolides Candidin and Candihexin: Macrolide Aglycones as Intracellular Components. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.7(2):208-214.

Martínez F., Carnot U., Castro A., Muñío P. y Torres I. (1998). Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. *Acta Medica*. 8:80-85.

Mendez M., Recio E., Fouces R., Luiten R., Martín J., y Aparicio J. (2001). Engineered biosíntesis of novel polyenes: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. *Chemistry and Biology*. **8**. 635-644.

Mendez C. y salas J. (2001). The role of ABC transpopters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms. *Research in Microbiology*. **152**:341-350.

Miller. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*. New York. **21**:81-90.

Moore B. y Hertweck C. (2001). Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Natural products Research*. **19**:70-99

Mozodier P., Petter R. y Thompson C. (1989). Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *Journal of Bacteriology*. **171**:3583-3585

Mulks, M., Nair M., y Putnam A. (1990). In vitro antibacterial activity of faeriefungin, a new broad-spectrum polyene macrolide antibiotic. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **34**(9): 1762-1765

Nakayama K., Yamaguchi T., Doi T., Usuki Y., Taniguchi M. y Tanaka T. (2002) Synergistic combination of direct plasma membrane damage and oxidative

stress as a cause of antifungal activity of polyol macrolide antibiotic niphimycin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **94**(2):207-211.

Nedal, A. (2007) Post-PKS modifications in the biosynthesis of the antifungal antibiotic nystatin. Tesis Doctoral. Norwegian University of Science and Technology Faculty of Natural Science and Technology Department of Biotechnology.

Nikolova S. A. Stefanova V. y Yocheva L. (2006-2007). Taxonomic study of *Streptomyces* Sp strain 34-1. *Journal of culture collections*. 5:10-15.

Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M. y Ikeda H. (2008). Genome Sequence of the Streptomycin-Producing Microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *Journal of Bacteriology*. **190**(11):4050-4060.

Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Takahashi C, Shinose M, Takahashi Y, Horikawa H, Nakazawa H, Osonoe T, Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., y HottorM. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermectilis*:Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **98**:12215-12220.

Omura, S. y H. Tanaka (1984). Production, structure and antifungal activity of polyene macrolides. *Macrolide Antibiotics, chemistry, biology and practice*. S. Omura. London, Academic Press: 351-404.

Otsuka M., Ichinose K., Fujii I., y Ebizuka Y. (2004). Cloning, sequencing, and functional analysis of an iterative type I polyketide synthase gene cluster for biosynthesis of the antitumor chlorinated polyenone neocarzilin in *Streptomyces carzinostaticus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**:3468-3476.

Pfeifer B. y Khosla C. (2001). Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiology and Molecular Biology*. **65**(1):106-118.

Pigac J y Schrempf H. (1995). A simple and rapid method of transformation of *Streptomyces rimosus* R6 and other *Streptomyces* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**(1):352-356.

Qin Z., Peng K., Zhou X., Liang R., Zhou Q., Chen H., Hopwood D., Kieser T y Deng Z. (1994). Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *Yingchengensis*, a producer of three useful antifungal compounds, by elimination of three barriers to DNA transfer. *Journal of Bacteriology*. **176**(7):2090-2095.

Rascher A., Hu Z., Buchanan G., Reid R. y Hutchinson C. (2005). Insights into the Biosynthesis of the Benzoquinone Ansamycins Geldanamycin and Herbimycin, Obtained by Gene Sequencing and Disruption. *Applied and Environmental Microbiology*. **71**(8):4862-4871.

Rawlings B. (1997). Biosynthesis of polyketides. Biosynthesis of polyketide. *Natural Product Reports*. **12**: 523-554.

Redenbach, M., Kieser, H., Cullum, J., Kinashi y Hopwood. (1996). A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Molecular microbiology*. **21** (1): 76-96.

Rudd BAM, y Hopwood D. (1979). Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor*. *Journal genetic microbiology*. **114**:35-43 en: **Hopwood, D. (2003).** *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **30**:468-471.

Ryley, J.F., Wilson RG., Gravestock M.B. y Poyser J.P. (1981). Experimental approaches to antifungal chemotherapy. *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*. **18**:49-176.

Saadoun I. y Blevins W. T., (1997). Detection of giant linear plasmids in off-flavor compound-producing strains of *Streptomyces* by PFGE. *Actinomycetes*. **8**(part 3):58-65.

Sanford J. C., Smith F. D., y Russell J A. (1993). Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*. **217**(36):483-509

Sanford J. C (1988). The biolistic process. 299-302

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I,II,III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*. **7**:285-295

Shen B. y Hutchinson C. (1993). Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A. *Science*. **262**:1535-1540.

Seco M., Pérez-Zuñiga J., Rolón S y Malpartida F. (2004). Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108. *Chemistry & Biology*. **11**: 357–366

Seok K., Oh H., Young K., Ah P., Joon J., Kil L. y Yong A. (2005). Identification and antibacterial activity of a new oleandomycin derivative from *Streptomyces antibioticus*. *The Journal of Antibiotics*. **58**(3):196-201.

Sekurova O., Brautaset T., Sletta H., Borgos S., Jakobsen O., Ellingsen T., Strom A., Valla S. y Zotchev S. (2004). In Vivo Analysis of the Regulatory Genes in the Nystatin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces noursei* ATTC 11455 Reveals Their Differential Control Over Antibiotic Biosynthesis. *Journal of Bacteriology*. **186**(5):1345-1354.

Saxena, P., Yadav G., Mohanty D. y Gokhales R. (2003). A new family of type III polyketide synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(45): 44780-44790.

Sletta H., Borgos S., Bruheim P., Sekurova O., Grasdalen H., Aune R., Ellingsen T. y Zotchev S. (2005). Nystatin Biosynthesis and Transport: nysH and nysG Genes Encoding a Putative ABC Transporter System in *Streptomyces noursei* ATTC 11455 Are Required for Efficient Conversion of 10-Deoxynystatin to Nystatin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **49**(11):4576-4583.

Smith F., Harpending P. y Sanford J. (1992). Biolistic transformation of prokaryotic: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *Journal of General Microbiology*. **138**:239-248.

Takesako K. y Beppu T. (1984). Studies new antifungal antibiotics guanidilfungins A and B. I taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *The Journal of Antibiotics*. **37**(10):1161-1169.

Takesako K. y Beppu T. (1985). Demalonyl derivatives of guanidylfungin A and copiamycin: their synthesis and antifungal activity. *The Journal of Antibiotics*. **38**(10):1363-1369.

Thompson J. H., Fink D. y Nguyen D. L. (2002). Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. *Genome Biology*, **3**: 1020.1-1020.4

Thompson J., Ward M. y Hopwood D. (1980). DNA cloning in *Streptomyces*: resistance genes from antibiotic-producing species. *Nature*. **286**: 525-527.

Trejo-Estrada, A Paszczynski y Crawford. (1998). Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **21**:81-90.

Trejo-Estrada SR, IR Sepulveda y DL Crawford. (1998). *In vitro* and *in vivo* antagonism of *Streptomyces violaceusniger* YCED9 against fungal pathogens of turfgrass. *World Journal Microbiology Biotechnology*. **14**:865–872.

Tomich P. (1988). *Streptomyces* cloning: useful recombinant DNA systems and a summation of cloned genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **32**(10):1465-1471.

Usuki Y, Matsumoto K, Inoue T, Yoshioka K, Lio H y Tanaka T. (2006). Structure-activity relationship studies on niphimycin, a guanidylpolyol macrolide antibiotic. Part 1: The role of the N-methyl-N"-alkylguanidinium moiety. *Bioorganic & medical Chemistry Letters* **16**:1553-1556.

Vining, L. C. (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity: *Gene*.**115**:135-140.

Walter M. y Rapley R. (2000). *Molecular Biology and Biotechnology*. Royal Society of Chemistry. 563

Watve M.G., Tickoo R., Jog, M.M. y Bhole B.D., (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*. **176**: 386–390.

Wei-Qing HE y Yi-Guang (2006). Cloning and analysis of geldanamycin partial biosynthetic gene cluster of *streptomyces hygrosopicus* 17997. *Chinese Journal of Biotechnology*. **22**(Issue 6):902-905.

Weissman J. K. y Leadlay F. P. (2005). Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nature Review Microbiology*. **3**:925-936.

Yang, K., Han L. y Vining L. (1995). Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuela* ISP5230: involvement of a repressor gene, jadR2. *Journal of Bacteriology*. **177**:6111-6117.

Zawada X. y Khosla C. (1997). Domain análisis of the molecular recognition features of aromatic polyketide synthase subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(26)

Zotchev S., Haugan K., Sekurova O., Sletta H., Ellingsen T. y Valla S. (2000). Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology*.

146:611-619.