

R. 15993



# Síntesis de giberelinas y transformación integrativa en *Gibberella fujikuroi*

Trabajo realizado en el Departamento de Genética,  
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al  
grado de Doctor en Biología por el Licenciado

**Rafael Fernández Martín**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Rafael Fernández Martín".

**Sevilla, 1.998**

**Directores**

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Enrique Cerdá Olmedo".

**Dr. Enrique Cerdá Olmedo**  
Catedrático de Genética

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Javier Ávalos Cordero".

**Dr. Javier Ávalos Cordero**  
Profesor Titular de Genética

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS

24

140  
04 DIC. 1997

508

El Jefe del Departamento de Física

Ruiz de Alcazar

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Departamento de Opto-Física  
Facultad de Ciencias  
C/Recoletas s/n Sevilla 41013  
Teléfono 3592111 Fax 3592112  
9/1/98

9 de Enero de 1998  
EL DIRECTOR DE

| C a r e r o .

TD-384



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Síntesis de gibberinas y transformación integrativa en Gibbella Fujikuroi sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado: Rafael Fernández Martín

Sevilla, a 16 de Febrero de 1998

*A la memoria de mi padre*

**Índices**

# ÍNDICE GENERAL

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 El organismo	2
1.2 Las giberelinas	3
1.2.1 Biosíntesis de giberelinas	5
1.2.2 Mutantes de la síntesis de giberelinas	9
1.2.2.1 Mutantes de la síntesis de giberelinas en plantas	9
1.2.2.2 Mutantes de la síntesis de giberelinas en <i>Gibberella</i>	10
1.2.3 Aislamiento de genes de la síntesis de giberelinas	10
1.2.4 Regulación de la síntesis de giberelinas en <i>Gibberella</i>	11
1.2.5 Biosíntesis de esteroides y carotenoides	12
1.3 Transformación de hongos filamentosos	13
1.3.1 Entrada del ADN exógeno	14
1.3.2 Marcadores de transformación	14
1.3.3 Mantenimiento del ADN exógeno	15
1.3.4 Transformación de <i>Gibberella</i>	17
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
<b>Resultados 1. Síntesis de giberelinas</b>	<b>19</b>
2.1 Mutantes <i>gib</i>	20
2.1.1 Producción de giberelinas y otros terpenoides	20
2.1.2 Síntesis de kaureno <i>in vitro</i>	23
2.2 Síntesis de giberelinas en mutantes albinos	25
2.3 Regulación de la síntesis de giberelinas	26
2.3.1 Represión	27
2.3.2 Inducción	29
2.3.3 Requerimientos de síntesis de proteínas para la producción de giberelinas	31
2.3.4 Aminoácidos como fuente de nitrógeno	33
<b>Resultados 2. Transformación integrativa</b>	<b>34</b>
3.1 Transformación a resistencia a higromicina	35
3.1.1 Caracterización de la secuencia repetida	38

3.1.2	Número de ejemplares por genomio de las secuencias de 6 kb de ADN de <i>Gibberella</i> clonadas en pAN7-1	38
3.1.3	Estabilidad de la transformación	41
3.1.4	Estructura de los genomios transformados	42
3.2	Disrupción del gen de la deshidrogenasa del fitoeno	47
3.2.1	Clonación de un fragmento del gen de la deshidrogenasa del fitoeno	47
3.2.2	Complementación por transformación de un mutante <i>carB</i>	51
3.2.3	Mutación dirigida y sustitución alélica	51
3.2.4	Estructura de los genomios de los transformantes y de sus descendientes albinos	55
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>59</b>
4.1	Síntesis de giberelinas	60
4.1.1	Mutantes <i>gib</i>	60
4.1.2	Regulación de la síntesis de giberelinas	64
4.2	Transformación integrativa	65
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>68</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>		<b>70</b>
6.1.	Estirpes y plásmidos	71
6.1.1	Estirpes	71
6.1.2	Plásmidos	72
6.2	Medios de cultivo	73
6.2.1	Medios de cultivo para <i>Gibberella</i>	73
6.2.1.1	Medio mínimo	73
6.2.1.2	Medio nutritivo	74
6.2.1.3	Medio de germinación	74
6.2.1.4	Medio de esporulación	74
6.2.1.5	Medio mínimo ICI	74
6.2.1.6	Medio mínimo ICI con exceso nitrógeno	74
6.2.1.7	Glucosa y microelementos	74
6.2.1.8	Medio para la obtención de protoplastos	75
6.2.1.9	Medios selectivos	75

6.2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	75
5.2.2.1 Medio nutritivo LB	75
5.2.2.2 Medio SOC	75
6.2.2.3 Antibióticos y compuestos añadidos a medios bacterianos	75
6.3 Protocolos de biología molecular	76
6.3.1 Transformación de <i>Gibberella</i>	76
6.3.1.1 Preparación de protoplastos	76
6.3.1.2 Transformación	76
6.3.2 Transformación de <i>E. coli</i>	77
6.3.3 Extracciones de ADN	77
6.3.3.1 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	77
6.3.3.2 Extracción de ADN genómico de <i>Gibberella</i>	77
6.3.4 Cuantificación de ADN	78
6.3.5 Manipulación enzimática del ADN	78
6.3.5.1 Digestiones	78
6.3.5.2 Relleno de extremos de moléculas de ADN	79
6.3.5.3 Ligaciones	79
6.3.5.4 Separación de fragmentos de ADN	79
6.3.5.5 Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa	80
6.3.6 Detección de secuencias de ADN por hibridación en filtro	80
6.3.6.1 Preparación de sondas	80
6.3.6.2 Transferencia y fijación del ADN	80
6.3.6.3 Prehibridación e hibridación	81
6.3.6.4 Detección	81
6.3.6.5 Reutilización de las membranas	81
6.3.7 Amplificación <i>in vitro</i> de ADN con la polimerasa <i>Taq</i> (PCR)	82
6.3.8 Secuenciación de ADN	82
6.4 Inoculación y condiciones de cultivo de <i>gibberella</i>	83
6.4.1 Conservación de las estirpes	83
6.4.2 Obtención de microconidios	84
6.4.3 Condiciones de cultivo	84

---

6.5 Tratamientos mutagénicos	84
6.6 Medidas de los cultivos de <i>gibberella</i>	84
6.6.1 Masa seca	84
6.6.2 Giberelinas	85
6.6.2.1 Por fluorescencia	85
6.6.2.2 Por cromatografía de gases	85
6.6.3 Carotenoides	86
6.6.4 Proteínas	86
6.6.5 Aminoácidos	86
6.7 Biosíntesis de terpenoides <i>in vitro</i>	87
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>88</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Contenido en giberelinas, carotenos y fujenal de los mutantes <i>gib</i>	22
<b>Tabla 2.</b> Producción de carotenoides y giberelinas en mutantes albinos	25
<b>Tabla 3.</b> Transformación de <i>Gibberella</i> a resistencia a higromicina	37
<b>Tabla 4.</b> Estabilidad de la transformación	42
<b>Tabla 5.</b> Contenido en carotenoides en la complementación	51
<b>Tabla 6.</b> Análisis de los transformantes secundarios con pTCB1 y pTCB2, plásmidos que contienen alelos nulos del gen <i>carB</i>	54
<b>Tabla 7.</b> Contenido en carotenoides de los micelios de los segregantes albinos del transformante con pTCB1	54
<b>Tabla 8.</b> Estirpes de <i>Gibberella fujikuroi</i> utilizadas en este trabajo	71
<b>Tabla 9.</b> Oligonucleótidos empleados en esta Tesis	82

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Esqueleto <i>ent</i> -giberelano	4
<b>Figura 2.</b> Síntesis de giberelinas desde mevalonato hasta el aldehído de GA <sub>12</sub> .	6
<b>Figura 3.</b> Síntesis de las giberelinas mayoritarias en <i>Gibberella fujikuroi</i> desde el aldehído de GA <sub>12</sub>	8
<b>Figura 4.</b> Modificaciones de las giberelinas GA <sub>3</sub> y GA <sub>7</sub>	21
<b>Figura 5.</b> Síntesis de terpenoides <i>in vitro</i> de los mutantes <i>gib</i>	24
<b>Figura 6.</b> Síntesis de terpenoides <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> con y sin exceso de nitrógeno	27
<b>Figura 7.</b> Represión de la síntesis de giberelinas	28
<b>Figura 8.</b> Inducción de la síntesis de giberelinas	30
<b>Figura 9.</b> Efecto de la cicloheximida en la inducción de la giberelinas	31
<b>Figura 10.</b> Efecto de la cicloheximida en la síntesis de terpenoides	32
<b>Figura 11.</b> Síntesis de terpenoides <i>in vitro</i> con distintos aminoácidos como fuentes de nitrógeno	33
<b>Figura 12.</b> Resultado de una transformación	36
<b>Figura 13.</b> Comparación de los genes 25S de ARN ribosómico	39
<b>Figura 14.</b> Cuantificación de las secuencias de 6 kb	40
<b>Figura 15.</b> Integración homóloga de pU1	44
<b>Figura 16.</b> Integración homóloga de pU2	45
<b>Figura 17.</b> Integración homóloga de pU3	46
<b>Figura 18.</b> Disrupción génica en un solo paso	47
<b>Figura 19.</b> Comparación de las deshidrogenasas del fitoeno	48
<b>Figura 20.</b> Clonación del gen <i>carB</i>	50
<b>Figura 21.</b> Localización del gen <i>carB</i>	50
<b>Figura 22.</b> Reemplazamiento de alelos en dos pasos	52

---

<b>Figura 23.</b> Revertiente albino derivado de un transformante secundario	53
<b>Figura 24.</b> Identificación del alelo <i>carB</i>	56
<b>Figura 25.</b> Hibridación de los transformantes con los alelos mutantes del gen <i>carB</i> y los albinos derivados del transformante T1.1	57
<b>Figura 26.</b> Esquema de las regiones que contienen el alelo <i>carB</i> en los transformantes y en los albinos	58

## **Introducción**

## 1.1 EL ORGANISMO

El trabajo de esta Tesis se ha desarrollado fundamentalmente con la estirpe IMI58289 de *Gibberella fujikuroi*, estado perfecto de *Fusarium moniliforme*.

El género *Fusarium* fue definido por Link en 1809 (citado en Booth, 1971) y agrupa muchos hongos imperfectos con esporas fusiformes, denominadas conidios. Este género incluye patógenos de plantas con interés económico, lo que ha espoleado la atención de los investigadores (Booth, 1971). *Fusarium moniliforme* se incluye en la sección *Liseola*, una de las 16 secciones en las que se divide el género. La mayoría de las estirpes del género *Fusarium* con ciclo sexual se han transferido a los géneros *Nectria*, *Calonectria* y *Gibberella*, que pertenecen al orden *Hypocreales*, a la subclase *Ascomycotina* y a la clase *Euascomycetes* (Nelson *et al.*, 1983). A esta clase también pertenecen los géneros *Neurospora*, *Aspergillus* y *Saccharomyces*.

Los taxónomos reconocen en el género *Gibberella* 15 especies distintas (Nelson *et al.*, 1983), entre las que destacan *G. fujikuroi*, *G. pulicaris*, *G. zae* y *G. subglutinans*. En esta Tesis nos referiremos con el nombre del género a *Gibberella fujikuroi*.

*Gibberella* es un hongo haplonte y heterotálico con un sistema sexual con dos alelos (+) y (-) de un único gen (Sidhu, 1983a). Dentro de esta especie se incluyen al menos seis grupos de cruzamiento, denominados con letras desde la A a la F (Kuhlman, 1983; Leslie, 1991; Klittich y Leslie, 1992), que corresponden realmente a especies independientes, cada una de las cuales parasita preferentemente una determinada especie de planta (Kuhlman, 1983; Leslie, 1991; Voigt *et al.*, 1995). La estirpe IMI58289 es patógena del arroz y pertenece presumiblemente a la especie genética C.

El ciclo sexual de *Gibberella* se reproduce en condiciones de laboratorio añadiendo conidios de la estirpe de sexo (+) sobre micelio de la estirpe (-) crecido en un medio apropiado (Sidhu, 1983a; Klittich y Leslie, 1988). Tras varios días de incubación se forman peritecios, estructuras especializadas que contienen ascosporas desordenadas. Las especies genéticas de *Gibberella* difieren en su capacidad de reproducción sexual, y C está entre las menos fértiles.

En *Gibberella* se han descrito estirpes heterocariontes, aisladas de la naturaleza (Sidhu, 1983b) o conseguidas en el laboratorio por anastomosis (Ming *et al.*, 1966; Correll *et al.*, 1987; Adams *et al.*, 1987) o por fusión de protoplastos

(Adams *et al.*, 1987). Es frecuente la incompatibilidad vegetativa, o incapacidad de formar heterocariontes unas estirpes con otras (Puhalla y Spieth, 1983 y 1985), y la autoincompatibilidad, o incapacidad de formarlos con ella misma (Correll *et al.*, 1989). Nuestra estirpe es autoincompatible (Sánchez-Fernández, comunicación personal) y no se conocen estirpes compatibles vegetativamente con ella.

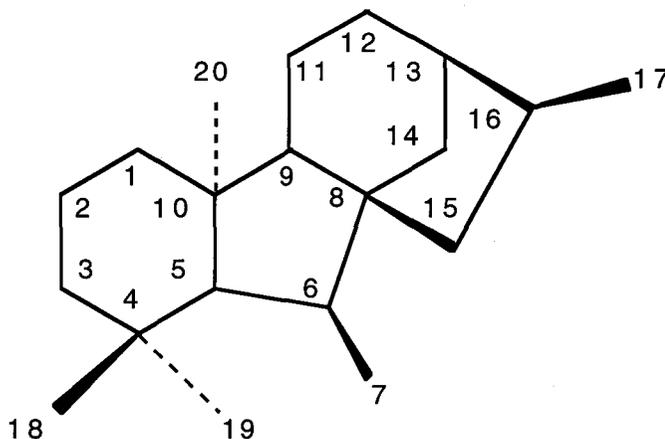
*Gibberella* se reproduce asexualmente mediante esporas denominadas conidios. Se distinguen dos tipos de conidios: los microconidios, pequeños, fusiformes y uninucleados; y los macroconidios, más grandes, arqueados, tabicados y presumiblemente multinucleados (Kuhlman, 1983). La estirpe empleada en esta Tesis, como la mayoría de estirpes del grupo C, prácticamente solo produce microconidios. La presencia de un solo núcleo en estos conidios facilita el aislamiento de estirpes con mutaciones recesivas (Avalos *et al.*, 1985). La exposición de los microconidios de *Gibberella* a diversos tratamientos físicos y químicos produce elevadas tasas de mutación (Puhalla y Spieth, 1983; Avalos *et al.*, 1985; Koelblin *et al.*, 1990).

Las estirpes de *Gibberella* producen muchos metabolitos secundarios, entre los que destacan por su relevancia algunas toxinas. Algunas de estas afectan a la especie humana (Marasas *et al.*, 1988) y a animales domésticos (Uhlinger, 1997) a través del consumo de alimentos vegetales contaminados. Destacan tres familias: las fumonisinas (Gelderblom *et al.*, 1988), las fusarinas (Gelderblom *et al.*, 1984; Steyn y Vlegaar, 1985; Barrero *et al.*, 1991) y las bicaverinas (Balan *et al.*, 1970). Otros metabolitos secundarios relevantes producidos por *Gibberella* son los carotenoides y las giberelinas. Estos compuestos de la familia de los terpenoides carecen de toxicidad. Los carotenoides son acumulados en cantidades similares por especies de *Gibberella* pertenecientes a distintos grupos de cruzamiento (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987), mientras que las giberelinas solo son producidas por estirpes del grupo C.

## 1.2 LAS GIBERELINAS

Las giberelinas son un amplio grupo de terpenoides que poseen en común una estructura tetracíclica, el esqueleto *ent*-giberelano (Fig. 1). La nomenclatura sistemática se realiza a partir de dicho esqueleto, pero normalmente se denominan por sus nombres triviales giberelina 1, giberelina 2, giberelina 3, ...; o abreviados GA<sub>1</sub>, GA<sub>2</sub>, GA<sub>3</sub>, ... Las giberelinas son hormonas de las plantas, en las que inducen el crecimiento y regulan el desarrollo. Se han identificado 108 giberelinas (MacMillan, 1996), y continúan encontrándose otras nuevas. La mayoría de ellas solo se han encontrado en plantas, otras son compartidas por *Gibberella* y

plantas, y algunas se han encontrado solo en *Gibberella* (Mander, 1992; MacMillan, 1996).



**Figura 1. Esqueleto *ent*-giberelano.** Esquema del esqueleto de las giberelinas con las posiciones de los átomos de carbono.

Las giberelinas se descubrieron como resultado de las investigaciones sobre una enfermedad del arroz conocida en Japón como *bakanae*. Las plantas que padecen la enfermedad son más delgadas y largas que las normales y sus frutos están ausentes o muy poco desarrollados (Phinney, 1983). En 1898 Hori (citado en Phinney, 1983) detectó que la enfermedad era causada por un hongo. Las investigaciones culminaron con la identificación de un compuesto, que se denominó giberelina, presente en los caldos de cultivo del hongo y capaz de inducir un crecimiento anormal en plántulas de diversas especies (Yabuta *et al.*, 1935, citado en Phinney, 1983). Dicho hongo fue clasificado como *Fusarium moniliforme*, y posteriormente reclasificado como *Gibberella fujikuroi*. Años después se encontraron sustancias con las mismas propiedades estimuladoras del crecimiento en extractos de semillas inmaduras de soja y su análisis químico reveló que también eran giberelinas (Mitchell *et al.*, 1951). Las giberelinas se encuentran en todas las plantas (Radley, 1956; Phinney y West, 1960; Elson, 1964), en algunos hongos (Tudzynski, 1997), como *Sphaceloma manihoticola* (Rademacher y Graebe, 1979), y en procariontes, como *Azospirillum brasilense* (Janzen *et al.*, 1992).

Las giberelinas, por su acción sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, tienen numerosas aplicaciones. El uso de las giberelinas está muy extendido en la industria cervecera, para acortar el tiempo de malteado, y en cultivos de caña de azúcar, cítricos, uvas y hortalizas tempranas, para mejorar la cantidad y calidad de la producción (Martin, 1983; Brückner *et al.*, 1989).

### 1.2.1 Biosíntesis de giberelinas

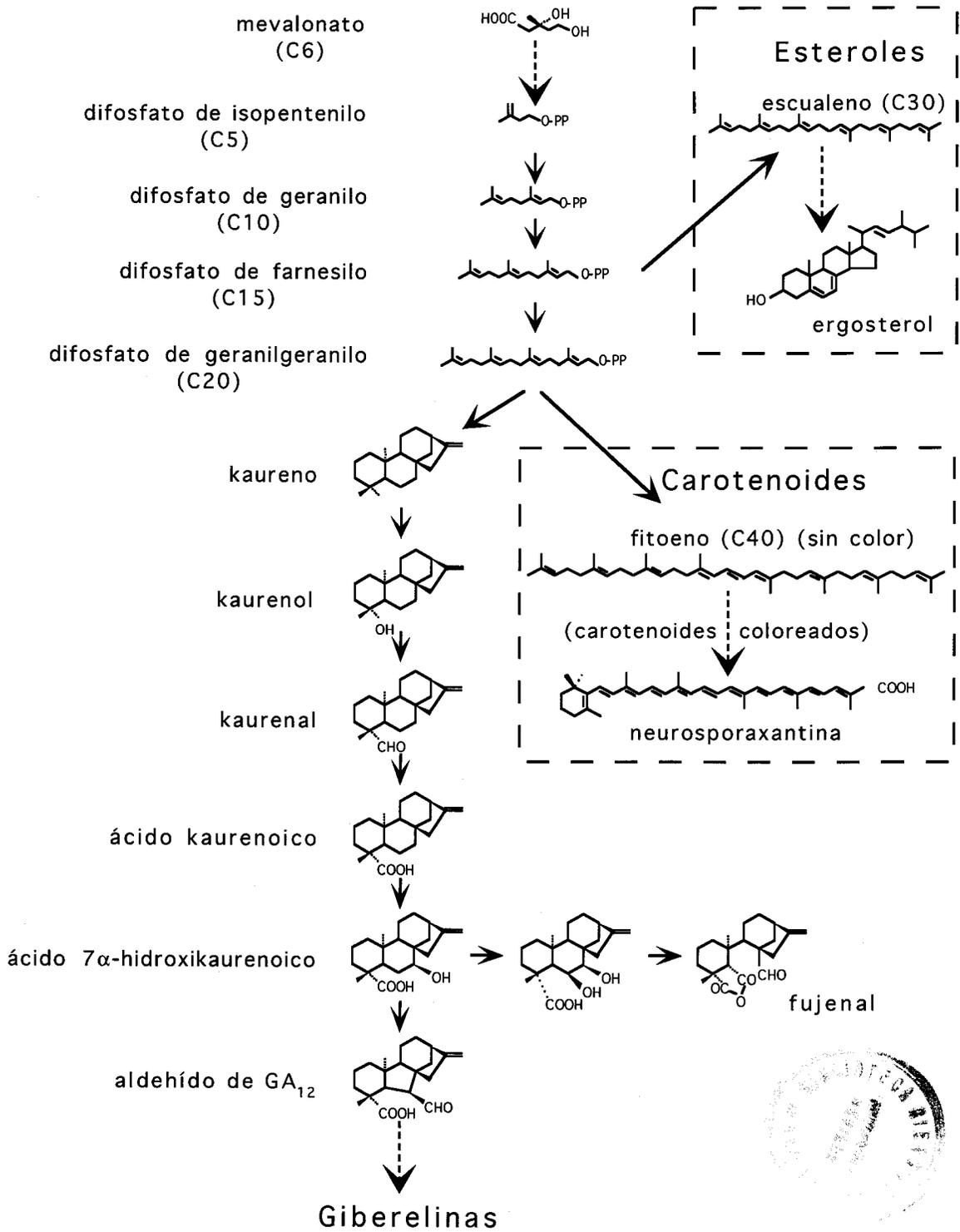
Como todos los terpenoides, las giberelinas proceden del difosfato de isopentenilo. Este compuesto se puede sintetizar por dos rutas biosintéticas diferentes. La primera, considerada durante mucho tiempo como única, usa como intermediarios el hidroximetilglutaril-CoA y el mevalonato; la otra, recientemente descubierta, usa como intermediario el fosfato de gliceraldehído y el piruvato (Rohmer *et al.*, 1993). La ruta a través de mevalonato se da en eucariontes y la del gliceraldehído en procariontes y en los cloroplastos de las plantas.

Los experimentos de alimentación con mevalonato radioactivo, tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que las giberelinas se sintetizan, en *Gibberella* y en plantas, por la vía del mevalonato (Birch *et al.*, 1958; Coolbaugh, 1983; Domenech *et al.*, 1996). En la Figura 2 se muestran los pasos de la parte inicial de la ruta, desde el mevalonato hasta el aldehído de GA<sub>12</sub>, la primera molécula con el esqueleto *ent*-giberelano.

La ruta biosintética de las giberelinas comparte sus primeras reacciones con las síntesis de otros terpenoides, como los esteroides y los carotenoides (Fig. 2). En *Gibberella* se detectan también otros terpenoides menos conocidos que comparten los primeros pasos de la ruta con las giberelinas; entre ellos se incluyen: 1) el fujenal (Cross *et al.*, 1963) (Fig. 2) y el gibelactol (Barrero *et al.*, 1992), que derivan del ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico; 2) las kaurenolidas (Beale *et al.*, 1982), que proceden del ácido kaurenoico; 3) el ciclonerodiol (Cross *et al.*, 1971), que se sintetiza a partir del difosfato de farnesilo; y 4) las gibepironas (Barrero *et al.*, 1993), posiblemente derivadas del difosfato de geranilo.

Un paso crítico en la síntesis de giberelinas es la ciclación del difosfato de geranilgeranilo para dar kaureno, el primer diterpeno tetracíclico en la ruta. Las enzimas que convierten el mevalonato en kaureno están en la fracción soluble citosólica (Hedden, 1983). Se han desarrollado sistemas libres de células que sintetizan kaureno a partir de mevalonato (Graebe *et al.*, 1965; Coolbaugh, 1983). En muchos casos, la síntesis de kaureno *in vitro* ha sido utilizada como indicadora de la síntesis de giberelinas *in vivo* (Coolbaugh, 1983; Coolbaugh y Moore, 1969).

La purificación parcial de la sintetasa del kaureno de *Gibberella* permitió su caracterización bioquímica (Fall y West, 1971). Se trata de un complejo soluble de dos actividades enzimáticas cuyo intermediario es el difosfato de copalilo. La actividad de síntesis del difosfato de copalilo se denomina actividad A y su conversión en kaureno, actividad B. En *Marah macrocarpus* se ha purificado el



**Figura 2.** Biosíntesis de giberelinas desde mevalonato hasta el aldehído de GA<sub>12</sub>. Se incluyen otros terpenoides sintetizados por *Gibberella* (carotenoides, esteroles y fujenal) de relevancia en esta Tesis. Las flechas con trazos discontinuos indican más de una reacción enzimática.

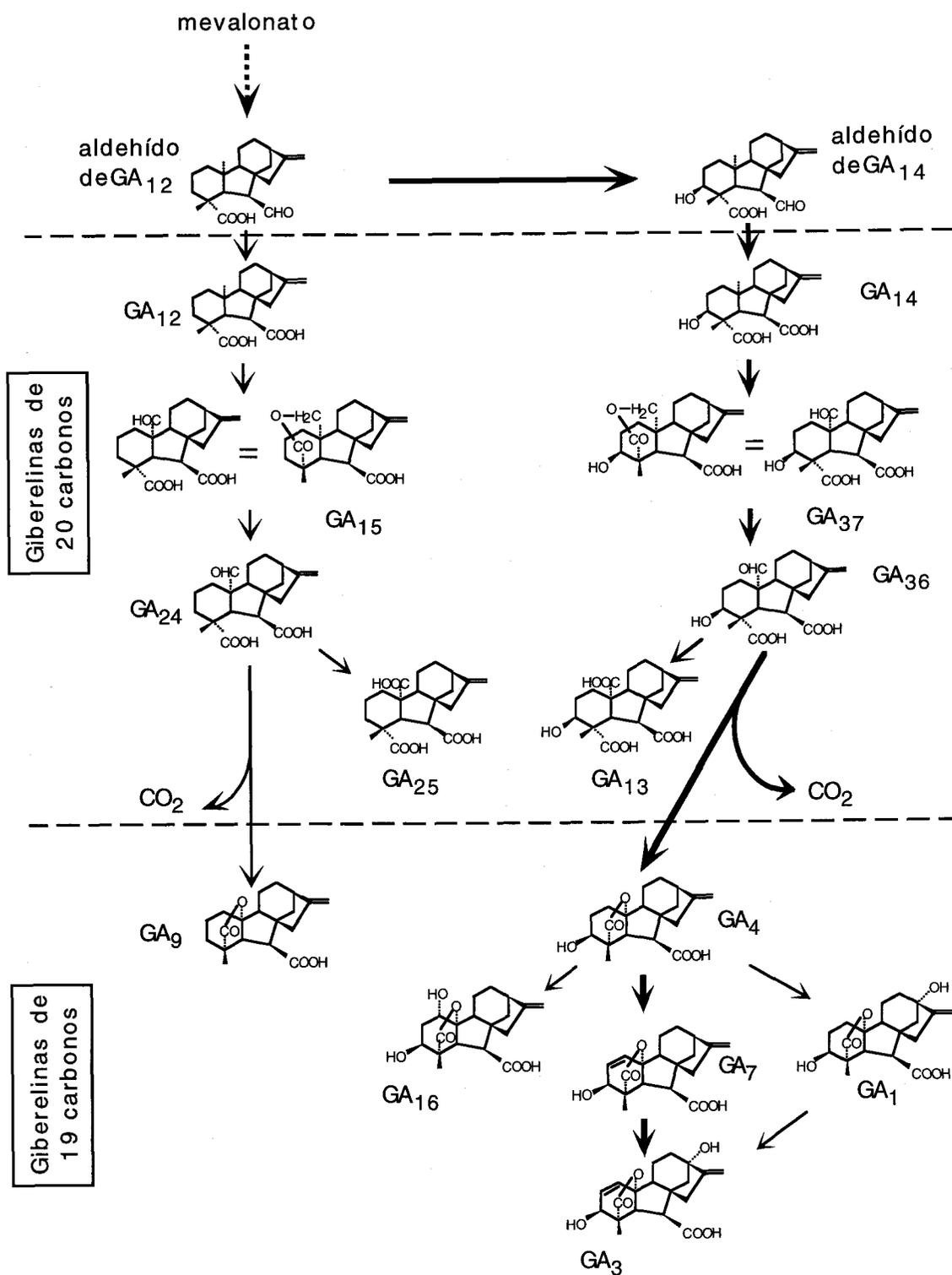
complejo y se ha conseguido la separación parcial de las dos actividades (Duncan y West, 1981). Las dos actividades de la sintetasa de kaureno tienen requerimientos similares de pH y de cofactores tanto en *Gibberella* como en *Marah* (Frost y West, 1977).

El kaureno se oxida sucesivamente a kaurenol, kaurenal, ácido kaurenico y ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenico por enzimas localizadas en la fracción microsomal (Dennis y West, 1967), cuyas propiedades recuerdan a las de las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450 y requieren oxígeno molecular y NADPH (Ashman *et al.*, 1990; Jennings *et al.*, 1993). Ninguna de estas enzimas ha sido purificada.

La contracción del anillo del ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenico para dar el aldehído de GA<sub>12</sub> es catalizada también en la fracción microsomal. Este paso y la formación del ácido 6,7-dihidroxikaurenico parecen ser realizados por la misma enzima en *Cucurbita maxima* (MacMillan, 1996). Este último compuesto es el precursor del fujenal (Fig. 2), un diterpeno muy abundante en los cultivos de *Gibberella*.

Hasta la síntesis del aldehído de GA<sub>12</sub>, primer compuesto con la estructura *ent*-giberelano de dos anillos pentagonales y dos hexagonales, no hay diferencias entre las rutas biosintéticas de las giberelinas en las plantas y en *Gibberella*. A partir de este compuesto la ruta varía incluso entre distintas plantas (Hedden, 1983). En general, las monooxigenasas microsomales pueden oxidar el aldehído de GA<sub>12</sub> en los carbonos 3 y 13 antes de que actúen las dioxigenasas del carbono 20, que son solubles y dependientes de 2-oxo-ácidos (Hedden y Graebe, 1982; Hedden, 1983; Graebe y Lange, 1990). En algunos organismos existen rutas paralelas que forman las giberelinas de 19 átomos de carbono mediante una oxidación progresiva del carbono 20 hasta CO<sub>2</sub> (Hedden, 1983; MacMillan, 1996).

En *Gibberella* hay dos rutas paralelas debido a que el aldehído de GA<sub>12</sub> es el único sustrato para la hidroxilasa del carbono 3 (Fig. 3) (Bearder, 1983; MacMillan, 1996). La ruta hidroxilada en este carbono es predominante en las estirpes silvestres estudiadas. La secuencia de las reacciones ha sido esclarecida por bioconversión de intermediarios radioactivos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Geissman *et al.*, 1966; Pitel *et al.*, 1971; Hedden *et al.*, 1978). La disponibilidad de un mutante de *Gibberella* bloqueado en un paso inicial de la ruta ha permitido la utilización de intermediarios no marcados en los experimentos de bioconversión (Bearder *et al.*, 1983).



**Figura 3.** Síntesis de las giberelinas mayoritarias en *Gibberella* desde el aldehído de GA<sub>12</sub>. Las flechas gruesas muestran las reacciones predominantes y las flechas discontinuas indican más de una reacción enzimática.

Algunos pasos de la ruta biosintética son realizados por familias de enzimas con ligeras diferencias en las tasas de conversión de sus sustratos (MacMillan, 1996). La baja especificidad por el sustrato de las enzimas de la ruta es también puesta de manifiesto por la capacidad de *Gibberella* de metabolizar sustratos modificados para dar nuevas giberelinas (Bearder *et al.*, 1974). En plantas se han identificado familias de genes que codifican proteínas con actividad oxidasa del carbono 20 (Phillips *et al.*, 1995).

### 1.2.2 Mutantes de la síntesis de giberelinas

En las plantas, las alteraciones en la biosíntesis de giberelinas suelen afectar al crecimiento. Así, los mutantes que producen menos giberelinas se desarrollan más lentamente, dando lugar a los denominados mutantes enanos. En *Gibberella*, sin embargo, las alteraciones en la síntesis de giberelinas no dan lugar a un cambio fenotípico fácilmente identificable y el aislamiento de mutantes en este organismo requiere un escrutinio individualizado de la producción de giberelinas. Como consecuencia, el número de mutantes aislados en plantas es muy superior a los encontrados en *Gibberella* (Reid, 1986).

#### 1.2.2.1 Mutantes de la síntesis de giberelinas en plantas

En las plantas los mutantes más frecuentes relacionados con las giberelinas son enanos. Algunos de estos mutantes recuperan el fenotipo silvestre con la adición de giberelinas exógenas, pero otros no. Los primeros suelen ser mutantes de la biosíntesis de giberelinas, mientras que los segundos suelen estar afectados en las respuestas a las giberelinas (Reid, 1986).

También existen mutantes que muestran un crecimiento anormalmente acelerado, fenotipo similar al de las plantas silvestres suplementadas con giberelinas. Estos mutantes producen más giberelinas o tienen una respuesta más sensible a estas hormonas.

Los mutantes mejor conocidos de la síntesis de giberelinas en plantas son los de calabaza (*Cucurbita maxima*), guisante (*Pisum sativum*), maíz (*Zea mays*) y *Arabidopsis thaliana*. La caracterización de estos mutantes se ha centrado en sus contenidos de giberelinas (Fujioka *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1989) y los cambios fenotípicos provocados por la adición de intermediarios purificados (Reid, 1986). Se han identificado mutaciones que provocan una disminución del crecimiento de las plantas por una disminución de la síntesis de giberelinas en cinco genes del maíz (*dwarf1*, *dwarf2*, *dwarf3*, *dwarf5* y *an1*) y *Arabidopsis* (*ga-1*,

*ga-2*, *ga-3*, *ga-4* y *ga-5*) y en cuatro del guisante (*le*, *lh*, *ls* y *na*). Los mutantes *dwarf1*, *ga-5* y *le* están afectados en la oxidación del carbono 20.

A pesar de la exhaustividad de las búsquedas de mutantes afectados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, no se han encontrado mutantes afectados en algunos pasos de la ruta biosintética de las giberelinas.

### 1.2.2.2 Mutantes de la síntesis de giberelinas en *Gibberella*

En *Gibberella* se conoce desde hace más de veinte años un mutante, B1-41a (Bearder *et al.*, 1974), afectado en las oxidaciones del kaureno hasta el ácido kaurenoico. Además, también existe una estirpe, R-9 (Bearder *et al.*, 1973), obtenida de forma casual en un cruce entre una estirpe productora y no productora de giberelinas, que está afectada en la hidroxilación en el carbono 13, por lo que aumenta la producción de GA<sub>7</sub> y GA<sub>4</sub> y disminuye la de GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método simplificado de escrutinio de la producción de giberelinas por fluorescencia que ha permitido el aislamiento de 13 mutantes *gib* (Candau *et al.*, 1991) estudiados en esta Tesis.

### 1.2.3 Aislamiento de genes de la síntesis de giberelinas

El primer gen clonado de la síntesis de giberelinas en plantas fue *gal1*, responsable de la sintetasa de kaureno de *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 1992). Se clonó mediante la técnica de "sustracción genómica" aprovechando la existencia de un mutante con una delección del gen.

Dos años después se clonó el gen de la oxidasa del carbono 20 de *Cucurbita maxima* (Lange *et al.*, 1994). Se consiguió rastreando una genoteca de expresión de ADN complementario del endospermo de *Cucurbita* en *E. coli* con anticuerpos contra la enzima. Posteriormente se han clonado otros genes de oxidasas del carbono 20 mediante estrategias basadas en el conocimiento de su secuencia. Así, se han multiplicado *in vitro* con la polimerasa *Taq* secuencias internas de otros genes utilizando cebadores basados en la secuencia de *Cucurbita* (Phillips *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1996; García-Martínez *et al.*, 1997) y se han rastreado genotecas con sondas heterólogas (Xu *et al.*, 1995).

La inserción de transposones o del ADN-T de *Agrobacterium* permitió clonar el gen *ga4* de *Arabidopsis*, responsable de la hidroxilación  $\beta$  en el carbono 3 (Chiang *et al.*, 1995) y los genes *an1* y *dwarf3* de *Zea*, que codifican, respectivamente, la sintetasa del kaureno (Bensen *et al.*, 1995) y una dioxigenasa dependiente de P-450

que interviene en los primeros pasos de la síntesis de giberelinas (Winkler y Helentjaris, 1995).

Una nueva búsqueda de genes, con la misma estrategia que se utilizó para la clonación de la primera oxidasa del carbono 20, ha permitido identificar, por primera vez, un gen responsable de una enzima con actividad oxigenasa en el carbono 7 (Lange, 1997).

Recientemente se ha clonado el primer gen responsable de una actividad de la síntesis de giberelinas, posterior al difosfato de geranilgeranilo, en un hongo. Se ha obtenido multiplicando *in vitro* un fragmento del ADN del ascomiceto *Phaeosphaeria* con cebadores basados en las secuencias de sintetasas de difosfato de copalilo de plantas (Kawaide *et al.*, 1997). La secuencia de aminoácidos coincide con las de las sintetasas de difosfato de copalilo y kaureno de plantas en menos del 25 %. Resulta paradójico que en *Gibberella*, el organismo más activo en la producción de giberelinas y en el que se detectaron por primera vez, aún no se hayan clonado genes de la síntesis de las giberelinas. La estrategia utilizada en *Phaeosphaeria* ha sido usada en *Gibberella* sin éxito. La clonación y secuenciación de estos genes en *Gibberella* aportará información sobre el origen de la ruta y posibilitará un conocimiento molecular que permita mejorar la producción industrial de giberelinas.

#### **1.2.4 Regulación de la síntesis de giberelinas en *Gibberella***

*Gibberella* sintetiza giberelinas cuando agota el nitrógeno asimilable del medio de cultivo (Borrow *et al.*, 1964). Esta inducción no es resultado de la detención del crecimiento por agotamiento de un nutriente esencial, ya que no ocurre si el nutriente que se agota es el fósforo (Candau *et al.*, 1992). La síntesis de giberelinas va acompañada por la de bicaverinas (Balan *et al.*, 1970; Cornforth *et al.*, 1971). Las bicaverinas son poliquétidos, compuestos derivados del acetato, que presentan un intenso color rojo a pH ácido.

La adición de nitrógeno a un cultivo en plena producción de giberelinas da lugar a la detención inmediata de esta síntesis (Candau *et al.*, 1992). El efecto es independiente de la reanudación del crecimiento, porque la adición de amonio reprime la síntesis de giberelinas en un mutante auxótrofo para la asparragina, en el que no se restablece el crecimiento (Sánchez-Fernández, 1993). Todas las fuentes de nitrógeno comprobadas reprimen la síntesis de giberelinas. La represión por el nitrógeno implica la mediación de alguna molécula derivada del metabolismo de las fuentes nitrogenadas. En presencia de L-metionina-DL-sulfoximina, un

inhibidor de la síntesis de glutamina, el amonio no reprime la síntesis de giberelinas (Muñoz y Agosín, 1993), por lo que el regulador debe ser la glutamina o un compuesto derivado de este aminoácido.

La síntesis de giberelinas correlaciona con las actividades enzimáticas implicadas en la asimilación de fuentes de nitrógeno diferentes del amonio y la glutamina (Muñoz y Agosín, 1993). La activación de estas rutas está mediada por una proteína activadora, denominada AreA en *Aspergillus nidulans* y Nit-2 en *Neurospora crassa* (Marzluf, 1983). En los hongos filamentosos estudiados, el amonio, cuando es muy abundante, se incorpora fundamentalmente en esqueletos carbonados vía la deshidrogenasa de glutamato dependiente de NADP, mientras que cuando escasea lo hace a través de las sintetetasas de glutamina y glutamato (Mora *et al.*, 1980; Marzluf, 1983).

### 1.2.5 Biosíntesis de esteroides y carotenoides

Los esteroides (Fig. 2) forman parte de las membranas celulares y son esenciales para la vida eucariótica. El primer esteroide sintetizado es el escualeno, que se produce por la condensación de dos moléculas de difosfato de farnesilo. El escualeno sufre posteriormente diversas oxidaciones y ciclaciones que dan lugar a los distintos esteroides. Las oxidaciones son dependientes de O<sub>2</sub> y de NADPH (Yanamoto y Bloch, 1970). Algunas reacciones de la síntesis de esteroides y giberelinas se parecen. Estas similitudes pueden ser la causa de la disminución de la síntesis de giberelinas en ciertos mutantes de *Gibberella* resistentes a pefurazoato (Takenaka *et al.*, 1992), un inhibidor de la biosíntesis de ergosterol, el esteroide mayoritario en *Gibberella* (Nes y Heupel, 1986).

Los carotenoides son tetraterpenos derivados del difosfato de geranilgeranilo (Fig. 2). Los carotenoides se encuentran en todos los grandes grupos de seres vivos, de las bacterias a los animales, aunque estos no son capaces de sintetizarlos y los toman de la dieta. Su papel en la fotosíntesis provoca que sean esenciales en los organismos fotosintéticos y explica que las enzimas para la biosíntesis de carotenoides en plantas sean dianas de herbicidas. *Gibberella* sintetiza y acumula carotenoides, principalmente la neurosporaxantina (ácido 4'-apo- $\beta$ -caroten-4'-oico), un apocarotenoide de 35 átomos de carbono (Aasen y Jensen, 1965). En menor cantidad se detectan carotenoides precursores como el fitoeno, el toruleno y el  $\gamma$ -caroteno y otros como el  $\beta$ -caroteno (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986). Los carotenoides no son esenciales en *Gibberella* y sus funciones no están claras, aunque, como en otros hongos, se especula que puedan estar relacionadas con la protección frente a la luz o la oxidación. El primer caroteno de la ruta biosintética

es el fitoeno, que se produce por condensación de dos moléculas de difosfato de geranilgeranilo. Este caroteno incoloro sufre 5 deshidrogenaciones y una ciclación para convertirse en toruleno, que es finalmente convertido en neurosporaxantina mediante una reacción inusual, consistente en la pérdida de 5 átomos de carbono y la adición de un grupo carboxilo terminal en su extremo no ciclado (Valadon y Mummery, 1969). El estudio de mutantes alterados en la carotenogénesis en *Gibberella* sugiere que las cinco deshidrogenaciones son llevadas a cabo por una misma enzima, la deshidrogenasa del fitoeno, producto del gen *carB* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). En *Gibberella*, como en muchos otros organismos, la carotenogénesis es fotoinducible (Avalos y Schrott, 1990).

Los resultados obtenidos en experimentos de alimentación *in vivo* con diferentes sustratos marcados radioactivamente (leucina, acetato y mevalonato) sugieren que las giberelinas, los carotenoides y los esteroides se sintetizan a partir del acetato en compartimentos celulares independientes (Domenech *et al.*, 1996).

### 1.3 TRANSFORMACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS

Se entiende por transformación de un organismo la modificación de su genotipo y fenotipo por incubación con ADN exógeno. Las primeras transformaciones de un hongo filamentoso se consiguieron con *Neurospora crassa*, mediadas por ADN genómico (Mishra y Tatum, 1973) o por un plásmido (Case *et al.*, 1979) y, posteriormente, se han desarrollado métodos de transformación para muchos otros hongos (Fincham, 1989; Lemke y Peng, 1995). El enorme potencial de *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* en investigación básica justificó el esfuerzo dedicado a desarrollar y mejorar métodos de transformación. El interés aplicado ha sido el motivo de la extensión y aplicación de estos métodos a muchas otras especies. Ejemplos representativos son *Penicillium chrysogenum*, por la producción de antibióticos (Kolar *et al.*, 1988), *Trichoderma harzianum*, por la producción de enzimas hidrolíticas (Ulhoa *et al.*, 1992), y *Gibberella pulicaris* (Salch y Beremand, 1993) y *Nectria haematococca* (Oliver *et al.*, 1987), especies patógenas. En *Gibberella*, el uso potencial en el análisis de los genes involucrados en la síntesis de giberelinas y en la patogenicidad al arroz animan a desarrollar métodos de transformación.

Los hongos son organismos muy diversos, por lo que los métodos de transformación desarrollados para una especie no son necesariamente eficaces en otras. Los principales problemas que se tienen que resolver en un protocolo de transformación son la permeabilidad de las células al ADN, la expresión en la



célula receptora de los genes introducidos y el mantenimiento indefinido del ADN exógeno.

### 1.3.1 Entrada del ADN exógeno

Para que entre el ADN exógeno se suelen usar protoplastos (Fincham, 1989; Timberlake y Marshall, 1989; Lemke y Peng, 1995), que son células desprovistas de la pared celular (Peberdy, 1989). La hidrólisis de la pared ha sido facilitada por la comercialización de preparados enzimáticos, tales como el Novozym 234. Además, facilitan la entrada del ADN en los protoplastos los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y el polietilenglicol (Fincham, 1989; Timberlake y Marshall, 1989; Lemke y Peng, 1995). Otros protocolos emplean un choque eléctrico (electroporación) para facilitar esta entrada (Goldman *et al.*, 1990).

Otros métodos eluden el uso de protoplastos. Entre ellos destacan la permeabilización de células intactas con acetato de litio (Ito *et al.*, 1983), la agitación violenta de células con perlas de vidrio en un medio osmoestabilizado (Costanzo y Fox, 1988) o el bombardeo de micelio con microproyectiles (Armeleo *et al.*, 1990).

### 1.3.2 Marcadores de transformación

Los experimentos de transformación requieren el uso de genes marcadores cuya expresión delate la entrada y el mantenimiento del ADN exógeno y, por tanto, permita la detección de las células transformadas. La expresión del marcador produce un cambio fenotípico que puede ser seleccionable o identificable visualmente. Lo más común es emplear un marcador seleccionable que proporcione una función nueva (resistencia a antibióticos o uso de una nueva fuente nutritiva) o restituya un fenotipo silvestre seleccionable en ciertas condiciones restrictivas (por ejemplo, el crecimiento en medio mínimo de un mutante auxótrofo).

Entre otros, se suelen usar los genes de resistencia a higromicina B (Punt *et al.*, 1987), benomilo (Orbach *et al.*, 1986) y bleomicina (Engelenburg *et al.*, 1989). El gen *amdS*, responsable de la acetamidasa, permite usar la acetamida como nueva fuente de carbono y nitrógeno en algunos hongos. Estos marcadores tienen la ventaja de poder ser empleados con cualquier estirpe sensible al antibiótico o incapacidad de usar la nueva fuente nutritiva, entre las que normalmente se encuentran las estirpes silvestres.

Otros marcadores no sirven para transformar el tipo silvestre, y se precisa el uso de mutantes. Entre estos destacan los genes *pyrG* (Mattern *et al.*, 1987), *trpC* (Yelton *et al.*, 1984), *argB* (John y Peberdy, 1984), *niaD* (Malardier *et al.*, 1989) y *qa-2* (Case *et al.*, 1979). En algunos casos, la desventaja de requerir un mutante determinado como receptor es compensada por la existencia de métodos para seleccionarlos (Fincham, 1989).

Los marcadores no seleccionables permiten la identificación de los transformantes, visualmente o por subcultivo en medios apropiados. Estos marcadores se utilizan mucho menos, y casi siempre junto con marcadores seleccionables, presentes en la misma molécula de ADN o en moléculas separadas. La cotransformación se basa en que los protoplastos competentes, que son una pequeña minoría de los empleados, incorporan con frecuencia varias moléculas de ADN. En algunos casos, el 90 % de los micelios transformados expresan genes de dos plásmidos diferentes (Kolar *et al.*, 1988). En *Neurospora*, la cotransformación de un heterocarionte ha puesto de manifiesto que la competencia es una característica del núcleo a transformar y no del protoplasto (Grotelueschen y Metzenberg, 1995). Los marcadores no seleccionables se emplean a menudo para investigar la expresión de promotores que se colocan ante ellos.

### 1.3.3 Mantenimiento del ADN exógeno

Para que las estirpes transformadas mantengan el fenotipo adquirido, el ADN exógeno debe conservarse y expresarse en los núcleos descendientes del transformado inicialmente. Para ello se dispone de dos mecanismos alternativos: la replicación autónoma y la integración en el genomio del receptor. Se han descrito plásmidos capaces de replicarse autónomamente en hongos filamentosos (Gems *et al.*, 1991; Kistler y Benny, 1992; Tsukuda *et al.*, 1988, García-Pedrajas y Roncero, 1996). La capacidad de autorreplicación está limitada a ciertas especies, lo que refleja diferencias en los orígenes de replicación de los hongos.

Más común en los hongos es la transformación por integración del ADN exógeno en el genomio receptor (Fincham, 1989; Lemke y Peng, 1995). Si el vector comparte secuencias de ADN con la célula receptora, la integración del plásmido puede producirse por recombinación entre ellas (integración homóloga). Es frecuente la recombinación entre secuencias no homólogas, que da lugar a integración ectópica. Si el vector no comparte ADN con el genomio receptor, la integración no es necesariamente aleatoria (Diallinas y Scazzocchio, 1989). En *Saccharomyces* predomina la recombinación homóloga en la integración (Orr-Weaver *et al.*, 1981). Las frecuencias de integración homóloga y ectópica son

diferentes en distintos hongos filamentosos e incluso varía entre distintas secuencias homólogas en una misma estirpe (Lemke y Peng, 1995; Bird y Bradshaw, 1997).

Las frecuencias de integración homóloga correlacionan con la longitud de la secuencia compartida (Asch y Kinsey, 1990). La repetición de esta secuencia en el genomio receptor aumenta la frecuencia de transformación en algunos casos (Tsuge *et al.*, 1990), pero no en otros (Tilburn *et al.*, 1983). La linearización del plásmido por corte en la región homóloga aumenta la frecuencia de transformación unas mil veces en *Saccharomyces* (Orr-Weaver *et al.*, 1981). En los hongos filamentosos este aumento es menos claro (Paietta y Marzluf, 1985), aunque sí parece aumentar la relación entre la integración homóloga y la ectópica (Bird y Bradshaw, 1997).

La transformación integrativa suele ser muy estable, incluso en ausencia de selección. La inestabilidad se debe a la escisión del vector del genomio. En algunos casos se han recuperado los plásmidos originales, transformando *E. coli* con ADN extraído de las estirpes transformadas (Ballance y Turner, 1985). En los casos de integración homóloga, la escisión está asociada a recombinación homóloga entre las repeticiones originadas por la integración. Cuando se escinde el plásmido queda un solo ejemplar de la secuencia compartida entre el vector y el genomio; así se puede reemplazar una secuencia por otra. Este método, desarrollado inicialmente en *Saccharomyces* (Scherer y David, 1979) y *Aspergillus nidulans* (Miller *et al.*, 1985) se ve favorecido por la existencia de genes como *URA3* de *Saccharomyces*, que permiten seleccionar tanto la presencia del alelo silvestre como su pérdida (Rothstein, 1991).

El reemplazamiento de una secuencia en un genomio puede conseguirse también mediante dos hechos de recombinación simultáneos (Rothstein, 1983). La sustitución de un alelo silvestre por uno nulo se puede seleccionar con dos marcadores. El alelo nulo se construye insertando un marcador seleccionable (marcador interno) en el alelo silvestre. El segundo marcador, no necesariamente seleccionable, se coloca en otra región del vector, fuera de la secuencia a reemplazar (marcador externo). Las estirpes transformadas que tengan el fenotipo del marcador interno, pero no el del externo, se deben probablemente a una doble recombinación que ha dejado en el genomio el alelo nulo (Rothstein, 1991).

La recombinación homóloga va acompañada de la conversión génica, definida como una transferencia no recíproca de información genética entre dos secuencias de ADN (Hanstings y Rosemberg, 1992). Por conversión génica se puede producir

la sustitución de alelos, que difieran en pocas bases, en un paso y con un solo hecho de recombinación.

### 1.3.4 Transformación de *Gibberella*

El primer método descrito para la transformación de *Gibberella* empleó como marcador seleccionable el gen de la reductasa del nitrato (*niaD*) de *Aspergillus oryzae* (Sánchez-Fernández *et al.*, 1991), ya usado en otros hongos (Daboussi *et al.*, 1989). La estirpe receptora fue un mutante carente de reductasa de nitrato, derivado de la estirpe silvestre IMI58289, empleada en esta Tesis. Se obtuvieron menos de 10 transformantes por microgramo de ADN exógeno. El vector utilizado carecía de secuencias de *Gibberella* y la transformación fue por integración ectópica, en algunos casos múltiple. Resultados muy similares se obtuvieron posteriormente con el gen *argB* (Brückner *et al.*, 1992), responsable de uno de los pasos de la biosíntesis de arginina. La transformación de un mutante *argB* de *Gibberella* con el gen *argB* de *Aspergillus nidulans* produjo también menos de 10 transformantes por microgramo de ADN. En estos experimentos se usaron mutantes derivados de dos estirpes silvestres diferentes, ambas productoras de giberelinas. La introducción en el vector de la secuencia autoreplicativa AMA1, eficaz en *Aspergillus nidulans* (Gems *et al.*, 1991), no aumentó la frecuencia de transformación significativamente (Brückner *et al.*, 1992).

Recientemente se ha clonado el gen *niaD* de *Gibberella* y se ha utilizado para transformar un mutante *niaD*, obteniéndose unos 200 transformantes por microgramo de ADN (Tudzynski *et al.*, 1996). Esta frecuencia multiplica casi por cien las publicadas anteriormente. En este caso, casi la mitad de los transformantes se debieron a integración homóloga.

El único marcador empleado para transformar estirpes silvestres de *Gibberella* es un gen bacteriano *hph*, que confiere la resistencia a higromicina B. Se usó primero para transformar una estirpe de *Gibberella* del grupo A, no productora de giberelinas y que es una especie genética diferente de la nuestra. En este caso, se usaron esporas en germinación permeabilizadas con acetato de litio y se consiguió aproximadamente un transformante por microgramo de ADN (Leslie y Dickman, 1991). La escasa producción de conidios dificulta la aplicación de este método a nuestra estirpe.

La resistencia a higromicina se ha empleado también en una estirpe productora de giberelinas. Con el gen bacteriano *hph* bajo el control de un promotor de *Aspergillus nidulans* se consiguió una frecuencia de transformación inferior a 1

transformante por microgramo de ADN (Brückner *et al.*, 1992). Esta frecuencia se multiplicó por diez, aproximadamente, al sustituir el promotor de *Aspergillus* por un promotor de *Gibberella pulicaris* (Brückner *et al.*, 1992).

**Resultados 1**

**Síntesis de giberelinas**

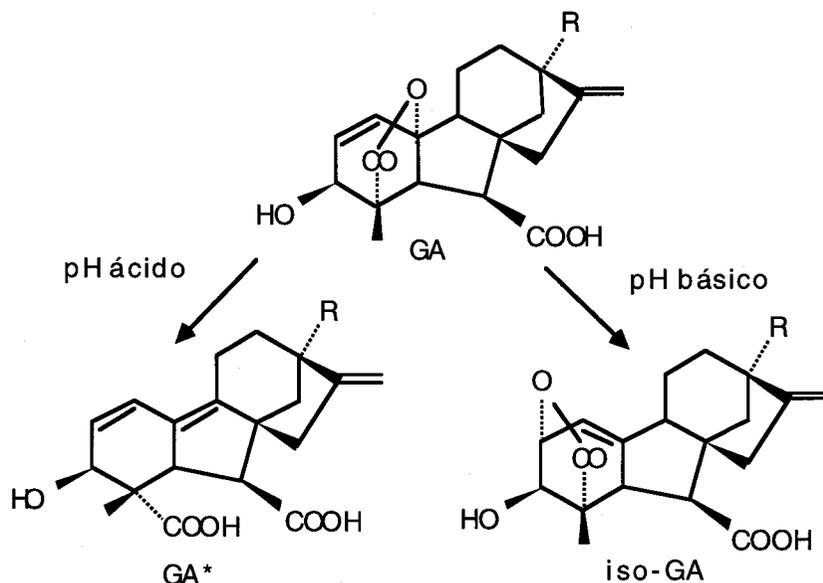
Pese a los muchos años de investigación sobre la biosíntesis de giberelinas en *Gibberella fujikuroi* y en plantas, aún quedan muchos interrogantes sobre los genes y las enzimas involucrados. En plantas sólo se han caracterizado por mutación 5 genes y en *Gibberella* no se sabe el número de genes implicados por los pocos mutantes disponibles. En este capítulo se describe la biosíntesis de giberelinas de un grupo de mutantes *gib* aislados en nuestro laboratorio (Candau *et al.*, 1991), así como la regulación de la biosíntesis de giberelinas y de la sintetasa de kaureno en la estirpe silvestre.

## 2.1 MUTANTES *gib*

### 2.1.1 Producción de giberelinas y otros terpenoides

Los mutantes *gib* se aislaron con un método simplificado de medición de la fluorescencia que permite estimar la producción de giberelinas en colonias aisladas. El escrutinio de más de 4000 colonias sobrevivientes a un tratamiento mutagénico con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina condujo a la identificación de 13 mutantes *gib*, alterados en la producción de giberelinas (Candau *et al.*, 1991).

Las giberelinas y el fujenal presentes en el medio de cultivo, se analizaron por cromatografía de gases con la colaboración del grupo del profesor Alejandro Fernández Barrero de la Universidad de Granada. Las giberelinas GA<sub>3</sub> y GA<sub>7</sub> sufren modificaciones en el proceso de extracción (Fig. 4) y cada una de ellas se cuantificaron como tres compuestos diferentes. Los carotenoides presentes en el micelio se analizaron espectrofotométricamente, después de retirar las bicaverinas por partición (Tabla 1). La biosíntesis de estos terpenoides se resume en la Figura 2 (pág. 6).



**Figura 4.** Modificaciones de las giberelinas GA<sub>3</sub> y GA<sub>7</sub> por los cambios de pH durante el proceso de extracción; -R es -OH en GA<sub>3</sub> y -H en GA<sub>7</sub>.

Todas las estirpes, excepto SG127, producen carotenoides coloreados en las condiciones de producción de giberelinas, en concentraciones que varían poco de los 8 a los 14 días (Tabla 1). La ausencia de carotenoides en la estirpe SG127, incluidos los incoloros, como el fitoeno y el fitoflueno, se confirmó por cromatografía en alúmina de extractos de micelios incubados en medio mínimo bajo la luz durante 9 días. En estas condiciones de cultivo, la estirpe silvestre acumula más de 100 µg de carotenoides coloreados por g de masa seca (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1986).

De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 1, los mutantes *gib* se pueden clasificar en cuatro grupos fenotípicos:

**Grupo 1.** Formado por estirpes con menos del 10% de las giberelinas y el fujenal de la silvestre, pero con una producción normal de carotenoides. Comprende las estirpes SG121, SG136, SG138 y SG139. Deben sufrir un bloqueo parcial o total de la ruta de las giberelinas entre el difosfato de geranilgeranilo y el ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico. En este grupo destacan los mutantes SG138, que solo produce un poco de GA<sub>24</sub> (una giberelina de 20 carbonos, no hidroxilada en el carbono 3), y SG139, que carece totalmente de giberelinas y fujenal.

**Tabla 1** Masa seca ( $g \cdot l^{-1}$ ) y producción de carotenoides, fujenal y giberelinas ( $mg \cdot l^{-1}$ ) de la estirpe silvestre y los mutantes *gib* incubadas en medio mínimo ICI durante 8 días (primera línea) y 14 días (segunda línea).

	Silvestre	SG 139	SG 121	SG 138	SG 136	SG 123	SG 133	SG 127	SG 122	SG 124	SG 128	SG 129	SG 135	SG 134
Peso seco	7.4 ± 0,1	8.5 ± 0,2	5.5 ± 0,3	7.6 ± 0,2	7.1 ± 0,1	7.8 ± 0,2	7,9 ± 0,3	5.9	7.4 ± 0,2	7.4	5.0 ± 0,3	7.7 ± 0,2	7.9 ± 0,1	8,1 ± 0,1
	8.6 ± 1	9.0 ± 0,3	6.4 ± 0,3	8.8 ± 0,6	8.1	8.3	8.7 ± 0,2	6.0 ± 0,1	8.5 ± 0,6	8.3	5.6	8.6 ± 0,4	8.8 ± 0,3	8.8 ± 0,5
Carotenoides	0.58	0.68	0.19	0.98	0.64	0.53	0.39	<0.01	1.28	0.43	0.22	0.41	0.84	0.74
	0.60	0.55	0.26	1.08	0.81	0.38	0.35	<0.01	1.27	0.32	0.19	0.55	0.93	0.73
Fujenal	41,2 ± 6,5	0	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,3	1,6 ± 1,6	24,2 ± 4,4	84,6 ± 34,2	7,6 ± 0,2	9,8 ± 2,9	8,0 ± 0,1	8,6 ± 1,8	12,1 ± 3	14,2 ± 8,4	50,2 ± 17
	58,7 ± 0,7	0	1,3 ± 0,7	5,5 ± 1,3	2,6 ± 0,8	64,8 ± 15	84	10,5 ± 1,7	15,3 ± 6,4	13,8 ± 0,8	21,4 ± 2,4	28,3 ± 6,6	20,2 ± 9,2	80,3 ± 2,8
Σ giberelinas	94,6 ± 15	0	3,9 ± 3,3	0,8 ± 0,8	4,6 ± 4,6	57,3 ± 22	148,9 ± 26	22,5 ± 1,5	20,8 ± 7,0	24,7 ± 2,4	25,4 ± 7,6	35,8 ± 5,7	32,4 ± 16,3	117,0 ± 20,4
	154,7 ± 21	0	2,7 ± 2,7	6,4 ± 3,9	6,1 ± 2,0	130,3 ± 50	184,1 ± 52	29,2 ± 5,1	29,1 ± 15,6	50,1 ± 4,5	56,0 ± 8,0	67,9 ± 11,7	45,5 ± 16,6	245,1 ± 17,3
GA24	2,0 ± 0,3	0	0	0,8 ± 0,8	0	1,0 ± 0,1	22,5 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0	0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0	1,8 ± 0,1
	2,3 ± 0,5	0	0	4,8 ± 2,3	0	0	3,3 ± 1,2	0,7 ± 0,1	0	0	1,6 ± 0,1	0	0	3,9 ± 0,2
GA25	2,9 ± 0,4	0	0	0	0	2,0 ± 0,1	3,2 ± 0,2	0	0,3 ± 0,3	0,9	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,3 ± 0,3	1,9 ± 0,3
	4,3 ± 1,5	0	0	0	0	8,7 ± 1,9	3,9 ± 2,2	0,6	0,5 ± 0,5	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	2,5 ± 0,3	1,1 ± 0,1	5,9 ± 0,3
GA9	2,5 ± 1,1	0	0	0	0	1,8 ± 1,8	0,9 ± 0,1	0,6	0	0	1,2 ± 0,6	0	0	1,6 ± 1,2
	4,7 ± 2,4	0	0	0	0	8,4 ± 7,8	3,6 ± 3,6	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0	3,4 ± 0,1	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,3	4,9 ± 0,4
GA13	0,8 ± 0,1	0	0	0	0	0,2 ± 0,2	1,7 ± 0,7	0	0,3 ± 0,3	0	0	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,4	0,5
	1,3 ± 0,4	0	0	0	0	0,9 ± 0,9	1,2 ± 0,4	0,9 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0	0	0	0,3 ± 0,3	1,6 ± 0,4
GA16	14,9 ± 1,2	0	0,5 ± 0,5	0	0,6 ± 0,6	8,7 ± 0,8	27,7 ± 10,4	3,2 ± 0,3	5,2 ± 2,7	4,5 ± 1,3	2,5 ± 0,4	4,6 ± 0,9	10,7 ± 3,2	17,6 ± 6,7
	20,1 ± 1,1	0	0,4 ± 0,4	0	1,0 ± 0,3	21,8 ± 4,5	30,6 ± 1,6	3,5 ± 0,6	8,3 ± 5,3	7,1 ± 0,4	6,5 ± 0,2	11,5 ± 2,7	10,9 ± 6,6	30,4 ± 2,0
GA4	5,5 ± 0,5	0	0,3 ± 0,3	0	0,2 ± 0,2	4,8 ± 1,4	9,5 ± 3,6	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,3	5,6 ± 1,4
	7,5 ± 2,5	0	0	0	0	11,1 ± 4,1	9,4 ± 2,1	1,1 ± 0,3	0,6 ± 0,6	0,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,3	9,0 ± 1,3
GA1	12,1 ± 0,5	0	0,4 ± 0,4	0	0,5 ± 0,5	0	7,2 ± 2,7	2,8 ± 0,3	2	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,7	2,1 ± 0,5	3,6 ± 0,9	10,7 ± 2,1
	22,6 ± 1,5	0	0,5 ± 0,5	0	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,4	11,9 ± 1,5	4,9 ± 0,7	3,2 ± 0,5	5,3 ± 0,3	6,2 ± 1,3	5,3 ± 0,9	6,5 ± 2,9	26,9 ± 2,2
GA7	17,1 ± 3,0	0	1,5 ± 0,9	0	1,7 ± 1,7	36,5 ± 16	69,7 ± 2,8	5,0 ± 0,1	4,5 ± 2,4	8,6 ± 1,5	6,7 ± 1,8	17,5 ± 2	4,9 ± 3,4	28,3 ± 2,0
	29,7 ± 8,1	0	0,9 ± 0,9	0	2,5 ± 0,8	70,2 ± 28	81,8 ± 35,8	6,7 ± 1,5	6,9 ± 4,5	20,0 ± 2,6	17,7 ± 0,8	32,2 ± 5,9	11,4 ± 0,6	69,1 ± 3,6
GA3	36,3 ± 3,0	0	1,3 ± 1,3	0	1,5 ± 1,5	2,3 ± 1,2	24,9 ± 5,1	9,7 ± 0,4	7,3 ± 0,7	8,1 ± 0,5	9,8 ± 3,3	8,3 ± 1,4	11,7 ± 3,7	48,8 ± 6,4
	61,1 ± 3,3	0	1,0 ± 1,0	1,6 ± 1,6	1,7 ± 0,7	8,0 ± 1,7	36,3 ± 3,8	10,1 ± 1,6	8,2 ± 2,7	13,8 ± 0,8	16,2 ± 4,8	14,0 ± 1,2	14,0 ± 5,6	91,3 ± 6,7
GA3/GA7	2.2	-	-	-	-	0.2	0.3	2.2	1.7	1.0	1.3	0.5	2.2	2.2
	2.1	-	-	-	-	0.1	0.4	1.4	1.9	0.7	0.6	0.4	1.2	1.4

**Grupo 2.** Constituido por las estirpes SG123 y SG133, similares a la silvestre por su producción total de fujenal y giberelinas, pero diferentes por las proporciones de distintas giberelinas. Como aumentan GA<sub>7</sub> y GA<sub>4</sub> y disminuyen GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>, la mutación debe afectar la hidroxilación  $\beta$  del carbono 13.

**Grupo 3.** Incluye solo la estirpe SG127, que no sintetiza carotenoides y acumula menos del 25% de las giberelinas y el fujenal producidos por la estirpe silvestre. Este fenotipo se puede explicar tanto por una mutación en la sintetasa del difosfato de geranilgeranilo como por dos mutaciones independientes. Si el doble fenotipo se debe a dos mutaciones, la mutación *gib* sería del grupo 4.

**Grupo 4.** Los mutantes SG122, SG124, SG128, SG129 y SG135, que producen entre el 20 y el 35% de las giberelinas y el fujenal de la estirpe silvestre. La proporción relativa entre distintas giberelinas no se ve significativamente alterada, con la excepción en algunos casos de una mayor producción de GA<sub>7</sub>. Estos mutantes aportan poca información sobre la ruta de las giberelinas.

La estirpe SG134, descrita anteriormente como un mutante *gib* (Candau *et al.*, 1991), se parece a la silvestre por su producción de giberelinas. La alteración de la fluorescencia en esta estirpe puede deberse a causas no relacionadas con la síntesis de giberelinas.

Las diferencias de crecimiento observadas en los mutantes SG121, SG127 y SG128, y de producción de carotenoides en SG122 y en SG121 (Tabla 1), podrían deberse a mutaciones adicionales introducidas por el tratamiento mutagénico. La dificultad para llevar a cabo el ciclo sexual con nuestras estirpes nos ha impedido separar las mutaciones *gib* de otras mutaciones, posiblemente introducidas a la vez, y determinar el número de genes afectados por mutaciones *gib* y sus relaciones de ligamiento.

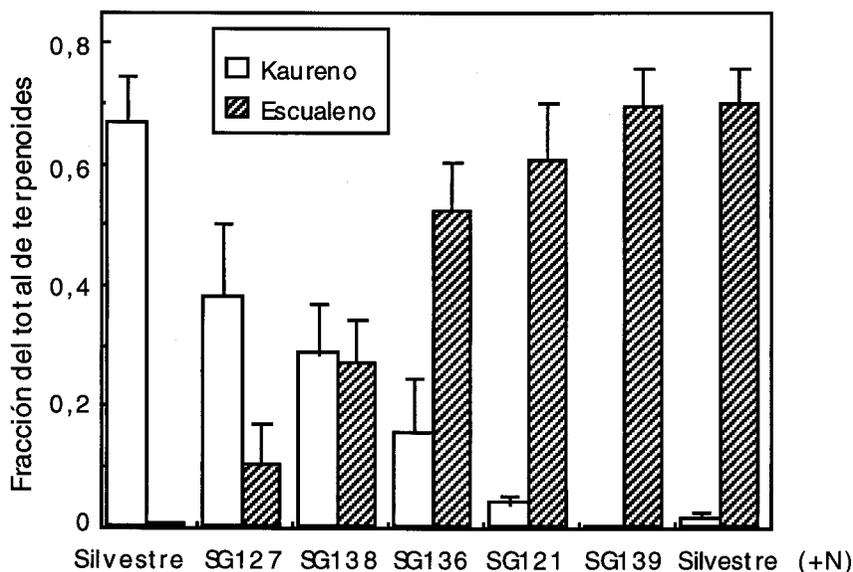
Los mutantes *gib* no están alterados en la síntesis de bicaverinas, salvo SG121, que disminuye su producción a menos del 10% de la del silvestre (W. Giordano, comunicación personal).

### 2.1.2 Síntesis de kaureno *in vitro*

El kaureno es el primer precursor tetracíclico de las giberelinas (Fig. 2, en la pág. 6). Varios protocolos permiten ensayar la síntesis de kaureno a partir de precursores radioactivos en extractos crudos (Shechter y West, 1969; Coolbaugh y Moore, 1969; Hedden y Phinney, 1979). En nuestro trabajo se ha

adaptado un método ya empleado para investigar la síntesis de carotenoides por extractos de *Gibberella* (Avalos *et al.*, 1988). En las condiciones del ensayo, el kaureno y el escualeno se comportan como productos finales, puesto que las reacciones posteriores dependen de NADPH, cofactor ausente en la reacción (Ashman *et al.*, 1990; Yanamoto y Bloch, 1970).

Una alteración en las sintetasas de difosfato de geranylgeranilo o de kaureno debe provocar una disminución en la síntesis de kaureno a partir de mevalonato, por lo que hemos analizado esta síntesis en los mutantes *gib* de los grupos 1 y 3.



**Figura 5.** Incorporación de  $2\text{-}^{14}\text{C}$  mevalonato en kaureno y escualeno respecto a todos los terpenoides (es decir, radioactividad extraíble con éter de petróleo) por extractos crudos de micelios cultivados 8 d en medio mínimo ICI. El testigo "Silvestre (+N)" es la estirpe silvestre cultivada 6 d en medio mínimo ICI con mucho nitrógeno, condiciones en las que no produce giberelinas.

El kaureno representa más del 60% de la incorporación en terpenoides realizada por extractos de micelios silvestres cultivados en condiciones de producción de giberelinas. Todas las estirpes *gib* ensayadas sintetizan menos kaureno y más escualeno que la silvestre en esas condiciones.

Los extractos del mutante SG139 no sintetizan kaureno, como los extractos de micelios silvestres cultivados en condiciones de no producción de giberelinas.

La disminución en la síntesis de kaureno de los extractos de SG127, SG136 y SG138 respecto a la del silvestre es menos drástica que la encontrada en la

síntesis de giberelinas *in vivo*. La estirpe SG121 presenta disminuciones similares en las síntesis de kaureno y giberelinas respecto a la estirpe silvestre.

## 2.2 SÍNTESIS DE GIBERELINAS EN MUTANTES ALBINOS

El fenotipo de la estirpe SG127, carente de carotenoides y con escasa producción de giberelinas y fujenal, puede explicarse por una mutación en la sintetasa de geranilgeranilo o por dos mutaciones independientes, una en la sintetasa del fitoeno y otra en un paso previo a la síntesis del ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico.

Se han aislado y caracterizado 64 nuevos mutantes albinos (Tabla 2), 36 obtenidos a partir de la estirpe silvestre y 28 a partir de la estirpe SG22, superproductora de neurosporaxantina. La mitad de ellos (31 de 64) acumulan fitoeno, un caroteno incoloro. Este fenotipo es atribuible a una mutación en el gen de la deshidrogenasa de fitoeno (denominado *carB* en *Phycomyces* y *al-1* en *Neurospora*). Los demás mutantes carecen de carotenoides, como SG127, pero, al contrario que este mutante, no sufren modificaciones en la producción de giberelinas. En consecuencia, no se ha conseguido ningún nuevo mutante con el fenotipo doble de SG127.

**Tabla 2.** Producción de carotenoides ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  masa seca de micelio) y giberelinas ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  del medio) en cultivos en agar nutritivo en condiciones de producción máxima de carotenoides y medio mínimo ICI líquido, respectivamente.

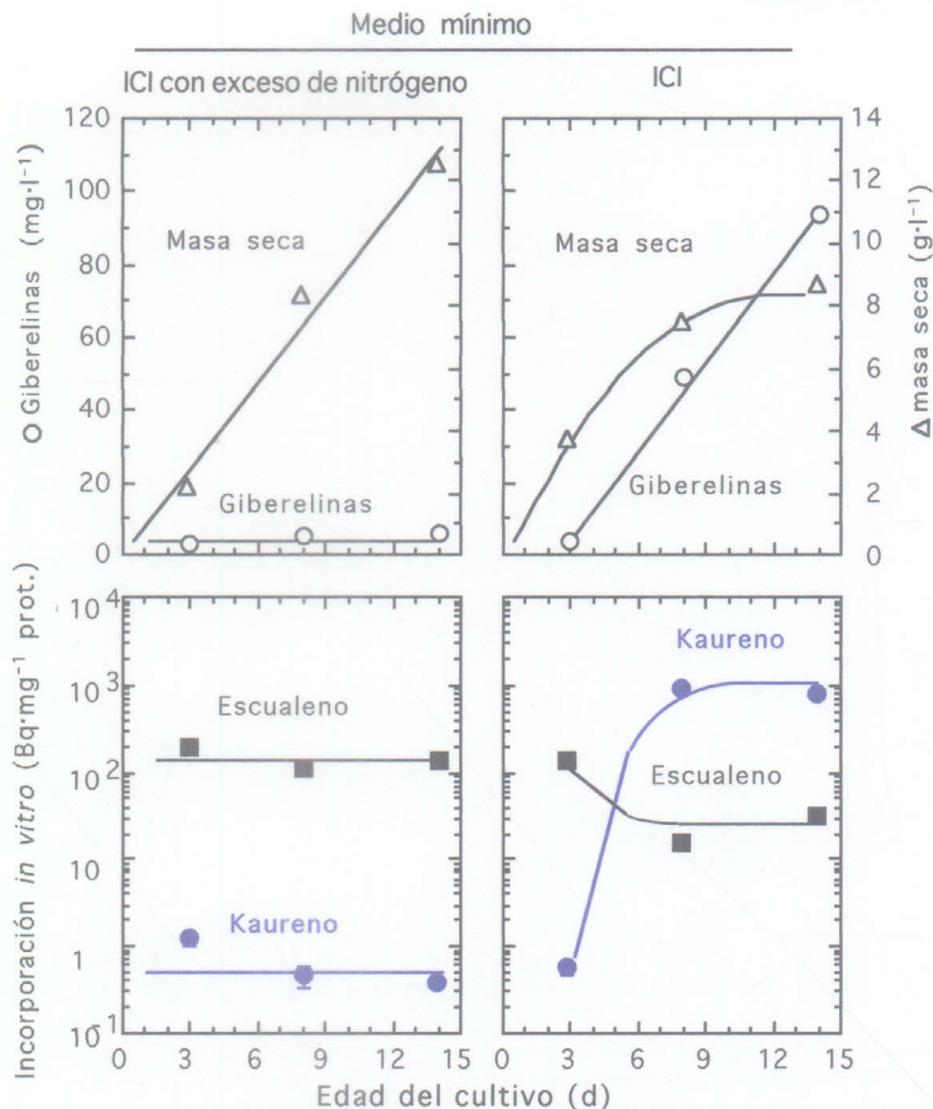
Estirpes	Carotenoides		Giberelinas
	fitoeno	coloreados	
Silvestre	12	177	98
36 mutantes derivados de la estirpe silvestre			
21 mutantes	4-21	<5-25	71-132
15 mutantes	355-232	<5-48	no determinadas
SG22	214	1091	106
28 mutantes derivados de la estirpe SG22			
12 mutantes	28-69	<5-31	71-149
16 mutantes	1557-864	<5-110	no determinadas

Si el fenotipo de SG127 se debe a dos mutaciones independientes, se podrán obtener revertientes de una mutación que no afectarán a la otra. No se encontraron revertientes coloreados entre más de un millón de colonias sobrevivientes a un tratamiento mutagénico a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Previamente se habían aislado mutantes espontáneos resistentes a benomilo para distinguir los posibles revertientes de estirpes coloreadas ya existentes.

## 2.3 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GIBERELINAS

La capacidad de sintetizar kaureno *in vitro* ha sido utilizada en plantas como indicativo de la producción de giberelinas (Coolbaugh y Moore, 1969; Barendse *et al.*, 1983). En *Gibberella*, solo los extractos de micelios silvestres que producen giberelinas *in vivo* sintetizan kaureno *in vitro* (Fig. 6). El escualeno es sintetizado sobre todo por los micelios de los cultivos que no producen giberelinas.

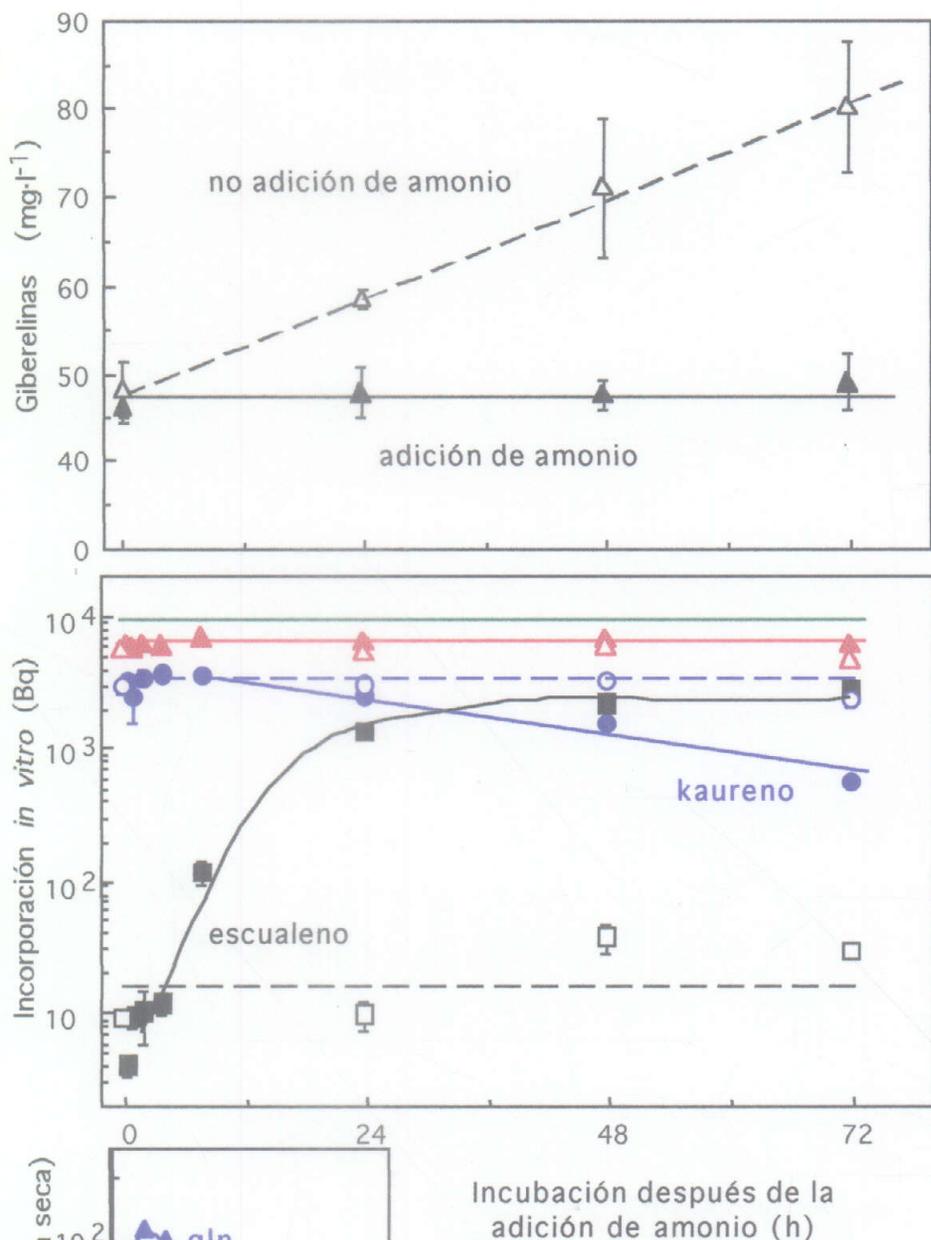
*Gibberella* permite investigar la regulación de la síntesis de giberelinas *in vivo* y de terpenoides *in vitro* en unas condiciones sencillas, que facilitan los análisis. Hemos reproducido la represión mediante la adición de amonio a un micelio productor de giberelinas, y la inducción mediante el lavado y la incubación de un micelio no productor en glucosa (20 g·l<sup>-1</sup>) y microelementos, sin fuente de nitrógeno. Además, hemos comprobado los requerimientos de síntesis de proteínas en la producción de giberelinas.



**Figura 6. Producción de terpenoides *in vitro* e *in vivo*.** La estirpe silvestre se cultivó en medio mínimo ICI con exceso de nitrógeno (a la izquierda) y en medio mínimo ICI (a la derecha) y se determinó la masa seca ( $\Delta$ ) y la concentración de giberelinas en el medio ( $\circ$ ) (gráficas superiores). En las gráficas inferiores se muestra la síntesis de kaureno ( $\bullet$ ) y escualeno ( $\blacksquare$ ) *in vitro*.

### 2.3.1 Represión

La adición de una fuente de nitrógeno a un cultivo de *Gibberella* que sintetiza giberelinas provoca una rápida represión de esta ruta y un gran aumento de la síntesis de escualeno *in vitro*. La síntesis de kaureno *in vitro* se mantiene mucho tiempo y tres días después sigue siendo la quinta parte de la de los testigos (Fig. 7).



**Figura 7. Represión de la síntesis de giberelinas.** A un cultivo en plena producción de giberelinas, incubado 8 d en medio mínimo ICI, se le añade CINH<sub>4</sub> (100 mM). Las figuras huecas y las líneas discontinuas corresponden a los testigos sin la adición de amonio. Se representa la producción de giberelinas *in vivo* (▲), la radioactividad disponible (—) y su incorporación en terpenoides (▲), kaureno (●) y escualeno (■) *in vitro*; y las concentraciones internas de alanina (■), glutamina (▲) y ácido glutámico (●) libres.

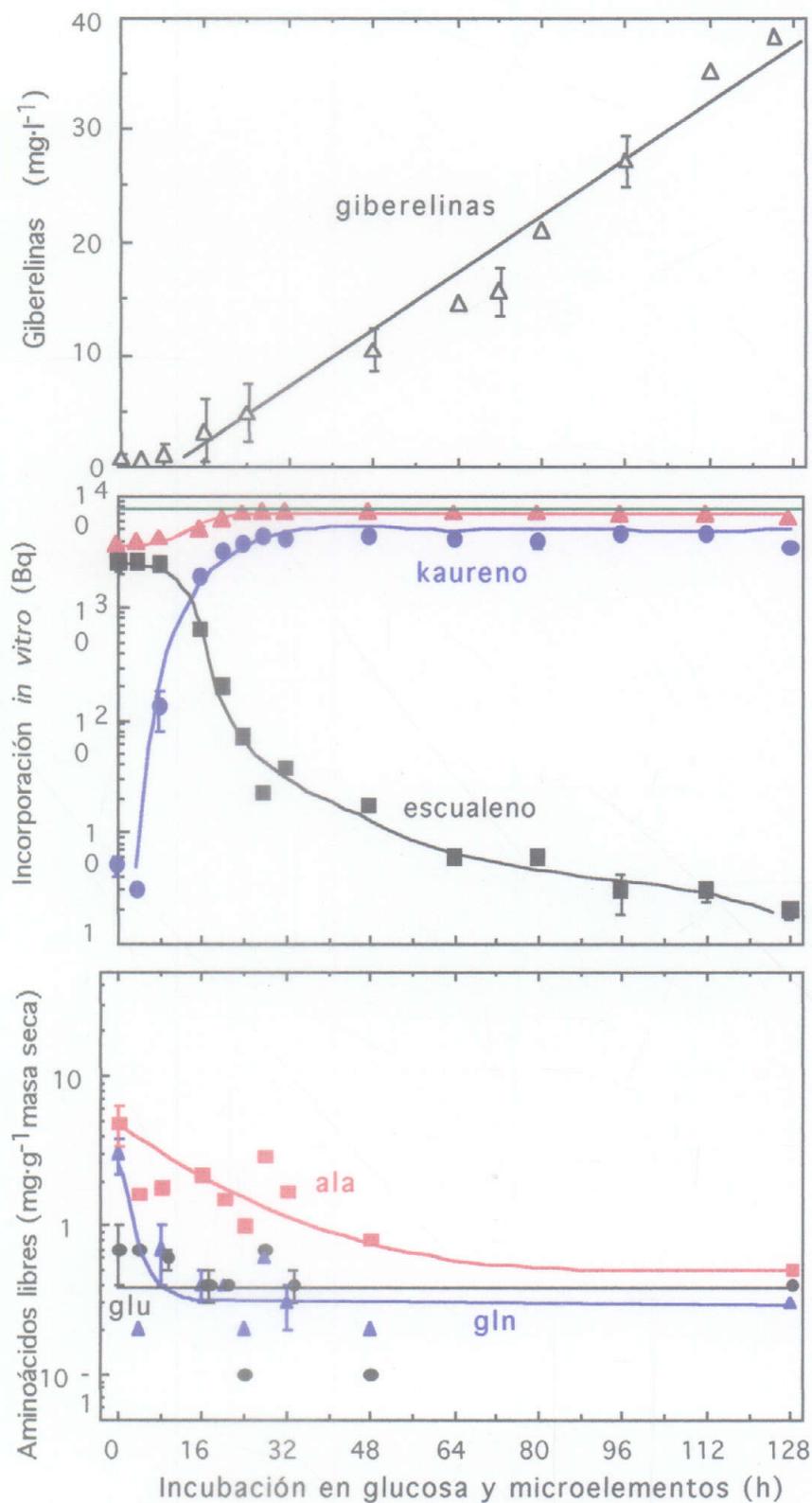
En un análisis preliminar no hemos detectado diferencias significativas en las concentraciones de los aminoácidos libres después de la adición de amonio, salvo en las de glutamina y alanina (Fig. 7). La glutamina alcanza un máximo de más del 10% de la masa seca del micelio a las 2 h y después disminuye. El aumento de la concentración de alanina es más lento y se mantiene más tiempo. Se representan también las concentraciones del ácido glutámico, el precursor de la glutamina.

### 2.3.2 Inducción

La transferencia de un micelio cultivado en medio mínimo ICI con exceso de nitrógeno a una solución de glucosa y microelementos produce cambios significativos en la síntesis de terpenoides (Fig. 8). Las giberelinas empiezan a detectarse 16 h después de la transferencia, unas 8 h más tarde que la actividad sintetasa de kaureno. La capacidad de síntesis de kaureno *in vitro* se multiplica por diez mil en 24 h y se mantiene durante al menos las 100 h siguientes. Al mismo tiempo disminuye la capacidad de sintetizar escualeno. En paralelo a este aumento se produce una reducción en la síntesis de escualeno.

La incorporación máxima en kaureno se alcanza cuando la totalidad del sustrato radioactivo disponible (línea verde) se ha consumido en terpenoides. Además, al mismo tiempo, la producción de giberelinas *in vivo* llega a ser máxima, lo que sugiere que el máximo de sintetasa de kaureno observado es real y no un artefacto debido a la escasez de sustratos.

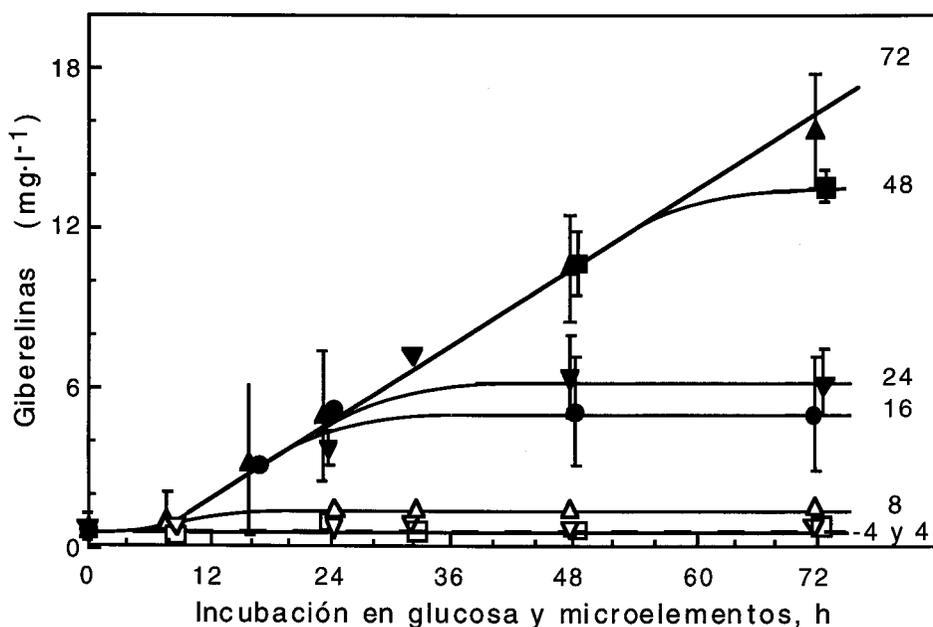
La concentración intracelular de aminoácidos libres se mantiene prácticamente constante después de la transferencia, con las excepciones, de nuevo, de las de glutamina y alanina, que disminuyen a la décima parte (Fig. 8).



**Figura 8. Inducción de la síntesis de giberelinas.** Los micelios cultivados durante 6 d en medio mínimo ICI con exceso de nitrógeno (no sintetizan giberelinas) se transfirieron a una solución de glucosa y microelementos. Se representa la concentración de giberelinas *in vivo* ( $\Delta$ ); la radioactividad disponible en los ensayos (—) y su incorporación en terpenoides ( $\blacktriangle$ ), kaureno ( $\bullet$ ) y escualeno ( $\blacksquare$ ) *in vitro*; y las concentraciones intracelulares de alanina ( $\blacksquare$ ), glutamina ( $\blacktriangle$ ) y ácido glutámico ( $\bullet$ ) libres.

### 2.3.3 Requerimientos de síntesis de proteínas para la producción de giberelinas

La cicloheximida, un eficaz inhibidor de la síntesis de proteínas en eucariontes (Siegel y Sisler, 1963), inhibe totalmente el crecimiento de *Gibberella* a una concentración de  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Para determinar si la inducción y el mantenimiento de la síntesis de giberelinas requiere nueva síntesis de proteínas se añadió cicloheximida a suspensiones de micelio en glucosa y microelementos (Fig. 9).

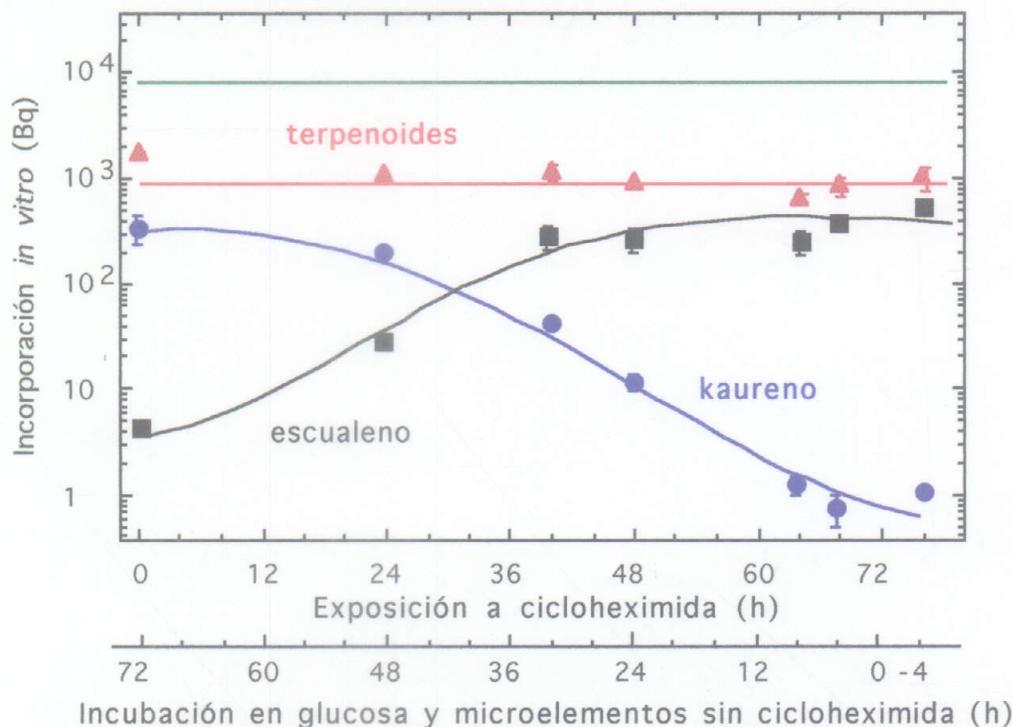


**Figura 9. Efecto de la cicloheximida en la inducción de la giberelinas.** Los micelios cultivados durante 6 d en medio ICI con exceso de nitrógeno (que no sintetizan giberelinas) se transfirieron a una solución de glucosa y microelementos. A estas suspensiones de micelio en glucosa se les añadió cicloheximida ( $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en el momento señalado junto a cada curva (h después de la transferencia a glucosa y microelementos). Los cultivos señalados con "-4" se añadió la cicloheximida 4 h antes de la transferencia, en medio ICI con exceso de nitrógeno.

Si se añade cicloheximida a micelios en plena producción de giberelinas se detiene la síntesis entre 6 y 8 h después. Si la producción de giberelinas no ha empezado, se inhibe por completo.

La síntesis de escualeno se mantiene alta en los micelios de cultivos expuestos a cicloheximida durante 76 h (Fig. 10). En el apartado anterior se muestra que la actividad de síntesis de kaureno alcanza el máximo en cultivos incubados 24 h en glucosa y microelementos, y se mantiene al menos durante las siguientes 100 h (Fig. 8). La exposición durante 24 h a cicloheximida prácticamente no afecta a la síntesis de kaureno (Fig. 10). En cultivos que ya habían alcanzado la síntesis de kaureno máxima (24 h en glucosa sin

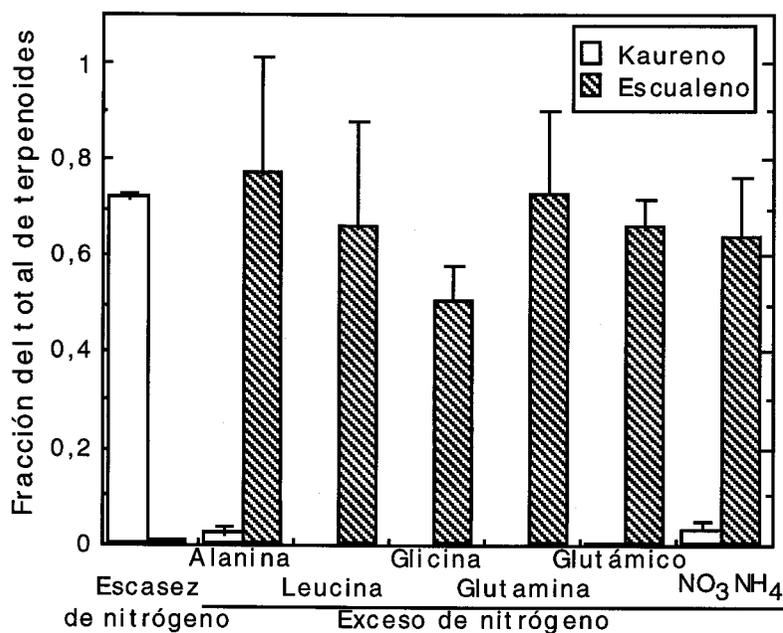
cicloheximida), las incubaciones con cicloheximida durante 48 h disminuyen la sintetasa de kaureno hasta valores inferiores al 10 %, respecto la detectada en los cultivos sin tratar. Sin embargo, la síntesis de escualeno, que ha disminuido en los micelios de cultivos incubados 24 y 32 h en glucosa y microelementos (Fig. 8), sube con exposiciones a cicloheximida de 48 y 40 h, respectivamente.



**Figura 10. Efecto de la cicloheximida en la síntesis de terpenoides.** Se representa la radioactividad disponible (—) y su incorporación en terpenoides (▲), en kaureno (●) y en escualeno (■) por extractos de micelios suspendidos durante 72 h en glucosa y microelementos. Se añadió cicloheximida ( $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a las suspensiones un tiempo antes de preparar los extractos, indicado en abscisas. El valor complementario a 72 h, también indicado, fue el tiempo de incubación en glucosa y microelementos antes de añadir la cicloheximida.

### 2.3.4 Aminoácidos como fuente de nitrógeno

Los extractos de micelios cultivados con exceso de nitrógeno sintetizan mucho escualeno, pero no kaureno. Usando distintos aminoácidos como fuentes de nitrógeno se obtiene el mismo resultado (Fig. 11).



**Figura 11.** Incorporación de  $2\text{-}^{14}\text{C}$  mevalonato en kaureno y escualeno respecto a todos los terpenoides por extractos crudos de micelios de la estirpe silvestre cultivados 6 d con las fuentes de nitrógeno que se indican. En los cultivos con exceso de nitrógeno se usaron  $4,8\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o cantidades de distintos aminoácidos que contienen la misma cantidad de nitrógeno. Escasez de nitrógeno indica  $0,48\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

**Resultados 2**

**Transformación integrativa**

Al comienzo de este trabajo se disponía de un protocolo de transformación de *Gibberella* con el gen *niaD* de *Aspergillus oryzae* como marcador seleccionable (Sánchez-Fernández *et al.*, 1991). La estirpe receptora de la transformación con este método debe ser mutante en la reductasa del nitrato. La imposibilidad de obtener cruzamientos fértiles con nuestra estirpe, y con todas sus derivadas, exigiría la obtención de nuevos mutantes a partir de las estirpes que se quieran transformar, lo que puede introducir otras mutaciones indeseables.

En este capítulo se describe un método de transformación con un marcador seleccionable directamente en la estirpe silvestre, la resistencia a higromicina, y la clonación del gen *carB*, responsable de la deshidrogenasa del fitoeno. Este gen, aunque no es seleccionable, permite la identificación visual de transformantes de estirpes mutantes *carB*. Por último, aprovechando las características de la transformación a resistencia a higromicina, se ha reemplazado el alelo del gen *carB* de la estirpe silvestre por un alelo nulo construido *in vitro*.

### 3.1 TRANSFORMACIÓN A RESISTENCIA A HIGROMICINA

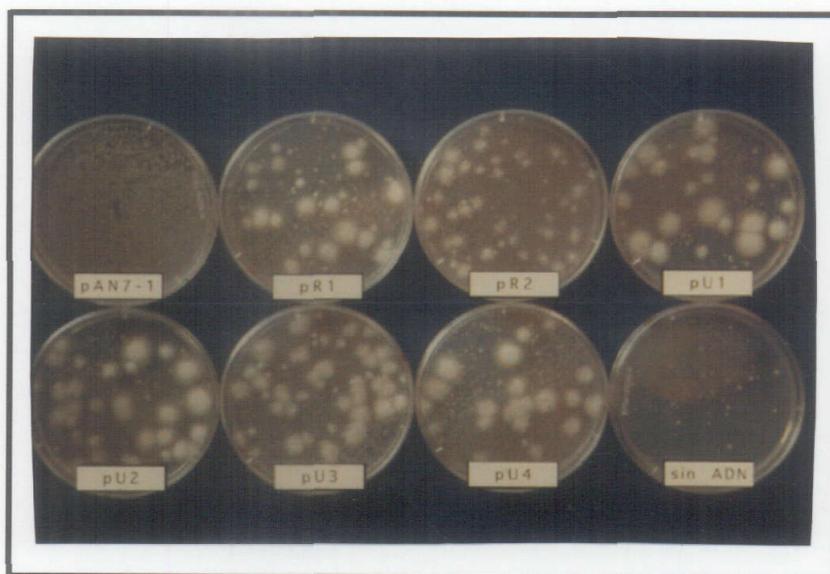
Se disponía del vector pAN7-1 (Punt *et al.*, 1987), que había transformado hongos próximos al nuestro. Este vector contiene, bajo el control de un potente promotor de *Aspergillus nidulans*, el gen bacteriano *hph*, responsable de la transferasa de fosfato a higromicina y que confiere la resistencia a este antibiótico.

Los intentos de transformación de nuestra estirpe con este plásmido no dieron resultado (Sánchez-Fernández, 1993). Este hecho puede atribuirse a dificultades en el mantenimiento del plásmido en *Gibberella*, ya que el vector no tiene un origen que le permita mantenerse libre en el hongo ni secuencias homólogas que le faciliten integrarse. Para facilitar la integración, decidimos introducir en el vector ADN repetido de *Gibberella*, de dos formas distintas.

La primera se basó en la observación de que los fragmentos de 6 kb eran muy abundantes en las digestiones totales con *XbaI* del ADN genómico de *Gibberella* (Sánchez-Fernández, 1993). La ligación de estos fragmentos en pAN7-1 dio 27 clones independientes, diez de los cuales tenían insertos con el mismo patrón de restricción con *EcoRI*. Uno de ellos se denominó pR1, y a su inserto secuencia R1. Los demás clones eran diferentes entre ellos. Se eligieron al azar cuatro clones distintos con insertos de 6 kb que se denominaron pU1, pU2, pU3 y pU4, y sus insertos secuencias U1, U2, U3 y U4.

La otra secuencia repetida introducida fue un fragmento de 1,8 kb del gen responsable del ARN ribosómico 18S que se clonó mediante la multiplicación *in vitro* de una región muy conservada evolutivamente (White *et al.*, 1990). El plásmido derivado de pAN7-1 con este fragmento se denominó pR2.

Todos los plásmidos que contienen secuencias de ADN de *Gibberella* originaron transformantes que mantuvieron la resistencia a higromicina en sus descendientes obtenidos a partir de esporas (Tabla 3). No se obtuvieron resistentes con el plásmido pAN7-1 ni en ausencia de ADN. En la Figura 12 se muestra el aspecto de las cajas primarias de una transformación. Las colonias pequeñas que aparecen en las cajas de la transformación con pAN7-1 y sin ADN, también presentes en las otras cajas, no crecieron indefinidamente con higromicina.



**Figura 12.** Resultado de una transformación. Se indica el plásmido utilizado en cada transformación.

**Tabla 3** Transformación de *Gibberella* a resistencia a higromicina con plásmidos derivados de pAN7-1. En las tres transformaciones se utilizaron unos  $5 \times 10^7$  protoplastos y 5  $\mu\text{g}$  de plásmido, salvo en los casos indicados. Las transformaciones de un mismo experimento se realizaron con un mismo preparado de protoplastos.

Plásmido	Número de colonias transformadas			$\alpha$
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	
pAN7-1	0	0	0	
pR1	35	25	2	0,82
pU1	25 *	23	2	0,89
pU2	3 #	21	3	0,69
pU3	9 ¢	36	4	0,77
pU4	19 ¢	45	2	0,81
pR2	4	33	4	1,23
-ADN	0	0	0	
$\beta$	0,55	0,30	0,35	

En \* se transformó con 3  $\mu\text{g}$ , en # con 0,7  $\mu\text{g}$  y en ¢ con 2  $\mu\text{g}$  de plásmido.  
 $\alpha$  y  $\beta$ : Coeficientes de variación de las frecuencias de transformación (nº de transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN) de cada plásmido y de cada experimento, respectivamente.

Los resultados son bastante erráticos, como se refleja en la variabilidad de los resultados de la Tabla 3 y en la ausencia de transformantes en otros cuatro experimentos similares. La media de los coeficientes de variación de las frecuencias de transformación (desviación típica dividida por la media) de los tres experimentos fue de 0,4; mientras que los coeficientes de variación de las frecuencias obtenidas con cada plásmido fueron superiores. Esto indica que la variación encontrada en las transformaciones depende más de los protoplastos (compartidos por todas las transformaciones de un mismo experimento) que de los plásmidos utilizados.

### 3.1.1 Caracterización de la secuencia repetida de 6 kb

Una secuenciación parcial de R1 nos permitió comprobar que esta es muy similar a fragmentos de los genes para el ARN ribosómico 25S de muchos organismos (Fig. 13). Las numerosas coincidencias encontradas en estas comparaciones nos permiten afirmar que la secuencia R1 es un fragmento del gen para el ARN ribosómico 25S de *G. fujikuroi*. No puede descartarse que algunas diferencias entre la secuencia de *G. fujikuroi* con la de otros organismos se deban a errores de secuenciación, ya que solo se ha hecho la lectura de una cadena.

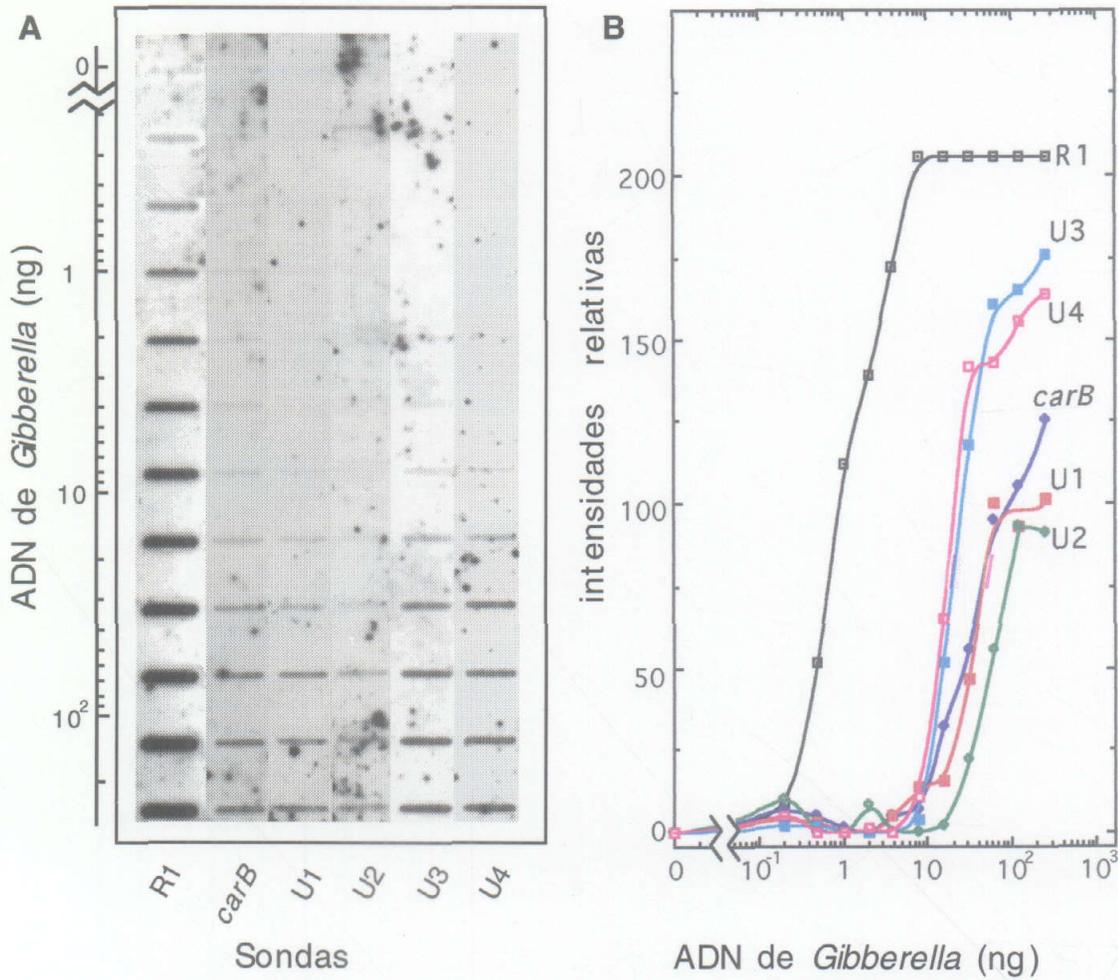
### 3.1.2 Número de ejemplares por genomio de las secuencias de 6 kb de ADN de *Gibberella* clonadas en pAN7-1

Hay unas 40 copias del ADN ribosómico (secuencia R1) por genomio y probablemente solo una del resto de las secuencias de 6 kb (secuencias U1, U2, U3 y U4). Se ha puesto de manifiesto porque, en las mismas condiciones de hibridación, la cantidad mínima de ADN de *Gibberella* detectada con la sonda del fragmento de ADN ribosómico es 40 veces inferior a las detectadas con las sondas de las otras secuencias de 6 kb y con una secuencia única. Las diferencias entre estas secuencias de 6 kb y la elegida como única parece que no son significativas (Fig. 14).

Como secuencia única se empleó un fragmento del gen *carB* (la deshidrogenasa del fitoeno), cuya clonación se describe en el apartado 3.2.1 de esta Tesis. La frecuencia de mutantes albinos que acumulan fitoeno es un indicio de que este gen es único en *Gibberella* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). La complementación con este gen de un mutante que acumula fitoeno y la obtención de mutantes por reemplazamiento de alelos descritas en esta Tesis (apartados 3.2.2 y 3.2.3) confirman que el gen *carB* es de copia única.

<i>Gibberella fujikuroi</i>	ATGGGGGATGAAACCGAACGTGAAAGTTAAGG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATGCGGGATGAAACCGAACGTAGAGTTAAGG
<i>Mucor racemosus</i>	ATGCGGGATGAAACCGAACGAGAAGTTAAGG
<i>Ganoderma australe</i>	ATGCGGGATGAAACCGAACGCGAGGTTAAGG
<i>Homo sapiens</i>	CTGCGGGATGAAACCGAACGCCGGGTTAAGG
<i>Gibberella fujikuroi</i>	TGCCGGAATAC - GCGCTCATCAGACACCAC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TGCCGGAATAC - ACGCTCATCAGACACCAC
<i>Mucor racemosus</i>	TGCCGGAATAC - ACGCTCATCAGACACCAC
<i>Ganoderma australe</i>	TGCCGGAATAC - ACGCTCATCAGACACCAC
<i>Homo sapiens</i>	CGCCCGATGCCGACGCTCATCAGACCCAG
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCCGGA
<i>Mucor racemosus</i>	AAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGA
<i>Ganoderma australe</i>	AAAAGGTGTTAGTTCATCTAGACAGCAGGA
<i>Homo sapiens</i>	AAAAGGTGTTGGTTGATATAGACAGCAGGA
<i>Gibberella fujikuroi</i>	CGGTGGCCATGG AAGTCGGAAACCGCTAAG
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CGGTGGCCATGG AAGTCGGAAATCCGCTAAG
<i>Mucor racemosus</i>	CGGTGGCCATGG AAGTCGGAAATCCGCTAAG
<i>Ganoderma australe</i>	CGGTGGCCATGG AAGTCGGAAATCCGCTAAG
<i>Homo sapiens</i>	CGGTGGCCATGG AAGTCGGAAATCCGCTAAG
<i>Gibberella fujikuroi</i>	GAGTGTGTAAACA ACTCACCTGCCGGAATGAA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	GAGTGTGTAAACA ACTCACCGGCCGGAATGAA
<i>Mucor racemosus</i>	GAGTGTGTAAACA ACTCACCTGCCGGAATGAA
<i>Ganoderma australe</i>	GAGTGTGTAAACA ACTCACCTGCCGGAATGAA
<i>Homo sapiens</i>	GAGTGTGTAAACA ACTCACCTGCCGGAATCAA
<i>Gibberella fujikuroi</i>	CTAGCC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CTAGCC
<i>Mucor racemosus</i>	CTAGCC
<i>Ganoderma australe</i>	CTAGCC
<i>Homo sapiens</i>	CTAGCC

**Figura 13.** Identities de un fragmento de la secuencia R1 con fragmentos para el gen ARN ribosómico 25S en los hongos *Saccharomyces* (ascomiceto), *Mucor* (zigomiceto) y *Ganoderma* (basidiomiceto), y para el 28S humano. Las posiciones conservadas en al menos 4 de las 5 secuencias aparecen con un fondo amarillo.



**Figura 14.** (A) Hibridación entre distintas cantidades de ADN genómico de *Gibberella* y diferentes sondas. (B) Intensidad máxima relativa de las bandas de (A) en función de la cantidad de ADN genómico de *Gibberella*.

### 3.1.3 Estabilidad de la transformación

Los transformantes primarios, obtenidos de la regeneración de los protoplastos, son presumiblemente heterocariontes. Estos heterocariontes se pueden formar porque los protoplastos transformados sean plurinucleados o, aunque tuvieran un solo núcleo, porque este se divida antes de la integración. Los transformantes secundarios, obtenidos a partir de esporas uninucleadas de transformantes primarios, deben ser homocariontes a menos que la transformación sea inestable.

La estabilidad de los plásmidos en las transformaciones se determinó por el número de esporas producidas por un micelio transformante secundario que mantienen el fenotipo de resistencia tras un ciclo de crecimiento vegetativo en un medio no selectivo.

Las transformaciones conseguidas son estables, excepto las obtenidas con el plásmido pU4 (Tabla 4). En este caso un ciclo vegetativo en medio no selectivo da lugar a que más de la mitad de las esporas pierdan la resistencia a higromicina. Los resultados obtenidos con varios micelios transformados no difirieron significativamente.

La transformación obtenida con los demás plásmidos fue muy estable. La resistencia a higromicina se mantuvo en 1947 esporas de un total de 2061 ensayadas. Los resultados con micelios transformados por distintos plásmidos no difieren significativamente de la frecuencia media global del 94,5 %.

La inestabilidad se origina, presumiblemente, por resolución del cointegrado plásmido-genomio mediante una recombinación homóloga. Esta resolución regeneraría el plásmido, y esto se puede poner de manifiesto mediante transformación de *E. coli*. Se realizaron dos electroporaciones de células de *E. coli* con 100 ng de ADN genómico de un transformante secundario obtenido con cada plásmido en el primer experimento y se recuperaron los plásmidos pR1, pR2 y pU4. Los plásmidos libres son poco abundantes, según se deduce de las pocas bacterias transformadas (de 0 a 3 por electroporación).

**Tabla 4 Estabilidad de la transformación.** Micelios resistentes a higromicina producidos por esporas de transformantes secundarios y número total de micelios ensayados.

Transformantes		Plásmidos					
		pR1	pR2	pU1	pU2	pU3	pU4
Exp. 1	T1	92/98	17/17	22/25	16/20	25/25	9/23
	T2	25/25	24/25	10/11	24/25	25/25	10/22
	T3	24/24	25/25	-	-	-	16/24
	T4	25/25	92/93	-	-	-	5/12
	T5	25/25	-	-	-	-	11/25
Exp. 2	T1	99/99	80/87	83/96	96/100	48/50	21/50
	T2	93/94	97/100	75/82	-	94/98	-
Exp. 3	T1	96/100	92/100	75/92	95/100	68/75	30/64
	T2	100/100	94/100	-	92/100	-	31/94
Total		579/590	520/547	265/306	323/345	260/273	133/314

### 3.1.4 Estructura de los genomios transformados

Los genomios de los transformantes a higromicina contienen secuencias del vector pAN7-1, que están ausentes en los genomios no transformados, como se comprobó mediante hibridación. El ADN plasmídico se ha integrado en los genomios transformados, ya que si estos genomios no se tratan con restrictasas, las secuencias plasmídicas se encuentran en fragmentos de gran tamaño, mayores que el plásmido libre (datos no mostrados).

Los plásmidos se han integrado por recombinación homóloga entre la secuencia de ADN de *Gibberella* del plásmido y la del genomio receptor, como se puso de manifiesto por hibridaciones separadas con ADN del plásmido pAN7-1 y del inserto.

La secuencia U1 hibrida con un fragmento de 12 kb en el ADN de genomios no transformados cortado con *EcoRI*, lo que confirma la presencia de un solo ejemplar en el genomio (Fig. 15). En las hibridaciones de dos de los

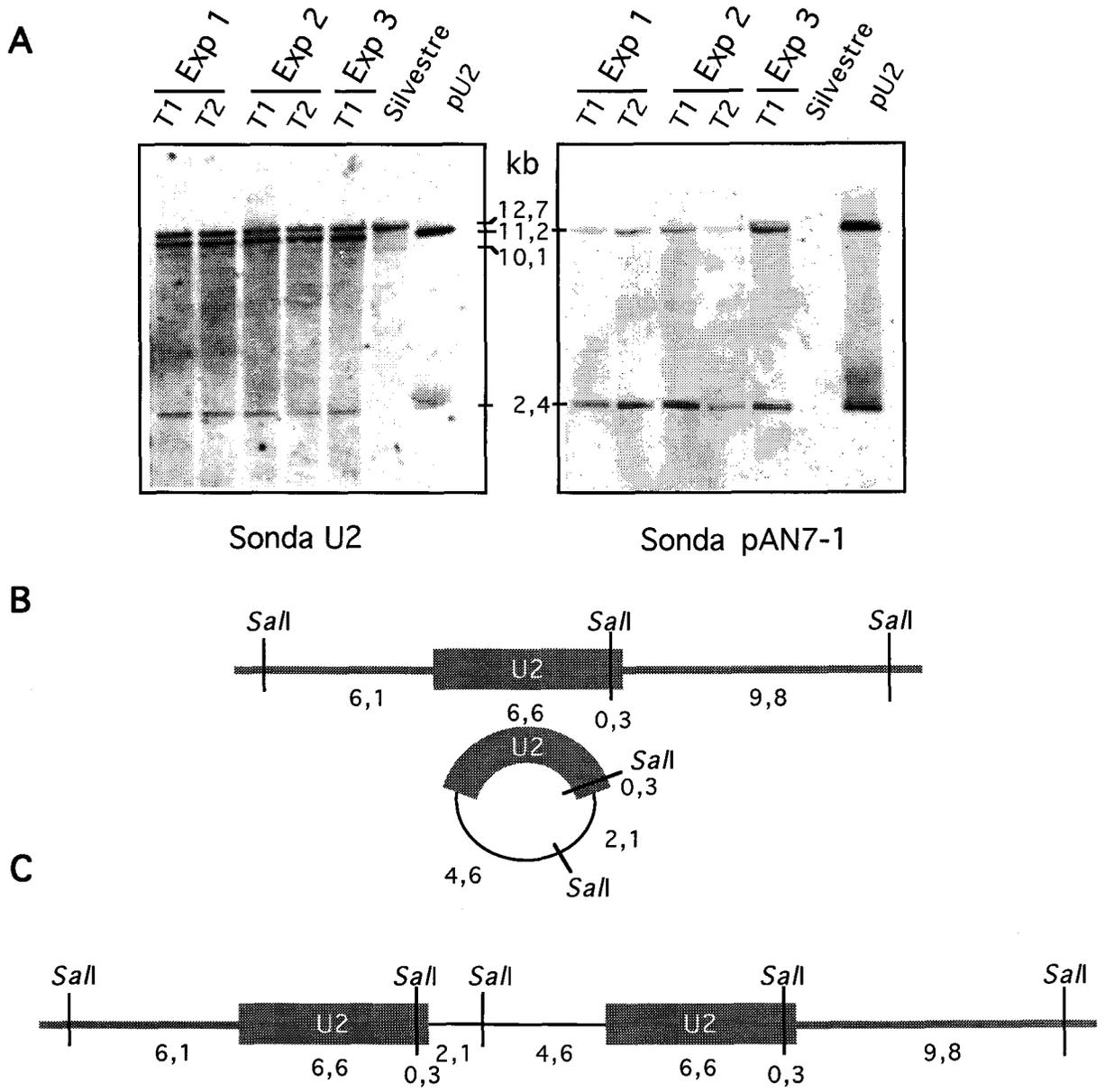
transformantes con U1 desaparece el fragmento de 12 kb y aparecen dos nuevos, de 13,4 kb y 8,6 kb, que están presentes en todos los transformantes con pU1. Esto indica que la integración se ha producido por recombinación homóloga. Los genomios de los transformantes conseguidos en el experimento 1 mantienen una banda del mismo tamaño que el silvestre. Cuando se hibridan estos genomios con el plásmido pAN7-1 no aparece la banda de 12 kb, pero si las de 13,4 kb y 8,6 kb (datos no mostrados). La explicación a estos transformantes será abordada más profundamente en el apartado 2 de la discusión.

El análisis de la transformación con pU2 y pU3 no se realizó de la misma forma que en el caso de pU1 porque *EcoRI* tiene una diana en la secuencia U2 y dos en U3. Para este análisis se empleó la restrictasa *SalI* que corta una vez en las secuencias U2 y U3 y en el vector pAN7-1 (Fig. 16 y 17).

Como era de esperar, los insertos hibridan con dos fragmentos en el genomio silvestre cortado con la restrictasa *SalI*. En el caso del inserto U2, la hibridación con uno de los fragmentos (de 10,1 kb) es menos efectiva, ya que solo comparten unas 300 pb. En el ADN de los transformantes, los insertos hibridan con estos mismos fragmentos y otros dos que coinciden en tamaño con los fragmentos reconocidos por el vector pAN7-1. Estos resultados indican que la integración ocurrió por recombinación homóloga en todos los casos.

En las transformaciones con pU2 y pU3 no se han producido integraciones múltiples de los plásmidos, heterocariontes con una alta proporción de núcleos no transformados ni ningún otro fenómeno que provoque un cambio en la relación entre los plásmidos insertados y los genomios transformados. Con la lógica excepción del fragmento de 10,1 kb en las transformaciones con pU2, las bandas observadas de un mismo carril en las Figuras 16 y 17 tienen la misma intensidad.



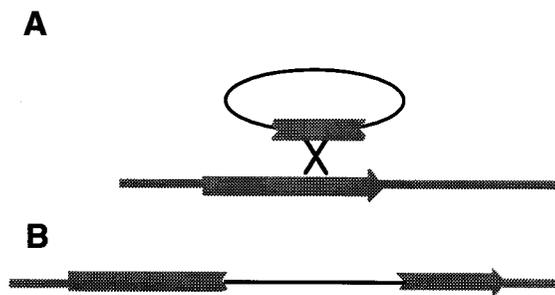


**Figura 16. Integración homóloga de pU2.** (A) Hibridaciones entre la secuencia U2 y el plásmido pAN7-1 con los ADN genómicos, cortados con *SalI* y separados por tamaños en una electroforesis, de la estirpe silvestre y de 5 transformantes con el plásmido pU2. (B) Esquemas del plásmido y de la región genómica de la estirpe silvestre. (C) Resultado de la integración del plásmido por recombinación homóloga de las secuencias U2. Los tamaños de los fragmentos se expresan en miles de pares de bases.



### 3.2 DISRUPCIÓN DEL GEN DE LA DESHIDROGENASA DEL FITOENO

Los resultados descritos en el apartado 2.1 indican que la transformación de *Gibberella* a resistencia a higromicina se produce por integración mediante recombinación homóloga. Las características de esta transformación integrativa pueden aprovecharse para conseguir disrupción génica. La integración por recombinación homóloga de un plásmido a través de un fragmento interno de un gen, como describió Shortle *et al.* (1982), provoca la rotura del gen en dos partes incompletas, que probablemente no serán funcionales. En la Figura 18 se representa un ejemplo de esta integración.



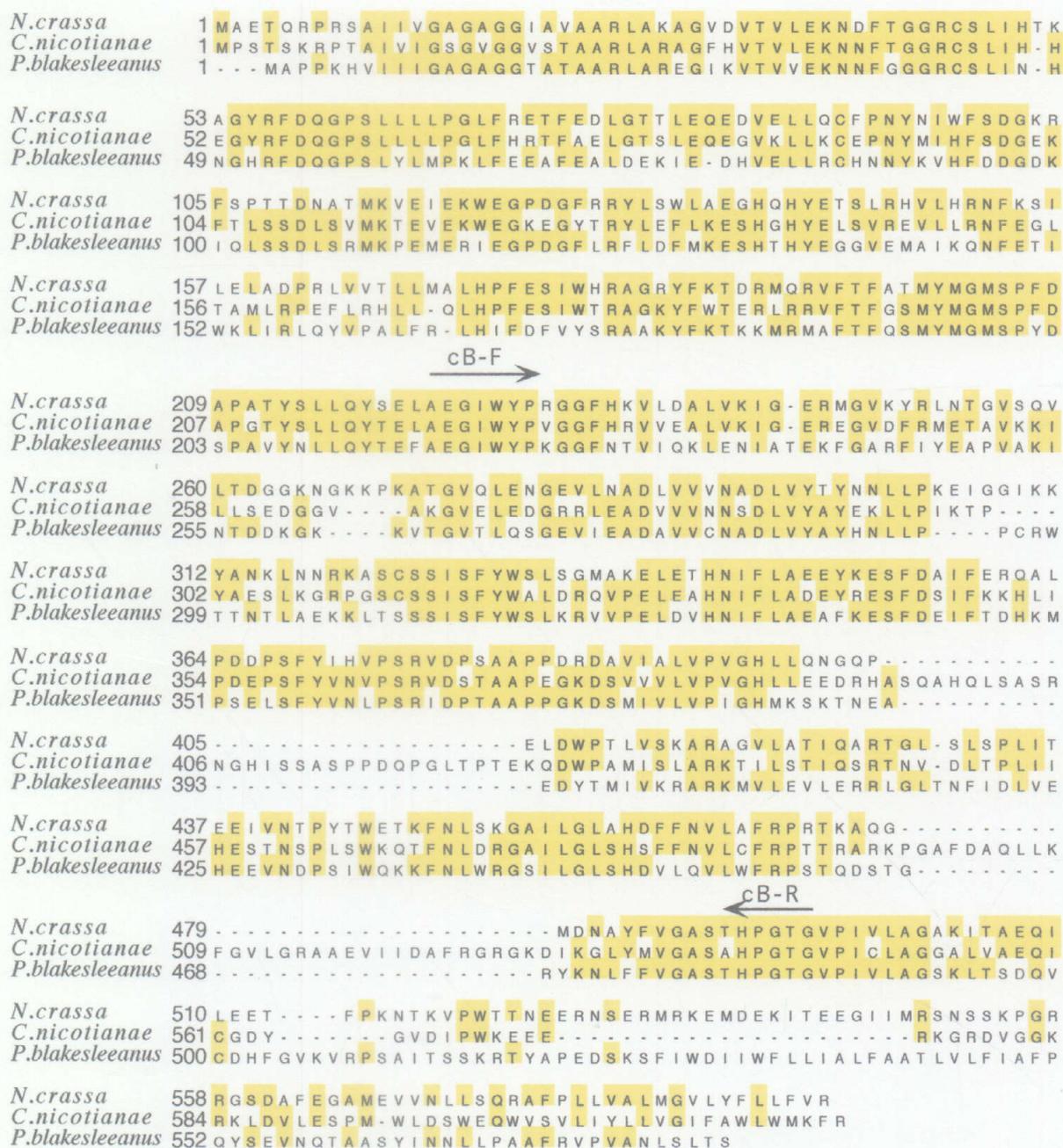
**Figura 18 Disrupción génica en un solo paso. (A).** Esquema del plásmido con un fragmento del gen *carB* de *Gibberella* y de la región genómica de este gen en la estirpe silvestre. **(B).** Resultado de la integración homóloga por el fragmento del gen *carB*

Para facilitar la detección de la pérdida de función, decidimos clonar un fragmento interno del gen *carB*, responsable de la deshidrogenasa del fitoeno. El fenotipo albino generado por la pérdida de su función es fácilmente reconocible en el fondo silvestre. La acumulación de fitoeno distingue a los mutantes *carB* de otros albinos.

#### 3.2.1 Clonación de un fragmento del gen de la deshidrogenasa del fitoeno

Para la clonación de un fragmento interno de este gen se recurrió a la multiplicación *in vitro* con la polimerasa *Taq*. La comparación de las secuencias de las deshidrogenasas del fitoeno de los hongos *Cercospora nicotianae* (Ehrenshaft y Daub, 1994), *Neurospora crassa* (Schmidhauser *et al.*, 1990) y *Phycomyces blakesleanus* (Ruiz-Hidalgo *et al.*, 1997) nos permitió diseñar dos oligonucleótidos, cB-F y cB-R (Fig. 19). La complejidad de los cebadores se redujo colocando solo nucleótidos con pirimidinas, cuando el código genético lo permitía, en las terceras posiciones de los codones.

La multiplicación *in vitro* con estos cebadores sobre el ADN genómico de la estirpe silvestre dio un fragmento de unas 820 pb. Este fragmento se clonó en pBS y se secuenciaron parcialmente clones independientes. Los clones eran



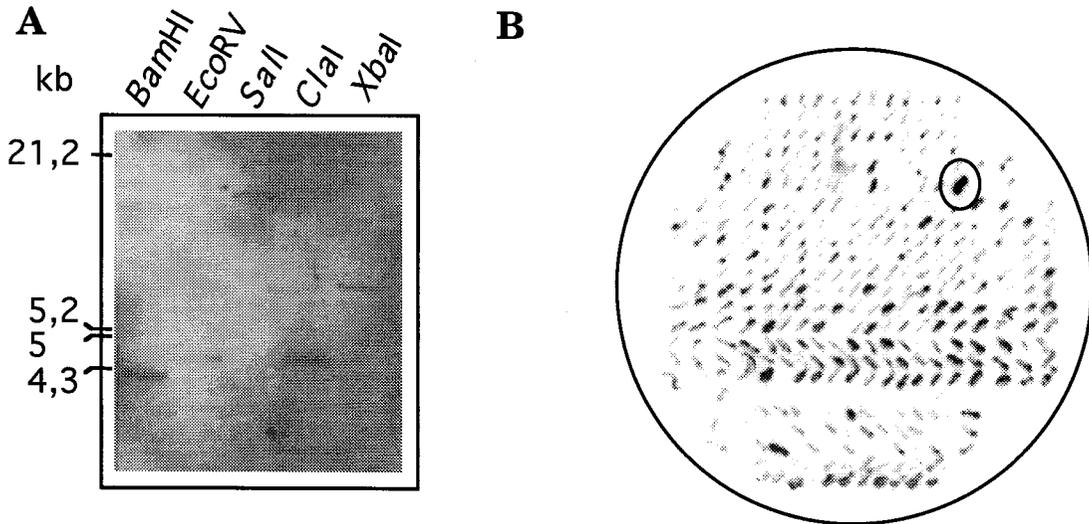
**Figura 19. Identities entre las deshidrogenasas del fitoeno de hongos y situación relativa de los cebadores cB-F y cB-R.** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las deshidrogenasas del fitoeno de *Neurospora crassa*, *Cercospora nicotianae* y *Phycomyces blakesleeanus*. Con fondo amarillo aparecen los aminoácidos conservados en al menos 2 secuencias. Los cebadores cB-F y cB-R han sido utilizados para amplificar un fragmento de 820 pb de este gen en *Gibberella*.

idénticos, y las secuencias de aminoácidos deducidas de las secuenciaciones presentaban similitudes con otros genes *carB* de hongos. Uno de estos fragmentos se clonó en el vector pAN7-1, y el plásmido resultante se denominó pCB.

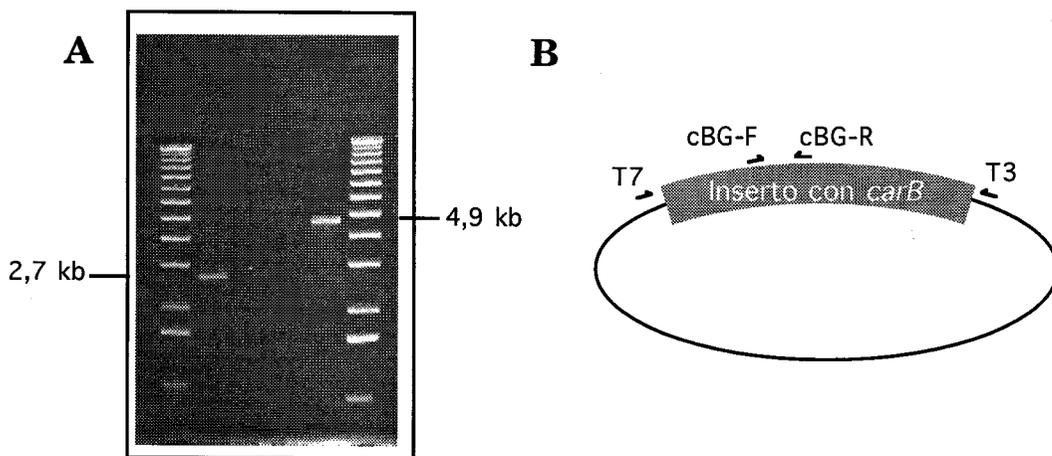
No se obtuvieron transformantes en 4 intentos de transformación con pCB a la estirpe silvestre y 6 a SG22, estirpe superproductora de neurosporaxantina. Decidimos clonar un fragmento mayor de ADN de *Gibberella* con el gen *carB*, por si existiera una limitación superior a las 820 pb para la integración homóloga.

Se realizó una genoteca parcial de ADN genómico de *Gibberella* enriquecida en el gen *carB*. Por hibridación, utilizando el inserto de pCB como sonda, se determinó el tamaño de los fragmentos de ADN cortados, con distintas restrictasas, que contenían el gen *carB* (Fig. 20). Solo fragmentos de un tamaño en cada una de las restricciones contienen el gen *carB*, lo que apoya que sea una secuencia única. Los fragmentos de ADN de *Gibberella* cortados con *Xba*I de unas 7 kb, tamaño del que contiene el gen *carB*, se clonaron en pHJA2, un plásmido derivado de pAN7-1 que permite distinguir construcciones recombinantes por el color de los transformantes de *E. coli*. Se obtuvieron 392 clones recombinantes que se rastrearon por hibridación con el inserto de pCB como sonda (Fig. 20). Los clones que dieron una señal más intensa se recomprobó por multiplicación *in vitro* usando los cebadores cBG-F y cBG-R, específicos del gen *carB* de *Gibberella*. Solo un clon originó una multiplicación del tamaño apropiado con estos cebadores, y el plásmido que contenía se denominó pTCB.

La ubicación del gen y la presencia de otros genes en los extremos del inserto confirman que el plásmido pTCB contiene el gen completo de la deshidrogenasa del fitoeno de *Gibberella*. La localización del gen *carB* de *Gibberella* en el inserto, de unas 6,7 kb, se realizó por multiplicaciones *in vitro* con distintas combinaciones de los cebadores T3 y T7, que flanquean el sitio de clonación, y los presentes en la secuencia del gen, cBG-F y cBG-R (Fig. 21). Las secuenciaciones parciales de los extremos 5' y 3' del inserto de pTCB respecto al gen *carB* identificaron, por similitud, secuencias del gen *carP*, responsable de la sintetasa de fitoeno, y de un gen responsable de una permeasa de amonio, respectivamente.



**Figura 20. Clonación del gen *carB*.** (A) Hibridación entre el fragmento del gen *carB* de pCB y ADN genómico de la estirpe silvestre, cortado con distintas restrictasas y separado por tamaños en una electroforesis. (B) Hibridación de colonias de *E. coli* con plásmidos recombinantes resultantes de la ligación de pHJA2 y fragmentos de 7 kb de ADN de *Gibberella* cortados con *XbaI*. Hay un positivo destacado con un círculo.



**Figura 21. Localización del gen en el inserto.** (A) Amplificaciones *in vitro* con la polimerasa *Taq* usando las 4 posibles combinaciones con un cebador del plásmido (T7 ó T3) y otro del gen *carB* (cBG-F o cBG-R). (B) Esquema con la orientación de los cebadores deducida del resultado de las amplificaciones.

### 3.2.2 Complementación por transformación de un mutante *carB*

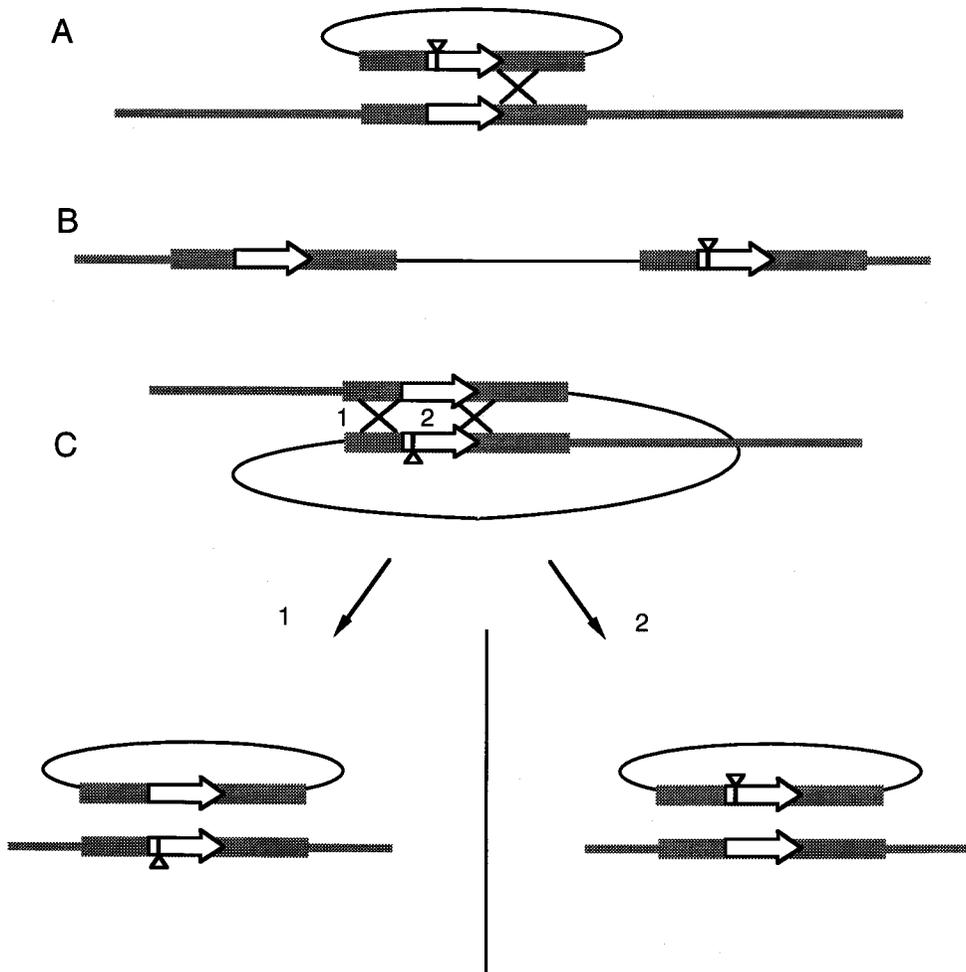
El fragmento del plásmido pTCB contiene un gen *carB* funcional que puede complementar mutantes en este gen. La estirpe SG207 es un mutante superproductor de fitoeno aislado a partir de SG22. Se ha obtenido un micelio transformado con pTCB a partir de protoplastos de SG207. El contenido en carotenoides de este transformante es similar al de la estirpe SG22 (Tabla 5). Este resultado también nos permite comprobar que SG207 es un mutante *carB*.

**Tabla 5** Contenido en carotenoides ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  masa seca) de los micelios de las estirpes indicadas incubadas en oscuridad a 22 °C durante 4 días en agar nutritivo.

	Fitoeno	Carotenos intermediarios	Neurosporaxantina	Carotenos coloreados
S1	< 5	3	4	7
SG22	< 5	145	463	608
SG207	631	< 1	no detectada	< 1
T SG207 + pTCB	< 5	123	425	548

### 3.2.3 Mutación dirigida y sustitución alélica

Hemos reemplazado el alelo del gen *carB* presente en la estirpe silvestre por un alelo nulo construido *in vitro*. El alelo fue construido cortando el plásmido con *KpnI* en una diana presente en el gen *carB* cerca de su extremo 5', rellenando los extremos con la polimerasa de T4 y circularizándolo en romo. Dos clones independientes con estos alelos, denominados pTCB1 y pTCB2, se emplearon para transformar a la estirpe silvestre. Estos nuevos alelos han perdido la diana *KpnI*, y deben presentar una inserción de 4 pb que provoque un cambio en la pauta de traducción y la consiguiente pérdida de función.



**Figura 22. Reemplazamientos de alelos en dos pasos.** (A) Integración del plásmido portador del nuevo alelo mediante recombinación homóloga a través del alelo presente en el genoma. (B) Resultado de la integración del plásmido. (C) La resolución del cointegrado plásmido-genoma por recombinación homóloga reemplaza el alelo silvestre por el nulo (1) o regenera la situación silvestre (2). Este esquema no incluye la conversión génica.

Se obtuvieron dos transformantes con cada uno de estos plásmidos (T1.1 y T1.2 de pTCB1; T2.1 y T2.2 de pTCB2), y se incubaron esporas derivadas de un transformante secundario de cada uno de ellos en condiciones de síntesis de carotenoides durante 4 días. El transformante secundario de T1.1 dio lugar a colonias albinas (Fig. 23). Entre los descendientes de 5 transformantes secundarios independientes, derivados del transformante T1.1, aparecen  $16.6 \pm 8,4$  colonias albinas cada  $10^4$  colonias (Tabla 6).

La mayoría de las colonias albinas son sensibles a higromicina (Tabla 6), como se espera por la pérdida del plásmido (Fig. 22). Sin embargo, una considerable proporción (10 / 38) son resistentes.



**Figura 23** Colonias de *Gibberella* derivadas de un transformante secundario con el plásmido pTCB1. Las colonias han sido incubadas 4 días a 28 °C con una intensidad luminosa de unos  $15 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$  de luz blanca continua. En el centro de la caja se observa una colonia albina.

**Tabla 6** Fenotipos de las colonias derivadas de transformantes secundarios independientes obtenidos a partir de transformantes con pTCB1 y pTCB2, plásmidos que contienen alelos nulos del gen *carB*.

T. 1 <small>arios</small>	T. 2 <small>arios</small>	albinos/totales	anaranjados sensibles/ anaranjados comprobados	albinos sensibles / albinos comprobados
T1.1	1	5/4500	11/237	4/5
	2	16/4900	0/50	11/14
	3	7/6260	0/50	4/7
	4	6/5680	0/50	3/6
	5	7/4030	2/50	6/6
T1.2	1	0/5670	0/100	
T2.1	1	0/3710	0/100	
T2.2	1	0/5590	0/100	

El contenido en fitoeno de los dos tipos de albinos derivados del transformante T1.1 confirman que son mutantes *carB* (Tabla 7).

**Tabla 7** Contenido en carotenoides ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  masa seca) de los micelios incubados 9 días en agar nutritivo a 28 °C bajo luz blanca continua.

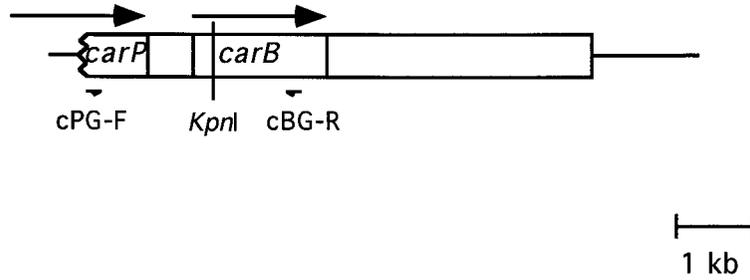
	Fitoeno	Carotenos intermediarios	Neurosporaxantina	Carotenos coloreados
Silvestre	< 5	36	140	176
Albino sensible	707	< 1	< 1	< 1
Albino resistente	631	< 1	< 1	< 1

### 3.2.4 Estructura de los genomios de los transformantes y de sus descendientes albinos

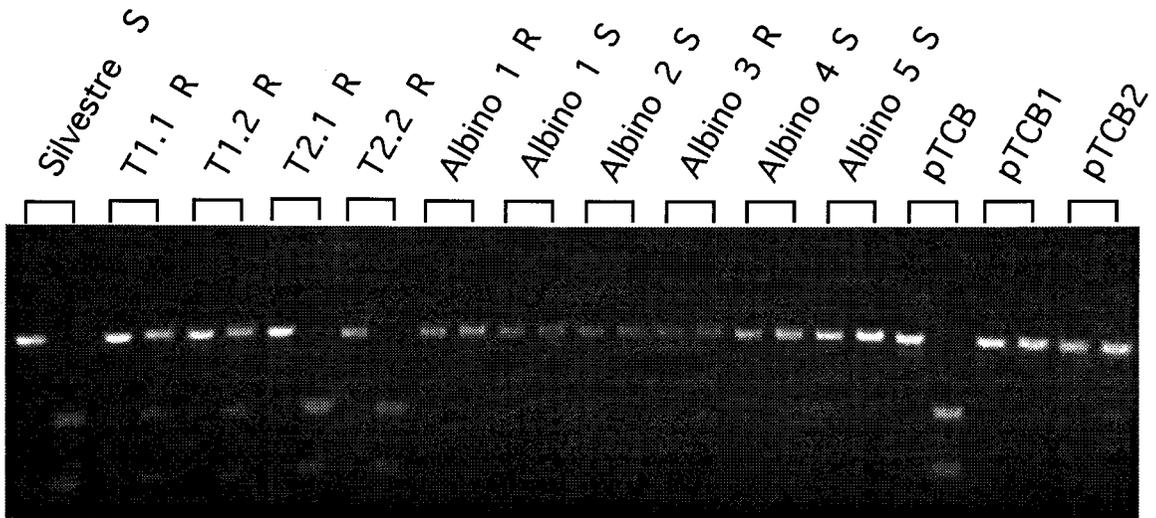
Los micelios albinos derivados del transformante T1.1 solo tienen el alelo mutante del gen *carB*. Los transformantes T1.1 y T1.2 contienen tanto el alelo silvestre como el mutante, mientras que los transformantes T2.1 y T2.2 solo tienen el silvestre. Estos resultados se obtuvieron mediante la restricción con *KpnI* de los fragmentos obtenidos a partir de multiplicaciones *in vitro* con los cebadores cBG-R y cPG-F, este último específico del gen *carP*. La presencia o ausencia de una diana *KpnI* en estos fragmentos permite identificar los alelos presentes en el genomio (Fig. 24). Este resultado explica que no aparezcan colonias albinas entre los descendientes de los transformantes T2.1 y T2.2, pero no entre los de T1.2.

En todos los transformantes con los plásmidos pTCB1 y pTCB2, la integración se ha producido por recombinación homóloga. En el transformante T1.2 se ha producido una integración múltiple. Tanto en la primera integración del transformante T1.2 como en las de T2.1 y T2.2 deben haberse producido conversiones génicas que han provocado la duplicación del alelo silvestre y la pérdida, en esta integración, de los alelos mutantes. Los albinos sensibles tienen una sola copia del alelo mutante, mientras que los resistentes tienen dos copias de este alelo unidas con el vector. Estos albinos resistentes se deben haber producido también por conversión génica. La estructura de la región que contiene el gen *carB* en estas estirpes se ha deducido por hibridación del ADN genómico, cortado con *KpnI*, con una sonda de la región del gen *carB* que incluye esta diana (Fig. 25 y 26). Este resultado explica la ausencia de albinos entre los descendientes del transformante T1.2.

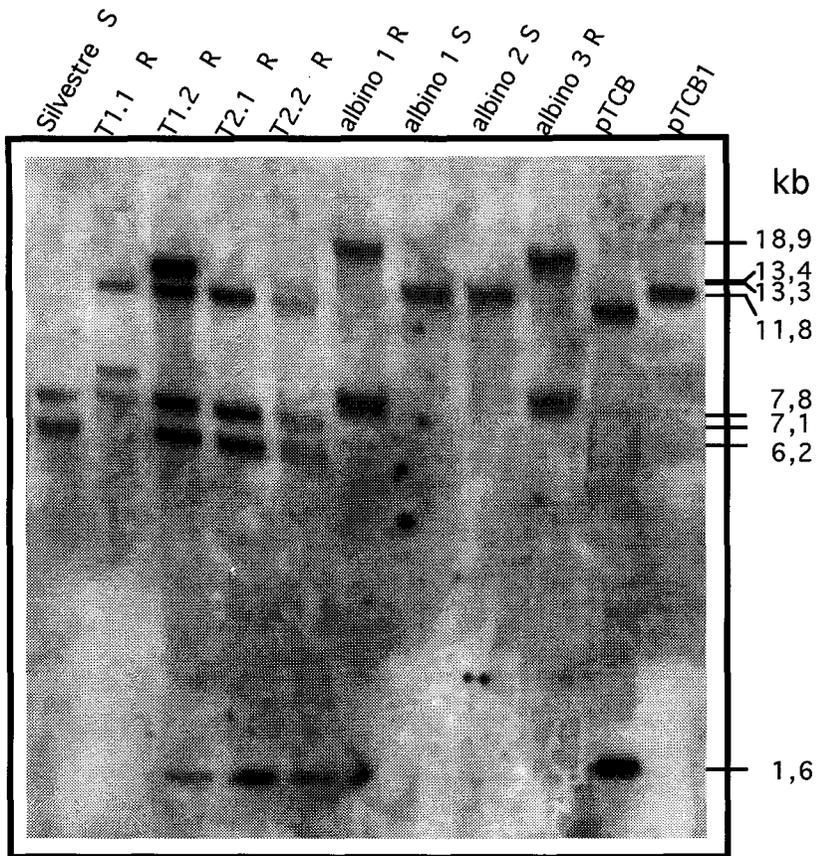
A



B

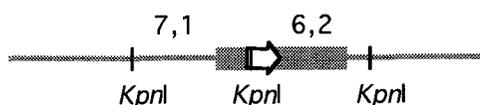


**Figura 24. Identificación del alelo *carB*.** (A) Esquema del fragmento de ADN clonado que contiene el gen *carB* de *Gibberella*. Los tamaños de los genes *carP* y *carB* representan los de *Neurospora crassa*. La flecha indica la dirección de la transcripción. (B) Separación por tamaños de los fragmentos multiplicados *in vitro* con los cebadores cPG-F y cBG-R, sin tratar (primer carril de cada pareja) y tratados con la restrictasa *KpnI* (segundo). En cada pareja de carriles se indica la estirpe, cuyo ADN genómico fue empleado como molde en la multiplicación. Estas fueron: la silvestre; las transformantes T1.1 y T1.2 (obtenidas con el plásmido pTCB1) y, T2.1 y T2.2 (obtenidas con pTCB2); y 6 albinas derivadas del transformante T1.1. En las estirpes albinas se indica con un número el transformante secundario del que se aislaron. El fenotipo de resistencia (R) o sensibilidad (S) a higromicina se indica en todas las estirpes.



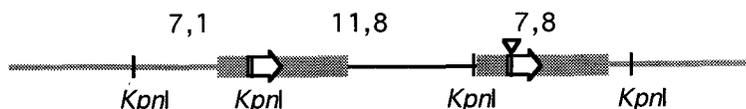
**Figura 25.** Hibridación entre una secuencia que contiene la diana *KpnI* y los ADN genómicos, cortados con *KpnI* y separados por tamaños en una electroforesis, de la estirpe silvestre, 2 transformadas con pTCB1 (T1.1 y T1.2), 2 transformadas con pTCB (T2.1 y T2.2) y 4 albinas derivadas de T1.1. En las estirpes albinas se señala con un número el transformado secundario del que se aislaron. Se indica el fenotipo de resistencia (R) o sensibilidad (S) a higromicina de todas las estirpes.

Silvestre

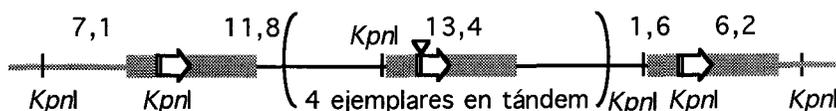


Estirpes transformadas

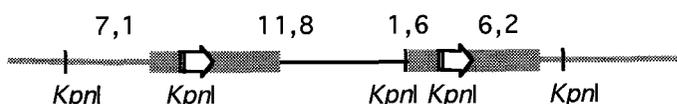
T1.1



T1.2

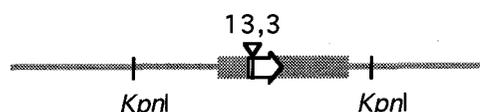


T2.1 y T2.2

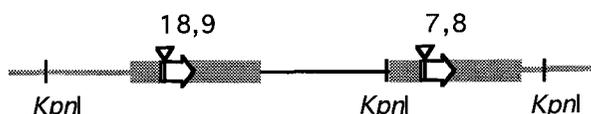


Estirpes albinas derivadas de T1.1

Sensibles a higromicina

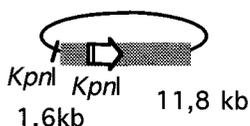


Resistentes a higromicina

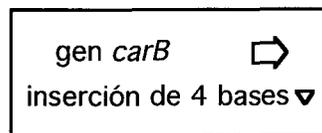
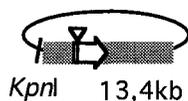


Plásmidos

pTCB (plásmido con alelo silvestre)



pTCB1 (plásmido con alelo mutante)



**Figura 26.** Esquemas de los plásmidos con el alelo mutante y silvestre y de las regiones genómicas de la estirpe silvestre, las transformadas con el plásmido pTCB1 (T1.1 y T1.2), las transformadas con pTCB2 (T2.1 y T2.2) y las albinas derivadas de la transformada T1.1. Se indica el fenotipo de resistencia (R) o sensibilidad (S) a higromicina de todas las estirpes.

**Discusión**

## 4.1 SÍNTESIS DE GIBERELINAS

### 4.1.1 Mutantes *gib*

Esta Tesis ha completado la caracterización de la producción de giberelinas de los mutantes *gib* previamente aislados en nuestro laboratorio (Candau *et al.*, 1991). Los fenotipos de estos mutantes confirman que el método de detección, desarrollado para su aislamiento, es eficaz para encontrar mutantes alterados en la cantidad total y en la composición de la mezcla de giberelinas acumuladas en el medio de cultivo.

Nuestra colección no incluye mutantes afectados en muchas etapas de la formación de GA<sub>3</sub>. Tenemos mutantes en los primeros pasos de la ruta (mutantes agiberélicos) o en un paso final, la hidroxilación en la posición 13 del esqueleto *ent*-giberelano (mutantes que acumulan GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> a expensas de GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>). Se echan de menos mutantes afectados en pasos intermedios, entre el ácido kaurenico y las giberelinas GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>. En las plantas, a pesar de la facilidad en la identificación de mutantes *gib* por su enanismo, no se han encontrado mutantes en muchos pasos de la ruta. Varias hipótesis pueden explicar estos resultados:

1) Una misma reacción es llevada a cabo por varias enzimas similares, producto de genes distintos. Para bloquearla habría que mutar todos estos genes. En *Arabidopsis thaliana* se han caracterizado tres oxigenasas solubles capaces de oxidar el carbono 20 del esqueleto *ent*-giberelano (Phillips *et al.*, 1995), lo que demuestra que esta hipótesis es cierta, al menos para esta actividad.

2) Una misma enzima es responsable de varias reacciones. Si una enzima cataliza varias reacciones de la ruta de biosíntesis de giberelinas la mutación de su gen se reflejaría en la pérdida de la reacción más temprana en la ruta. Si alguna de las reacciones que cataliza fuera esencial, la mutación sería letal. La biotransformación por *Gibberella* de sustratos artificiales (modificados químicamente) para dar giberelinas no naturales (Bearder *et al.*, 1974) es un indicio de que existen pasos de la ruta con cierta inespecificidad de sustrato, una característica de las enzimas responsables de varias reacciones. El aislamiento de mutantes de *Gibberella* resistentes al pefurazolato, un inhibidor de la síntesis de ergosterol, con la producción de giberelinas alterada (Takenaka *et al.*, 1992) es un indicio de la existencia de enzimas compartidas con rutas esenciales.

3) Algunos mutantes que no den cambios detectables en el ensayo de fluorescencia no podrían ser aislados por nuestros métodos. Bastaría que produjeran una mezcla de giberelinas cuya fluorescencia, tras la reacción con ácido sulfúrico, sea similar a la del silvestre.

Casi la mitad de los mutantes *gib*, los incluidos en el cuarto grupo, no presentan cambios importantes en la producción de giberelinas. Estos mutantes pueden haberse originado por mutaciones rezumantes o por mutaciones de pérdida de función en genes que forman parte de familias de genes responsables de enzimas que catalizan una misma reacción con eficiencias diferentes.

Se investigó la síntesis de kaureno *in vitro* en los mutantes que producen menos giberelinas (grupos 1 y 3). En los cinco mutantes se observa una disminución en la síntesis de kaureno, que se puede correlacionar con un incremento en la síntesis de escualeno. Los aumentos en la síntesis de escualeno deben ser provocados por una mayor disponibilidad de sustrato, más que por un aumento en la sintetasa de escualeno, puesto que se debe esperar que los cinco mutantes hayan incrementado esta actividad. Las disminuciones de la síntesis de kaureno encontradas *in vitro* también podrían deberse a inhibiciones por la acumulación de kaureno *in vivo* que hayan sido provocadas por mutaciones en los genes responsables de las enzimas que metabolizan este compuesto hacia las giberelinas. Para la discusión del fenotipo de estos mutantes ha sido esencial un trabajo realizado recientemente por el grupo del Prof. Alejandro Fernández Barrero en la Universidad de Granada, que ha analizado la bioconversión de distintos precursores purificados de la ruta por los mutantes del primer grupo (Barrero AF, comunicación personal).

El mutante SG121 tiene disminuida la producción de giberelinas y bicaverinas a menos del 10% respecto de la silvestre. Los extractos crudos de micelios de este mutante prácticamente no sintetizan kaureno. La disminución de la producción de bicaverinas, compuestos que no son terpenoides pero que están sujetos a la misma regulación que las giberelinas (Giordano W, comunicación personal), hace pensar que esta estirpe sea un mutante regulador, que no es capaz de inducir ni las giberelinas ni las bicaverinas. Sin embargo, este mutante es capaz de metabolizar eficientemente en giberelinas los precursores posteriores al kaureno (Barrero AF, comunicación personal). La existencia de elementos del complejo de la sintetasa de kaureno compartidos con la sintetasa de poliquétidos podría explicar el fenotipo de este mutante.

Las síntesis de giberelinas y fujenal *in vivo*, y de kaureno *in vitro* están ausentes en el mutante SG139. Esta estirpe tampoco metaboliza diversos precursores de las giberelinas (Barrero AF, comunicación personal). El fenotipo es consecuente con una mutación reguladora, específica de las giberelinas, que afecte a todas las actividades de la ruta de biosíntesis.

El mutante SG136 prácticamente no produce giberelinas ni fujenal. Se observa una disminución en la síntesis de kaureno *in vitro*, pero las condiciones del ensayo no permiten comparar las eficiencias en las incorporaciones y, por lo tanto, localizar el bloqueo de la síntesis de giberelinas observada *in vivo* respecto de la síntesis de kaureno. Una disminución a la mitad en la síntesis de kaureno *in vitro* no corresponde a la misma disminución de esta actividad *in vivo*. En los estudios de bioconversión se ha puesto de manifiesto que este mutante es capaz de metabolizar kaureno hasta GA<sub>3</sub>. Los datos existentes indican que SG136 está afectado en la sintetasa de kaureno.

La producción de giberelinas del mutante SG138 prácticamente se concentra en GA<sub>24</sub>, una giberelina de 20 átomos de carbono y sin hidroxilar en el carbono 3 (Fig. 2). La síntesis de kaureno *in vitro* también se encuentra disminuida. Los estudios de bioconversión han puesto de manifiesto que SG138 sólo no es capaz de metabolizar precursores anteriores al ácido kaurenoico. Además, la conversión se localiza mayoritariamente en giberelinas de 20 átomos de carbono y no hidroxiladas en el carbono 3 (Barrero AF, comunicación personal). Si se utiliza GA<sub>4</sub> como precursor, una giberelina de 19 átomos de carbono e hidroxilada en el carbono 3, se pone de manifiesto la incapacidad para hidroxilar el carbono 13. Los datos de este mutante parecen indicar que está afectado en las siguientes oxidaciones: las del carbono 19 del kaureno para dar ácido kaurenoico, las del carbono 3 del aldehído de GA<sub>12</sub> para formar el aldehído de GA<sub>14</sub>, las del carbono 20 de GA<sub>24</sub> para dar GA<sub>9</sub> y las del carbono 13 de GA<sub>7</sub> hasta GA<sub>3</sub>. Este mutante confirma la segunda hipótesis, propuesta anteriormente, como una de las causas de la ausencia de fenotipos intermedios en nuestra colección de mutantes.

El mutante SG127 no produce carotenoides y tiene disminuida al 20% la producción de giberelinas y fujenal. Sintetiza kaureno *in vitro* aunque menos que el silvestre. Como ya se ha discutido antes, el ensayo no permite localizar el bloqueo de las síntesis de giberelinas observada *in vivo* respecto de la síntesis de kaureno. El fenotipo de este mutante se puede explicar con una sola mutación en el gen de la sintetasa del difosfato de geranilgeranilo. En *Neurospora*, solo se han aislado mutantes rezumantes en este gen (Barbato *et al.*, 1996), posiblemente

por la existencia de metabolitos esenciales derivados del difosfato de geranilgeranilo (Chappell, 1995). En *Gibberella*, las diferencias de utilización del difosfato de geranilgeranilo por las rutas de síntesis de carotenoides y giberelinas, pueden explicar la existencia de mutaciones que provoquen un bloqueo parcial de la ruta de la giberelinas y total en carotenoides (Candau *et al.*, 1991). Además, los carotenoides y las giberelinas se sintetizan en compartimentos separados (Domenech *et al.*, 1996), por lo que una alteración en los mecanismos que dirigen la sintetasa del difosfato de geranilgeranilo a los distintos compartimentos también puede provocar este fenotipo. En esta Tesis se ha intentado reproducir este fenotipo aislando mutantes albinos sin carotenoides, pero ninguno de ellos resultó estar afectado en la síntesis de giberelinas. Este resultado negativo puede ser un indicio de que SG127 tenga dos mutaciones independientes, lo que disminuiría las probabilidades de reproducirlo. El reciente aislamiento del gen responsable de la sintetasa del difosfato de geranilgeranilo de *Gibberella* (Tudzinsky *et al.*, 1997) hace posible comprobar la existencia de la mutación en este gen por transformación de SG127 con el alelo silvestre.

Los mutantes SG123 y SG133 están afectados en la hidroxilasa  $\beta$  del carbono 13, fenotipo similar al de la estirpe R-9 de *Gibberella* (Bearder *et al.*, 1973). El aislamiento de dos mutantes con este genotipo sugiere que deberían haberse encontrado otros tipos de mutantes que afecten a pasos intermedios de la ruta. Los posibles motivos de la escasez de distintos tipos de mutantes ya han sido objeto de discusión.

En *Gibberella*, el fenotipo albino puede ser producido por mutaciones en al menos dos genes estructurales: el *carB* (la deshidrogenasa del fitoeno) y el *carP* (la sintetasa del fitoeno). Los mutantes *carB* acumulan fitoeno mientras que los *carP* carecen de este caroteno. En el intento de reproducir el fenotipo de la estirpe SG127 se ha aislado una colección de mutantes albinos obtenidos a partir del silvestre y de SG22, un mutante superproductor de neurosporaxantina. La proporción de albinos que acumulan fitoeno derivados del silvestre y de SG22 parece ser diferente. Este resultado sugiere la existencia de un tipo de mutante entre los albinos derivados del silvestre ausente entre los obtenidos a partir de SG22. Se ha propuesto un mecanismo regulador de la síntesis de carotenoides de *Gibberella* que predice la existencia de mutantes reguladores albinos que no podrían detectarse a partir de mutantes superproductores, ya que estos estarían afectados en un gen cuya pérdida de función sería epistática sobre otras mutaciones reguladoras albinas (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987).

### 4.1.2 Regulación de la biosíntesis de giberelinas

Los extractos de micelios silvestres que producen giberelinas sintetizan mucho kaureno, mientras que los que no las producen sintetizan mucho escualeno. Ambas rutas compiten por un sustrato común limitante, el mevalonato. Por las condiciones del ensayo, basta una disminución en la síntesis de kaureno para producirse un incremento en la síntesis de escualeno, sin aumentar la síntesis de enzima. Los cultivos incubados 24 y 32 h en glucosa, que ya tiene muy disminuida la síntesis de escualeno (Fig. 8), recuperan la síntesis de escualeno máxima cuando se exponen a cicloheximida de 48 y 40 h, respectivamente (Fig. 10).

Una vez inducida la síntesis de giberelinas, ésta se mantiene constante durante al menos tres semanas (Candau *et al.*, 1992). El costo de la reposición de las enzimas se evitaría si fueran estables durante el período de producción de giberelinas. Sin embargo, las síntesis de kaureno y de giberelinas son sensibles a la inhibición de la síntesis de proteínas. La síntesis de giberelinas se detuvo entre 6 y 8 h después de la adición de cicloheximida, o sea, mucho antes que la de kaureno, que continuó más de 24 h. Esta observación sugiere que al menos una de las enzimas necesarias para la síntesis de giberelinas es más inestable que la sintetasa de kaureno y necesita, por tanto, una reposición más rápida. Las diferencias en la detención de las síntesis de giberelinas y kaureno pueden deberse también a una regulación presente *in vivo* que desaparece en los ensayos *in vitro*. Si las diferencias ocurren también *in vivo* se deben manifestar por la acumulación de kaureno u otro metabolito intermediario de las giberelinas, en estas condiciones.

La adición de amonio a un cultivo en plena producción de giberelinas también provoca una detención de esta síntesis que contrasta con el mantenimiento de la sintetasa de kaureno (Fig. 7). La regulación por nitrógeno de la síntesis de giberelinas es mediada por la glutamina o un metabolito posterior (Muñoz y Agosín, 1993). La rapidez de la inhibición de la síntesis de giberelinas producida por la adición de nitrógeno sugiere una represión de alguna actividad enzimática. La adición de amonio a un cultivo que produce giberelinas provocó un gran aumento de la concentración de glutamina, que llegó a alcanzar el 10% de la masa seca (Fig. 7). Esta subida debe ir acompañada por una bajada en la concentración de 2-oxoglutarato, compuesto necesario para el funcionamiento de las oxigenasas solubles de la ruta de biosíntesis de giberelinas (Hedden y Graebe, 1982). La escasez de este ácido podría explicar la rápida represión de la síntesis de giberelinas.

La hidroxilasa del ácido kaurenico no se detecta en cultivos crecidos con AMO-1618, un inhibidor de la síntesis de kaureno, pero se recupera si además se añade kaureno a los cultivos (Jennings *et al.*, 1996). Este resultado sugiere que el kaureno es preciso para la puesta en marcha de actividades posteriores de la ruta y por lo tanto, puede existir un desfase en la inducción entre la sintetasa de kaureno y el resto de las enzimas de la ruta.

Las giberelinas comenzaron a detectarse a las 16 h tras la retirada de nitrógeno del medio, unas 8 h más tarde que la sintetasa de kaureno (Fig. 8). Sin embargo, la adición de cicloheximida a un cultivo 8 h después de quitar el nitrógeno puso de manifiesto que en ese momento ya existían suficientes enzimas para conseguir cantidades detectables de giberelinas (Fig. 9). Esto indica que el desfase entre la inducción de la síntesis de kaureno y el resto de actividades de la ruta, si existe, es muy pequeño.

Si se asume una regulación transcripcional, los resultados sugieren que en estas condiciones experimentales la población de mensajeros debe estar enriquecida en el del gen de la sintetasa de kaureno y de otros genes de la síntesis de giberelinas durante el período de incremento de estas actividades enzimáticas, o un poco antes. La transcripción podría mantenerse si las enzimas sintetizadas son inestables. Con estas premisas, entre las 8 y las 16 h, la concentración de mensajeros de genes de la síntesis de las giberelinas debe ser máxima.

## 4.2 TRANSFORMACIÓN INTEGRATIVA

La transformación de *Gibberella* por un gen que confiere resistencia a higromicina, requirió la presencia en el vector de ADN de *Gibberella*. En todos los casos investigados, el ADN exógeno se integró por recombinación homóloga en el genomio receptor.

Las primeras transformaciones descritas con una estirpe derivada de nuestra silvestre se obtuvieron por integración ectópica de un plásmido sin ADN homólogo de *Gibberella* (Sánchez-Fernández *et al.*, 1991). Por la naturaleza del marcador empleado (gen de la nitrato reductasa de *Aspergillus oryzae*), la selección se realiza sin preincubación y los transformados tardan de 10 a 15 días en aparecer. En nuestros experimentos se lleva a cabo una preincubación de 12-16 h en ausencia de antibiótico y los transformantes tardan de 3 a 4 días en aparecer. Probablemente no detectamos integración ectópica porque ésta ocurre con baja probabilidad y requiere periodos más largos de incubación en ausencia de antibiótico.

La frecuencia de transformación es aproximadamente la misma si la secuencia de *Gibberella* presente en el vector es de ADN repetido o único. No conocemos más ADN repetido en *Gibberella* que el ADN ribosómico. Hemos estimado que hay unos 40 ejemplares de esta secuencia por genomio. La presencia de esta secuencia en el vector implica la existencia de otros tantos lugares de posible recombinación homóloga, por lo que creemos que el factor limitante de la transformación en *Gibberella* es la competencia de los protoplastos y no la integración del ADN. También podría ser que el ADN ribosómico tenga una menor accesibilidad para el plásmido o la maquinaria de recombinación, que compensara el aumento en el número de secuencias recombinables.

La estabilidad de la transformación depende del fragmento de ADN de *Gibberella* usado. En la mayoría de los casos, la transformación es muy estable, aunque siempre segregan algunos micelios sensibles a higromicina. Los plásmidos integrados por recombinación homóloga pueden escindirse del genomio por un fenómeno inverso a la integración (Fig. 20). Este fenómeno se ha puesto de manifiesto en *Gibberella* rescatando algunos plásmidos libres presentes en células transformadas.

En dos micelios transformados con el plásmido pU1 obtenidos en el experimento 1, la secuencia U1 está presente en un fragmento del mismo tamaño que el del silvestre al cortar con *EcoRI*. La coincidencia de tamaño de los dos nuevos fragmentos generados y los presentes en los otros micelios transformados con pU1 hacen que la interpretación de una integración ectópica sea poco probable. Una alternativa es que estas estirpes sean heterocariontes de núcleos silvestres y transformados. Sin embargo, la alta estabilidad de la transformación con el plásmido pU1 no correlaciona con la proporción, aproximadamente del 50%, de núcleos transformados y no transformados deducida de la intensidad de la hibridación de la secuencia U1 con el fragmento de 12 kb respecto a los otros dos fragmentos. Otra posibilidad es que los genomios de estos transformados hayan sufrido reorganizaciones cromosómicas que originaron diploides parciales de esta región genómica, y una región está transformada y la otra no. En *Neurospora*, el 10 % de los transformados estables presentan reorganizaciones cromosómicas (Perkins *et al.*, 1993). La preincubación en medio líquido de los protoplastos puede provocar que los micelios transformados de un mismo experimento sean derivados de un mismo hecho de integración, lo que puede explicar la aparición de un fenotipo peculiar en dos micelios transformados en un mismo experimento.

La integración por recombinación homóloga, obtenida con nuestros protocolos de transformación, permite diseñar experimentos de disrupción génica para determinar las funciones de los genes clonados. La integración de un plásmido a través de un fragmento interno de un gen provocaría la duplicación de dos fragmentos no funcionales (Fig. 18). Se clonó un fragmento interno de 820 pb del gen de la deshidrogenasa del fitoeno, cuya disrupción debería ser detectable por un cambio de color, pero con él no se encontró transformación alguna. La secuencia de ADN homólogo de menor tamaño con la que se ha obtenido transformación ha sido un fragmento de 1.6 kb de ADN ribosómico. El tamaño medio de los genes de *Gibberella* y la exigencia de tamaño de ADN homólogo en estas transformaciones (entre 820 pb y 1,6 kb) no permiten un uso general de estos protocolos de disrupción génica.

La liberación del plásmido integrado por recombinación homóloga sugiere un método para la sustitución de alelos en *Gibberella*, ya empleado en *Saccharomyces cerevisiae* (Scherer y Davis, 1979) y *Aspergillus nidulans* (Miller *et al.*, 1985). Se ha clonado un fragmento de 6.7 kb que contiene el gen *carB* y se ha construido *in vitro* un alelo nulo, que presuntamente lleva una mutación de desfase. Al integrarse en el genomio se encontrarán próximos, separados por el ADN del vector, los alelos silvestre y mutante. En la mitad de los casos de liberación del plásmido por recombinación homóloga entre ambos alelos, el alelo mutante se quedará solo en el genomio y generará un fenotipo albino.

Hemos conseguido albinos a partir de un micelio transformado con el alelo nulo. Alguno de los albinos son resistentes a higromicina. El análisis molecular de los transformados que no originaron albinos y de los albinos resistentes a higromicina indica que en ellos ha existido conversión génica. Este fenómeno se puede minimizar con una inserción o una deleción mayor en el alelo nulo.

El alelo silvestre del gen *carB*, aislado en esta Tesis, constituye un marcador identificable por cambio de color en un mutante *carB*. Los albinos sensibles a higromicina originados por reemplazamiento de alelos son las estirpes receptoras ideales para transformaciones con este marcador ya que no presentan otras mutaciones, inevitables en los métodos de mutagénesis convencionales. El uso del alelo silvestre del gen *carB* como marcador externo y del gen de resistencia a higromicina como marcador interno permite la selección de nuevas sustituciones de alelos en un solo paso, por doble recombinación. Además, también se pueden aislar estirpes con los alelos reemplazados entre los descendientes de los transformantes por una sola recombinación.

**Conclusiones**

1.- El método empleado por Candau *et al.* (1991) permite aislar mutantes que difieren del tipo silvestre por su producción total y por la composición de la mezcla de giberelinas.

2.- Los mutantes presentan alteraciones en los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de ácido giberélico o en su último paso, la hidroxilación del carbono 13. Entre los primeros destacan SG138, que está afectado en la síntesis del ácido 7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico, en la descarboxilación del carbono 20 y en la hidroxilación del carbono 3, y SG139, que carece totalmente de todas las giberelinas, e incluso de síntesis de kaureno.

3.- La transferencia de un micelio de un medio con mucho nitrógeno a una solución de glucosa activa simultáneamente la síntesis de kaureno y de giberelinas. Si lo que se regula es la transcripción, la célula estará enriquecida en mensajeros de los genes de la síntesis de giberelinas entre 8 y 16 horas después de la transferencia a glucosa.

4.- El gen bacteriano *hph* con un promotor de *Aspergillus* confiere resistencia a higromicina en *Gibberella* y la transformación a esta resistencia requiere ADN de *Gibberella*, de un tamaño mínimo entre 0,8 y 1,6 kb, en el vector. Todos los transformantes estudiados en esta Tesis integraron el ADN exógeno en su genomio por recombinación homóloga. La frecuencia de transformación no varía cuando el vector contiene secuencias homólogas que se encuentran una o 40 veces en el genomio de *Gibberella*.

5.- La estabilidad de la transformación depende de la secuencia de *Gibberella* presente en el vector y es muy alta en la mayoría de los casos. Se han recuperado plásmidos libres de algunos transformantes, lo que demuestra que la integración es reversible.

6.- Se ha clonado un fragmento de 6,7 kb de ADN de *Gibberella* que contiene el gen *carB*, responsable de la deshidrogenasa de fitoeno. Este gen hace naranja los micelios blancos de los mutantes *carB*. Se ha reemplazado el alelo silvestre de este gen por un alelo no funcional construido *in vitro*. La estirpe resultante de esta sustitución es un receptor ideal para futuras transformaciones con el gen *carB*, ya que no contiene mutaciones desconocidas que puedan haber sido introducidas por los tratamientos mutagénicos tradicionales.

## **Materiales y métodos**

## 6.1 ESTIRPES Y PLÁSMIDOS

### 6.1.1 Estirpes

Las estirpes de *Gibberella fujikuroi* utilizadas en este trabajo están descritas en la Tabla 8. La estirpe silvestre IMI58289 procede de la colección del Imperial Mycological Institute (Kew, Surrey, Inglaterra). Las demás se obtuvieron a partir de ella, salvo en un caso, con tratamientos con el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

**TABLA 8** Estirpes de *Gibberella fujikuroi* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Fenotipo		Origen y referencia
		Color	Giberelinas	
IMI58289	Silvestre	Naranja claro	Normal	Imperial Mycological Institute
SG22	<i>carS6</i>	Naranja intenso	Normal	IMI58289 (Ávalos y Cerdá-Olmedo, 1987)
SG121	<i>gib-1</i>	Naranja claro	Alterada	IMI58289 (Candau <i>et al.</i> , 1991)
SG122	<i>gib-2</i>	Idem	Idem	Idem
SG123	<i>gib-3</i>	Idem	Idem	Idem
SG124	<i>gib-4</i>	Idem	Idem	Idem
SG127	<i>gib-5</i>	Blanco	Idem	Idem
SG128	<i>gib-6</i>	Naranja claro	Idem	Idem
SG129	<i>gib-7</i>	Idem	Idem	Idem
SG133	<i>gib-8</i>	Idem	Idem	Idem
SG134	<i>gib-9</i>	Idem	Normal	Idem
SG135	<i>gib-10</i>	Idem	Alterada	Idem
SG136	<i>gib-11</i>	Idem	Idem	Idem
SG138	<i>gib-13</i>	Idem	Idem	Idem
SG139	<i>gib-14</i>	Idem	Idem	Idem
SG207	<i>carS6 carB39</i>	Blanco	Normal	SG22 (esta Tesis)

La estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, utilizada rutinariamente, tiene el genotipo F<sup>-</sup> *endA1*, *hsdR17* (*rK*<sup>+</sup> *mK*<sup>-</sup>) *supE44* *thi-1* *gyrA96* *recA1* *relA1* *DlacU169* [*F80cl lacZDM15*]  $\lambda^{-1}$  (Hanahan, 1983). Los plásmidos que se iban a digerir con una restrictasa sensible a metilación por el sistema *dam* o *dcm* se multiplicaron en la estirpe GM119 cuyo genotipo es F- *dam*<sup>-3</sup> *dcm*<sup>-6</sup> *metB1* *galK2* *galT22* *lacY1* *tsx78* *supE44* (*thi1* *tonA31* *mtl1*).

### 6.1.2 Plásmidos

Los plásmidos empleados en esta Tesis tienen un origen y un gen de resistencia a ampicilina funcionales en *E. coli* y son los siguientes:

#### **pBluescript II KS -**

Vector de Stratagene Cloning Systems (La Jolla, USA) derivado de pUC19. Contiene una diana múltiple en el ADN de la subunidad  $\alpha$  de la galactosidasa  $\beta$  que permite el escrutinio de los plásmidos recombinantes por diferencias en el color de las colonias transformantes crecidas con Xgal e IPTG (Sambrook *et al.*, 1989). En la Tesis nos referiremos a este plásmido como pBS.

#### **pAN7-1**

Construido por Peter J. Punt (Punt *et al.*, 1987). El plásmido lleva el gen bacteriano *hph*, que confiere resistencia a higromicina por fosforilación, entre el promotor del gen *gpd* (deshidrogenasa del 3 fosfato de gliceraldehído) y el terminador del gen *trpC* (síntesis de triptófano), ambos de *Aspergillus nidulans*.

#### **pR1, pU1, pU2, pU3 y pU4**

Construidos en esta Tesis, derivan de pAN7-1 por inserción de distintos fragmentos de unas 6 kb de ADN de *Gibberella* procedentes de una digestión total de ADN genómico con la restrictasa *XbaI*.

#### **pR2**

Construido en esta Tesis, deriva de pAN7-1 por inserción de un fragmento de 1,8 kb del ADN responsable del ARN 18 S de los ribosomas. Este fragmento se obtuvo *in vitro* con la polimerasa *Taq* (Boehringer Mannheim) y con los cebadores NS1 y NS8 (White *et al.*, 1990), utilizando una temperatura de apareamiento de 45 °C. Se introdujo primero en la diana *EcoRV* de pBS, se aisló de este intermediario con las restrictasas *HindIII* y *XbaI* y se clonó en estas mismas dianas de pAN7-1.

### **pCB**

Construido en esta Tesis, deriva de pAN7-1 por inserción de un fragmento de 820 pb del gen *carB* de *Gibberella* (deshidrogenasa del fitoeno). Este fragmento se obtuvo *in vitro* con la polimerasa *Taq* y con los cebadores cB-F y cB-R, con una temperatura de apareamiento de 45 °C, y se clonó en pAN7-1 de la misma forma que el inserto de pR2.

### **pHJA2**

Construido por J. Ávalos a partir de pAN7-1 y pBS. Contiene el gen *hph* del primero y la diana múltiple de pBS. Una digestión total con *XbaI* y parcial con *EcoRI* del plásmido pAN7-1 dio como resultado un fragmento de 4,06 kb que contenía el gen *hph* con su terminador y promotor. Este fragmento, tras un tratamiento con la polimerasa Klenow, para hacer romos sus extremos, se clonó en la diana *NaeI* de pBS.

### **pTCB**

Construido en esta Tesis, deriva de pHJA2 por inserción de un fragmento *XbaI-XbaI* de ADN de *Gibberella* de 6,7 kb que contiene el gen *carB* completo de la deshidrogenasa del fitoeno.

### **pTCB1 y pTCB2**

Construidos en esta Tesis, derivan de pTCB por inserción de 4 bases en el gen *carB*. Esta inserción se consiguió por digestión parcial del plásmido con la restrictasa *KpnI*, tratamiento con la polimerasa de T4 para rellenar los extremos y la religación del plásmido en romo.

## **6.2 MEDIOS DE CULTIVO**

Todos los medios sólidos utilizados en esta Tesis contienen 16 g·l<sup>-1</sup> de agar (Adsa Micro, Barcelona).

### **6.2.1 Medios de cultivo para *Gibberella***

#### **6.2.1.1 Medio mínimo**

Composición por litro: 30 g de glucosa, 3 g de NaNO<sub>3</sub>, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,5 g de KCl y los siguientes microelementos: 10 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>,

10 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 20 mg de  $\text{FeCl}_3$ , 20 mg de  $\text{MnCl}_2$ , 20 mg de  $\text{NaMoO}_4$  y 2 mg de  $\text{ZnSO}_4$  (Avalos *et al.*, 1985).

#### **6.2.1.2 Medio nutritivo**

Una variante del medio mínimo con  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de extracto de levadura y sin microelementos (Avalos *et al.*, 1985).

#### **6.2.1.3 Medio de germinación**

Composición por litro: 30 g de glucosa, 3 g de  $\text{NaNO}_3$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4 g de extracto de levadura, 8 g de peptona.

#### **6.2.1.4 Medio de esporulación**

Composición por litro: 1 g de glucosa, 1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g de  $\text{KCl}$ , 1 g de extracto de levadura (Ávalos *et al.*, 1985).

#### **6.2.1.5 Medio mínimo ICI**

Utilizado para la producción de giberelinas. Composición por litro: 80 g de glucosa, 0,48 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y los microelementos: 10 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mg de  $\text{CuSO}_4$ , 20 mg de  $\text{FeCl}_3$ , 20 mg de  $\text{MnCl}_2$ , 20 mg de  $\text{NaMoO}_4$  y 2 mg de  $\text{ZnSO}_4$  (Geissmann *et al.*, 1966, que lo llamaron 10%ICI).

#### **6.2.1.6 Medio mínimo ICI con exceso de nitrógeno**

Es una variante del medio mínimo ICI con 10 veces más  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $4,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) (Geissmann *et al.*, 1966, que lo llamaron ICI). La producción de giberelinas se mantiene inhibida en este medio.

Para estudiar la regulación por nitrógeno de la biosíntesis de giberelinas se empleó el medio mínimo ICI con variaciones en la fuente de nitrógeno y su concentración.

#### **6.2.1.7 Glucosa y microelementos**

Utilizado para inducir la síntesis de giberelinas de micelios cultivados 6 d en medio ICI con exceso de nitrógeno, que no las producen. Composición por litro: 20 g de glucosa y los microelementos descritos en el medio mínimo ICI.

### **6.2.1.8 Medio para la obtención de protoplastos**

Composición por litro: 273 g de glucosa, 1 g de extracto de levadura y 1 g de peptona (Sánchez-Fernández, 1993).

Los protoplastos se incubaron en medios osmoestabilizados con 90 g·l<sup>-1</sup> de KCl y se diluyeron en sulfato de magnesio 0,9 M. En medio sólido se inocularon con agar de cobertera (8 g·l<sup>-1</sup> de agar).

### **6.2.1.9 Medios selectivos**

Para seleccionar transformantes resistentes a higromicina B (Boehringer Mannheim) se utilizó medio nutritivo suplementado con 100 mg·l<sup>-1</sup>. Los mutantes resistentes a benomilo (Energía e Industrias Aragonesas SA, Madrid) se seleccionaron en agar nutritivo suplementado con 5,8 mg·l<sup>-1</sup>.

## **6.2.2 Medios de cultivo para *E. coli***

### **6.2.2.1 Medio nutritivo LB**

Composición por litro: 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona hidrolizada enzimáticamente ("bacto-tryptone" Difco Laboratories, Detroit, USA) y 5 g de NaCl (Sambrook *et al.*, 1989).

### **6.2.2.2 Medio SOC**

A un litro de una solución autoclavada con 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,6 g de NaCl y 0,19 g de KCl se añaden 10 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M, 10 ml de MgSO<sub>4</sub> 1M y 20 ml de una solución glucosa (200 g·l<sup>-1</sup>)

### **6.2.2.3 Antibióticos y compuestos añadidos a medios bacterianos**

La ampicilina se utilizó a una concentración de 100 mg·l<sup>-1</sup> en medio nutritivo LB. Las concentraciones de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) e IPTG (Isopropil β-D-galactopiranosido) utilizadas fueron de 40 mg·l<sup>-1</sup> y 20 mg·l<sup>-1</sup> respectivamente en medio nutritivo LB.

## 6.3 PROTOCOLOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 6.3.1 Transformación de *Gibberella*

#### 6.3.1.1 Preparación de protoplastos

Se siguió básicamente el protocolo descrito por Sánchez-Fernández (1991). Se inocularon  $10^6$  esporas en 50 ml de medio para la obtención de protoplastos y se incubaron en un matraz de 500 ml a 30 °C durante 40 h con una agitación circular a 150 rpm. El micelio se recogió por filtración con papel, se lavó primero con agua y después con tampón CMP, se resuspendió en tampón CMP, se sonicó a 50 W (30 s en la posición 5) en un sonicador Sonifier 250 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA) y se recogió por centrifugación a 1200 x g durante 10 min en una centrifuga con tubos colgantes. El precipitado se resuspendió en 5 ml de tampón CMP y 5 ml de una solución de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  de Novozym 245 (Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) en  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,9 M y se incubó 4 h a 30 °C con agitación. Los protoplastos se separaron de los restos de micelios filtrando a través de membranas de nilón (diámetro medio de poro de 50  $\mu\text{m}$ ) y se concentraron y lavaron centrifugando tres veces en solución A durante 10 min a 1200 x g.

**Tampón CMP.** Composición por litro: 15,6 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 29,4 g de citrato trisódico dihidratado y 145,7 g de manitol.

**Solución A.** Sorbitol 1,2 M,  $\text{CaCl}_2$  50 mM y Tris-HCl (Tris(hidroximetil)-aminometano) 10 mM a pH 7,5.

#### 6.3.1.2 Transformación

Se mezclaron 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión de protoplastos en Solución A, 12,5  $\mu\text{l}$  de Solución B y una solución de ADN (volumen máximo, 10  $\mu\text{l}$ ) y se incubaron en hielo durante 20 min. Se añadió 1 ml de Solución B e inmediatamente después 2 ml de Solución A. Los protoplastos se concentraron por centrifugación durante 10 min a 1200 x g y se incubaron de 12 a 15 h en 500  $\mu\text{l}$  de medio de germinación osmoestabilizado líquido, sin agitación. Se sembraron en agar de cobertera sobre agar nutritivo con higromicina, se incubaron a 30 °C y se observó la aparición de transformantes en los días sucesivos.

**Solución B.** Polietilenglicol 4 kD 500 g·l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

Para determinar la estabilidad de la transformación se aislaron micelios en medio no selectivo derivados de esporas uninucleadas obtenidas a partir de transformantes secundarios y se trasplantaron tanto a medio selectivo como a no selectivo.

### 6.3.2 Transformación de *E. coli*

Se emplearon tres protocolos diferentes para la preparación de las células competentes. Para transformar con mezclas de ligaciones se empleó rutinariamente el método descrito por Inoue *et al.* (1990). Para transformar con un plásmido purificado se empleó un método más simplificado, descrito por Chung y Miller (1988), que alcanza frecuencias de transformación de 10<sup>6</sup> transformantes por µg de ADN.

Las frecuencias de transformación más altas se alcanzaron por electroporación. En este caso se utilizó el electroporador Electro cell manipulator 600 (BTX Electroporation Systems, San Diego, USA), y se siguió el método descrito por el fabricante.

### 6.3.3 Extracciones de ADN

#### 6.3.3.1 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la obtención de pequeñas cantidades de ADN (menos de 10 µg) se utilizó el método de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989). Para grandes cantidades (mg) se siguió el mismo método partiendo de 1 l de cultivo. Tras la extracción, el ADN se purificó con polietilenglicol 8 kD a 130 g·l<sup>-1</sup> (Sambrook *et al.*, 1989).

Los plásmidos destinados a secuenciaciones manuales se obtuvieron con un protocolo derivado del anterior (Stephen *et al.*, 1990).

#### 6.3.3.2 Extracción de ADN genómico de *Gibberella*

Se utilizó una variante de un protocolo descrito originalmente para levaduras (Sherman *et al.*, 1986). Se inocularon unas 10<sup>6</sup> esporas en 200 ml de medio nutritivo en matraces de 500 ml y se incubaron a 30 °C en agitación durante 48 h, se filtró el micelio con papel y se lavó con abundante agua estéril,



se secó con papel y se trituroó en un mortero con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, procurando mantener el micelio cubierto siempre con nitrógeno líquido. El polvo de micelio se pasó inmediatamente a un tubo de centrífuga de 50 ml, se resuspendió por agitación suave en 7,5 ml de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl a pH 7.5, 20 mM EDTA (etilén-diaminotetraacetato disódico) y 0,5 ml de una solución de laurilsulfato sódico (SDS) al 100 g·l y se incubó a 65 °C durante 30 min. Se añadieron 2,3 ml de acetato potásico 5 M y se incubó en hielo de 30 a 60 min. Pasado este tiempo, se centrifugó 10 min a 9.000 x g, al sobrenadante filtrado a través de una gasa estéril se le añadieron dos volúmenes de etanol 960 ml·l<sup>-1</sup>, y una vez mezclado se dejó una noche a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 9000 x g, se lavó el precipitado con etanol al 700 ml·l<sup>-1</sup> y, tras secarlo, se resuspendió en 3 ml de tampón TE (Sambrook *et al.*, 1989). La solución de ADN en TE se pasó a un tubo de 10 ml de polipropileno y se incubó con 15 µl de una solución de 10 g·l<sup>-1</sup> de ribonucleasa (Boehringer Mannheim) durante 30 min a 37 °C. El tratamiento se detuvo con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó 5 min a 3500 x g. La epifase acuosa se pasó a un tubo limpio, se añadió 1 volumen igual de isopropanol lentamente por las paredes formando dos fases que se mezclaron suavemente para formar una madeja de ADN. Una vez mezcladas las dos fases, se centrifugó a 1000 x g durante 5 min. El precipitado se lavó con 2 ml de etanol 700 ml·l<sup>-1</sup> y se dejó secar antes de resuspenderlo en 1 ml de tampón TE.

### 6.3.4 Cuantificación de ADN

Las concentraciones de ADN se estimaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Boehringer Mannheim) y tinción con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989), tomando como referencia la fluorescencia de cantidades conocidas de los fragmentos de ADN del fago lambda digerido con *Hind*III. Las concentraciones de cebadores o de plásmidos purificados con polietilenglicol se midieron por la absorbencia a 260 nm tomando un coeficiente de extinción de 500 para una solución del 1 g·l<sup>-1</sup> y un paso de luz de 10 mm.

### 6.3.5 Manipulación enzimática del ADN

#### 6.3.5.1 Digestiones

Para digerir el ADN con endonucleasas de restricción se siguieron esencialmente las técnicas descritas por Sambrook *et al.* (1989) y las

recomendaciones de tampones y condiciones de incubación de la empresa suministradora (Boehringer Mannheim).

Los plásmidos se incubaron al menos 2 h. El ADN genómico de *Gibberella* se incubó en un volumen final de 450  $\mu$ l del tampón de restricción durante 1 h a 65 °C antes de la adición de la enzima. A la temperatura óptima de la enzima, se añadieron 20 unidades de ésta y se incubó de 4 a 6 h. Se confirmó la digestión por electroforesis de una alícuota. Si no era completa se añadieron otras 10 unidades de enzima y se incubó otras 2 h. Se precipitó el ADN con etanol y acetato sódico (Sambrook *et al.*, 1989) y se resuspendió en un volumen apropiado de TE.

### 6.3.5.2 Relleno de extremos de moléculas de ADN

Los extremos unicitenarios 3' de los fragmentos de ADN generados por restrictasas y por la polimerasa *Taq* se rellenaron y convirtieron en extremos romos mediante un tratamiento con la polimerasa Klenow. Los extremos unicitenarios 5' se trataron con la polimerasa de T4. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim).

### 6.3.5.3 Ligaciones

Las ligaciones se hicieron en 10  $\mu$ l del tampón quinasa con ATP 3 mM (Sambrook *et al.*, 1989), con 0,5 unidades de ligasa de T4 (Boehringer Mannheim). Las ligaciones de moléculas con extremos cohesivos se incubaron durante 12-16 h a 16 °C y las de moléculas romas 2 h a 22 °C.

### 6.3.5.4 Separación de fragmentos de ADN

La electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (Sambrook *et al.*, 1989), a una concentración entre 6 y 15  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  según el tamaño de las moléculas a separar, se usó tanto para comprobar rutinariamente tamaño, cantidad y calidad de muestras de ADN como para posteriores hibridaciones. Se emplearon cubetas (Lagoplast, Madrid) alimentadas con una fuente modelo LKB (Pharmacia). El tampón de carga fue glicerina 0,5  $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$  y el marcador del frente de la electroforesis, azul de bromofenol 0,5  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Como testigos de peso molecular se emplearon 100 ng de ADN del fago lambda digerido con *Hind*III o 10  $\mu$ l del marcador "1 kb ladder" (Gibco BRL). En los geles destinados a experimentos de hibridación se utilizaron 20 ng del marcador molecular III marcado con digoxigenina (Boehringer Mannheim).

Para ver los fragmentos de ADN se añadió a los geles, antes de solidificar, bromuro de etidio  $5 \text{ mg l}^{-1}$ . Alternativamente, los geles se tiñeron sumergiéndolos 20 min en una solución de bromuro de etidio  $5 \text{ mg l}^{-1}$ . Los geles teñidos se expusieron a radiación ultravioleta en un transiluminador Fotodyne y se fotografiaron empleando una película instantánea Polaroid ISO 3000/36° interponiendo un filtro Wratten 22A (Kodak); o sobre papel térmico mediante un analizador de imagen ImageStore 5000 (Ultra Violet Products, Cambridge, Inglaterra).

### 6.3.5.5 Aislamiento de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN para la clonación o la preparación de sondas se aislaron de geles de agarosa y se purificaron con QIAEX II (QIAGEN, Hiden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. En estos casos, los geles se iluminaron con una lámpara ultravioleta portátil (6 W, 312 nm), en lugar del transiluminador.

### 6.3.6 Detección de secuencias de ADN por hibridación en filtro

Para la detección quimioluminiscente de ácidos nucleicos se siguieron las recomendaciones del manual *The DIG system user's guide for filter hybridization* (Boehringer Mannheim, 1995).

#### 6.3.6.1 Preparación de sondas

Para la preparación de sondas se marcaron al menos 100 ng de fragmentos de restricción aislados de geles de agarosa con digoxigenin-dUTP (Boehringer Mannheim) empleando el método del cebo aleatorio (*standard random primed DNA labelling*). Las sondas se conservaron a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  en el tampón de hibridación y se reutilizaron varias veces.

#### 6.3.6.2 Transferencia y fijación del ADN

En esta Tesis se han aplicado técnicas de hibridación a (a) fragmentos de ADN separados por electroforesis (*southern blot*), (b) ADN sin separar (*slot blot*) y (c) colonias de *E. coli* (hibridación *in situ*).

**a) Southern blot.** Los geles de agarosa con los fragmentos de ADN separados por electroforesis se expusieron a  $1,5 \times 10^{-3} \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$  de radiación ultravioleta de 254 nm en un cross-linker RPN 2500 (Amersham, Little Chalfont, Inglaterra) o se incubaron 10 min con HCl 250 mM para despurinizar

el ADN. El gel se trató con las soluciones estándar de desnaturalización y neutralización descritas en el manual Boehringer Mannheim (1995). El ADN se transfirió a un filtro de nilón Hybond (Amersham) con un equipo de vacío TransVac TE80 (Hoeffer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, USA) según las instrucciones del fabricante.

**b) Slot blots.** El ADN se preparó según el protocolo descrito por Ausubel *et al.* (1995) y se transfirió a un filtro de nilón Hybond (Amersham) usando un equipo de vacío Slot blot PR600 (Hoeffer) según las instrucciones del fabricante.

**c) Hibridación *in situ*.** Se siguió el protocolo descrito en el manual Boehringer Mannheim (1995).

El ADN se fijó covalentemente a las membranas por exposición a radiación ultravioleta ( $0,7 \times 10^{-3} \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ ) con un cross-linker RPN 2500 (Amersham).

### 6.3.6.3 Prehibridación e hibridación

Los filtros de nilón se prehibridaron e hibridaron según el manual Boehringer Mannheim (1995) en un horno de hibridación Hybridizer HB-1D (Techne Ltd., Cambridge, Inglaterra) con el tampón estándar de hibridación.

La prehibridación se realizó a 65 °C durante al menos 1 h y la hibridación a la misma temperatura de 6 a 16 h. Los 2 primeros lavados se realizaron a temperatura ambiente y en el mismo tubo de hibridación y los 2 últimos en una bandeja en un baño con agitación a 68 °C.

### 6.3.6.4 Detección

Se siguieron las recomendaciones del manual Boehringer Mannheim (1995) con el sustrato quimioluminiscente CSPD (Boehringer Mannheim). La emisión de este compuesto se registró por exposición en una película X OMAT S (Kodak) durante el tiempo adecuado, de 15 min a 48 h, a temperatura ambiente.

Se midieron las densidades luminosas de imágenes digitalizadas con un detector Arcus II (Agfa) en un ordenador Apple Power Macintosh 9500/132 con el programa NIH Image (National Institutes of Health, USA).

### 6.3.6.5 Reutilización de las membranas

Para reutilizar una membrana, se eliminó el sustrato quimioluminiscente enjuagándola con agua y se retiró la sonda con un tratamiento con NaOH a 37 °C siguiendo las recomendaciones del manual Boehringer Mannheim (1995).

### 6.3.7 Multiplicación de ADN *in vitro* con la polimerasa *Taq* (PCR)

Se usó un termociclador DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) con polimerasa *Taq*, tampón, cebadores y dNTPs de Boehringer Mannheim. Las concentraciones utilizadas fueron: 4 trifosfatos de los nucleótidos del ADN, 200  $\mu\text{M}$  de cada uno, los cebadores, 1  $\mu\text{M}$ , la polimerasa *Taq*, 35 unidades  $\cdot\text{ml}^{-1}$  y 100  $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$  de ADN genómico de *Gibberella* o 10 pg de plásmido según el caso. Los cebadores empleados en esta Tesis se describen en la Tabla 9.

**Tabla 9** Oligonucleótidos empleados en tesis.

Nombre	dirección	Genes que reconocen	Secuencia de nucleótidos
	*		
T3	F	<i>lacZ</i> (galactosidasa $\beta$ )	5'AATTAACCCATCAAAAGGG 3'
T7	R	Idem	5'GTAATACGACTCACTATAGGGC 3'
NS1	F	ARN ribosómico 18 S	5'GTAGTCATATGCTTGTCTC 3'
NS8	R	Idem	5'TCCGCAGGTTACCTACGGA 3'
cB-F	F	<i>carB</i> (deshidrogenasa del fitoeno)	5'GC(CT)GA(AG)GGTAT(CT)TGGTA(CT)CC 3'
cB-R	R	Idem	5'GG(AG)ACACC(AG)GTACC(AG)GG(AG)TG 3'
cBG-F	F	Idem	5'AGGTGGATTCCACAGCTTAG 3'
cBG-R	R	Idem	5'ACTTCTCTTGCCACGTGAAG 3'
cPG-F	F	<i>carP</i> (sintetasa del fitoeno)	5'TCCGGCGCATTTCCTATC 3'

\* F: el extremo 5' del oligonucleótido corresponde con el 5' del gen.

R: el extremo 5' del oligonucleótido corresponde con el 3' del gen.

El volumen de las reacciones (10-50  $\mu\text{l}$ ), así como el número y la duración de los ciclos y las temperaturas de apareamiento y polimerización variaron en los distintos experimentos. Salvo que se indique lo contrario, el volumen final fue 50  $\mu\text{l}$  y se aplicaron un primer ciclo de 5 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 1 min a 72 °C, y un ciclo final de 10 min a 72 °C.

### 6.3.8 Secuenciación de ADN

Para la secuenciación de ADN se aplicaron métodos manuales o automáticos y se utilizaron los cebadores usuales T3 ó T7 de pBS. Para la secuenciación manual se utilizaron dideoxinucleótidos y demás componentes de

Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB). Se desnaturalizó un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico durante 15 min a 37 °C con 1  $\mu\text{l}$  de NaOH 0,2 M, se añadieron 1  $\mu\text{l}$  cebador 10  $\mu\text{M}$  y 6  $\mu\text{l}$  de agua, se neutralizó con 3  $\mu\text{l}$  de acetato sódico 3 M, pH 5,2, y se añadieron 75  $\mu\text{l}$  de etanol para precipitar el ADN. La solución se mantuvo a -80 °C durante 10 min y se centrifugó 10 min a 13000 rpm. El precipitado se lavó dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de etanol 750  $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$  y se resuspendió en 8  $\mu\text{l}$  de agua. Las reacciones se enfriaron en hielo y se guardaron a -20 °C. Se calentaron a 100 °C durante 2 min y se enfriaron en hielo inmediatamente antes de someterlas a electroforesis en un gel de acrilamida al 6 % en tampón TBE (Sambrook *et al.*, 1989) y urea 8 M a 80 W durante el tiempo necesario (de 1 a 4 h) en un aparato de electroforesis Poker Face Se1500 Sequencer (Hoeffer) conectado a una fuente LKB Multidrive XL (Farmacia). El gel se secó en un secador de geles DrygelSr SE1160 (Hoeffer) y se registró la radioactividad en una película X OMAT-S (Kodak).

Las secuenciaciones automáticas se encargaron a la empresa Medigene (Martinsried, Alemania), que utilizó un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) y terminó las reacciones con didesoxinucleótidos fluorescentes.

Las semejanzas de secuencias se buscaron en las bases de secuencias de genes (European Molecular Biology Laboratory) aplicando los programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y FASTA (<http://www.ebi.ac.uk>) a todas las secuencias disponibles. Las de secuencias se alinearon con el programa Clustalw.PPC (European Molecular Biology Laboratory) y se representaron con el programa Seqvu (Garvan Institute of Medical Research, Sidney, Australia).

## 6.4 INOCULACIÓN Y CONDICIONES DE CULTIVO DE *GIBBERELLA*

### 6.4.1 Conservación de las estirpes

Las estirpes de *Gibberella* se conservaron congelando suspensiones de micelio esporulado a -80 °C en glicerina 100  $\text{ml}\cdot\text{l}^{-1}$  y se recuperaron inoculando cajas de medio de germinación con una gota de la suspensión de esporas y micelio.

### 6.4.2 Obtención de microconidios

Sobre agar de esporulación se colocaron con palillos estériles siete inóculos de micelio (pinchando con el palillo) en distribución hexagonal y se incubaron durante una semana a 28 °C bajo una luz blanca continua de unos 15 W·m<sup>-2</sup> (Avalos *et al.*, 1985). Las colonias obtenidas se lavaron con 10 ml de agua estéril y los microconidios se separaron de los fragmentos de micelio por filtración y se lavaron dos veces por centrifugación en agua estéril.

El título de esporas se determinó al microscopio con una cámara de Burker y el título de esporas viables por incubación de diluciones de la suspensión de conidios en medio nutritivo sólido.

### 6.4.3 Condiciones de cultivo

Para los cultivos líquidos se emplearon matraces de 500 ml con 200 ml de medio que se inocularon con 1 ml de una suspensión de fragmentos de micelio y esporas procedente de una sola caja de esporulación o con 10<sup>6</sup> esporas filtradas. Los cultivos se incubaron a 30 °C con agitación circular a 150 rpm.

Salvo especificación contraria, los cultivos en medio sólido se incubaron a 30 °C en la oscuridad. Para inducir la carotenogénesis se incubaron a 28 °C bajo luz blanca continua de unos 15 W·m<sup>-2</sup>.

## 6.5 TRATAMIENTOS MUTAGÉNICOS

Para la inducción de mutaciones se mezclaron 0,2 ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma Chemical Corporation, San Luis, USA), 1 g·l<sup>-1</sup>, con 0,8 ml de esporas recién recogidas, resuspendidas en agua y se incubaron a 22 °C en la oscuridad durante 1 h. El tratamiento se detuvo mediante dos lavados con agua destilada estéril. Las esporas tratadas se conservaron a -20 °C en glicerina, 100 mg·l<sup>-1</sup> en agua. A este tratamiento sobreviven aproximadamente el 5 % de las esporas (Ávalos *et al.*, 1985).

## 6.6 MEDIDAS DE LOS CULTIVOS DE *GIBBERELLA*

### 6.6.1 Masa seca

La masa seca se determinó de micelios liofilizados con una balanza AJ100 (Mettler Toledo, Greifensee, Suiza).

## 6.6.2 Giberelinas

Se utilizaron dos métodos de medida, uno basado en la fluorescencia de los compuestos derivados de la reacción de las giberelinas y del ácido sulfúrico que estima la producción total de giberelinas y otro, por cromatografía de gases, que permite cuantificar las distintas giberelinas producidas.

### 6.6.2.1 Por fluorescencia

Se siguió básicamente el método descrito por Candau *et al.* (1991). Se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo filtrado con papel, 100  $\mu\text{l}$  de etanol y 1 ml de una mezcla a temperatura ambiente de etanol y ácido sulfúrico (1:1), se incubaron a 48 °C durante 30 min. Se determinó la fluorescencia emitida a 464 nm por las muestras excitadas a 406 nm en un espectrofluorímetro LS-3B (Perkin Elmer Cetus). Si las concentraciones de giberelinas eran superiores a los 50  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , y la medida se saturaba, las muestras se diluían con 1 ml de etanol. Las concentraciones de giberelinas se calcularon teniendo la referencia de la fluorescencia de soluciones de concentraciones conocidas de ácido giberélico (Sigma).

### 6.6.2.2 Por cromatografía de gases

Se siguió el protocolo descrito en Fernández-Martín *et al.* (1994). Se extrajeron tres veces por partición con acetato de etilo 21 ml de medio de cultivo filtrado con papel basificado a pH 8 con NaOH. La fase acuosa se acidificó a pH 2 con HCl y se extrajo con acetato de etilo otras tres veces. Los extractos ácidos, que contienen las giberelinas, se secaron, se metilaron con diazometano y se calentaron a 60 °C durante 30 min mezclados con 40  $\mu\text{l}$  de tetrahidrofurano y 40  $\mu\text{l}$  de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida para formar derivados metiltrimetilsililos. Un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de esta mezcla se inyectó en un cromatógrafo de gases 5890A (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) con una columna de capilaridad HP-1 de 25 m x 0,2 mm y 0,33 mm de grosor de película. La cromatografía se realizó con un incremento de temperatura de 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  desde 120 a 220 °C y de 3 °C $\cdot\text{min}^{-1}$  desde 220 a 280 °C. La temperatura del inyector fue 260 °C y la del detector 290 °C, y el N<sub>2</sub> se utilizó como gas portador a un flujo de 25  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Los tiempos de retención de los compuestos identificados en los cromatogramas están descritos en Fernández-Martín *et al.* (1994). Las áreas registradas en los cromatogramas se hicieron corresponder con concentraciones

teniendo la referencia de las áreas de una solución de 75 mg·l<sup>-1</sup> de ácido giberélico (Sigma) en medio mínimo ICI. Las áreas de los picos nuevos, que no aparecen en los cromatogramas solo con el medio, se hicieron corresponder a los mg inyectados.

### 6.6.3 Carotenoides

El micelio (lavado con agua destilada si procede de medio líquido) se liofilizó, se trituró con arena en un mortero enfriado en hielo y se extrajo varias veces con acetona. Los extractos se secaron en un rotoevaporador a una temperatura inferior a 50 °C. Si tenían bicaverinas se sometieron a tres particiones metanol:agua (30:1) y éter de petróleo (40-60°C) (1 l:1 l), donde las bicaverinas quedaron retenidas en la hipofase y los carotenoides pasaron a la epifase. Los extractos con carotenoides se secaron, se disolvieron en n-hexano y se determinó su espectro de absorción con un espectrofotómetro UV-160 (Shimadzu). El total de carotenoides coloreados (mayoritariamente la neurosporaxantina) se determinó usando un coeficiente de extinción de 200 (para una solución de 1 mg·l<sup>-1</sup> y un paso de luz de 10 mm) con la absorbencia máxima próxima a 475 nm. El fitoeno se separó de los esteroides por cromatografía en columna de alúmina hidratada, 30 ml·kg<sup>-1</sup> (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986). La concentración de fitoeno se determinó usando un coeficiente de extinción de 91,5 a 284 nm, en las mismas condiciones que los carotenoides totales. La concentración de carotenoides intermediarios se determinó por la absorbencia de los carotenoides eluidos de la columna de alúmina con acetona usando un coeficiente de extinción de 250 en las mismas condiciones anteriores. La concentración de neurosporaxantina se determinó por la diferencia entre el total de carotenoides coloreados y los carotenoides intermediarios eluidos de la columna.

### 6.6.4 Proteínas

La concentración de proteínas en los extractos celulares se determinó mediante el método descrito por Bradford (1976). Para ello se usó un preparado comercial del reactivo (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) y se siguieron las indicaciones del fabricante.

### 6.6.5 Aminoácidos

La concentración de aminoácidos presentes en lisados celulares o en el medio de cultivo se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, siguiendo el protocolo descrito por Farfán *et al.* (1996).

El micelio se recogió por filtración, se liofilizó, se ralló hasta hacerlo pasar por un cedazo de 0,5 mm de poro, se resuspendió en agua y se hirvió durante 15 min. A la solución control de aminoácidos de Sigma se le añadió glutamina y asparragina en las mismas concentraciones que el resto de aminoácidos.

## 6.7 BIOSÍNTESIS DE TERPENOIDES *IN VITRO*

Se siguió un protocolo basado en el descrito por Ávalos *et al.* (1988). Los micelios liofilizados se rompieron pasandolos por un cedazo de 0,5 mm de diámetro, se resuspendieron en tampón de extracción en una relación de 8 ml de tampón por gramo de micelio y se centrifugaron a 12100 x g. El sobrenadante se incubó con el tampón de reacción en una relación 2:3, durante 2 h a 35 °C con agitación. La reacción se paró con 1 ml metanol y los terpenoides se extrajeron tres veces por partición con 2 ml de éter de petróleo (40-60°C). Una alícuota de 100 µl de los 6 ml extraídos se usó para estimar la producción de los terpenoides totales del ensayo. El resto se secó con N<sub>2</sub> y se separó en una cromatografía de capa fina de sílica gel G con éter de petróleo como solvente. La bandas de interés se retiraron de la capa fina con una espátula y se midieron directamente en un contador de centelleo 1409 (Wallac Oy., Turku, Finlandia) con 4 ml de líquido de centelleo Biogreen 1 (Sharlau SA, Barcelona).

**Tampón de reacción.** Composición por litro: 9,2 g de ATP, 2,2 g de nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD), 2,5 g de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato (NADP), 2 g de MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1,4 g de MgCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1 g de KF, 48,4 de Tris-HCl pH 8, 0,77 g de Ditiotreitól (DTT) y 18,5 kBq de R 2-<sup>14</sup>C mevalonato, o el doble si el mevalonato es R y S, en forma de lactona. La actividad específica del mevalonato fue de 2,07 GBq·mmol<sup>-1</sup>.

**Tampón de extracción.** Composición por litro: 48,4 g de Tris-HCl pH 8, 0,77 g de ditiotreitól (DTT) y 200 ml glicerina.

## **Bibliografía**

- Aasen AJ y Jensen SL (1965). Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. *Acta Chemica Scandinavica*. **19**: 1843-1853
- Adams G, Johnson N, Leslie JF y Hart LP (1987). Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hyphal anastomosis or protoplast fusion. *Experimental Mycology*. **11**: 339-353
- Armeleo D, Ye GN, Klein TM, Shark KB, Sanford JC y Johnston SA (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* **17**: 97-703
- Asch DK y Kinsey JA (1990). Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa* with the cloned *am* (GDH) gene. *Mol. Gen. Genet.* **221**: 37-43
- Ashman PJ, Mackenzie A y Bramley PM (1990). Characterization of *ent*-kaurene oxidase activity from *Gibberella fujikuroi*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1036**: 151-157
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K (1995). Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc.
- Avalos J, Casadesús J, Cerdá-Olmedo E (1985). *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 187-191
- Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1986). Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*. **25**: 1837-1841
- Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1987). Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr. Genet.* **11**: 505-511
- Avalos J, Mackenzie A, Nelki DS y Bramley PM (1988). Terpenoid biosynthesis in cell extracts of wild-type and mutant strains of *Gibberella fujikuroi*. *Biochim. Biophys. Acta.* **966**: 257-265
- Avalos J y Schrott EL (1990). Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters.* **66**: 295-298
- Balan J, Fuska J, Kuhr I y Kuhrová V (1970). Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Folia Microbiologica.* **15**: 479-484
- Ballance DJ y Turner G (1985). Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **36**: 321-331
- Barendse GWM, Dijkstra A y Moore TC (1983). The biosynthesis of the gibberellin precursor ent-kaurenoe in cell-free extracts and the endogenous gibberellins of Japanese morning glory in relation to seed development. *J Plant Growth Regul.* **2**: 165-175
- Barrero AF, Sánchez JF, Oltra JE, Tamayo N, Cerdá-Olmedo E, Candau R y Avalos J (1991). Fusarin C and 8Z-fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry.* **30**: 2259-2263
- Barrero AF, Oltra JE, Cabrera E, Herrador MM, Rojas FJ, Reyes JF y Godoy F (1992). Gibelactol, a diterpenoid from *Gibberella fujikuroi*. *Natural Product Letters.* **1**: 155-160
- Barrero AF, Oltra JE, Herrador MM, Cabrera E, Sánchez JF, Quílez JF, Rojas FJ y Reyes JF (1993). Gibepyrone: a-pyrone from *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron.* **49**: 141-150
- Beale MH, Bearder JR, Down GH, Hutchison M, MacMillan J y Phinney BO (1982). The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry.* **21**: 1279-1287

- Bearder JR, MacMillan J y Phinney BO (1973). Conversion of gibberellin A1 into gibberellin A3 by the mutant R-9 of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*. **12**: 2655-2659
- Bearder JR, MacMillan J, Wels CM, Chaffey MB y Phinney BO (1974). Position of the metabolic block for gibberellin biosynthesis in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*. **13**: 911-917
- Bearder JR (1983). *In vivo* diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: the pathway after entkaurene. En el libro: *The biochemistry and physiology of gibberellins 1*. Editado por Crozier A. en Praeger: 251-388
- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS, Meeley RB, Briggs SP (1995). Cloning and characterization of the maize *An1* gene. *The Plant Cell*. **7**: 75-84
- Birch AJ, Rickards RW y Smith H (1958). The biosynthesis of gibberellic acid. *Proc. Chem. Soc. London*. : 192-193
- Bird D y Bradshaw R (1997). Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet*. **255**: 219-225
- Booth C (1971). The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Borrow A, Brown S, Jefferys EG, Kessell RHJ, Lloyd EC, Lloyd PB, Rothwell A, Rothwell B, Swait JC (1964). The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Canadian Journal of Microbiology*. **10**: 407-444
- Brückner B, Blechschmidt D, Sembdner G, Schneider G (1989). Fungal gibberellin production. En el libro: *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*. Editado por Vandamme EJ. en Elsevier Applied Science. 383-429
- Brückner B y Blechschmidt D (1991). Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **35**: 646-650
- Brückner B, Unkles SE, Weltring K y Kinghorn JR (1992). Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet*. **22**: 313-316
- Candau R, Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1991). Gibberellins and carotenoids in the wild type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **57**: 3378-3382
- Candau R, Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1992). Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiology*. **100**: 1184-1188
- Case ME, Schweizer M, Kushner SR y Giles NH (1979). Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**: 5259-5263
- Chiang H, Hwang I. y Goodman HM (1995). Isolation of the *Arabidopsis* GA4 locus. *The Plant Cell*. **7**: 195-201
- Chung C y Miller R (1988). A rapid and convenient method for preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*. **16**: 632
- Coolbaugh RC y Moore TC (1969). Apparent changes in rate of kaurene biosynthesis during the development of pea seeds. *Plant Physiology*. **44**: 1364-1367
- Coolbaugh RC (1983). The biochemistry and physiology of gibberellins. En el libro: *The biochemistry and physiology of gibberellins 1*. Editado por Crozier A. en Praeger. 53-58
- Cornforth JW, Ryback G, Robinson PM y Park D (1971). Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). *J. Chem. Soc*. 2786-2788

- Correll JD, Klittich CJR, Leslie JF (1987). Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. *Phytopatology*. **77**: 1640-1646
- Correll JD, Klittich CJR y Leslie JF (1989). Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Mycological Research*. **93**: 21-27
- Costanzo MC y Fox TD (1988). Transformation of yeast by agitation with glass beads. *Genetics*. **120**: 667-670
- Cove DJ (1976). Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity*. **36**: 191-203
- Cross BE, Galt RHB, Hanson JR, Curtis PJ, Grove JF y Morrison A (1963). New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites. *J. Chem. Soc.* 2937-2943
- Cross BE, Markwell RE y Stewart JC (1971). New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part XVI. Cyclonerodiol. *Tetrahedron* **27**: 1663
- Daboussi MJ, Djeballi A, Gerlinger C, Blaiseau PL, Bouvier I, Cassan M, Lebrun MH, Parisot D y Brygoo Y (1989). Transformation of seven species of filamentous fungi using the nitrate reductase gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **15**: 453-456
- Dennis DT y West CA (1967). Biosynthesis of gibberellins III. The conversion of (-)-kaurene to (-)-kauren-19-oic acid in endosperm of *Echinocystis macrocarpa* Greene. *J. Biol. Chem.* **242**: 3293-3300
- Diallinas G y Scazzocchio C (1989). A gene coding for the uric acid-xanthine permease of *Aspergillus nidulans*: inactivational cloning, characterization, and sequence of a cis-acting mutation. *Genetics*. **122**: 341-350
- Domenech CE, Giordano W, Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1996). Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Europ. J. Biochem.* **239**: 720-725
- Duncan JD y West CA (1981). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus* endosperm: evidence for the participation of separate but interacting enzymes. *Plant Physiol.* **68**: 1128-1134
- Ehrenshaft M y Daub ME (1994). Isolation, sequence, and characterization of the *Cercospora nicotianae* phytoene dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2766-2771
- Elson GW, Jones DF, MacMillan J y Suter PJ (1964). Plant hormones IV. Identification of the gibberellins of *Echinocystis macrocarpa* greene by thin layer chromatography. *Phytochemistry*. **3**: 93-101
- Engelenburg F, Smit R, Goosen T, Broek H y Tudzynski P (1989). Transformation of *Claviceps purpurea* using a bleomycin resistance gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 364-370
- Fall RR y West CA (1971). Purification and properties of kaurene synthetase from *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* **246**: 6913-6928
- Farfán MJ, Martín-Rendón E y Calderón IL (1996). Effect of gene amplification on threonine production by yeast. *Biotech. and Bioeng.* **49**: 667-674
- Fernández-Martín R, Reyes F, Domenech CE, Cabrera E, Bramley PM, Barrero AF, Avalos J y Cerdá-Olmedo E (1995). Gibberellin biosynthesis in *gib* mutants of *Gibberella fujikuroi*. *J. Biol. Chem.* **270**: 14970-14974
- Fincham JRS (1989). Transformation in fungi. *Microbiological Reviews*. **53**: 148-170

- Frost RG y West CA (1977). Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus*. *Plant Physiol.* **59**: 22-29
- Fujioka S, Yamane H, Spray CR, Gaskin P, McMillan J, Phinney BO y Takahashi N (1988). Qualitative and quantitative analyses of gibberellins in vegetative shoots of Normal, *dwarf-1*, *dwarf-2*, *dwarf-3* and *dwarf-5* seedlings of *Zea mays* L. *Plant Physiol.* **88**: 1367-1372
- García-Martínez JL, López-Díaz I, Sánchez-Beltrán MJ, Phillips AL, Ward DA, Gaskin P, Hedden P (1997). Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. *Plant Mol Biol.* **33**: 1073-1084
- García-Pedrajas MD y Roncero MIG (1996). A homologous and self-replicating system for efficient transformation of *Fusarium oxysporum*. *Curr. Genet.* **29**: 191-198
- Geissman TA, Verbiscar AJ, Phinney BO y Cragg G (1966). Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry.* **5**: 933-947
- Gelderblom WCA, Marasas WFO, Steyn PS, Thiel PG, Merwe KJ van der, Rooyen PH van, Vlegaar R y Wessels PL (1984). Structure elucidation of fusarin C, a mutagen produced by *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 122-124
- Gelderblom WCA, Marasas WFO, Jaskiewicz K, Combrinck S y Schalkwyk DJ van (1988). Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short-term cancer initiation/promotion assay. *Carcinogenesis.* **9**: 1405-1409
- Gems D, Johnstone IL y Clutterbuck AJ (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene.* **98**: 61-67
- Georgiev OI, Nikolaev N, Hadjiolov AA, Skryabin KG, Zakharyev VM y Bayev AA (1981). The structure of the yeast ribosomal RNA genes. 4. Complete sequence of the 25 S rRNA gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **9**: 6953-6958
- Goldman GH, van Montagu M, Herrera-Estrella A (1990). Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse. *Curr. Genet.* **17**: 169-174
- Graebe JE, Dennis DT, Upper CD y West CA (1965). Biosynthesis of gibberellins. I The biosynthesis of kaurene, kauren-19-ol and trans-geranylgeraniol in endosperm nucellus of *Echinocystis macrocarpa*. *J. Biol. Chem.* **240**: 1847-1854
- Graebe JE y Lange T (1990). The dioxygenases in gibberellin biosynthesis after gibberellin A12-aldehyde. En el libro: *Plant Growth Substances 1988*. Editado por Pharis RP y Rood SB en Springer: 314-321
- Grotelueschen J y Metzenberg RL (1995). Some property of the nucleus determines the competence of *Neurospora crassa* for transformation. *Genetics.* **139**: 1545-1551
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hastings PJ y Rosemberg SM (1992). Gene conversion. En el libro: *Encyclopedia of immunology*. Editado por Roit IM y Devels PJ en Saunders scientific publications. 602-605
- Hedden P, MacMillan J y Phinney BO (1978). The metabolism of the gibberellins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 149-192
- Hedden P y Phinney BO (1979). Comparison of *ent*-kaurene and *ent*-isokaurene synthesis in cell-free systems from etiolated shoots of normal and DWARF-5 maize seedlings. *Phytochemistry.* **18**: 1475-1479

- Hedden P y Graebe JE (1982). The cofactor requirements for the soluble oxidases in the metabolism of the C20-gibberellins. *J. Plant Growth Regulation*. **1**: 105-116
- Hedden P (1983). *In vitro* metabolism of gibberellins. En el libro: *The biochemistry and physiology of gibberellins 1*. Editado por Crozier A. en Praeger. 53-58
- Inonue H, Nojima H y Okama H (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. **96**: 23-28
- Ito H, Fukuda Y, Murata K y Kimura A (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168
- Janzen RA, Rood SB, Dormaar JF y McGill WB (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure culture on chemically-defined medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 1061-1064
- Jennings JC, Coolbaugh RC, Nakata DA y West CA (1993). Characterization and solubilization of kaurenoic acid hydroxylase from *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiology*. **101**: 925-930
- Jennings JC, Banks JA y Coolbaugh RC (1996). Subtractive hybridization between cDNAs from untreated and AMO-1618-treated cultures of *Gibberella fujikuroi*. *Plant Cell Physiol.* **37**: 847-854
- Ji, GE y Orlowski, M (1990). 25S rRNA of *Mucor racemosus*: Primary and secondary structure. *Curr. Genet.* **17**: 499-506
- John MA y Peberdy JF (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* using the *argB* gene. *Enzyme Microb. Technol.* **6**: 386-389
- Kawaide H, Imai R, Sassa T y Kamiya Y (1997) *Ent*-kaurene synthase from *Phaeosphaeria* sp L487. cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **272**: 21706-21712
- Kistler HC y Benny UK (1992). Autonomously replicating plasmids and chromosome rearrangement during transformation of *Nectria haematococca*. *Gene*. **117**: 81-89
- Klittich CJR y Leslie JF (1988). Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics*. **118**: 417-423
- Klittich CJR y Leslie JF (1992). Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia*. **84**: 541-547
- Kobayashi, M., Sakurai, A., Saka, H. y Takahashi, N. (1989). Quantitative analysis of endogenous gibberellins in Normal and dwarf cultivars of rice. *Plant Cell Physiol.* **30**: 963-969
- Koelblin R, Brückner B, Blechschmidt D y Fischer W (1990). Activity of mutagens in the fungus *Gibberella fujikuroi*. *J. Basic. Microbiol.* **30**: 675-677
- Kolar M, Punt PJ, Hondel CAMJJ van den y Schwab H (1988). Transformation of *Penicillium chrysogenum* using dominant selection markers and expression of an *Escherichia coli lacZ* fusion gene. *Gene*. **62**: 127-134
- Kuhlman EG (1983). Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia*. **74**: 759-768
- Lange, T., Hedden, P. y Graebe J.E. (1994). Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellins biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**: 8552-8556

- Lange T (1997), Cloning gibberellin dioxigenase genes from pumpkin endosperm by heterologous expression of enzyme activities in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 6553-6558
- Lemke PA y Peng M (1995). Genetic manipulation of fungi by DNA-mediated transformation. En el libro: *The Mycota. Genetics and biotechnology II*. Volumen editado por Kück, U en Springer-Verlag. 109-139
- Leslie JF (1991). Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology*. **81**: 1058-1060
- Leslie JF y Dickman MB (1991). Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 1423-1429
- MacMillan J (1996). Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. *Natural Product Reports*. 221-243
- Malardier L, Daboussi MJ, Julien J, Roussel F, Scazzocchio C y Brygoo Y (1989). Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene*. **78**: 147-156
- Mander LN (1992). The chemistry of gibberellins: an overview. *Chem. Rev.* **92**: 573-612
- Marasas WF, Jaskiewicz K, Venter FS y Van Schalkwyk DJ (1988). *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S Afr Med J.* **74**: 110-114
- Martin GC (1983). Commercial uses of gibberellins. En el libro: *The biochemistry and physiology of gibberellins II*. Editado por Crozier A. en Praeger. 395-444
- Marzluf GA (1983). Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiological Reviews*. **45**: 437-461
- Mattern IE, Unkles S, Kinghorn JR, Pouwels PH y Hondel CAMJJ van den (1987). Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 460-461
- Miller BL, Miller KY y Timberlake WE (1985). Direct and indirect gene replacements in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cel. Biol.* **5**: 1714-1721
- Ming YN, Lin PC y Yu TF (1966). Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw.) Wr. *Scientia Sinica*. **15**: 371-378
- Mishra NC y Tatum EL (1973). Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **70**: 3875-3879
- Moncalvo JM, Wang HH y Hseu RS (1995). Phylogenetic relationships in *Ganoderma* inferred from the internal transcribed spacers and 25S ribosomal DNA sequences. *Mycologia* **87**: 223-238
- Mora J, Dávila G, Espín G, González A, Guzmán J, Hernández G, Hummelt G, Lara M, Martínez E, Mora Y, Romero D (1980), II. Glutamine metabolism in *Neurospora crassa*. En el libro: *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Editado por Mora J y Palacios R en Academic Press. 185-210
- Mungall AJ, Huckle E, Langford C, Ross MT y Rice CM (1996) The Sanger Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, U.K.
- Muñoz GA y Agosin E (1993). Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 4317-4322

- Nelson PE, Toussoun TA y Marasas WFO (1983). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press.
- Nes WD y Heupel RC (1986). Physiological requirement for biosynthesis of multiple 24b-methyl sterols in *Gibberella fujikuroi*. *Arch. Biochem. and Biophysics*. **244**: 211-217
- Oliver RP, Roberts IN, Harling R, Kenyon L, Punt PJ, Dingemanse MA, Hondel CAMJJ van den (1987). Transformation of *Fulvia fulva*, a fungal pathogen of tomato, to hygromycin B resistance. *Curr. Genet.* **12**: 231-233
- Orbach MJ, Porro EB y Yanofsky C (1986). Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol. and Cell. Biol.* **6**: 2452-2461
- Orr-Weaver TL, Szostak JW y Rothstein RJ (1981). Yeast transformation: A model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6354-6358
- Peberdy (1989). Fungi without coats - protoplasts as tools for mycological research. *Mycol. Res.* **93**: 1-20
- Paietta JV y Marzluf GA (1985). Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1554-1559
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly, AK, Gaskin, P, Graebe, JE y Hedden, P (1995). Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **108**: 1049-1057
- Phinney BO y West CA (1960). Gibberellins as native plant growth regulators. *Annual Review of Plant Physiology.* **11**: 411-436
- Phinney BO (1983). The history of gibberellins. En el libro: *The biochemistry and physiology of gibberellins I*. Editado por Crozier, A. en Praeger. 19-52
- Pitel DW, Vining LC y Arsenault GP (1971). Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after gibberellin A4. *Can. J. Biochem.* **49**: 194-200
- Puhalla JE y Spieth PT (1983). Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*. *Experimental Mycology.* **7**: 328-335
- Puhalla JE y Spieth PT (1985). A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Experimental Mycology.* **9**: 39-47
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemanse MA, Pouwels PH y Hondel CAMJJ van den (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene.* **56**: 117-124
- Rademacher W y Graebe JE (1979). Gibberellin A4 produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*). *Biochem. Biophys. Res. commun.* **91**: 35-40
- Reid JB (1986). Gibberellin mutants. En el libro: *Plant gene research, a genetic approach to plant biochemistry*. Editado por Blonstein AD y King PJ en Springer-Verlag.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B y Sahn H (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.* **295**: 517-524
- Rothstein R (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**: 202-211
- Rothstein R (1991). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol.* **194**: 281-301

- Ruiz-Hidalgo MJ, Benito EP, Sandmann G y Eslava, AP (1997). The phytoene dehydrogenase gene of *Phycomyces*: regulation of its expression by blue light and vitamin A. *Mol. Gen. Genet.* **253**: 734-744.
- Salch YP y Beremand MN (1993). *Gibberella pulicaris* transformants: state of transforming DNA during asexual and sexual growth. *Curr. Genet.* **23**: 343-350
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Fernández R, Unkles SE, Campbell EI, Macro JA, Cerdá-Olmedo E y Kinghorn JR (1991). Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **225**: 231-233
- Sánchez-Fernández R (1993). Transformación y biosíntesis de giberelinas en *Gibberella fujikuroi*. Tesis doctoral de la Universidad de Sevilla.
- Scherer S y Davis RW (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**: 4951-4955
- Schmidhauser TJ, Lauter FR, Russo VE y Yanofsky C (1990). Cloning, sequence, and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **10**:5064-5070
- Shechter I y West CA (1969). Biosynthesis of gibberellins IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **244**: 3200-3209
- Sherman F, Fink GR y Hicks JB (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Shortle D, Haber JE y Botstein D (1982). Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science.* **217**: 371-373
- Sidhu GS (1983)a. Genetics of *Gibberella fujikuroi*. I. Inheritance of certain cultural traits. *Can. J. Gen. Cytol.* **25**: 93-96
- Sidhu GS (1983)b. Genetics of *Gibberella fujikuroi*. II. Natural occurrence and significance of heterokaryosis in sorghum isolates. *Can. J. of Botany.* **61**: 3314-3319
- Siegel MR y Sisler HD (1963). Inhibition of protein synthesis *in vitro* by cycloheximide. *Nature.* **200**: 675-676
- Stephen D, Jones C y Schofield JP (1990). A rapid method for isolation high quality plasmid DNA suitable for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7463-7464
- Steyn PS y Vlegaar R (1985). Biosynthetic studies on the fusarins, metabolites of *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1189-1191
- Sun T, Goodman HM y Ausubel FM (1992). Cloning the *Arabidopsis GA1* locus by genomic subtraction. *The Plant Cell.* **4**: 119-128
- Takenaka M, Hayashi K, Ogawa T, Kimura S y Tanaka T (1992). Lowered virulence to rice plants and decreased biosynthesis of gibberellins in mutants of *Gibberella fujikuroi* selected with pefurazoate. *J. Pesticide Science.* **17**: 213-220
- Tilburn J, Scazzocchio C, Taylor GG, Zabicky-Zissman JH, Lockington RA y Davies RW (1983). Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene.* **26**: 205-221
- Timberlake WE y Marshall MA (1989). Genetic engineering of filamentous fungi. *Science.* **244**: 1313-1317

- Tsuge T, Nishimura S y Kobayashi H (1990), Efficient integrative transformation of the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata* mediated by the repetitive rDNA sequences. *Gene*. **90**: 207-214
- Tsukuda T, Carleton S, Fotheringham S y Holloman WK (1988). Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cel. Biol.* **8**: 3703-3709
- Tudzynski B, Mende K, Weltring KM, Kinghorn JR y Unkles SE (1996). The *Gibberella fujikuroi* *niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. *Microbiology*. **142**: 533-539
- Tudzynski B (1997). Fungal phytohormones in pathogenic and mutualistic associations. En el libro: *The Mycota. Plant relationships V, part A*. Volumen editado por Carroll GC y Tudzynski P, U en Springer-Verlag. 109-139
- Uhlinger C (1997). Leukoencephalomalacia. *Vet Clin North Am Equine Pract.* **13**: 13-20
- Ulhoa CJ, Vainstein MH y Peberdy JF (1992), Transformation of *Trichodema* species with dominant selectable markers. *Curr. Genet.* **21**: 23-26
- Valadon LRG, Mummery RS (1969). Biosynthesis of neurosporaxanthin. *Microbios.* **1A**: 3-8
- Voigt K, Schleier S y Brückner B (1995). Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* **27**: 528-535
- White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En el libro: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Editado por Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ y White TJ en Academic Press, Inc: 315-322
- Winkler, RG y Helentjaris T (1995). The maize *Dwarf3* gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *The Plant Cell.* **7**: 1307-1317
- Wu K, Li L, Gage DA y Zeevaart JA (1996), Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol.* **110**: 547-554
- Xu Y-L, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevaart JAD (1995), The *GA5* locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 6640-6644
- Yanamoto S y Bloch K (1970). Studies on squalene epoxidase. *J. Biol. Chem.* **245**: 1670-1674
- Yelton MM, Hamer JE y Timberlake WE (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**: 1470-1474



## **Agradecimientos**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Junta de Andalucía, la Organización Europea de Biología Molecular, la Fundación Ramón Areces y la Fundación Caja Madrid la financiación de este proyecto.

Al profesor Enrique Cerdá-Olmedo la oportunidad que me brindó para realizar este trabajo, así como sus esfuerzos para recabar fondos con los que financiar el grupo en el que se ha desarrollado este trabajo.

Al profesor Javier Ávalos por su amistad y ayuda constante durante todo el trabajo. Sin ellas, no habría terminado esta Tesis.

Al profesor Carlos Domenech por su maestría. Su capacidad de trabajo y su sencilla visión del mundo son encomiables. Los años que llevo conociéndolo lo han convertido en un amigo y maestro. No he descartado la idea de asociarnos para montar un restaurante internacional.

Al profesor Alejandro Fernández Barrero y a todos sus colaboradores de Granada por su hospitalidad y amabilidad. Destaco a Fernando Reyes, compañero del duro trabajo y de alguna que otra agradable cervecita.

Al profesor Peter Bramley por su dirección científica en mi estancia en Egham, Inglaterra. En este país, la amistad de Mike y Naoko me ayudaron a sentirme como en casa. También, Enca y su compañera Gema me ayudaron a sobrellevar algunos malos momentos.

A todos los profesores del Departamento, que han contribuido enormemente en mi formación, y han conseguido que este Departamento sea de los que funcionan. A las secres, Chon, Ana y Gloria y a Pepe Córdoba y Luis Romanco, que siempre han estado dispuestos a ayudarme en lo que les he solicitado. A los doctorando y doctores de la Pandi y del Cluster que pasaron y que aún quedan por el Departamento, con los que he compartido tantos buenos ratos.

A la AAB115 por hacer de la amistad y de la solidaridad cosas rutinarias. Entre todos me han enseñado mucho. Con las múltiples conversaciones que hemos mantenido han conseguido, aunque difícilmente lo reconociera en los campos de batalla, cambiar mi visión del mundo. A Rafa Flores, por saber vivir, por su filosofía de vida con la que simplifica los grandes problemas. A Nicolás, por estar siempre dispuesto a ayudar con las mejores soluciones. A Santi, por su capacidad de hacer sonreír, y de ver más allá de las preocupaciones. A Bina por ser amiga y

madre de todos. A Beatriz, que pese a llegar más tarde parece que está desde siempre con nosotros, por tener un poco de todos. A Nabil, M<sup>a</sup> del Mar, Irina, Carmela y Javi por haberme aguantado y ayudado, y por los ratos compartidos.

A Chicha, Sergio, Tere, Pepa, Santi, Paco, Alicia, Ramón, Francisco, Pepe, Pablito, Cris, Jesus y Cristina. Algunos conocidos desde los primeros años de carrera, otro desde que nació, pero con todos he compartido muy buenos ratos, y no tan buenos, cuando el Otto nos perdía por los montes de Cazorla y empezaba a hacer cada vez más frío y menos luz. Las cervecitas del Margarita, los espaguetis a la lata, las partidas de cartas jugandonos el fregao y mi primera nevada son cosas que no se olvidan. A Pito y Sergio por tener tan buen perder al Mus. A Pito espero seguir viendolo muchos 24 de Diciembre.

A David, Alfredo, Cristina, Margarita, Antonio, Guillermo, Puri, Todd y Fajardo. Compañeros del Instituto con los que pasé la adolescencia bebiendo cerveza e intentando ligar, y con los que mantengo, desde entonces, una buena amistad. A Alicia Chaparro principal responsable de que estudiara Biología.

A Isabel, M<sup>a</sup>Carmen, Antonio, Manolo, Ana Belen, Lupe, Juanito, Pepe, Evaristo, Manolo Sánchez, Alberto, Francisco, Salvi, Ana Mari... Me acogieron como un amigo "de hecho" pero pronto hicieron que me sintiera como uno más. Su solidaridad, puesta de manifiesto en reuniones como "las del trabajo", y su capacidad para empaparse de todo lo que le rodea sin perder su identidad, deberían ser imitadas por todos.

A mi Madre, que desde muy pronto se ha visto obligada a actuar de padre y madre, y que con su lucha, sensibilidad y firmeza a conseguido salvar dificultades, sin contar con la preparación que le hubiese gustado, y nos ha dado lo que necesitabamos e incluso más de lo que podía. A mis tres hermanas por todos los momentos que hemos compartido.

A mi familia política que desde el primer momento me han tratado como a un hijo. Especialmente a Juan, un hombre que ha dejado un profunda huella tanto en mí como en todo los que tuvimos la suerte de conocerlo.

A la colonia en Madrid: Pili, el Indio, Patri, Vicki, Pito, el Cata y la otra Pili que pese a la distancia han hecho que siempre que aparecía por allí pareciese que nos veíamos todos los días. A Pili por ser más que una amiga, que me ha enseñado a ver las cosas de otra manera.

Por último a la Dra Pepa, por su frescura, espontaneidad y sinceridad. Con ella he compartido muy buenos ratos y espero que sean muchos más.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
en el Departamento de Física y Matemática

Rafael Fernández Martín  
Tesis de Integración y transformación  
integrativa en Gibberella fujikuroi

estado de grado de la tesis: Apto con laude

En virtud de  
*[Signature]*  
El Director

26 de Enero  
El Vocal  
Isabel Gaezder  
El Secretario

1998  
El Vocal,  
*[Signature]*  
El Doctorado,

Talicio Benítez  
*[Signature]*

*[Signature]*

*[Signature]*



501014704

FBI E TD / 384

1014704