

Nombres propios

Rubén López: "42 años en el CIB"

Queridos compañeros:

"...la investigación biológica es quizá la actividad más costosa de la ciencia actual y uno de los lujos más caros del presupuesto de los Estados modernos. El capital que estos Estados dedican en todas partes a la investigación, no produce dividendos regulares, es decir, hallazgos fijos y normales; tal vez, ninguno, durante largo tiempo. Pero todo esto es aparente, digo, porque la verdadera característica de los estudios biológicos, es, que el tiempo que parecía perdido, resulta que se ha ganado en cuanto pasan algunos años..."

Estas palabras que acabo de leerlas pronunció hace casi 48 años D. Gregorio Marañón en el discurso inaugural del antiguo CIB de la calle de Velázquez que hemos abandonado hace apenas 2 años y medio. Su vigencia permanece intacta porque creo que difícilmente se encontrará un mejor pensamiento para encuadrar la dedicación que se precisa en biología para encarar el día a día del laboratorio y, además, encierran las razones más poderosas para premiar los muchos esfuerzos que se realizan a diario en la poyata. Hoy, hago míos los esclarecedores pensamientos del maestro para agradecer a los ponentes de estas jornadas que nos hagan partícipes de sus esfuerzos y de sus logros, que, sin duda, iluminarán una vez más sobre la irrenunciable vocación investigadora que ha marcado la trayectoria científica del Centro de Investigaciones Biológicas durante medio siglo.

Apenas, cinco años después de ese 8 de febrero de 1958 cuando don Gregorio aleccionara, como solía hacerlo, a sus oyentes, el que os habla se incorporaba como becario en el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, uno de los pilares fundacionales del CIB. Hoy, el grupo de amigos encargado de organizar estas jornadas, me ha pedido que haga una breve presentación para agradecer, como acabo de manifestar, a los conferenciantes, por compartir con nosotros su ciencia y su sabiduría y a los asistentes, por arroparnos con su interés por la ciencia.

Una reflexión serena me ha llevado a pensar que la deferencia que me han concedido los organizadores al invitarme a participar hoy en este foro podría reunir como único mérito personal el hecho de haberse difundido la noticia de que el próximo

10 de enero pongo un punto y final a mis 42 años de trabajo en el CIB, sólo interrumpidos por mis 4 años de estancias en centros extranjeros. Pero, ante el jubileo solo nos queda aceptar, al menos con cierta dignidad, ese designio implacable al que nos condiciona la biología e insistir

exclusivamente sobre este argumento solo me llevaría a situaciones que recordarían las coplas de un Jorge Manrique a la muerte de su padre, y ese sesgo literario, en tono menor, no encontraría una sintonía adecuada en esta sala. Es por eso, que un cierto toque de vanidad profesional me ha llevado al convencimiento de que el afán investigador que, durante tantos años, he desarrollado en esta mi casa, me facultan para hacer hoy algunas consideraciones sobre las referencias que han marcado mi trayectoria científica. Quiero pensar que esas referencias han propiciado los fundamentos para que fuera capaz de mantener trabajando de forma cohesionada y durante largo tiempo a un grupo de 4 ó 5 investigadores en plantilla en torno a un patógeno humano tan conocido como neumococo. Asimismo, albergó una cauta esperanza de que esta introspección pueda tener para vosotros un cierto interés instructivo.

Puedo resumir en tres los "mantras" que han servido, a lo largo del tiempo, para dar consistencia a nuestro grupo. Se trata de meditaciones materializadas como resultado de practicar una Ética situacional más que un plan rígidamente preestablecido:

1. El primero ha sido el saber rodearme de científicos que compartieran mi **pasión por la biología**. Esta es la tercera oportunidad a lo largo del último mes en que hago referencia, por diversas circunstancias, a una cita de Ernst Mayn quien nos iluminó al decir que *"ser biólogos, más que una profesión es elegir un estilo de vida"*. Al leerla por vez primera comprendí el por qué socialmente se nos suele ver en demasiadas oportunidades



como individuos algo indiferentes frente a los conductas que otras profesiones suelen marcar como socialmente correctas. No creo que esto sea cierto y mucho menos lo es la caricatura del científico que, con demasiada frecuencia, nos muestra el cine. Sucede simplemente que esa pasión por la biología nos lleva a incorporar entre nuestras normas de conducta el anteponer en nuestras vidas las virtudes sobre los bienes y esto marca un código de comportamiento que, con demasiada frecuencia, produce, una cierta incompreensión social. Sin embargo, siempre me ha preocupado la lectura negativa que los jóvenes licenciados pueden hacer, con razón, de ésta exigente norma de conducta cuando se incardina dentro de una sociedad científicamente inculta y soportando a una clase política que, tradicionalmente, sólo nos ofrece migajas para que le devolvamos milagros. Todo ello provoca deserciones entre los nuevos doctorandos que ven cómo aquellos compañeros que les precedieron unos años antes, con la razonable aspiración de adquirir el perfil de un profesional de la Ciencia y no el de un sacrificado misionero, después de años de doctorado y especialización fuera de nuestras fronteras, enfilando ya los 40 años, se ven obligados a apostar de la investigación en medio de la indiferencia de nuestras autoridades. Mientras no se subsane esta vergüenza institucional seguiremos dando vigencia al aserto de que “Investigar en España es llorar”, parafraseando a Larra una vez más.

2. La segunda referencia de nuestro trabajo ha sido los patrones que nos hemos marcado en el grupo sobre la orientación y la valoración de la producción científica. Volviendo nuevamente al citado discurso de Marañón, en su frase final ya advertía entonces sobre la necesidad de “habituarse al hombre de ciencia español a trabajar en equipo porque nada hay más anticientífico que el individualismo”. Sólo ahora, con el regreso de algunos destacados investigadores parece que se quiere poner en práctica este consejo del maestro. En este sentido os recomiendo reparar las recientes declaraciones de Massagué o de Fuster donde hablan de la imperiosa necesidad de tener grupos grandes y cohesionados. Más aún, esta obviedad ha sido incorporada apenas hace unos días al BOE, como formulación prioritaria, en la nueva convocatoria de Planes Nacionales.

Por eso apelo nuevamente a ese aserto implacable de Dürerant que nos recuerda: “*Dificiles tiempos los nuestros en que hay que explicar lo evidente*”, porque es un hecho históricamente contrastable que de acuerdo con las políticas científicas al uso (propiciadas tanto por las autoridades de turno como, en demasiadas ocasiones, por

nuestros propios compañeros) los grupos de más de 2 personas han sido considerados durante demasiado tiempo, como algo “poco recomendable”. Ocurría que el tener que compartir firmas en las publicaciones imponía una seria limitación para progresar profesionalmente según los patrones que han instruido durante demasiado tiempo aquellos que prefieren ignorar lo que debe ser la razón que impulse el progreso científico: la calidad del trabajo en sí mismo. Y, así, olvidan con demasiada frecuencia que: “*el arte es el yo, la ciencia el nosotros*” como nos dejara dicho Claude Bernard. No obstante, el tesón a la hora de perseverar en lo que creíamos más apropiado para nuestro trabajo, no ha impedido que esos compañeros que me han arropado durante tanto tiempo sean hoy científicos con excelentes *curricula* que han promocionado sus carreras de forma envidiable. Incluso, envidiable para mí por aquello de *Discipuli procter magister*, es decir los discípulos han superado con creces al maestro que nunca fui. Esta limitación funcional que he señalado debe ser corregida y va en paralelo con otro problema valorativo no menos grave y muy actual como es: la sacralización de los índices de impacto.

Resulta cansado y hasta insultante, recordar lo que realmente significan esos índices: valorar revistas, no trabajos. Uno de los tótem para aquellos que pontifican con el impacto, la revista *Nature*, denunciaba, mejor que nadie, en un reciente editorial la falacia de emplear estos métodos estadísticos como bien supremo: “*Comparar los IF de las revistas no tiene sentido (es inútil), por ejemplo, si sirven para cotejar disciplinas diferentes, sobre las cuales prevalecen desiguales prácticas de valoración. Pero mientras tanto tales comparaciones son aún usadas para juzgar el trabajo de los científicos*” y añadía: “... cuando estos índices caen en las manos de analistas no expertos en bibliometría el rigor en su uso se esfuma” (fin de la cita).

Para mi tengo que los muñidores de estas editoriales de *Nature* tienen ahora muy en cuenta los agravios de un pasado no muy lejano. En este sentido, la Microbiología nos proporciona un ejemplo paradigmático como ningún otro para ilustrar cómo los llamados *policy-shappers and decision makers*, por emplear los términos barbarizantes que tanto gusta, pueden hacernos caer en peligrosos errores conceptuales de consecuencias impredecibles. Así, se dijo, y, lo que es peor se practicó, por parte de un influyente sector de científicos que en los años 60 del pasado siglo XX marcaban las reglas del juego, que al disponer, desde los años 50, de esas “balas mágicas” que han sido los antibióticos, a la Microbiología solo le quedaría, en

adelante, el ocupar una página en la historia de la Biología. Hoy, los microorganismos, décadas después de que se predicara en esos foros la inutilidad de trabajar con ellos, no sólo continúan siendo la primera causa de muerte en el mundo sino que se han convertido en una novedosa fuente de conocimientos y en un caudal inagotable de aplicaciones técnicas y prácticas.

Si pese a los graves errores cometidos en el pasado, convertimos a los índices de citación en el nuevo vellocino de oro de la ciencia me temo que áreas como la microbiología, las ciencias agrarias y un largo etcétera correrán, una vez más, el peligro de despoblarse de buenos científicos y becarios al ser víctimas del empleo de criterios contrastados solo en apariencia, al medir, además, solo las citaciones de los 2 últimos años de nuestro trabajo. Pero la verdad científica, como no podía ser menos, es testaruda y por ello invita a una seria reflexión el hecho de que este año el premio Nobel de "Medicina y Fisiología" lo compartan dos microbiólogos a los que a tenor del impacto de la mayoría de las revistas en que se vieron obligados a publicar sus hallazgos sobre *Helicobacter pylori*, nunca les hubieran otorgado en nuestro país ni proyecto ni becarío, si se insiste en aplicar esta nueva forma de semiótica pseudocientífica en perjuicio de una perspectiva científica que alimente un valor duradero. Recordemos, con U. Eco, que: "*Lo que (se publica) no se ha hecho para que creamos lo que dice, sino para que lo analicemos*" y eso es lo que se espera de los científicos honestos: que sepan arbitrar sus propios criterios de valor.

3. Finalmente, y este es nuestro último "mantra", siempre he reclamado para nuestro trabajo la complicidad de la Sociedad y éste ha sido y será, ya jubilado, mi tercer caballo de batalla: Insistir en **la obligación que como científicos tenemos contraída hacia el hombre de la calle**. En el tan citado discurso de Marañón, del que he hecho, como no podía ser menos, el *leit motif* de esta presentación, el maestro terminaba su parlamento llamando a la ciencia "la religión de la verdad". No es el momento de analizar esta contundente afir-

mación pero creo que por razones que están en la mente de los presentes, tenemos que desarrollar nuestro trabajo dentro de una sociedad que arrastra siglos de ignorancia científica. Y, es por ello, que resulta imperativo el que hagamos un esfuerzo intelectual para incorporar la ciencia a los nobles, pero aún limitados, logros del pensamiento humano. Reconozcamos, con pensadores como mi maestro el profesor Mayor Zaragoza, que es plausible, por vez primera, enfrentarse a los grandes problemas de la humanidad con una visión científica. Creamos, una vez más, en la utopía, y confiemos en que esa aportación integradora de la Ciencia contribuya con nuevos elementos a establecer barreras culturales que eviten que los arteños intereses de unos pocos sigan fundamentándose en la esclavitud intelectual y material del resto de los seres humanos. La ciencia necesita ser divulgada, aunque su comprensión requiera, sin duda, un esfuerzo de inspiración que nos lleve a usarla como bandera de agitación social y quizás ese empeño lo haya actualizado mejor que nadie, con su agresivo optimismo, Lynn Margulis al afirmar que: "*Hoy, sólo la ciencia es noticia, lo demás es cotilleo*". Estoy convencido de que el conocimiento científico aportaría prudencia a la vida pública, al menos en aquellos países ya capacitados intelectualmente, merced a la herencia que les legó la Ilustración, para incorporar a la Historia de la Humanidad las experiencias generadas por la Biología Evolutiva, y así, saber discernir "lo que es bueno o malo para seguirlo o huir de ello". Tal vez, en este planteamiento esté la base del diseño del nuevo orden mundial que se precisa construir. En cualquier caso, para iniciarnos en este novedoso, y sin duda difícil, objetivo hagamos cómplices del mismo al ciudadano medio llevando a su mente, con la tenacidad que caracteriza a los buenos científicos, que deben integrar en sus vidas ese imperecedero consejo de Kant que reza: *Sapere aude*, es decir, "atrévete a pensar (¿saber?)".

Rubén López

Temas de actualidad

Características de levaduras y hongos filamentosos de interés en agroalimentación. ¿Adaptación al ambiente?

Tahía Benítez*, Miguel Angel Moreno-Mateos, Ana M^a Rincón y Antonio C. Codón
Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
Apartado 1095, E-41080 Sevilla.
*E-mail: thaia@us.es

Las levaduras y los hongos filamentosos

Las levaduras se definen como hongos unicelulares que crecen y se dividen asexualmente, la mayoría por gemación (Fig. 1A). A pesar de esta definición, las levaduras representan con frecuencia sólo la fase unicelular del ciclo de vida de los hongos filamentosos. Bajo el punto de vista taxonómico se agrupan en diferentes géneros de ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y esta diversidad apunta a que las levaduras son estructuras morfológicas favorecidas por la selección y que han aparecido de forma recurrente a lo largo de la evolución. De hecho, existen levaduras con ciclo sexual o asexual, haplonte o diplonte, con características metabólicas muy diferentes o con un complemento cromosómico que varía desde 3 a más de 20 cromosomas. El proceso de selección ha sido tal que se pueden encontrar tantas diferencias a nivel molecular o metabólico entre cepas de la misma especie que entre especies distintas, lo cual resulta de enorme interés bajo el punto de vista de la aplicación industrial.

Es posible que tanto los estados levaduriformes como los miceliales respondan a un dimorfismo que originalmente formaba parte del ciclo de vida de todos los hongos, y que las especies que hoy definimos exclusivamente como levaduras o como hongos filamentosos sean simplemente mutantes que han perdido la capacidad dimórfica o que el dimorfismo ocurra bajo unas condiciones que aún no se han establecido. En cualquier caso, sorprenden las diferencias estructurales y metabólicas que separan a las levaduras de los hongos filamentosos, incluso para una misma especie, y que son fundamentalmente intrínsecas del propio carácter levaduriforme o micelial. Quizás, porque el dimorfismo consiste básicamente en adoptar una morfología y una pauta de comportamiento que encaje de forma óptima con unas condiciones precisas, diferentes para la forma levaduriforme y la micelial. Salvando las diferencias que puedan

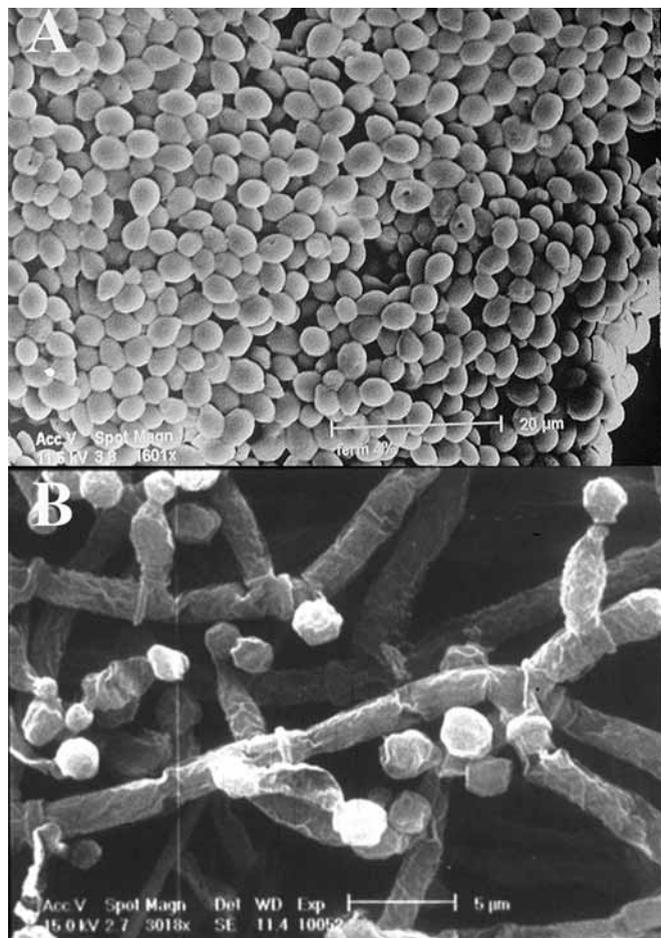


Figura 1. A. Células gemando, ovoides, casi redondas de una cepa de levadura de *S. cerevisiae* al microscopio electrónico. B. Micelio, conidióforos y conidios de la cepa *T. harzianum* CECT 2413 al microscopio electrónico. (Citado en Benítez *et al.*, 2004).

derivarse del hecho de ser especies distintas, aquí vamos a comparar el comportamiento de dos organismos de gran interés en agroalimentación. Por una parte *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de hongo levaduriforme (Fig. 1A) y por otra *Trichoderma harzianum* como modelo de hongo filamentosos (Fig. 1B). Sus características morfológicas, genéticas y metabólicas parecen responder

en muchos casos a un proceso de adaptación óptimo a las condiciones ambientales en las que se encuentran habitualmente las cepas pertenecientes a estas especies, mientras que otras veces no existe una explicación clara que justifique dichas características.

Ecología de *S. cerevisiae* y *T. harzianum*

Los hongos filamentosos como *T. harzianum* son organismos del suelo donde los nutrientes de fácil asimilación son muy escasos, la competencia con otros organismos es feroz y los sustratos se encuentran en su mayoría formando polímeros de alto peso molecular. Estos hongos filamentosos poseen una gama extraordinaria de enzimas líticas que excretan al exterior por el ápice de las hifas y que les permite hidrolizar y asimilar sustratos tan diversos como la celulosa, hemicelulosa, quitina, glucano, pectina, proteínas y otros. Este metabolismo es oxidativo, con preferencia por la respiración y un crecimiento lento pero con un alto rendimiento en ATP. En estas condiciones

muchos de los transportadores presentes en la membrana plasmática son de alta afinidad, posiblemente por la baja concentración de sustrato transportable existente en el medio natural. En el caso específico de cepas de *T. harzianum*, muchas de ellas utilizadas como biofertilizantes y biopesticidas, éstas han desarrollado además una capacidad asombrosa de interaccionar de forma parasítica y simbiótica con microorganismos y plantas (Figs. 2A y 2B), y de utilizar y degradar polisacáridos, pesticidas xenobióticos, hidrocarburos, clorofenoles y derivados cianogénicos. De ahí que estas cepas se empleen en agricultura, en la producción de enzimas, en biocontrol como biopesticidas, bioprotectores, bioestimulantes de plantas y biofertilizantes, y se comercialicen más de 50 productos diferentes basados en ellas (Kubicek y Harman, 1998; Harman *et al.*, 2004).

Por su parte, las levaduras como las pertenecientes al género *Saccharomyces* son fundamentalmente fermentativas, utilizan sobre todo monómeros como glucosa, fructosa o galactosa, prácticamente no secretan hidrolasas ni ninguna otra enzima o metabolito y por lo tanto son incapaces de utilizar polímeros o compuestos de alto peso

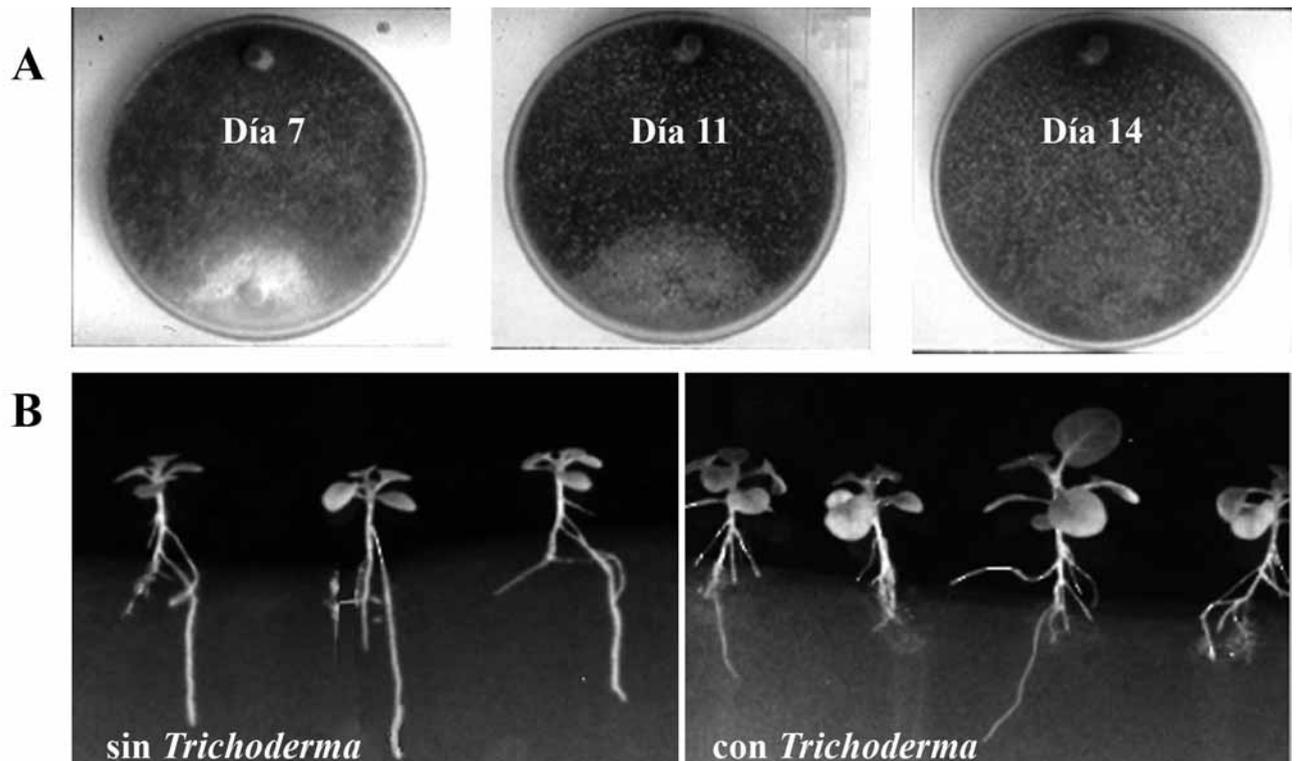


Figura 2. *T. harzianum* CECT 2413 es capaz de micoparasitar otros hongos, actuando como biofungicida. Sobrecrecimiento de una cepa del hongo fitopatógeno *Phytophthora cactorum* (parte inferior) por *T. harzianum* CECT 2413 (parte superior) a lo largo del tiempo. Fig. 2B. *T. harzianum* CECT 2413 estimula el crecimiento de las plantas, actuando como biofertilizante. Aspectos de plántulas de tabaco germinadas en agar-agua (sin *Trichoderma*) o en estas condiciones y un inóculo de esporas de *T. harzianum* CECT 2413 (con *Trichoderma*). (Citado en Benítez *et al.*, 2004).

molecular. Como resultado de su metabolismo acumulan las fuentes de carbono como glucosa o fructosa en forma de intermediarios energéticos como etanol, consiguiendo con ello convertir un sustrato fácilmente asimilable por la mayoría de la flora con la que compite, en otro sustrato que pocas especies pueden utilizar. Además el etanol es altamente tóxico a concentraciones a las que *Saccharomyces* es muy tolerante. El metabolismo fermentativo y la producción de etanol correlacionan perfectamente con la disponibilidad de altas concentraciones de glucosa o fructosa presentes en las uvas y otros frutos en cuya piel se encuentra *Saccharomyces*. El género *Saccharomyces* (*sensu stricto*) incluye las cepas de levadura más utilizadas en agroalimentación, responsables de la producción de vino, cerveza, sidra, sake o pan. Comprende especies adaptadas durante milenios a ambientes creados por el hombre, especies de ambientes naturales, de las que *S. paradoxus* parece ser el ancestro de la especie doméstica *S. cerevisiae*, e híbridos de las anteriores encontrados sobre todo en cerveza y sidra. De ahí que las cepas de *S. cerevisiae* sean altamente fermentativas y se encuentren exclusivamente en ambientes antrópicos (viñedos, bodegas). Reordenaciones cromosómicas y la acumulación de mutaciones han propiciado el aislamiento reproductivo entre el ancestro *S. paradoxus* y la especie doméstica *S. cerevisiae* (Benítez y Codón, 2002, 2005).

Características genéticas de *S. cerevisiae* y *T. harzianum*

Las cepas haploides de *S. cerevisiae* vienen definidas por un patrón de 16 cromosomas de entre 0,25 a 2,5 megabases. Las cepas de laboratorio son heterotálicas, con fases haploide o diploide estables y con una alta frecuencia de recombinación entre secuencias homólogas tanto en meiosis como en mitosis.

Se ha detectado un alto grado de polimorfismo cromosómico, tanto en número como en tamaño de los cromosomas, y este polimorfismo es mayor en cepas industriales que en cepas de laboratorio. Además, las cepas industriales son en su mayoría aneuploides, no conjugan, no esporulan o lo hacen pobremente y en estos casos la viabilidad de los productos meióticos es muy baja. Estas características se han asociado a un proceso de selección artificial que ha favorecido los genotipos estables que permiten producciones de compuestos de interés con las mismas propiedades deseables, y que resulta de la falta de recombinación y por lo tanto de meiosis y de manifestación de mutaciones recesivas en cepas poliploides. Es

decir, la estabilidad genética garantiza la reproducibilidad de las propiedades deseables de los productos finales (Benítez y Codón, 2002, 2005; Randez-Gil *et al.*, 2003). El hombre selecciona características deseables en las levaduras y las mantiene favoreciendo los genotipos deficientes en reproducción sexual como aneuploidías, homotalismo o apomixia. Las aneuploidías favorecen los problemas de no disyunción en meiosis y la letalidad de los productos meióticos; el homotalismo hace que sólo la fase diploide de las cepas sea estable y por lo tanto imposibilita los cruces con otras cepas; la apomixia hace que los cromosomas no se separen en la primera profase meiótica, de manera que los productos finales son dos esporas idénticas a la cepa parental. En este último caso, la esporulación permite a las células una mayor resistencia a condiciones hostiles, y la esporulación apomítica, menos dependiente de condiciones externas que la esporulación meiótica, puede tener lugar siempre que las condiciones no sean favorables. Al mismo tiempo, si se ha alcanzado un genotipo óptimo tras muchas reorganizaciones cromosómicas y aneuploidías, la esporulación apomítica impide la recombinación y la pérdida de ese genotipo óptimo (Castrejón *et al.*, 2004). De hecho, la frecuencia de apomixia en cepas industriales es relativamente alta; normalmente las cepas han acumulado varias mutaciones y todas se localizan en el cromosoma VIII, de forma que ninguna reversión puede conducir a la recuperación de la capacidad de hacer meiosis. Simultáneamente el hombre selecciona genomios mitocondriales que proporcionen una excelente capacidad respiratoria que aumenten los rendimientos –como ocurre con la producción de levadura panadera, lo que se traduce en un patrón de restricción del DNA mitocondrial idéntico en distintas cepas– y que aumenten la resistencia a condiciones hostiles como altas concentraciones de etanol o acetaldehído que tienen lugar en el medio donde se desenvuelven las levaduras vínicas. Al final y como consecuencia de esta adaptación a un ambiente doméstico, la levadura va desarrollando una serie de mecanismos que le permitan mantener el genotipo óptimo y necesario en las condiciones ambientales a las que normalmente está expuesta. Las translocaciones y reorganizaciones cromosómicas dan estabilidad a las duplicaciones génicas y las amplificaciones que, en tándem, no se mantendrían debido a la pérdida de material genético por recombinación entre secuencias repetidas. Los mecanismos responsables de las reorganizaciones génicas no se conocen, pero podrían estar mediados por recombinación homóloga entre regiones subteloméricas Y'

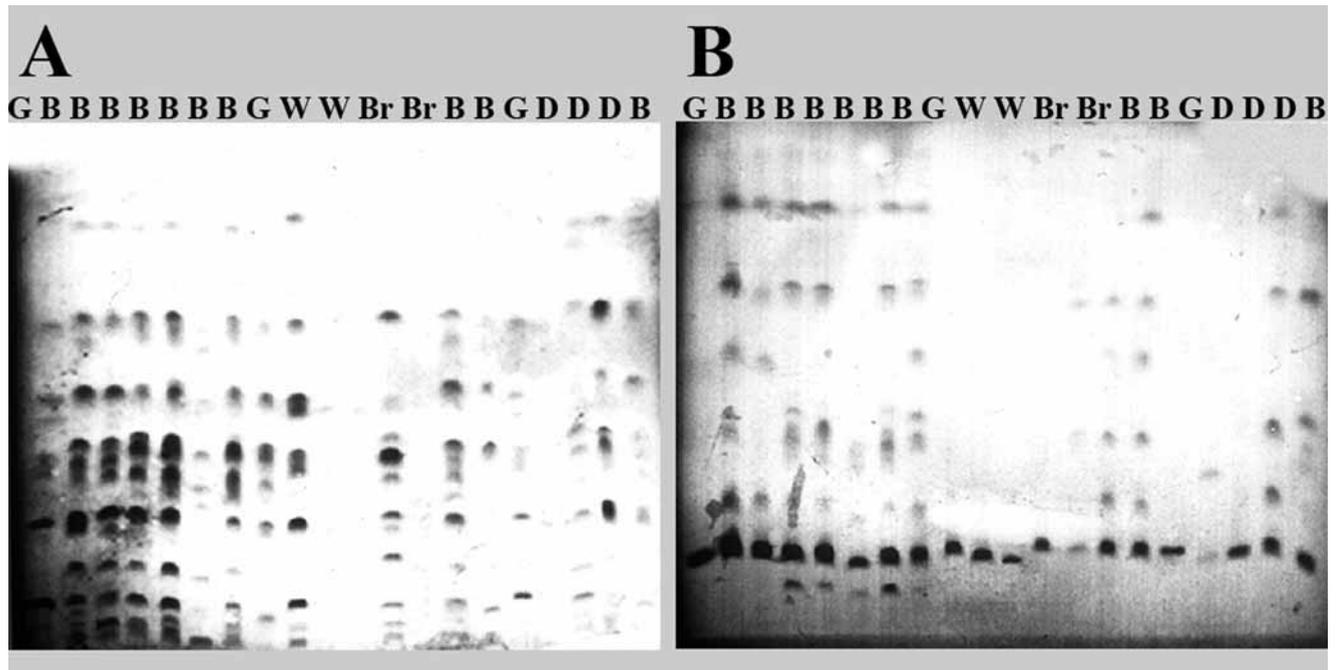


Figura 3. Presencia de elementos Ty1 (A) y del gen SUC que codifica la enzima invertasa (B) en los cromosomas de distintas cepas industriales (B, panaderas; W, vínicas; Br, cerveceras; D, de destilería) y de cepas de laboratorio (G) de *S. cerevisiae*. La invertasa hidroliza la sacarosa, y las cepas panaderas que se cultivan habitualmente en melazas donde la principal fuente de carbono es sacarosa, parecen poseer un alto número de copias de este gen (Citado en Benítez y Codón, 2002).

y/o transposición de elementos Ty muy abundantes en cepas industriales (Figs. 3A y 3B), sobre todo Ty1 en cepas panaderas y Ty2 en cepas vínicas. El polimorfismo cromosómico por tanto introduce variabilidad y depende de, al menos, elementos Ty. Si tiene lugar la meiosis en alguna cepa, la frecuencia de translocaciones intercromosmicas, amplificaciones y recombinaciones homólogas, asimétricas y ectópicas es espectacularmente alta.

El polimorfismo cromosómico se ha asociado al hecho de que los genomios nuclear y mitocondrial de las levaduras codifican funciones génicas requeridas para una adaptación óptima a las condiciones industriales en las que se encuentran los distintos tipos de levaduras, lo que implica que obedezca a una fuerte presión selectiva. La amplifi- cación de los genes SUC, responsables del metabolismo de la sacarosa, y su translocación a otros cromosomas en levaduras panaderas y de destilería cultivadas en melazas (Fig. 3), sugieren un mecanismo de adaptación que ha seleccionado las cepas que crecen mejor en medios donde la sacarosa es la principal fuente de carbono (Randez-Gil *et al.*, 2003). Es interesante el hecho de que la mayoría de las cepas de *T. harzianum* no utilizan la sacarosa, posiblemente porque es un azúcar que raramente se encuentra en su entorno natu-

ral. De hecho el gen SUC se ha utilizado como marcador de selección en algunos experimentos de transformación con estas cepas. La selección de levaduras vínicas en bodegas con altas concentraciones de etanol y/o acetaldehido ha favorecido la selección de aneuploides con polisomía del cromosoma XIII donde se encuentra genes como ADH2 y ADH3 que codifican isoenzimas de la alcohol deshidrogenasa, implicadas en el metabolismo oxidativo del etanol durante las fases de maduración de los vinos con crianza biológica (Benítez y Codón, 2005).

Las cepas industriales comparten características tales como una utilización eficiente del azúcar, alta tolerancia y producción de etanol, buenas propiedades organolepticas, altas tasas de fermentación, buen rendimiento y estabilidad genética. Las pertenecientes a grupos específicos tienen a su vez características comunes como utilización de trisacáridos, dextrinas o almidón, en el caso de las cepas panaderas, capacidad de flocular, baja producción de compuestos sulfurados, alto potencial glicolítico o capacidad de fermentar maltosa en el caso de las cerveceras o resistencia a la congelación, al almacenamiento o a la desecación en el caso de inoculantes comerciales para panadería, vino, cerveza o destilados (Benítez y Codón, 2002, 2005; Randez-Gil *et al.*, 2003). Las levadu-

ras de flor son cepas vínicas que están presentes en los vinos de crianza biológica durante la maduración. Se dividen en razas con características metabólicas diferentes, un fuerte aislamiento sexual, a pesar de que son de la misma especie, y pérdida de capacidades metabólicas correlacionadas con una mayor capacidad de formar velo y una mayor tolerancia a etanol y acetaldehído. Por ejemplo, la raza *montuliensis*, algunas de cuyas cepas toleran 800 mg/l de acetaldehído, utilizan y fermentan glucosa pero han perdido la capacidad de utilizar galactosa, sacarosa, rafinosa, trehalosa o maltosa, mientras que la raza *cheresien-sis* sólo tolera unos 300 ó 400 mg/l de acetaldehído pero las cepas pueden utilizar glucosa, sacarosa, maltosa y rafinosa (Martínez *et al.*, 1998; Benítez y Codón, 2002, 2005). No sabemos si estas pérdidas obedecen a mutaciones puntuales o deleciones, pero en levaduras panaderas la incapacidad de utilizar melibiosa se debe a la ausencia del gen MEL, presente en otras cepas industriales (Randez-Gil *et al.*, 2003)

Aunque las cepas industriales de *S. cerevisiae* han perdido en gran medida la capacidad de esporular y hacer meiosis, el alto polimorfismo en tamaño y número de cromosomas y las amplificaciones, translocaciones y deleciones de genes indican reorganizaciones génicas durante los ciclos mitóticos que introducen variabilidad. Las reorganizaciones cromosómicas durante las mitosis son frecuentes entre organismos en los que no se conoce una fase sexual, probablemente como una alternativa para introducir variación a pesar de la ausencia de meiosis. Y esto podría estar ocurriendo en las cepas de *T. harzianum*, pero con una diferencia fundamental, y es la existencia de sistemas de recombinación homóloga poco eficientes. En *S. cerevisiae* aunque no haya meiosis, las recombinaciones siempre tienen lugar entre secuencias repetidas homólogas, incluso en cepas haploides, ya sea entre elementos Ty o entre regio-

nes subteloméricas Y'. En *T. harzianum* el número de cromosomas varía de 4 a 7, y el tamaño de 3 a 7 megabases, con enormes diferencias entre cepas tanto en tamaño, número y localización de genes, por ejemplo los correspondientes al ARN ribosómico (Kubicek y Harman, 1998). Parece que las reorganizaciones cromosómicas son tan abundantes que han favorecido el aislamiento sexual y la reproducción asexual de las cepas. No parece que haya secuencias repetidas. Todos los genes descritos hasta ahora están en copia única. Por ejemplo, se han encontrado hasta 50 quitinasas distintas y todas están codificadas por genes con un grado de similitud relativamente bajo, no se trata por lo tanto de familias génicas. Lo mismo ocurre con otras hidrolasas (Benítez *et al.*, 2004; Kubicek y Harman, 1998). Curiosamente *S. cerevisiae* posee un solo gen que codifica una quitinasa implicada en morfogénesis. Cuando se transforma una cepa de *T. harzianum* con copias de genes de la propia cepa, intactas o con inserciones para interrumpir la copia endógena, prácticamente todas las integraciones son ectópicas, la frecuencia de recombinación homóloga está por debajo de 1%, y se dan reorganizaciones durante varios ciclos de crecimiento/esporulación hasta que se estabilizan algunos transformantes que mantienen una o varias de las copias del gen de interés (Benítez *et al.*, 2004; Kubicek y Harman, 1998). Probablemente el propio proceso de transformación sea mutagénico y active mecanismos de reparación por recombinación, pero no cabe duda de la poca eficiencia del sistema de recombinación homóloga –dada la escasez de transformantes con integraciones en la copia endógena– y el rechazo a la presencia de copias repetidas de genes –dada la inestabilidad y pérdida de muchas de estas copias durante sucesivas generaciones–. Además, la entrada de ADN exógeno parece activar mecanismos de protección de la integridad genómica que incluye la degradación masiva del ADN exógeno

Tabla 1. Características fisiológicas de la cepa vínica IFI256.

Características	Medio de cultivo	Valor	Referencia ¹
Tasa máxima de crecimiento (μ)	YPD	0,42	1
Tasa máxima de crecimiento (μ)	YPF	0,41	1
Producción de etanol a 22 °C (%)	YPD + 50% sacarosa	13,6–14	2
Producción de etanol a 37 °C (%)	YPD + 50% sacarosa	11,8	2
Mutantes "petite" (%)	YPD	0,5	3
Mutantes "petite" (%)	YPDE8	2,9	3
T ^a máxima de crecimiento (°C)	YPD	40,5	1
T ^a máxima de crecimiento (°C)	YPDE10	27,7	1

¹Citado en: (1) Benítez y Codón, 2002; (2) Benítez y Codón, 2005; (3) Castrejón *et al.*, 2004.

introducido, de manera que las integraciones de copias completas de genes son bajísimas y casi inexistentes si se transforma con un plásmido lineal. Esto marca una diferencia importante con *S. cerevisiae* donde, incluso en cepas industriales, la recombinación homóloga tiene lugar en la mayoría de los casos en los que el fragmento que se introduce va flanqueado por 50 pares de bases de homología.

El entorno en que se encuentran las cepas de *Trichoderma* y *Saccharomyces* es claramente hostil. En el caso de *Trichoderma*, el suelo posee pocos nutrientes, hay mucha competencia con otras especies y con frecuencia la concentración de compuestos tóxicos como pesticidas y herbicidas es alta. En el caso de *Saccharomyces*, durante la fermentación los mostos poseen altas concentraciones de azúcar -lo que crea un fuerte estrés osmótico- o de etanol -altamente tóxico- (Tabla 1) hay mucha competencia con otras especies y/o hay falta de nutrientes y bajas temperaturas, incluida la congelación, como ocurre durante el almacenamiento de cepas panaderas o de cepas inculantes.

Uno de los mecanismos que comparten las cepas de *Trichoderma* y *Saccharomyces* para contrarrestar y sobrevivir en condiciones hostiles consiste en la síntesis de proteínas estructurales localizadas en la superficie celular. Muchos de los genes de estas proteínas comparten elementos comunes como es la presencia de dominios altamente conservados entre sí y entre distintas especies, repetidos un número variable de veces, que se traducen en proteínas de alto peso molecular. Este es el caso de la proteína Qid74 y otras similares de distintas especies de *Trichoderma* localizadas en micelio o en conidios, o las floculinas de levaduras. Otras veces las proteínas se procesan en péptidos que se corresponden con los dominios repetidos, como los repelentes de *Ustilago*, que se insertan en la pared de manera estratégica. Otro grupo de genes codifica para proteínas de bajo peso molecular como las hidrofobinas de hongos filamentosos o las aglutininas y florinas de levaduras (Rey *et al.*, 1998; Benitez *et al.*, 2004).

Los genes de estas proteínas generalmente responden a hambre de carbono o nitrógeno (Fig. 4) o a distintos tipos de señales como presencia de hospedadores, de patógenos, de metales, de etanol, estrés oxidativo o estrés hídrico. El elemento común de todas estas proteínas es un incremento espectacular de la hidrofobicidad celular que confiere a las células una mayor capacidad de adhesión o de reconocimiento y/o una mayor resistencia a la sequedad, a la tracción mecánica, a la lisis enzimática o a agentes desnaturizantes como el

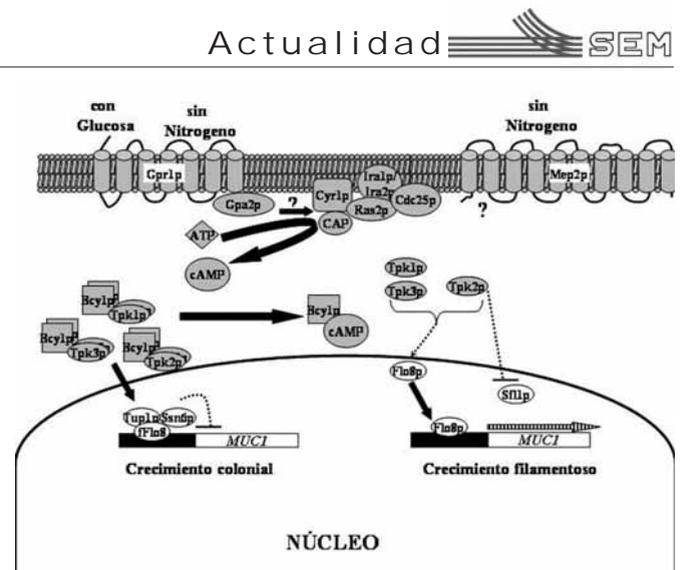


Figura 4. En condiciones de falta de nutrientes o -como ocurre en los vinos fortificados- la presencia de fuentes pobres de carbono y nitrógeno como el etanol y la prolina, *S. cerevisiae* aumenta la hidrofobicidad, se induce la filamentación y/o la formación de velo, y se desreprime la expresión de genes que codifican floculinas como MUC1 (FLO11) (Citado en Benítez y Codón, 2005).

pH extremo, el etanol o las altas temperaturas (Reynolds y Fink, 2001; Halme *et al.*, 2004).

Estas proteínas han sido esenciales para la colonización de la superficie terrestre por especies acuáticas y son determinantes en procesos específicos tan distintos como la capacidad de infección de hongos fitopatógenos (debido a su función en el proceso de adhesión o como fitotoxina) o de formación de velo en levaduras vínicas (Figs. 5A y 5B) (Martínez *et al.*, 1998; Benítez y Codón, 2002, 2005). La complementación de genes heterólogos que codifican este tipo de proteínas estructurales en organismos tan alejados taxonómicamente como hongos filamentosos y bacterias o levaduras y la enorme diversidad de condiciones estresantes contra las que protegen estas proteínas las convierten en un blanco interesante para estudiar mecanismos de protección y para el aislamiento de cepas altamente tolerantes a condiciones adversas.

En este sentido es fascinante el comportamiento de las levaduras vínicas de flor, que siendo cepas de la especie *S. cerevisiae*, marcan en los vinos finos un rasgo diferenciador debido a su metabolismo. Estas levaduras, como se ha indicado, crecen en la superficie de vinos fortificados que poseen 16% de etanol y carecen de fuente de carbono fermentable (Figs. 5A y 5B). La fuente de nitrógeno es prolina y el metabolismo en estas condiciones es oxidativo. La falta de amonio y glucosa activa en las células un mecanismo de

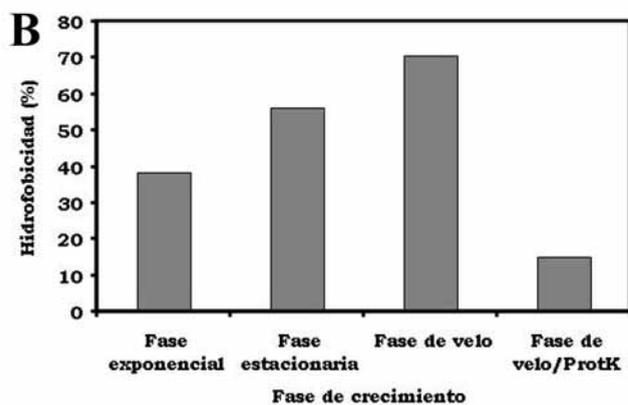


Figura 5. (A) Aspecto del velo de flor formado por la cepa de *S. cerevisiae* B16, en un matraz conteniendo mosto fermentado y fortificado. **(B)** La hidrofobicidad celular aumenta con la concentración de etanol, y parece venir determinada por la presencia de proteínas de superficie, puesto que el tratamiento con proteasas va acompañado de un descenso de la hidrofobicidad.

seudo-filamentación, con incremento de la hidrofobicidad, como ocurre en las formas miceliales (Fig. 4), un metabolismo exclusivamente respiratorio, un aumento de la resistencia a condiciones de estrés oxidativo, a desecación y a condiciones hostiles como altas concentraciones de acetaldehído y etanol y un aumento considerable de la adherencia célula-célula que concluye en la formación de un velo en la superficie del vino (Fig. 5). El aumento de la hidrofobicidad y la capacidad de adherencia se deben, entre otros factores, a la fuerte inducción del gen que codifica la proteína Muc1, también llamada Flo11, una floculina posiblemente responsable de la formación del velo y de filamentación (Fig. 4) (Martínez *et al.*, 1998; Benítez y Codón, 2002, 2005; Halme *et al.*, 2004; Reynolds y Fink, 2001). Se han descrito cepas de *Saccharomyces* que en condiciones de hambre

activan simultáneamente la filamentación y la expresión de genes que codifican amilasas, lo que refleja probablemente la situación en la naturaleza donde la falta de nutrientes conduce a un crecimiento invasivo y a la activación de genes que permitan la utilización de fuentes de carbono alternativas. En el caso de las levaduras de flor, la formación de pseudo-filamentos, el metabolismo oxidativo, la resistencia a condiciones hostiles y compuestos tóxicos, el aumento de la hidrofobicidad, el aislamiento sexual y la homogeneidad de los patrones cromosómicos de diferentes cepas, que indica pocas reorganizaciones cromosómicas, las aproxima a un tipo de comportamiento más parecido al de hongos filamentosos como *T. harzianum*. Sin embargo no hay que olvidar que el entorno de las levaduras de flor son las botas de vino fino, mientras que *T. harzianum* es un hongo del suelo, donde la mayoría de los nutrientes los obtiene por degradación de polímeros de alto peso molecular con hidrolasas extracelulares y donde la resistencia a herbicidas, fungicidas o sustancias tóxicas producidas por otros organismos va asociada a un alto número de transportadores ABC.

Asimilación de nutrientes en *S. cerevisiae* y *T. harzianum*

Frente a cepas de *S. cerevisiae*, sobre todo levaduras de flor que parecen haber sufrido pérdida de capacidades metabólicas relacionadas con una mayor tolerancia a etanol, una de las ventajas de la mayoría de las cepas de *T. harzianum* es su versatilidad metabólica, que las capacita para colonizar el entorno de forma eficaz evitando la proliferación de otros organismos. Esta capacidad de captar nutrientes a muy baja concentración o difícilmente asimilables ha resultado ser uno de los principales mecanismos de control biológico, por ejemplo, el hierro que se encuentra a concentraciones por debajo de 10^{-8} M y que algunas cepas capturan gracias a sideróforos de alta afinidad, inhibiendo el desarrollo de otros hongos, entre ellos cepas patógenas. El carbono y el nitrógeno lo obtienen las cepas tras la hidrólisis de polímeros de alto peso molecular –como celulosa, hemicelulosa o pectina– presentes en las paredes celulares de los restos vegetales, o quitina o glucano presentes en las paredes de los hongos a los que ataca. La expresión de los genes de enzimas hidrolíticas está controlada por la fuente de carbono, de modo que la transcripción se reprime en presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables como glucosa. A veces la ausencia de glucosa es suficiente para la expresión de muchos de

los genes, mientras que en otros casos es necesaria una inducción específica, generalmente por quitina (Benítez *et al.*, 2004). La molécula que específicamente induce la expresión no se conoce, pero se especula con oligosacáridos de bajo peso molecular como di o trisacáridos de quitina, posiblemente unidos a un aminoácido. En *T. harzianum* se ha identificado un gen que codifica un factor de transcripción, Cre1, que media la represión por glucosa. La proteína Cre1 posee dos dedos de zinc que se unen a secuencias específicas que, en los promotores en los que es funcional, se encuentran en pareja, separadas unos pares de bases. En muchos promotores de hidrolasas no existen secuencias conservadas de unión a Cre1, lo que apunta a la existencia de otros factores que controlen la represión por fuente de carbono (Kubicek y Harman, 1998; Harman *et al.*, 2004). Un factor de transcripción que media la represión por glucosa en *S. cerevisiae* es Mig1, que reprime simultáneamente la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono –como ocurre en *T. harzianum*– en la acumulación de trehalosa, en gluconeogénesis y en respiración. Mientras que la represión de la gluconeogénesis, la síntesis de trehalosa o la utilización de otras fuentes de carbono en presencia de glucosa hace que dichos mecanismos se activen sólo cuando son necesarios, la represión del metabolismo respiratorio sólo puede tener una interpretación de competencia ecológica. La glucosa a través del factor de transcripción Mig1 impide su metabolismo hasta CO₂ y agua via respiración, con formación de biomasa y con la ganancia de 36 moles de ATP por mol de glucosa. Incluso en presencia de oxígeno el metabolismo es fermentativo, de forma que más del 95% de la glucosa se metaboliza hasta etanol como intermediario metabólico, que en ausencia de dicho azúcar puede ser utilizado como fuente de carbono en detrimento de otras especies que no pueden utilizarlo. El rendimiento es en este caso de 2 moles de ATP por mol de glucosa, respirándose sólo un 5% o menos del azúcar. Finalmente y como ocurre en los promotores de genes de hidrolasas de *T. harzianum*, algunos promotores de genes *S. cerevisiae* requieren sólo la falta de glucosa para su expresión, por ejemplo los genes SUC, mientras que otros precisan de inductores específicos como los genes MAL (Randez-Gil *et al.*, 2003; Benítez y Codón, 2002, 2005).

Como ocurre con la fuente de carbono, la transcripción de genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno de difícil asimilación se reprime en presencia de otras fuentes fácilmente asimilables como el amonio o la glutamina tanto en *T. harzianum* como en *S. cerevisiae*. Este control

está mediado en *T. harzianum* posiblemente por un factor de transcripción ortólogo al de AreA en *Aspergillus*, que se une a secuencias específicas mediante un motivo de dedos de zinc, y un sistema específico de inducción mediado por sustratos concretos. Muchos genes de *T. harzianum* tienen secuencias de unión a AreA y se expresan específicamente en fuentes pobres de nitrógeno, por ejemplo los que codifican algunas proteasas y glucanasas, mientras que la presencia de quitina incrementa la expresión. La inducción generalizada de genes por quitina y la presencia de este polímero en la pared de la mayoría de los hongos filamentosos ha sugerido la existencia de una expresión coordinada de genes de antagonismo de *T. harzianum* desencadenada por oligómeros de quitina.

Además de la falta de carbono y nitrógeno, muchos genes de hidrolasas de *T. harzianum* parecen inducirse ante señales de estrés general. Se ha aislado en *T. harzianum* una proteína denominada Seb1, capaz de unirse a secuencias de promotores relacionadas con las que en *S. cerevisiae* responden a los factores de transcripción Msn2 y Msn4, que median la respuesta génica ante varios tipos de estrés.

Metabolismo del carbono y el nitrógeno en *S. cerevisiae* y *T. harzianum*

S. cerevisiae se encuentra habitualmente en las bodegas o sobre pieles de uvas y otros frutos que al romperse permiten el contacto de las levaduras con sustratos muy ricos en azúcar, del orden del 20 al 30% (p/v) (Tabla 1). La actividad fermentativa de las células convierte progresivamente el azúcar en etanol, hasta alcanzar concentraciones de entre 10 y 15% (v/v) dado que casi todo el azúcar se transforma en etanol (Tabla 1). Bajo un punto de vista aplicado, interesa que las cepas vínicas conviertan todo el azúcar en etanol y no dejen azúcar residual. Entre otras razones, el consumo total de azúcar evita posibles contaminaciones del vino con organismos no deseados. El papel determinante en el metabolismo de azúcares lo tienen los transportadores. Los transportadores de hexosa de *S. cerevisiae* pertenecen a una superfamilia de la que se han identificado 20 genes (HXT), todos de secuencia muy parecida, se han clonado y caracterizado y se sabe que están implicados en el transporte de glucosa, manosa y fructosa. De estos transportadores se generan básicamente dos sistemas de transporte, uno constitutivo de baja afinidad, con Km de 15 a 20 mM, y otro reprimible por glucosa de alta afinidad, con Km de 1 mM (Perez *et al.*, 2005). En hongos



Tahía Benítez Fernández (2ª por la derecha) es Licenciada en Ciencias Biológicas y Doctora en Ciencias por la Universidad de Salamanca. Realizó su tesis doctoral sobre morfogénesis de la pared celular de *Trichoderma viride* en el Dpto. de Microbiología de la Universidad de Salamanca bajo la dirección de los Profs. J.R. Villanueva e I. García Acha. Posteriormente estuvo en la Universidad de Edimburgo durante tres años trabajando en ciclo celular de levaduras bajo la dirección del Prof. J.M. Mitchison. Desde 1980 trabaja en el Departamento de Genética de la

Universidad de Sevilla donde ha colaborado con el Dr. J. Conde en heterocariontes de levaduras y en la genética de la producción y tolerancia a etanol. Ha sido *Visiting Scientist* en el *Solar Energy Research Institute* de Golden, Colorado. Actualmente es Catedrática de Genética en la Universidad de Sevilla. Sus líneas de investigación versan sobre caracterización y mejora de levaduras industriales, fundamentalmente panaderas y vnicas, y de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas.

Antonio C. Codón (2º por la izquierda) es Licenciado y Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla. Realizó su tesis doctoral sobre caracterización y mejora de cepas panaderas de *Saccharomyces cerevisiae* bajo la dirección de la Dra. Tahía Benítez. Durante este periodo realizó una estancia corta en los laboratorios de ALKO Ltd en Helsinki (Finlandia) y posteriormente estancias posdoctorales en el *Max-Planck Institute* de Berlin (Alemania) y en la *Cornell University* de Nueva York (EEUU). Desde 2000 trabaja en el Dpto. de Genética de la Universidad de Sevilla y paralelamente ha colaborado como investigador con la empresa Agrométodos S.A. y como Profesor Asociado en la Universidad de Málaga durante los cursos 2002-2004.

Ana María Rincón Romero (1ª por la derecha) es licenciada y doctora en Biología por la Universidad de Sevilla. Realizó su tesis doctoral sobre hidrolasas del hongo filamentoso *Trichoderma* y su aplicación en distintas estrategias de mejora del control biológico, en el grupo que dirige la profesora T. Benítez. Paralelamente ha trabajado en la mejora de levaduras de interés industrial, concretamente en las panaderas. Ha realizado una estancia posdoctoral en el laboratorio del Prof. C. Scazzocchio, Universidad *Paris-Sud*, para estudiar genes implicados en el desarrollo de *Aspergillus nidulans*. Actualmente es Ayudante de Universidad y trabaja en el grupo dirigido por la Profesora T. Benítez.

Miguel Angel Moreno Mateos (1º por la izquierda) es Licenciado y Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla. Ha realizado su Tesis Doctoral sobre la regulación por pH ambiental en el agente de biocontrol *Trichoderma harzianum*, caracterizando el factor de transcripción responsable. Ha realizado una estancia corta en el laboratorio del Dr. M. A. Peñalva, trabajando sobre la ruta endocítica del hongo *Aspergillus nidulans*.

filamentosos del suelo los transportadores de glucosa de baja afinidad tienen K_m de 1 a 5 mM y los de alta afinidad de 1 a 15 μ M, lo que refleja la diferente disponibilidad de glucosa en el medio. Además el transporte de glucosa en *S. cerevisiae* es por difusión facilitada, mientras que en hongos filamentosos el proceso requiere gasto de ATP. Concretamente en *T. harzianum* se ha aislado un gen que codifica un transportador de glucosa de alta afinidad, *gtt1*, con K_m de 10 a 15 μ M y que aparece en el genoma en copia única (Delgado-Jarana *et al.*, 2003). El incremento del transporte de glucosa en un transformante que expresa una segunda copia del gen apoyan que *gtt1* sea el único gen que codifica un transportador de glucosa de alta afinidad y le confiere un papel importante o esencial en el metabolismo del carbono en *T. harzianum*, puesto que la celulosa, los glucanos y la mayoría de los polímeros que hidroliza dan

glucosa como producto final de hidrólisis. El promotor de este gen tiene varias secuencias de unión a Cre1 y el patrón de expresión sugiere que estas secuencias son funcionales. Además en éste y otros transportadores de hexosas de hongos filamentosos parece que juega un papel importante la regulación por pH. Estos resultados apoyan que el transportador de glucosa codificado por *gtt1* está asociado al simporte de protones, dado que la disponibilidad de este ión es un factor esencial en la regulación por pH en este tipo de sistemas. Es posible que *T. harzianum* bajo un metabolismo respiratorio, alto rendimiento energético, crecimiento lento y con poca disponibilidad de glucosa en el medio, necesite sólo dos transportadores de glucosa, uno de alta y otro de baja afinidad. Además, las situaciones de antagonismo combinadas con la presencia de un transportador de glucosa de alta afinidad permitirían obtener energía

de los polímeros hidrolizados de las paredes celulares incorporando rápidamente las moléculas de azúcar en el interior celular, potenciando la capacidad antagonista con la competición por los nutrientes (Delgado-Jarana *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* es posible que, el hecho de que la fermentación rinda poco ATP obligue a un flujo altísimo de glucosa -mediado por numerosos transportadores- que habitualmente está presente a altas concentraciones pero cuya concentración cambia continuamente durante la fermentación. Estos transportadores también están regulados por la concentración de glucosa, de modo que los de alta afinidad como HXT2, HXT4, HXT6 y HXT7 se expresan a concentraciones bajas de sustrato (Perez *et al.*, 2005). Cuando se sobreexpresa en levaduras HXT2 se acorta sensiblemente el período de latencia previo a la fermentación de mostos. La sobreexpresión en levaduras de un transportador de alta afinidad de hongos filamentosos como Gtt1 permitiría además agotar completamente la fuente de carbono y evitaría la presencia de azúcar residual en los mostos fermentados. La interrupción de otros genes como NGR1 y GID7 da lugar a una mejora del catabolismo de azúcares en cepas vínicas. Los mutantes durante la fermentación de los mostos catabolizan más azúcar por fuente nitrogenada, que suele ser limitante en estos medios y causa común de dificultades en la fermentación. NGR1 está ligado a la respuesta a estrés por altas concentraciones de azúcar, mientras que GID7 interacciona con el transportador de hexosas de alta afinidad HXT7. Es posible que las deleciones de estos genes reduzcan la demanda de nitrógeno y/o eviten la inactivación de HXT7 (Perez *et al.*, 2005).

Por otra parte, la degradación de polímeros orgánicos por *T. harzianum* da lugar fundamentalmente a glucosa, pero también N-acetil-glucosamina, galactosa y manosa. De hecho, junto a la glucosa el otro monómero abundante resultante de la hidrólisis de paredes celulares de hongos es la N-acetil-glucosamina, que *T. harzianum* puede utilizar como fuente de carbono y nitrógeno. El transportador Gtt1 no transporta ni xilosa ni galactosa, ni N-acetilglucosamina, aunque este último azúcar parece ser un inductor específico de su expresión en condiciones en las que la N-acetilglucosamina es fuente de carbono y de nitrógeno. Es posible que haya numerosos transportadores en hongos filamentosos especializados en transportar casi exclusivamente un azúcar, dada la enorme variedad de azúcares que estos hongos pueden metabolizar. En *S. cerevisiae* en cambio casi todos los transportadores se centran en el transporte preferente de glucosa, aunque se pue-

den transportar otros azúcares, como maltosa, fructosa y otras hexosas, con mucha menos afinidad. Puede que la inducción de Gtt1 por N-acetilglucosamina, como monómero resultante de la hidrólisis de quitina, sea el resultado de una respuesta generalizada, derivada de una situación de antagonismo que pretende hidrolizar y asimilar al mismo tiempo, de manera que los hidrolizados de quitina activan simultáneamente toda una batería de genes implicados en *T. harzianum* en distintos procesos y no necesariamente relacionados con el metabolismo de la quitina.

Por otra parte, tanto *S. cerevisiae* como *T. harzianum* son hongos acidófilos moderados, y que bajan el pH por debajo de 2,0 cuando crecen activamente en medios con glucosa y amonio. La expresión de genes en función del pH externo está modulada en hongos por factores de transcripción como PacC en *T. harzianum* y otros hongos filamentosos y RIM101 en *S. cerevisiae* y otras levaduras. Ambos factores de transcripción presentan similitudes en los dedos de zinc, y controlan la expresión de numerosos genes, entre ellos genes de hidrolasas, de transportadores de azúcares, genes de proteínas integrantes de la pared celular y fenómenos como la filamentación en algunos hongos dimórficos. Además controlan la resistencia a estrés osmótico y salino y la producción y resistencia a algunos antibióticos (Peñalva y Arst, 2004).

La incapacidad de *S. cerevisiae* y de *T. harzianum* de crecer a pH alcalino se ha asociado a la necesidad de un ambiente ácido para transportar azúcares y aminoácidos mediante un simporte de protones, o a la toxicidad del amonio, si es ésta la fuente de nitrógeno, cuando aumenta el pH, ya que en estas condiciones se favorece la entrada de NH_3 por difusión frente a la entrada activa de NH_4^+ . En *S. cerevisiae* y otras levaduras se ha propuesto que la deficiencia de hierro y otros elementos es uno de los factores que dificulta el crecimiento a pH alcalino. Cuando se inocula *T. harzianum* en medios con glucosa y amonio, se produce una acidificación asociada al consumo de amonio, puesto que ocurre tanto a altas como a bajas concentraciones de glucosa o con otras fuentes de carbono como glicerol, y no ocurre cuando la fuente de nitrógeno es peptona o caseína. La acidificación no resulta de la liberación de ácidos orgánicos sino posiblemente de H^+ , como ocurre durante la fermentación con *S. cerevisiae*. Esta acidificación no ocurre en presencia de quitina, lo que le asigna un papel tamponador y permite sugerir que en la naturaleza las enzimas hidrolíticas de *T. harzianum* funcionan a intervalos de pH óptimos, entre 4 y 6, propiciados por la

presencia de quitina en las paredes celulares de la mayoría de los hongos y que son degradadas por *T. harzianum*. Como ocurre en *T. harzianum*, en levaduras la fuente de nitrógeno es también un factor importante con influencia en la acidificación del medio. De este modo, cuando es amonio la fuente de nitrógeno se produce un grado de acidificación que no tiene lugar cuando la levadura crece con urea u otras fuentes alternativas al amonio.

Conclusiones

Parece que el ambiente en el que se desarrollan los hongos filamentosos y las levaduras ha condicionado de forma sustancial sus características morfológicas y metabólicas. Las formas filamentosas favorecen los crecimientos invasivos, como hace *T. harzianum* cuando antagoniza un hongo o coloniza una superficie vegetal. La presencia de buenos sistemas de secreción de enzimas extracelulares permite crecer sobre estos sustratos y justifican la enorme versatilidad metabólica, acompañada de sistemas muy específicos de transporte de alta afinidad. Las formas unicelulares se ven favorecidas en medios líquidos como le ocurre a *S. cerevisiae* en las destilerías, las cervecerías o las bodegas, o cuando coloniza un fruto y fermenta el zumo. De esta forma lo que en *T. harzianum* (micelio) y *S. cerevisiae* (levadura) era sólo la fase de un ciclo se convierte en la condición natural de la especie.

El metabolismo del carbono en *S. cerevisiae* se ha especializado en monosacáridos, sobre todo glucosa, que convierte en etanol, al que tolera hasta concentraciones de más del 15% y que puede utilizar como fuente de carbono, lo que le confiere ventajas frente a otros organismos. Además, las funciones metabólicas y de crecimiento de ambos tipos de microorganismos interaccionan con otros factores ambientales como el pH. Por un lado, como resultado del metabolismo se modifica el pH y por otro, el pH condiciona el tipo de respuesta metabólica. Bajo el punto de vista genético, sistemas poco eficaces de recombinación homóloga en hongos filamentosos se ven compensados con grandes reorganizaciones de los cromosomas, que aumentan la variabilidad genética.

En *S. cerevisiae* la meiosis y la recombinación homóloga son muy importantes, pero las cepas industriales han seleccionado otras características como la apomixia o los genomios aneuploides, que les permiten protegerse y al mismo tiempo mantener la constitución genética idónea para el ambiente en el que se encuentran.

Bibliografía

- Benítez, T. y Codón, A.C. Genetic Diversity of Yeasts in Wine Production. *En: Applied Mycology and Biotechnology*, vol 2: Agriculture and Food Production, pp. 19-44. G.G.Khachatourians y D.K.Arora (Eds.), Elsevier Science (2002).
- Benítez, T. y Codón, A.C. Levaduras de vinos de crianza biológica. *En: Microbiología del Vino*, pp. 78-114. A.V. Carrascosa, R.Muñoz y R.González (Coord.), AMV Ediciones (2005).
- Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C. y Codón, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7. 249-260 (2004)
- Castrejón, F., Martínez-Force, E., Benítez, T. y Codón, A.C. Genetic analysis of apomictic wine yeasts. *Curr. Genet.* 45: 187-196 (2004).
- Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M.A. y Benítez, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of gtt1. *Eucaryot. Cell* 2: 708-717 (2003).
- Halme, A., Bumgarner, S., Styles, C. y Fink, G.R. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell* 116: 405-415 (2004).
- Harman, G., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. y Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43-56 (2004).
- Kubicek, C.P. y Harman, G.E. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*, vols. 1 y 2. Taylor and Francis (1998).
- Martínez, P., Valcárcel, M.J., Pérez, L. y Benítez, T. Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49: 240-250 (1998).
- Peñalva, M.A. y Arst, H.N.Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 58; 425-451 (2004).
- Perez, M., Luyten, K., Michel, R., Riou, C. y Blondin, B. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* hexose carrier expression during wine fermentation: both low- and high-affinity Hxt transporters are expressed. *FEMS Yeast Res.* 5: 351-361 (2005).
- Randez-Gil, F., Aguilera, J., Codón, A.C., Rincón, A.M., Estruch, F. y Prieto, J.A. Baker's yeast: challenges and future prospects. *En: Topics in Current Genetics*, vol. 2: Functional Genetics of Industrial Yeasts. pp. 57-92. J.H.de Winde (Ed.) Springer (2003).
- Rey, M., Ohno, S., Pintor-Toro, J.A., Llobell, A. y Benítez, T. Unexpected homology between inducible cell wall protein QID74 of filamentous fungi and BR3 salivary protein of the insect *Chironomus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6212-6216 (1998).
- Reynolds, T.B. y Fink, G.R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation. *Science* 291: 878-881 (2001).

DITTMAR, T., ZAENKER, K. S., SCHMIDT, A., **Infection And Inflammation: Impacts on Oncogenesis (Contributions to Microbiology)**. S Karger Pub, 2006. 246 pp. ISBN 3805580649. 211,00 \$.

MASKELL D., MASTROENI, P. **Salmonella Infections : Clinical, Immunological and Molecular Aspects (Advances in Molecular and Cellular Microbiology)**. Cambridge University Press, 2006. 400 pp. ISBN: 0521835046. 130,00 \$

TAXONOMÍA Y BIODIVERSIDAD

LOGAN, N. A., LAPPIN-SCOTT H. M., OYSTON, P. C. F.

Prokaryotic Diversity: Mechanisms and Significance (SGM Symposia). Cambridge University Press, 2006. 314 pp. ISBN: 0521869358. 130 \$.

VIROLOGÍA

CASEY, J. **Hepatitis Delta Virus (Current Topics in Microbiology and Immunology)**. Springer, 2006. 242 pp. ISBN: 3540298010. 129,00 \$.

ROY, P. **Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis (Current Topics in Microbiology and Immunology)**. Springer, 2006. 288 pp. ISBN: 3540307729. 139,00 \$.

Crítica de libros

MARÍN I, SANZ JL, AMILS R (Eds.) **Biotechnología y Medioambiente**. Editorial Ephemera, Madrid. 2005. ISBN 84-609-7344-1. 309 pp. 35 €



A la hora de recomendar libros que ayuden al alumno en la preparación de una asignatura, muchas veces nos encontramos ante la necesidad de utilizar tratados en inglés, debido a la carencia de libros originales en español o bien de traducciones de esas referencias anglosajonas.

Personalmente, creo que nuestros alumnos consultan esos libros en inglés en muy pocas ocasiones. Existe, por regla general, una laguna notable de textos científicos en nuestro propio idioma. El caso que nos ocupa hoy viene a "desechar" un poco esa laguna. Por eso es de alabar que autores, editores y patrocinadores hayan decidido llevar esta monografía a la imprenta. La elaboración de estos materiales de una forma instructiva es algo costoso aún cuando entren dentro de nuestro campo de investigación. Y esto es lo que han hecho en este libro un buen número de autores, referentes nacionales e internacionales en sus respectivos campos. La diversa procedencia de éstos muestra también la diversidad de temas, puntos de vista y aproximaciones técnicas en la resolución de diversos problemas medioambientales que permiten que el lector tome conciencia del vasto campo que se le introduce en tan pocas páginas.

Esta obra consta de 15 capítulos, un glosario y

un índice de términos. Al comienzo del libro se desglosa el contenido de cada uno de los capítulos en forma de índice (ocupando 15 páginas), pero no existe un índice común abreviado que dirigiera a los lectores directamente al capítulo de su interés y, así, deben hojear varias páginas observando los contenidos de cada uno de los capítulos hasta dar con aquel en el que están interesados. De estos 15 capítulos, los tres primeros recogen aspectos generales de la tecnología utilizada en la resolución de problemas medioambientales mediante la biotecnología y por sí solos constituyen un fabuloso bloque introductorio: el primero es un resumen de lo que se nos explica en el libro, mientras que el segundo muestra la metodología molecular básica utilizada y el tercero explica los conceptos básicos y tecnicismos de la biorremediación. A partir de ahí en cada uno de los capítulos se aborda un problema ambiental concreto solucionado mediante diversas estrategias que involucran a seres vivos o bien una metodología específica. Así, se muestra la biodegradación del petróleo, la de compuestos aromáticos o polímeros difíciles de degradar o el secuestro de metales, pero también el tratamiento de aguas residuales, el compostaje o la fitoremediación. El último capítulo se reserva a un tema importante desde el punto de vista de la aplicación de los conocimientos básicos que podemos obtener en el laboratorio: la solicitud de patentes a partir de microorganismos, siendo especialmente esclarecedor y claro acerca de los pasos a seguir para la obtención de una patente de este tipo. Todos los capítulos comienzan con una muy acertada revisión de su campo en la introducción pero el desarrollo posterior, en algunos casos, se convierte en una aplicación del método del caso, en el cual se muestra un solo ejemplo de la metodología a la que está dedicada el capítulo. A pesar de la cuidada selección de la temática incluida existen aspectos que no son

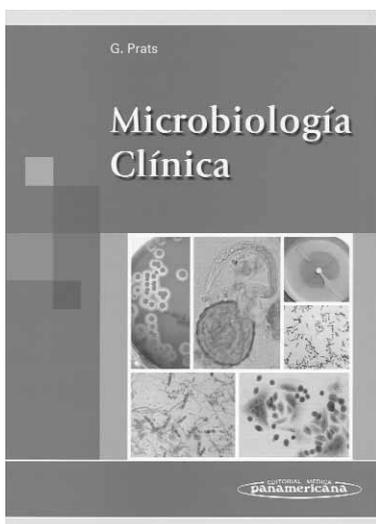
suficientemente cubiertos y que quizá pudieran ser añadidos en una segunda edición de esta obra, como son la bioextracción de metales con fines industriales o la biodescontaminación de suelos o metodologías muy novedosas como la utilización del proceso de anammox en la eliminación del amonio de las aguas residuales.

Si bien en algunas ocasiones la información facilitada es excesiva para alumnos de Primer y Segundo Ciclo de nuestras licenciaturas, es posible utilizar este libro como base de diversos temas de un curso de Microbiología Ambiental o de Ecología Microbiana, y nuestros alumnos de Tercer Ciclo apreciarán esa información adicional que, en algunos capítulos, incluye protocolos para su desarrollo en el laboratorio de investigación. Los esquemas incluidos son de fácil comprensión y apoyan en todo momento el desarrollo del texto. Es de destacar el precio del libro, especialmente asequible para los estudiantes.

Para acabar, la elaboración de manuales como este debería servir de acicate para la publicación en español de otros en diversas áreas de la Microbiología de los cuales nos encontramos huérfanos no sólo en España, sino en Hispanoamérica. La razón no sólo es el idioma, sino la presentación de datos y experiencias españolas, europeas e hispanoamericanas.

Federico Navarro

PRATS G. **Microbiología Clínica**. Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2006. ISBN 84-7903-971-X. 366 pp. 49 €



Este libro llena un hueco importante en la formación de microbiólogos clínicos. En la enseñanza de esta materia es necesario alternar entre voluminosos tratados de enfermedades infecciosas, tratados generales de Microbiología que resultan insuficientes en los aspectos clínicos, y manuales de laboratorio, demasiado

exhaustivos en el tratamiento de protocolos y de microorganismos muy raros. El libro del Profesor Guillem Prats consigue mantener ese difícil equilibrio, resultando una obra excelente para la enseñanza de esta disciplina en las distintas licencia-

turas biosanitarias, así como en la formación de técnicos de laboratorio.

El contenido se divide en tres partes. La primera se reduce a un capítulo que resumen los principales conceptos básicos sobre microorganismos, infección, enfermedad, transmisión, diagnóstico y tratamiento.

Sigue la parte más importante, dedicada a una cuidadosa descripción de la técnicas empleadas en bacteriología, micología, virología y parasitología, y que incluye capítulos sobre ensayos de sensibilidad a antimicrobianos, técnicas inmunológicas, genéticas, epidemiología y seguridad en el laboratorio. Mientras que en virología se sigue la taxonomía aceptada, no ocurre lo mismo en bacteriología, donde prima una clasificación estrictamente práctica, basada en la forma de cultivo. Es adecuada para la finalidad del libro, pero se agradecería algún comentario sobre taxonomía bacteriana y una referencia al Manual de Bergey. A este respecto, el autor ya advierte que no va a introducir la clasificación filogenética de Woese y mantiene una de dos reinos (como defiende Ernst Mayr).

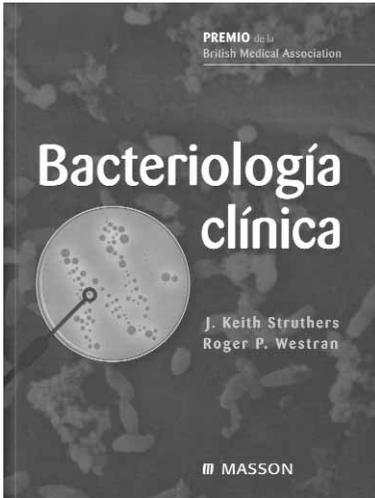
En la tercera parte se estudian los principales síndromes infecciosos, describiendo la etiología, la toma de muestras y el diagnóstico de laboratorio. En el capítulo de Infecciones oportunistas se incluye una descripción de los mecanismos de defensa que posiblemente hubiese sido más útil en la primera parte del libro. No se ha incluido en estos capítulos ningún aspecto relacionado con el tratamiento; aunque es muy loable limitar las dimensiones del volumen, máxime considerando que existen buenos manuales de quimioterapia antiinfecciosa, se echa en falta alguna información sobre los antimicrobianos frente a los que debe ensayarse la sensibilidad de los microorganismos aislados, y sobre los problemas de resistencia que pueden plantear algunos de ellos.

Un apéndice recoge los protocolos detallados agrupados por capítulos, incluyendo algunos comerciales; ni siquiera el flameado del asa de siembra escapa a la descripción.

A lo largo de toda la obra destaca la calidad y oportunidad de las imágenes, y sobre todo la excelente redacción. El Profesor Prats consigue hacer amenas la técnicas más tediosas y mantiene en todo momento un tono didáctico que hace honor a su experiencia docente. El idioma está perfectamente cuidado, evitando los usuales anglicismos y formas coloquiales a los que nos tienen acostumbrados muchas traducciones. Y la editorial Panamericana ha estado a la altura del autor en su presentación, ofreciendo además un precio tan ajustado que no puede ser motivo de disculpa por parte de los alumnos.

En conjunto, una magnífica obra que no debe faltar en facultades, escuelas ni laboratorios.

STRUTHERS JK, WESTRAN RP. **Bacteriología Clínica**. Editorial Masson, Barcelona, 2005. ISBN 84-458-1449-4. 192 pp. 40 €



Es un pequeño y bien ilustrado volumen que recoge aspectos básicos de la etiología, patogénesis, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Está organizado en torno a una multitud de esquemas y tablas que a veces remachan y otras amplían las descripciones del texto. Por ejemplo,

cada microorganismo está representado por un icono (morfología y tinción en el caso de las bacterias) que se repite cada vez que la especie es citada, de modo que el alumno debe acabar inconscientemente familiarizado con esas características básicas. Aunque el texto puede parecer muy breve, hay que tener en cuenta que la tipografía es más bien pequeña (10 pt).

Tras una breve introducción a la bacteriología, sigue un buen capítulo sobre la patogénesis de las enfermedades infecciosas, otro en el que se describen las técnicas de identificación (microbiológicas, inmunológicas y moleculares) y un cuarto dedicado a los antibióticos, mientras que el último capítulo trata del control de las infecciones. El grueso del libro está dedicado a describir los principales síndromes infecciosos, y en ellos se describe de forma muy equilibrada la etiología, la patogénesis y el diagnóstico, con un apartado final de "cuestiones sanitarias" con interesantes aspectos epidemiológicos.

El título señala que se trata de un manual de bacteriología; es así en los capítulos generales, pero en los capítulos dedicados a las enfermedades infecciosas existe más bien una falta de criterio: en algunos se incluyen los virus con bastante detalle, en otros se citan de pasada y en algunos no se mencionan en absoluto (por ejemplo, en infecciones del sistema nervioso central). Esta es la principal crítica que puede hacerse, ya que las ausencias pueden engañar al estudiante no advertido. Es una verdadera lástima que no se haya hecho el esfuerzo de convertirlo en un verdadero

manual de Microbiología, que podía haberse conseguido con pocas páginas más.

Un error bastante llamativo es el de utilizar en todo el texto el término "coliformes" como sinónimo de *Enterobacteriaceae*, cuando en realidad está limitado a las enterobacterias fermentadoras de lactosa y su uso concierne al análisis de indicadores de contaminación, pero no es habitual en microbiología clínica. De hecho, al definir "coliformes" (pág. 42) da como principales ejemplos *Salmonella* y *Shigella*, que obviamente no lo son. Especies de *Clostridium*, como *C. tetani*, aparecen clasificadas como aerobias/facultativas, cuando son anaerobias estrictas (Pág. 32). También es falso que el virus de la rubéola –un Togavirus– pertenezca a la familia *Flaviviridae* (pág. 147) o que actualmente *Coxiella burnetii* "pertenece a la familia bacteriana de las rickettsiosis (*sic*)" (pág. 95). La vacuna BCG y la prueba de la tuberculina se presentan como "Otros tratamientos de la tuberculosis" (pág. 112), y como actividad de la DNA girasa se da la "separación de una molécula de ADN", en lugar del corte de una cadena (Fig. 14a). Hay algunos otras afirmaciones discutibles, como el tratamiento recomendado para las gonococias, pese a que en otros muchos casos la información terapéutica es muy amplia y actualizada.

La traducción de las abreviaturas es siempre objeto de discusión, y no parece acertado haberlo hecho con algunas muy conocidas, como MHC –que aparece como "CPH"–, o TCR –como "RCT"–, máxime cuando se mantienen acertadamente TNF, PCR o MRSA (pero no MDRT para referirse a tuberculosis multirresistente, sino "TRMF"). Y el uso de la abreviatura "ANO₂" para anaerobiosis no es realmente clarificador (pág. 36). Explicar las siglas TPHA como "hemoaglutinación de *Treponema pallidum*" o TPPA como "aglutinación de partículas de *T. pallidum*" es poco exacto y puede inducir a error. Las carbapenemas aparecen como "carbapenems" y los cultivos de enriquecimiento se convierten en "cultivos enriquecidos".

Si lo comparamos con la obra de G. Prats arriba reseñada, el enfoque de éste es más el de un texto de fácil comprensión, y carece de la amplitud del libro de Prats en la descripción de las técnicas de diagnóstico de laboratorio, pero incorpora información sobre el tratamiento, por lo parece más dirigido a los alumnos de medicina que a futuros microbiólogos clínicos. Esperamos que la próxima edición aparezca más completa, ya como Microbiología Clínica. En su presentación actual, el principal inconveniente es el precio, claramente excesivo para el número de páginas y la encuadernación.

Rafael Rotger