

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
EL DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGIA
22 MAYO 1991
10 JUNIO 1991
17 JUNIO 1991
DEL DEPARTAMENTO

TD
349

JR

PRODUCCION DE GIBERELINAS POR
GIBBERELLA FUJIKUROI

R. 9413



Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Biotecnía,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla,
para optar al grado de Doctor en Biología
por la Licenciada

REYES CANDAU CHACON

Reyes Candau

Sevilla, 20 de mayo de 1991

Director y Ponente

E. Cerdá Olmedo

Dr. Enrique Cerdá Olmedo
Catedrático de Genética de la
Universidad de Sevilla

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS
Sede de la Comisión Doctoral
36 89
21
Luis Olmedo



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

TD
347

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral Regulación de la síntesis de giberelinas en *Gibberella fujikuroi* sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado: *Reyer Gaudin*

Sevilla, a 26 de Marzo de 2008

INDICE

INTRODUCCION	1
El organismo, generalidades	1
La genética de <i>Gibberella</i>	2
Los terpenoides de <i>Gibberella</i>	3
Los carotenoides de <i>Gibberella</i>	3
Las giberelinas	4
Biosíntesis de las giberelinas	5
Producción de giberelinas por <i>Gibberella fujikuroi</i>	6
Mutantes de plantas alterados en la síntesis de giberelinas	8
Efectos de las giberelinas sobre las plantas	9
Usos y aplicaciones de las giberelinas	10
MATERIAL Y METODOS	13
Estirpes	13
Métodos de cultivo	14
Medios de cultivo	14
Inoculación y condiciones de cultivo	14
Obtención de microconidios	15
Tratamientos mutagénicos	15
Mutagénesis	15
Selección de mutantes	16
Medidas de glucosa y peso seco	16
Análisis de glucosa	16
Medida del peso seco	16
Análisis de carotenoides	17
Extracción	17
Separación de carotenoides	17
Análisis de giberelinas	18
Medida de giberelinas por fluorescencia	18
Extracción de giberelinas	18
Análisis de giberelinas por HPLC	19
Marcado radiactivo <i>in vivo</i> de las giberelinas	19
Preparación del precursor	19
Condiciones de incubación	20
Extracción de giberelinas radiactivas	20

Separación de las fracciones radiactivas	20
Medida de la radiactividad	20
RESULTADOS	21
Método simplificado de medida de giberelinas	21
Aislamiento de mutantes <i>gib</i>	23
Método de selección de mutantes <i>gib</i>	23
Aplicación del método de medida por fluorescencia a los mutantes <i>gib</i>	24
Relación entre las biosíntesis de carotenoides y giberelinas	26
Producción de carotenoides por mutantes <i>gib</i>	26
Producción de giberelinas por los mutantes <i>car</i>	29
Efecto de inhibidores de la carotenogénesis sobre la síntesis de giberelinas	34
Efectos de la luz sobre la síntesis de giberelinas	37
Análisis por HPLC y marcado radiactivo <i>in vivo</i> de las giberelinas	38
Estirpe silvestre	38
Mutantes <i>gib</i>	40
Regulación de la síntesis de giberelinas	46
Efectos del nitrógeno	46
Efectos de la fuente de nitrógeno	46
Efectos de la concentración de nitrógeno	48
Efectos de la adición de nitrógeno	48
Efectos del carbono	51
Efectos de la fuente de carbono	51
Efectos de la concentración de carbono	52
Efectos de la concentración de fosfato	53
Síntesis de giberelinas con concentraciones limitantes de fosfato	56
Inducción de la síntesis de giberelinas	57
Adición de glucosa	57
Pérdida del nitrógeno	57
Efectos de la cicloheximida	58
Medio óptimo para la producción de giberelinas	63

DISCUSION GENERAL 64
 Relación entre la síntesis de carotenos y de giberelinas . . . 64
 Regulación de la síntesis de giberelinas 66
 Caracterización preliminar de los mutantes *gib* 67

CONCLUSIONES 71

BIBLIOGRAFIA 72

AGRADECIMIENTOS 86

INTRODUCCION

El organismo: generalidades

El género *Fusarium* fue creado por Link en 1809 para agrupar los hongos imperfectos con conidios no septados y fusiformes. Se han propuesto en este género más de mil especies de difícil clasificación debido a la ausencia de ciclo sexual. Las especies de *Fusarium*, muchas de ellas parásitas, están ampliamente distribuidas principalmente en cultivos de zonas templadas y tropicales y constituyen uno de los géneros aislados con más frecuencia por los fitopatólogos. Los criterios actuales de clasificación se basan en la morfología de las esporas, la tasa de crecimiento en agar y la pigmentación y reducen el número de especies a unas cincuenta (Széisi y Hornok, 1986; Ellis, 1988; Marín, 1986; Kommedahl, 1979).

F. moniliforme se caracteriza por la presencia de microconidios de unos 5-12 x 1.5-2.5 μm dispuestos en cadenas y por la formación en agar de colonias de color blanquecino o violeta de más de 2.5 cm de diámetro tras cuatro días de crecimiento (Kim, 1981; Kumar *et al.*, 1987).

Gibberella fujikuroi, estado perfecto de *Fusarium moniliforme*, se puede reproducir sexualmente añadiendo conidios de una estirpe de sexo (+) sobre el micelio de otra de sexo (-) en el medio adecuado. Varios días después se producen unas estructuras denominadas peritecios que contienen en su interior los productos meióticos, las ascosporas. Los peritecios son superficiales, de color azul oscuro, de forma globosa o cónica y con un tamaño de 250-350 μm de alto x 220-300 μm de diámetro. Las ascas son elipsoides y tienen de 4-8 ascosporas desordenadas uniseriadas o biseriadas en disposición oblicua. Las ascosporas, de 14-18 x 4.5-6 μm , son hialinas, elipsoides y a menudo presentan un septo (Booth, 1971; Goth y Johnston, 1981).

Gibberella fujikuroi se subdivide en cuatro subespecies, *moniliformis*, *subglutinans*, *fujikuroi* e *intermedia* atendiendo a criterios reproductivos (las estirpes de distinta subespecie no cruzan entre sí) y morfológicos (formación de micro y macroconidios y tamaño de los peritecios) (Kuhlman, 1983).

La estirpe IMI58289 de *G. fujikuroi*, empleada en este trabajo, pertenece a la variedad *intermedia* y produce giberelinas.

La genética de *Gibberella*

La genética de *G. fujikuroi* fue iniciada por Gordon, que había adquirido una gran colección de estirpes procedentes de huéspedes y localizaciones geográficas muy distintos (Gordon, 1960) y demostró que el hongo era heterotálico; estudios posteriores han puesto de manifiesto la variabilidad de la capacidad de cruzamiento entre distintas estirpes de *G. fujikuroi* (Sidhu, 1983).

Los cruces entre estirpes productoras y no productoras de giberelinas han dado siempre segregación 1:1. Otros cruces genéticos usando como marcadores el sexo, color, morfología y velocidad de crecimiento han dado también segregaciones 1:1 (Spector y Phinney, 1966, 1968; Phinney y Spector, 1967).

En *Gibberella* se pueden producir heterocariontes en medios naturales (Sidhu, 1983; Ming, 1966) y artificialmente por anastomosis espontánea de hifas (Adams *et al.*, 1987). Todas las subespecies tienen genes de incompatibilidad vegetativa (genes *vic*) aunque en distinto número; hasta el momento solo se han encontrado dos alelos de cada gen *vic*. Dos estirpes de *Gibberella* son compatibles únicamente si los alelos de todos los genes *vic* son iguales. La posibilidad de cruzar estirpes vegetativamente incompatibles indica que los genes *vic* no se expresan en la fase sexual del hongo (Puhalla y Spieth, 1983, 1985; Correll *et al.*, 1987, 1989).

También se han descrito en algunas estirpes de *Gibberella* la presencia de alelos letales para las esporas (Sidhu, 1984; Kathariou y Spieth, 1982).

Existen diversos tratamientos para el aislamiento de mutantes de *Gibberella*, como los rayos γ , metanosulfonato de etilo, N-nitrosourea, etilamina, radiación ultravioleta y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Harris, 1985; Avalos, 1983, 1985; Sokodova, 1969; Erokhina, 1969; Erokhina y Efremov, 1970). La estirpe IMI58289 de *Gibberella* es muy adecuada para la inducción y aislamiento de mutantes, ya que la existencia de conidios uninucleados permiten la expresión de mutaciones recesivas y el aislamiento de las células que las contienen (Avalos *et al.*, 1985).

La existencia de métodos para la obtención y regeneración de protoplastos (Harris, 1982; Harris y Partipilo, 1984) y la transformación con ADN exógeno (Sanchez *et al.*, 1991) permiten adelantar un desarrollo inmediato de la genética del organismo.

Los terpenoides de *Gibberella*

Los terpenoides forman una familia de varios miles de productos naturales en cuya estructura se observa la repetición de una unidad básica de cinco carbonos, el isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Los monoterpenos (C₁₀) proceden de la condensación de la forma pirofosforilada del isopreno, el pirofosfato de isopentenilo (IPP), con su isómero, el pirofosfato de dimetilalilo (DMAP). Nuevas adiciones de IPP a la cadena o la duplicación por condensación de dos moléculas iguales generan los sesquiterpenos (C₁₅), los diterpenos (C₂₀), los triterpenos (C₃₀), los tetraterpenos (C₄₀)... etc. En cada uno de estos grupos se pueden dar muchas otras reacciones de adición, ciclación, oxidación, etc.

G. fujikuroi sintetiza gran número de terpenoides, entre ellos los carotenoides, giberelinas y esteroides.

Los carotenoides de *Gibberella*

Los carotenoides son pigmentos tetraterpenos y contienen por tanto ocho unidades isoprenoides, un total de cuarenta átomos de carbono. En la naturaleza existen más de 400 carotenoides ampliamente distribuidos entre las plantas superiores, algas, bacterias, hongos y animales. Estos últimos son incapaces de sintetizarlos y los obtienen a partir de la dieta (Davies, 1976).

Los carotenoides hidrocarbonados se llaman carotenos y los que contienen oxígeno, xantofilas. Los apocarotenoides son los derivados de los carotenoides por pérdida secundaria de átomos de carbono.

G. fujikuroi IMI58289 sintetiza principalmente neurospora-xantina (ácido 4'-apo-beta-caroten-4'-oico), un apocarotenoide de 35 átomos de carbono y un grupo ácido terminal (Aasen y Jensen, 1965), y cantidades menores de otros carotenoides, como β-caroteno, licopeno, toruleno y fitoeno.

La figura 1 muestra la ruta biosintética del pirofosfato de geranilgeraniol (GGPP), precursor de los carotenos, a partir de ácido mevalónico. La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar al primer caroteno propiamente dicho, el fitoeno.

La conversión del fitoeno en β -caroteno se produce tras cuatro deshidrogenaciones, que dan lugar al licopeno, y dos ciclaciones (Porter y Lincoln, 1950). La síntesis de neurosporaxantina se realiza en *Fusarium aquaeductum* a partir del γ -caroteno, el intermediario entre el licopeno y el β -caroteno, después de una deshidrogenación y una reacción de rotura oxidativa con formación de un grupo carboxilo (Valadon y Mummery, 1969).

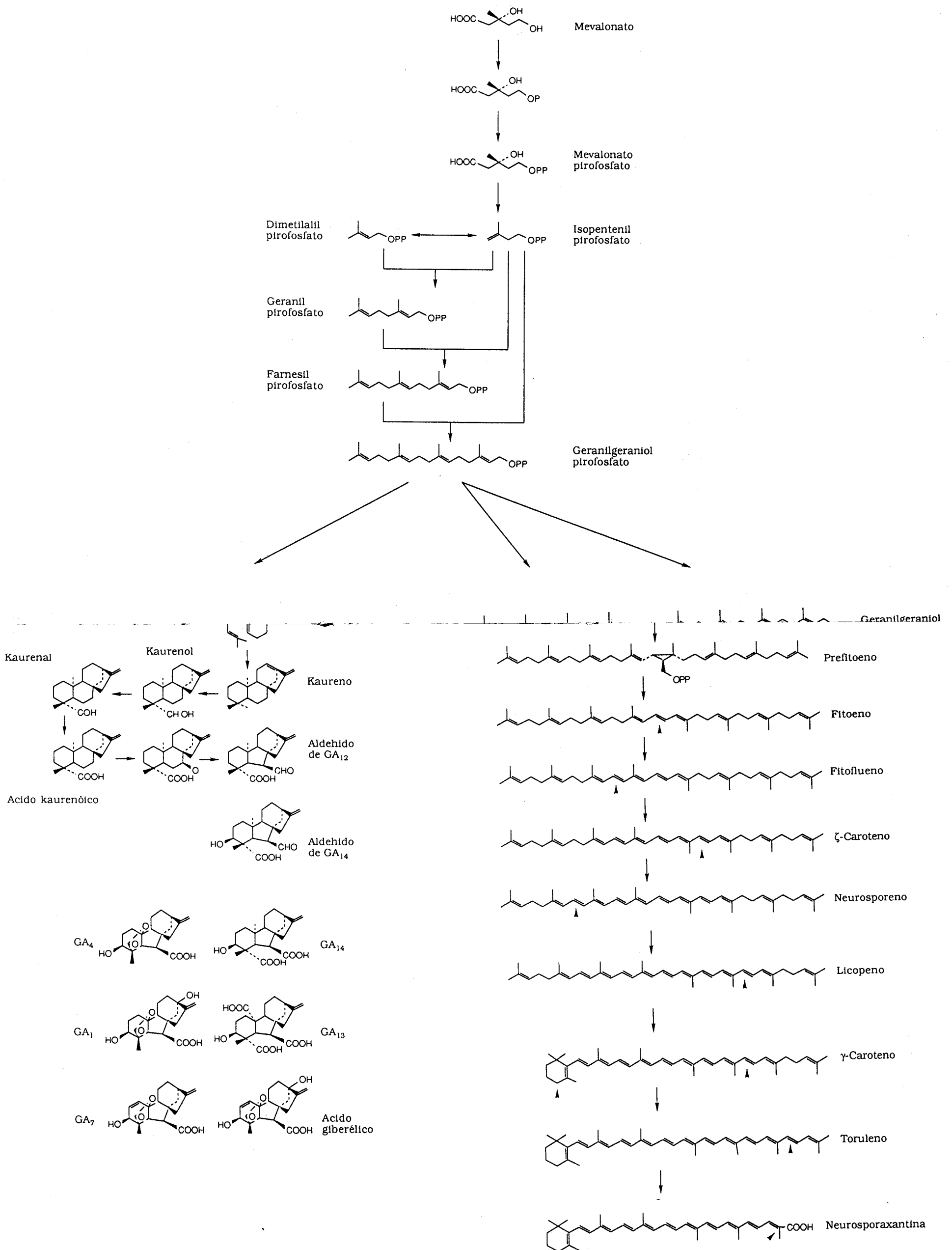
La existencia de mutantes alterados en la carotenogénesis en *G. fujikuroi* permite atribuir las cinco deshidrogenaciones a una misma enzima (Avalos y Cerdá Olmedo, 1987). En *G. fujikuroi*, como en muchos otros organismos, la carotenogénesis está regulada por la luz (Avalos y Schrott, 1990); los carotenoides son más abundantes en los cultivos iluminados que en los mantenidos en la oscuridad. La regulación de la carotenogénesis en este organismo (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1986; Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987), sin embargo, presenta grandes diferencias con la de otros organismos, como la falta de regulación por producto final (Murillo y Cerdá-Olmedo, 1976). Los análisis de diversos mutantes de esta ruta sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio mediado por dos productos génicos, un represor y un correpresor fotosensible. Observaciones de la carotenogénesis *in vitro* sugieren que el represor reprime la síntesis de las enzimas de la carotenogénesis (Avalos *et al.*, 1988).

Las giberelinas

Las giberelinas, aunque descubiertas como metabolitos secundarios de *G. fujikuroi*, son diterpenos naturales de las plantas, en las que actúan como hormonas de crecimiento (Phinney y West, 1960).

Hori en 1898 detectó el agente causante del *bakanae* (crecimiento anormal de las plántulas), una enfermedad conocida por los agricultores japoneses desde largo tiempo atrás, y lo identificó con un hongo imperfecto. En 1926 Kurosawa atribuyó la enfermedad a una "toxina" producida por un hongo que fue identificado posteriormente como *G. fujikuroi* (*F. moniliforme*).

FIGURA 1. Ruta biosintética de las giberelinas y los carotenoides en *G. fujikuroi*.



Un paso clave para el estudio de las giberelinas fue el aislamiento de dos sustancias cristalinas. La sustancia activa recibió el nombre de giberelina A; la segunda sustancia aislada, la giberelina B, carecía de actividad y posteriormente se identificó como ácido alogibérico (Yabuta y Sumiki, 1938).

Los estudios sobre las giberelinas continuaron en Japón durante la Segunda Guerra Mundial. Los primeros trabajos japoneses publicados después de la guerra atrajeron a grupos investigadores de todo el mundo, como los del Northern Regional Research Laboratory (NRRL) en Estados Unidos y el Imperial Chemical Industries, Ltd. (ICI) en Inglaterra. Curtis y Cross (1954) y Stodola (1955) publicaron de modo independiente dos nuevas giberelinas que recibieron el nombre de ácido giberélico y giberelina X respectivamente.

En 1951 se describió la presencia de sustancias estimuladoras del crecimiento en extractos de semillas inmaduras de soja (Mitchell *et al.*, 1951) y posteriormente se descubrió la existencia de sustancias semejantes a giberelinas en plantas superiores (Radley, 1956; West y Phinney, 1956).

En la actualidad se conocen más de 70 giberelinas de diversos orígenes. La más abundante en *G. fujikuroi* es la GA₃ (ácido giberélico), aunque también están presentes en menor cantidad sus precursores, entre ellos la GA₄, GA₇, GA₁₃ y GA₁₄ (Hedden *et al.*, 1978).

Biosíntesis de las giberelinas

Las giberelinas se sintetizan a partir del pirofosfato de geranilgeraniol, que se convierte en *ent*-kaureno mediante la formación de cuatro anillos. El *ent*-kaureno sufre varios pasos de oxidación para dar ácido kaurenoico. La primera giberelina propiamente dicha, es decir, con efectos sobre el crecimiento vegetal, es el aldehído de GA₁₂, que tiene la estructura característica de las giberelinas, dos anillos pentagonales y dos hexagonales. Las demás giberelinas derivan del aldehído de GA₁₂ por distintas reacciones (Lang, 1970; Geissman *et al.*, 1966; Dennis y West, 1967; Cross *et al.*, 1964, 1965).

Gracias a la capacidad de las giberelinas de inducir la actividad α -amilasa se han podido seleccionar varios mutantes de la síntesis de giberelinas, como R9, un mutante espontáneo (Bearder y

MacMillan, 1973) y B1-41a, obtenido mediante tratamiento con rayos ultravioleta (Bearder *et al.*, 1974).

Los estudios genéticos realizados con estos mutantes permitieron identificar dos genes, *g1* y *g2*, que controlan la síntesis de giberelinas. El gen *g1* controla la oxidación de *ent*-kaurenal a *ent*-kaurenoico (Bearder *et al.*, 1974) y los mutantes *g1*⁻ no producen giberelinas. El gen *g2* controla una de las hidroxilaciones; las estirpes *g2*⁻ no sintetizan GA₁ o GA₃ y acumulan sus precursores no hidroxilados GA₄ o GA₇. La estirpe R9 es un mutante *g2*⁻ y B1-41a es un mutante *g1*⁻ (Spector y Phinney, 1968; Pitel *et al.*, 1971; Cross *et al.*, 1963).

Producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi*

La síntesis de giberelinas es un proceso clásico de metabolismo secundario en el cual la producción solo empieza cuando el crecimiento ha cesado a causa del agotamiento de compuestos nitrogenados asimilables. Durante la fase de crecimiento exponencial, la captación de glucosa, nitrógeno y otros nutrientes permanece constante. En la fase siguiente o fase de almacenamiento, cuando el nitrógeno se agota, el peso seco del micelio continúa aumentando debido a la acumulación de lípidos y de hidratos de carbono. Esta fase se caracteriza por el rápido inicio de la producción de giberelinas y puede prolongarse industrialmente usando las fuentes de carbono adecuadas (Borrow *et al.*, 1961, 1964).

La fase de latencia entre la inoculación y el inicio de la fase exponencial puede evitarse en las fermentaciones a gran escala empleando suficiente inóculo y evitando concentraciones de glucosa iniciales muy altas (más de 200 g l⁻¹) y determinadas fuentes de nitrógeno, como el acetato amónico (Vass y Jefferys, 1979).

El suplemento de oxígeno es fundamental para la producción de giberelinas. El peso seco al final de la fase exponencial depende esencialmente de la concentración inicial de nitrógeno y de la aireación del fermentador (Borrow *et al.*, 1961, 1964).

Como fuentes de carbono se han usado frecuentemente glucosa y sacarosa. Se ha observado un descenso en la producción de giberelinas cuando la concentración de glucosa supera los 300 g l⁻¹ (Borrow *et al.*, 1964). Para evitar esto se han desarrollado procesos de alimentación añadiendo la glucosa a intervalos durante la fase de

producción, de modo que la concentración se mantenga siempre por debajo de 40 g l^{-1} . Otro medio para evitar el efecto inhibitorio de la glucosa es usar aceites vegetales, polímeros de carbohidratos como el almidón (Fusca *et al.*, 1964) o mezclas de fuentes de carbono de asimilación rápida y lenta (Darken *et al.*, 1959).

La fuente de nitrógeno también es un factor importante en la síntesis de giberelinas, tanto el tipo de fuente usada como la cantidad añadida. Fuentes de nitrógeno favorables para la síntesis de giberelinas son el sulfato amónico y el cloruro amónico y aquéllas que se asimilan lentamente, como la glicina o el tartrato amónico; la productividad con acetato amónico es considerablemente más baja (Jefferys, 1973). Sin embargo, otros estudios realizados usando gran número de fuentes de nitrógeno concluyen que el incremento en la producción de giberelinas está relacionado con la fuente de nitrógeno, pero no con la cantidad total de nitrógeno en el medio (Fuska *et al.*, 1961).

También son necesarias fuentes de magnesio, potasio, fósforo y azufre. Los elementos traza son aportados por las impurezas que se encuentran en los medios comerciales (Vass y Jefferys, 1979).

Para alcanzar una producción máxima de giberelinas es recomendable cultivar el organismo en dos etapas, con una primera fase de crecimiento a una temperatura de $31-32^{\circ}\text{C}$ y otra fase de producción a 29°C . La agitación o el flujo de aire deben ser tan vigorosos como permita el crecimiento del organismo (Jefferys, 1970).

Tanto el crecimiento como la producción de giberelinas permanecen constantes en un intervalo de pH de 3.5-6.5 (Borrow *et al.*, 1964). Sin embargo, la composición de la mezcla de giberelinas producida depende del valor de pH. En la estirpe silvestre de *G. fujikuroi*, el producto mayoritario de la síntesis de giberelinas es la GA_3 . A valores de pH mayores ($\text{pH} \geq 7$) se detectan menores cantidades de GA_3 pero aumenta la producción de los intermediarios GA_4 , GA_7 , GA_9 , GA_{12} , GA_{14} y GA_{16} . Este efecto del pH puede ser atribuido a una mayor disociación de los intermediarios a alto pH que hace que éstos sean expulsados al medio de cultivo y no puedan volver a entrar en el micelio para ser metabolizados (Bearder, 1983).

Cuando el hongo es cultivado en una fuente de nitrógeno compleja (por ejemplo, péptidos o polímeros de alto peso molecular), se producen cantidades relativamente altas de GA_1 , GA_{16}

y GA₄₇ en comparación con las producidas en medios sintéticos (McInnes *et al.*, 1977). Se ha sugerido que la deshidrogenación de la GA₄ a GA₇ se inhibe por nitrógeno inorgánico. Las fuentes de nitrógeno complejas liberan nitrógeno lentamente y se inhibe preferentemente la 1,2-deshidrogenasa de la GA₄ y se acumulan GA₁, GA₄₇, GA₁₆ y GA₄ (Bearder, 1983).

Por último, investigadores japoneses señalan que el actinio, zinc y cobre estimulan preferentemente la síntesis de GA₄ (Brückner *et al.*, 1989).

Se han establecido dos modelos alternativos de producción de giberelinas ligada a la supresión del crecimiento. El primero depende de una sustancia inhibidora de la síntesis de giberelinas cuya concentración es paralela al crecimiento. La otra posibilidad es que esa sustancia sea efectora de la síntesis de giberelinas y su concentración sea opuesta al crecimiento. Ambos modelos son equivalentes y producirían los efectos observados en la producción de giberelinas. Los datos que existen actualmente sobre regulación de la síntesis de giberelinas no permiten corroborar ni descartar ninguno de ellos (Bu'lock *et al.*, 1974).

Mutantes de plantas alterados en la síntesis de las giberelinas

Los mutantes enanos de plantas (*dwarf*) son de menor tamaño que las estirpes silvestres por tener entrenudos más cortos. Existen dos tipos de mutantes enanos según su respuesta a la adición de giberelinas. Los mutantes que responden a las giberelinas con un aumento el crecimiento tienen alterada la síntesis de las giberelinas y no las producen, lo hacen en menor cantidad o producen otro tipo de giberelinas; las plantas enanas que no responden a las giberelinas producen giberelinas normalmente pero tienen alterada la sensibilidad a ellas (Phinney, 1956).

Existe un tercer tipo de mutantes, el tipo delgado (*slender*), cuyo fenotipo es similar al de plantas silvestres tratadas con giberelinas (tallos delgados, mayores distancias entre nudos...). Algunos de estos mutantes son superproductores de giberelinas y otros tienen alteraciones en el receptor de la hormona (Jones, 1973; Marx, 1983; Reid, 1986).

En el guisante (*Pisum sativum*) se han encontrado ocho genes que regulan la elongación de los nudos. Cuatro de ellos están

directamente relacionados con la síntesis de giberelinas; el gen *na* controla el paso de ácido kaurenico a aldehído de GA₁₂; los mutantes de los genes *lh* y *ls* tienen bloqueados los pasos previos a la GA₄₄, al comienzo de la ruta; los mutantes en el gen *le*, la hidroxidación de GA₂₀ a GA₁, al final de la ruta (Reid, 1983; Ingram & Reid, 1987; Reid, 1986).

En el maíz (*Zea mays*) hay al menos cinco genes implicados en la síntesis de las giberelinas. El gen *d1* controla la hidroxilación de GA₂₀ a GA₁. El gen *d2* controla una oxidación y el gen *d3*, una hidroxilación; ambos pasos parecen estar al principio de la ruta. Los mutantes del gen *an1* no sintetizan kaurenol y los mutantes en el gen *d5* no sintetizan kaureno.

En el arroz (*Oryza sativa*), el gen *dx* controla pasos anteriores al kaureno y el gen *dy*, la hidroxilación de GA₂₀ a GA₁. En la cebada (*Hordeum vulgare*) el gen *br2* controla la hidroxilación de GA₂₀ a GA₁ y el gen *gigas* causa superproducción de giberelinas (Reid, 1986).

Se ha sugerido una homología entre los genes *d1* (del maíz), *dy* (del arroz), *le* (del guisante) y *br2* (de cebada). También existe homología entre los genes *d5* (del maíz) y *dx* (del arroz).

Efectos de las giberelinas sobre las plantas

El desarrollo de algunas plantas depende del fotoperiodo. Durante los días cortos de invierno, la espinaca (*Spinacia oleracea*) y *Agrosterma githago* presentan un crecimiento vegetativo en roseta; con la llegada del verano y la mayor duración de los días, los tallos se alargan y aparecen los primordios florales. En ambas especies, estos efectos parecen ser debidos a los efectos del fotoperiodo sobre el metabolismo de las giberelinas, y pueden ser simulados con la adición de la hormona (Jones y Zeevaart, 1980; Davies *et al.*, 1986).

Las giberelinas afectan de forma aparentemente contradictoria a la floración de diversas plantas; pueden inducir la floración en algunas plantas que requieren la llegada de días largos para florecer y en plantas que necesitan bajas temperaturas para florecer (Koranski *et al.*, 1979; Sircar *et al.*, 1970). Se ha sugerido que las giberelinas y el frío pueden actuar a través de un mecanismo común (Picard, 1965). Por otro lado, las giberelinas impiden la floración de algunas plantas, como en muchos árboles frutales; en éstos, la aplicación de GA₃ reduce la formación de inflorescencias y

estimula el crecimiento vegetativo. En manzanos y perales los primordios florales se diferencian en verano, a la vez que se desarrollan los frutos jóvenes. En las variedades bienales, la presencia de los frutos inhibe la formación de flores. Se ha sugerido que la inhibición de los frutos jóvenes sobre la floración puede ser debida a la liberación de giberelinas de las semillas (Terui y Okagami, 1988; Looney *et al.*, 1985).

La concentración de giberelinas en las semillas es más alta que en el resto de los tejidos. El papel de las giberelinas en la germinación de las semillas puede ser diferente en distintas especies (Nadeau y Rappaport, 1972). Las semillas de guisante germinan bien incluso después de añadir inhibidores de la síntesis de giberelinas; esto parece indicar que la germinación es independiente de la síntesis *de novo* de giberelinas. Sin embargo, cuatro días después de la germinación, las plántulas que nacen de esas semillas son notablemente más pequeñas que los testigos, ya que la elongación depende de la biosíntesis de giberelinas. Por el contrario, algunos mutantes de *Arabidopsis* y de tomate carentes de giberelinas no germinan a menos que se les añada giberelinas.

El ácido giberélico incrementa la actividad de gran número de enzimas en las células de aleurona de la semilla. Estas células son las encargadas de liberar las enzimas necesarias para la degradación del almidón en el embrión e inducir así la germinación. El ácido giberélico tiene distintos efectos; algunas enzimas, como las envueltas en la síntesis de fosfolípidos, aumentan su actividad; otras, como la α -amilasa y algunas proteasas, se empiezan a sintetizar y se secretan de las células; un tercer grupo que incluye β -glucanasas, fosfatasa ácida y ribonucleasas, incrementan su síntesis en respuesta al ácido giberélico (Jacobsen, 1983; Deikman y Jones, 1985; Huttly y Baulcombe, 1989; Jacobsen y Beach, 1985; Sakai-Wada y Nakata, 1987; Varty *et al.*, 1982).

Usos y aplicaciones de las giberelinas

De las 72 giberelinas conocidas, sólo el ácido giberélico y, en menor proporción, las mezclas de GA₄ y GA₇ tienen alguna utilidad. Actualmente, las giberelinas se usan principalmente en la industria cervecera y en agricultura.

La malta se produce por la germinación de los granos de cebada. Durante este proceso, las giberelinas endógenas inducen la síntesis de enzimas hidrolíticas, especialmente α -amilasa y diastasa, que degradan los hidratos de carbono de las paredes y las proteínas y el almidón presentes en el endospermo. Pequeñas adiciones de GA₃ aceleran la producción y liberación de enzimas, acortando el proceso de malteado de uno a tres días (Hardie, 1975; Paleg, 1960).

La aplicación de ácido giberélico a las variedades de uva sin semillas, con bajas cantidades de giberelinas endógenas, aumenta su tamaño (Weaver, 1958). Los agricultores usan las giberelinas desde hace más de veinte años para regular la época de recolección, incrementar el rendimiento y mejorar la calidad de la cosecha (aumento del tamaño y la separación de los granos, aumento de la cantidad de azúcar por grano, etc.) (Rappaport, 1980).

La GA₃ se usa también rutinariamente para mejorar el rendimiento en la caña de azúcar, cuya productividad aumenta en dos toneladas por hectárea con tratamientos de 25 g de giberelinas/Ha.

La aplicación de GA₃ en algunas especies de *Citrus* (naranjas, limones, mandarinas y pomelos) también tiene efectos beneficiosos. En las naranjas Navel mejora la calidad de la fruta, retardando la senescencia y evitando algunas enfermedades de la piel; en las mandarinas se incrementa el tamaño y el número total de frutos y el número de frutos sin semillas; en los limones se retarda la maduración y se prolonga la vida media del fruto en más de tres meses (Coggins y Lewis, 1965).

Las cerezas tratadas con GA₃ cuatro semanas antes de la recolección presentan frutos mayores y más firmes y se reducen las picaduras en la piel y las magulladuras de los frutos durante el transporte y almacenamiento (Looney y Lidster, 1980).

La GA₃ se usa también en los cultivos de peras para elevar el rendimiento, inducir la formación de frutos partenocárpicos y aumentar la resistencia a las heladas. Las giberelinas aplicadas a manzanos aceleran la fructificación de árboles jóvenes y alteran la forma del fruto; este efecto es más marcado con GA₄ y GA₇ (Williams y Stahly, 1969).

La GA₃ se usa en cultivos de patatas para romper la dormancia, lo que resulta particularmente útil en climas donde se recogen dos cosechas en una estación, como en la India. Además,

acelera la aparición de raíces e incrementa el número de tallos y tubérculos producidos (Metzger, 1983).

En los países mediterráneos y en Sudáfrica la GA₃ se usa en la producción de alcachofas; la aplicación de la hormona a plantas jóvenes aumenta el número de cabezas por planta y adelanta la cosecha varias semanas, especialmente a bajas temperaturas.

Además de estas aplicaciones a gran escala, las giberelinas se usan en mercados más reducidos para mejorar las cosechas tempranas de achicoria, col, menta, perejil, espinaca y fresa; aumentan el rendimiento de judías, apios, endivias, pimientos, berros y tomates cultivados en invernadero; mejoran la producción de semillas de zanahoria, cebolla y apio; incrementan el tamaño de limones y melones e inducen el desarrollo partenocárpico de muchos frutos como las pasas, higos, fresas, manzanas, peras y tomates.

Las mezclas de GA₄ y GA₇ rompen la termodormancia de las semillas de apio. Este tratamiento reduce la incidencia de enfermedades en manzanas y produce cambios en la forma del fruto, aumentando la relación entre la longitud y el diámetro.

En el campo de la cosmética, varias patentes japonesas describen la adición de giberelinas a cremas para decolorar las pecas y a tónicos para fortalecer el pelo (Brückner, 1989).

En esta tesis hemos desarrollado un método rápido de detección de giberelinas que nos ha permitido estudiar algunos aspectos de la regulación fisiológica de la síntesis de giberelinas por la estirpe IMI58289 de *G. fujikuroi*. Por otro lado, gracias a la puesta a punto de un método de selección de mutantes alterados en la síntesis de giberelinas hemos aislado trece de estos mutantes que nos han servido para estudiar la relación entre la síntesis de carotenos y giberelinas en *G. fujikuroi*.

MATERIAL Y METODOS

ESTIRPES

La Tabla 1 enumera las estirpes de *Gibberella fujikuroi* usadas en este trabajo junto con su fenotipo y su origen. La estirpe silvestre IMI58289 fue obtenida del *Imperial Mycological Institute* (Kew, Surrey, Inglaterra). Todas las demás estirpes fueron obtenidas a partir de la estirpe IMI58289 por tratamientos con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

TABLA I: Estirpes de *Gibberella* usadas en este trabajo

Estirpe	Genotipo	Fenotipo	Origen
SG1	<i>car-1</i>	naranja intenso agiberélico	IMI58289
SG4	<i>car-3</i>	blanco	IMI58289
SG22	<i>carS6</i>	naranja intenso	IMI58289
SG68	<i>carS6-carB31</i>	blanco (Fitoeno)	SG22
SG121	<i>gib-1</i>	agiberélico	IMI58289
SG122	<i>gib-2</i>	hipogiberélico	IMI58289
SG123	<i>gib-3</i>	alogiberélico	IMI58289
SG124	<i>gib-4</i>	hipogiberélico	IMI58289
SG127	<i>gib-5</i>	blanco agiberélico	IMI58289
SG128	<i>gib-6</i>	hipogiberélico	IMI58289
SG129	<i>gib-7</i>	alogiberélico	IMI58289
SG133	<i>gib-8</i>	alogiberélico	IMI58289
SG134	<i>gib-9</i>	alogiberélico	IMI58289
SG135	<i>gib-10</i>	hipogiberélico	IMI58289
SG136	<i>gib-11</i>	hipogiberélico	IMI58289
SG137	<i>gib-12</i>	agiberélico escaso crecimiento	IMI58289
SG138	<i>gib-13</i>	agiberélico	IMI58289
SG139	<i>gib-14</i>	agiberélico	IMI58289

MÉTODOS DE CULTIVO

Medios de cultivo

El medio mínimo contiene por litro: glucosa: 30 g, NaNO₃: 3 g, KH₂PO₄: 1 g, MgSO₄·7H₂O: 0,5 g, KCl: 0,5 g, H₃BO₃: 10 mg, CuSO₄: 100 mg, FeCl₃: 200 mg, MnCl₂: 20 mg, NaMoO₄: 20 mg y ZnSO₄: 2 mg.

En algunos casos se usó una variante de este medio llamado "medio de germinación" que contiene, además, 1g l⁻¹ de extracto de levadura.

Para la obtención de conidios se usó medio de esporulación (EG en Avalos *et al.*, 1985).

Para la producción de giberelinas se empleó caldo pobre en nitrógeno (10%ICI en Geissman *et al.*, 1966), caldo rico en nitrógeno (ICI en Geissman *et al.*, 1966) o variantes de estos medios.

Para solidificar los medios se emplearon 16 g l⁻¹ de agar Analema (Vorquímica, Vigo).

En los casos de adición de compuestos químicos, éstos fueron añadidos al medio inmediatamente antes de vertirlo en cajas de Petri. La β-ionona se disolvió en etanol y se emulsionó con monooleato de polioxietilensorbitano ("Tween 80"), que se encontraban en el medio a una concentración final de 8 ml l⁻¹ de etanol y 4 ml l⁻¹ de Tween 80. La difenilamina se disolvió en etanol, que alcanzaba en el medio una concentración final de 20 ml l⁻¹. Los demás compuestos químicos se añadieron al medio disueltos en agua.

Inoculación y condiciones de cultivo

Para refrescar las estirpes se inoculó una gota de una suspensión de esporas congeladas a -80°C en glicerol al 10% en cajas de medio de esporulación y se incubaron a 30°C durante tres días.

Para recoger conidios se inocularon siete transplantes del organismo en distribución hexagonal en medio de esporulación durante una semana a 30 °C a la luz.

Para contar colonias se inocularon las cajas con suspensiones de conidios recién cosechados.

Para medir carotenos se inocularon siete fragmentos de 1 mm^2 de micelio en cajas de medio mínimo, en distribución hexagonal. Las condiciones de temperatura e iluminación se señalarán en cada caso.

Para inducir la síntesis de giberelinas se inocularon matraces Erlenmayer de 500 ml con 250 ml de caldo pobre en nitrógeno (o variantes de éste) con 1 ml de una suspensión de fragmentos de micelio esporulado. Para ello se resuspendieron en 10 ml de agua fragmentos de esporas y micelio mezclándolos bien con una espátula. Estos cultivos se incubaron en un agitador orbital a 120 rpm en oscuridad a 30°C durante, al menos, 15 días.

Para comparar las síntesis de carotenos y giberelinas en caldo pobre en nitrógeno se usó el mismo método de cultivo empleado para inducir la síntesis de giberelinas.

Como fuente de iluminación se usó una batería de cinco fluorescentes que daban una intensidad luminosa de unos $0,5 \text{ W m}^{-2}$.

Obtención de microconidios

La superficie de cultivos en medio de esporulación se lavó con 10-15 ml de agua estéril. Los microconidios se limpiaron de fragmentos de micelio por filtración y se lavaron dos veces por centrifugación en agua estéril. Las suspensiones obtenidas se usaron inmediatamente o se resuspendieron en una solución al 10% (v/v) de glicerol en agua y se guardaron a -20°C .

TRATAMIENTOS MUTAGENICOS

Mutagénesis

Para todos los tratamientos se usó una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) de 1 mg ml^{-1} . Se añadieron 0.2 ml de esta solución a 0,8 ml de esporas recién recogidas suspendidas en agua y se incubaron a 22°C en oscuridad durante una hora. A continuación se eliminó la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina mediante dos lavados con agua destilada estéril. Las esporas mutagenizadas se conservaron a -20°C en una solución al 10% (v/v) de glicerol en agua.

Selección de mutantes

El método de selección de mutantes alterados en la síntesis de giberelinas se basa en la propiedad de fluorescencia de estos compuestos al reaccionar con H_2SO_4 .

Se sembraron esporas mutagenizadas de *Gibberella* en medio de germinación y se incubaron durante tres días a 30°C en oscuridad. Una vez desarrolladas las colonias, éstas se inocularon en viales con 1 ml de caldo pobre en nitrógeno y se incubaron a 30°C durante nueve días en oscuridad para inducir la síntesis de giberelinas. Pasado este tiempo, se mezclaron 0.5 ml de caldo de cultivo de cada uno de los viales con 0.25 ml de H_2SO_4 96% y se observaron bajo una lámpara de luz negra de unos 400 nm de longitud de onda (Sylvania F18W/BLB/ES).

El ácido giberélico (GA_3) en estas condiciones presenta una fluorescencia verdeazulada cuya intensidad se puede cuantificar a simple vista. Los mutantes no productores de giberelinas carecen de fluorescencia, mientras que en los superproductores la intensidad de la fluorescencia se ve incrementada.

Tras este primer paso de selección, todos los mutantes fueron comprobados haciéndoles el espectro de fluorescencia y por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Los mutantes alterados en la carotenogénesis fueron aislados por J. Avalos (Avalos *et al.*, 1985).

MEDIDAS DE GLUCOSA Y PESO SECO

Análisis de glucosa

Las concentraciones de glucosa en el filtrado se determinaron con un analizador de glucosa YSI modelo 27.

Medida del peso seco

El peso seco del micelio se midió después de liofilizarlo o bien tras mantenerlo a una temperatura de 105°C durante tres horas.

ANALISIS DE CAROTENOIDES

Extracción

El micelio cultivado como se ha descrito anteriormente se separó del medio de cultivo mediante filtración con papel de filtro cuando se usó medio líquido, o extrayendo el micelio de la caja eliminando los restos de agar cuando se empleó medio sólido. Los micelios se congelaron a -20°C y se liofilizaron. Se trituraron muestras de unos 0,1 g en frío en un mortero con arena lavada con ácido. El polvo resultante se extrajo con acetona varias veces hasta que la acetona y los restos celulares perdieron totalmente el color. La acetona recogida se centrifugó a 2.000 g y el sobrenadante se evaporó en un evaporador (Buchi) conectado a una bomba de vacío (Millipore). Las muestras evaporadas se guardaron en oscuridad a -20°C y atmósfera de nitrógeno.

Separación de carotenoides

Los análisis de carotenos se hicieron en columnas de cromatografía de 2 cm de diámetro interior con una capa de 1 cm (3 g aprox.) de óxido de aluminio (Merck grado II-III) desactivado al 3%. Las muestras se diluyeron en un pequeño volumen de éter de petróleo (punto de ebullición $40-60^{\circ}\text{C}$) y se añadieron a las columnas. La adición de 12 ml de éter de petróleo eluyó el fitoeno. La adición posterior de 10 ml de acetona eluyó los carotenos intermedios y esteroides. La adición final de 16 ml de una solución etanólica de sosa (50 g de NaOH y 50 ml de agua en el volumen de etanol 96% (v/v) necesario para completar un litro) eluyó la neurosporaxantina. A esta última fracción se le añadieron 5 ml de éter de petróleo y, lentamente, 8 ml de HCl 2N y se lavó con éter de petróleo hasta que desapareció el color.

Para identificar los carotenos se compararon sus espectros de absorción y sus comportamientos cromatográficos con los ya publicados (Davies, 1976).

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV160. Las concentraciones se determinaron por su coeficiente de extinción en hexano, $E = 91.5$ (1 mg l^{-1} , 1 cm) para el fitoeno a 284 nm y $E = 171.5$ (1 mg l^{-1} , 1 cm) para la

neurosporaxantina a 475 nm. Para estimar la concentración global de carotenos intermediarios se les atribuyó un coeficiente de extinción máximo de $E = 250$ (1 mg l^{-1} , 1 cm).

ANALISIS DE GIBERELINAS

Medida de giberelinas por fluorescencia

Los medios de cultivo se separaron del micelio mediante filtración con papel de filtro. A 0.2 ml del filtrado se le añadieron 0.2 ml de etanol 96% y 2 ml de una mezcla fría de etanol 96% y ácido sulfúrico 96% 1:1. Las muestras se agitaron cuidadosamente y se incubaron a 48°C durante 30 minutos. En las condiciones descritas las giberelinas reaccionan con el ácido sulfúrico y producen un derivado fluorescente.

Las concentraciones de giberelinas se calcularon por comparación con la fluorescencia mostrada en las mismas condiciones por medio fresco con concentraciones conocidas de ácido giberélico (Sigma) disuelto en los 0.2 ml de etanol 96% que se añaden a la mezcla. Se midió la emisión a 464 nm de muestras excitadas a 406 nm en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-5.

Extracción de giberelinas

La extracción de las giberelinas del medio de cultivo se realizó cuando se analizó el contenido en giberelinas por cromatografía HPLC. Antes de extraer las giberelinas, se añadió al medio de cultivo de cada muestra ácido sórbico (utilizado como estándar interno) a una concentración final de 200 mg l^{-1} .

A continuación se ajustó el medio a pH 8 con una solución de KOH al 60% y se hicieron tres particiones con eter de petróleo (punto de ebullición 40-60°C) para eliminar materiales liposolubles. La fase acuosa se ajustó a pH 2.5 con ácido acético 8.6 M y se hicieron cinco particiones con acetato de etilo. A la fase superior no acuosa se le añadió sulfato sódico anhidro y se dejó durante al menos una hora (preferentemente toda la noche) a 4°C. Hecho esto, se separó el sulfato sódico mediante filtración con papel de filtro y se evaporó el acetato de etilo en un evaporador (Buchi) acoplado a una bomba de vacío (Millipore).

Las muestras se disolvieron en metanol y se filtraron con un filtro Millipore de 0.2 μm antes de inyectarlas en el HPLC.

Análisis de giberelinas por HPLC

Se utilizó un cromatógrafo Waters con una columna Spherisorb S50DS C18, dos bombas Waters, modelos 501 y 510 y una red de diodos Waters. Los cromatogramas se midieron a 206 nm.

El control del sistema, la integración de datos y su almacenamiento se realizó siguiendo un programa "Baseline 810" en un ordenador IBM.

Los solventes usados fueron los siguientes: solvente A (40% de metanol en ácido fosfórico al 0.1%), solvente B (60% de metanol en ácido fosfórico al 0.1%), solvente C (metanol). Los solventes fueron desgasificados por burbujeo de Helio a un flujo de 1 ml min^{-1} .

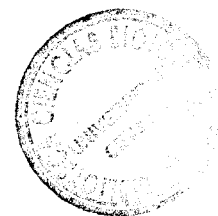
Después de un flujo del solvente A 100% durante 15 minutos, se empezó a bombear el solvente B de modo constante durante 10 minutos hasta alcanzar el 100% y estas condiciones se mantuvieron durante 15 minutos más. A continuación se dejó de bombear el solvente B y se bombeó el solvente C 100% manteniendo estas condiciones durante 15 minutos. El flujo de solventes se mantuvo constante a 0.75 ml min^{-1} .

Para identificar las giberelinas separadas en estas condiciones, los tiempos de retención se refirieron a un estándar interno de ácido sórbico y se compararon con giberelinas purificadas cedidas por el Prof. Hedden, del departamento de Química de la Universidad de Bristol.

MARCADO RADIATIVO *IN VIVO* DE LAS GIBERELINAS

Preparación del precursor

La lactona del ácido L[2- ^{14}C]mevalónico (1.88 MBq ml^{-1} ; 1.99 GBq mmol^{-1}), obtenida de Amersham International plc. (Amersham, Inglaterra), se desecó bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en una solución de NaOH 100 mM, para dar lugar a la correspondiente sal sódica.



Condiciones de incubación

Matraces Enlermeyer de 100 ml con 50 ml de caldo pobre en nitrógeno se inocularon con 0.1 ml de una suspensión de esporas y se cultivaron a 30°C, 120 rpm y oscuridad.

Tras seis días de incubación, se añadieron a cada cultivo 0.1 ml de la solución sódica del ácido [¹⁴C]mevalónico (2.64 μCi; 97.71 KBq; 51.76 μmoles). Los cultivos se volvieron a incubar durante nueve días más en las mismas condiciones.

Extracción de giberelinas radiactivas

La extracción se realizó del modo habitual.

Separación de las fracciones radiactivas

Las giberelinas se separaron mediante cromatografía HPLC. Al cromatógrafo se acopló un colector de fracciones que recogía una muestra de 0.75 ml por minuto.

Medida de la radiactividad

0.5 ml de cada fracción se disolvieron en 5 ml de tolueno con 5 g l⁻¹ de 2-5-difeniloxazol (PSPARK *Scientific limited*, *scintillation grade*) y se midió su radiactividad en un contador de centelleo Beckman LS7500.

RESULTADOS

3.1

METODO SIMPLIFICADO DE MEDIDA DE GIBERELINAS

Los métodos existentes de medida de giberelinas son muy complicados para una cuantificación rápida de un alto número de muestras. Nosotros hemos puesto a punto un método eficaz de medida de giberelinas sin pasos previos de purificación basado en la fluorescencia que presentan las giberelinas cuando reaccionan con ácido sulfúrico.

Mezclamos una alícuota del medio de cultivo de *Gibberella* con una solución de etanol y ácido sulfúrico y la incubamos a 48°C durante treinta minutos. Medimos en un espectrofluorímetro la luz emitida a 464 nm después de una excitación a 406 nm y la comparamos directamente con la emitida por concentraciones conocidas de ácido giberélico puro. Ambas determinaciones han de hacerse en paralelo.

La fluorescencia es proporcional a la concentración de ácido giberélico dentro de los límites usados (Fig. 2).

Los espectros de fluorescencia observados después de aplicar este método al medio de cultivo de la estirpe silvestre IMI58289 coinciden con los espectros del ácido giberélico puro. Medimos los espectros de emisión tras excitar las muestras a 406 nm y los de excitación midiendo la emisión a 464 nm.

Las concentraciones de giberelinas estimadas por este método son proporcionales a las obtenidas después de extraer y separar las giberelinas por HPLC y sumar los valores de cada una de ellas (Fig. 3).

Este nuevo método, simplificación de métodos analíticos tradicionales (Sembdner, 1988), podría dar falsos positivos debido a posibles reacciones de otras sustancias. Este no es el caso de la estirpe IMI58289 pues inhibiendo la síntesis de giberelinas química o genéticamente no observamos fluorescencia alguna.

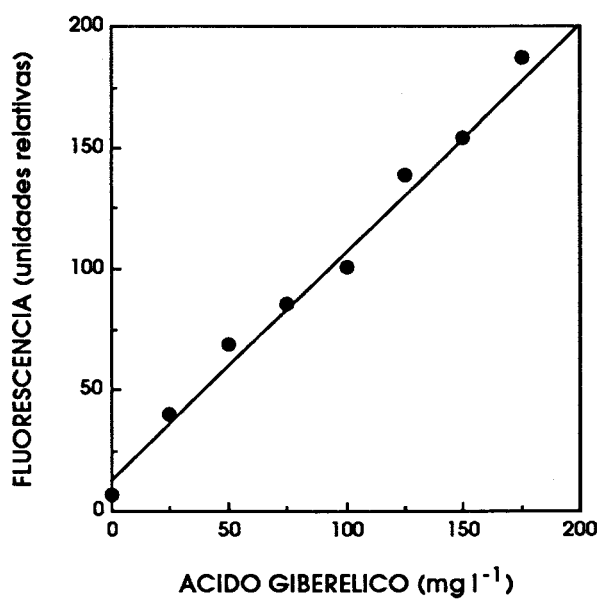


FIGURA 2. Relación entre la fluorescencia, en las condiciones descritas, y cantidades conocidas de ácido giberélico puro (Sigma).

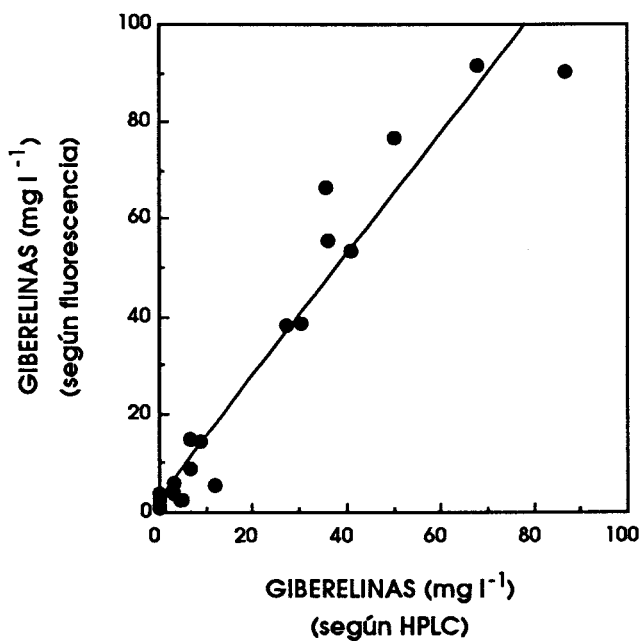


FIGURA 3. Relación entre la concentración de giberelinas estimadas por el método de fluorescencia y por el método de cromatografía HPLC.

3.2

AISLAMIENTO DE MUTANTES GIB

En este capítulo se describe la puesta a punto de un método rápido para la selección de mutantes de la biosíntesis de giberelinas basado en su fluorescencia cuando reaccionan con ácido sulfúrico. A partir de este método hemos aislado 14 mutantes alterados en distintos pasos de la ruta.

3.2.1

METODO DE SELECCION DE MUTANTES GIB

Sembramos una suspensión de esporas tratadas con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en cajas de medio de germinación y las incubamos a 30°C durante 2 ó 3 días. Transplantamos las colonias resultantes a cajas de medio mínimo y las cultivamos a 30°C durante dos días. Inoculamos estas colonias enteras en viales con 1 ml de caldo pobre en nitrógeno y las incubamos a 30°C durante nueve días. Para ensayar rápidamente la presencia de giberelinas añadimos 0.5 ml del caldo de cultivo a viales con 0.25 ml de ácido sulfúrico y los observamos bajo una lámpara de luz negra (aproximadamente 400 nm). Cuando la fluorescencia observada difería de la encontrada en cultivos silvestres volvimos a cultivar las colonias en las mismas condiciones y repetimos el ensayo.

Bajo las condiciones descritas, el ácido giberélico (GA₃) presenta una fluorescencia verdeazulada, las giberelinas GA₁, GA₅, GA₆ y GA₈ fluorescencia azul, la giberelina GA₇, amarilla y las giberelinas GA₂, GA₄ y GA₉, roja (Jones *et al.*, 1963). En principio, este método permite aislar mutantes alterados en alguno de los pasos anteriores a la síntesis de las giberelinas, mutantes desregulados en la síntesis de giberelinas y mutantes que sintetizan mezclas de giberelinas distintas a las de la estirpe silvestre.

Aplicamos este método a 4.100 colonias, 34 de las cuales presentaron fluorescencia alterada o reducida en tres ensayos sucesivos.

3.2.2

APLICACION DEL METODO DE MEDIDA DE GIBERELINAS POR FLUORESCENCIA A LOS MUTANTES *GIB*

Analizamos las colonias aisladas según el apartado anterior siguiendo el método simplificado de medida de giberelinas. De 34 colonias, 14 presentaron alteraciones en la fluorescencia. Elegimos las tres letras *gib* para las mutaciones responsables de las modificaciones en la biosíntesis de las giberelinas. Las nuevas estirpes tienen los alelos *gib-1* hasta *gib-14*.

Trece de los catorce mutantes crecen y consumen glucosa de manera parecida al silvestre (Tabla II). La estirpe SG137 es significativamente más lenta y no podemos excluir que produzca giberelinas en incubaciones más prolongadas.

De los trece mutantes que crecen normalmente, cuatro (SG121, SG127, SG138 y SG139) no presentan fluorescencia (menos de un 5% de la de la estirpe silvestre), dos (SG133 y SG134) tienen niveles de fluorescencia parecidos a los del silvestre, pero de color más azulado; las siete estirpes restantes (SG122, SG123, SG124, SG128, SG129, SG135 y SG136) tienen niveles de fluorescencia menores que la estirpe silvestre (10-40% de la de la estirpe silvestre).

TABLA II. Crecimiento y producción de giberelinas en los mutantes *gib*

Estirpe	Peso seco (g l ⁻¹)	Consumo de glucosa (g l ⁻¹)	Giberelinas (mg l ⁻¹)
Tipo silvestre			
IMI58289	7.1	35	89
Mutantes derivados de IMI58289			
SG121	6.5	30	4
SG122	5.4	39	29
SG123	6.2	36	37
SG124	6.6	31	27
SG127	5.2	28	5
SG128	4.9	26	17
SG129	5.6	36	37
SG133	6.9	37	47
SG134	5.2	47	88
SG135	6.7	32	10
SG136	6.4	45	14
SG137	2.5	12	0
SG138	7.8	30	2
SG139	7.6	31	2

Incubaciones de 14 días a 30°C en las condiciones normales de síntesis de giberelinas. Los valores de los mutantes son promedio de dos experimentos independientes. El coeficiente de variación medio de los valores en la estirpe silvestre es 11.3% para el peso seco (17 experimentos independientes), 11.5% para el consumo de glucosa (22 experimentos independientes) y 19.4% para las giberelinas (23 experimentos independientes).

3.3

RELACION ENTRE LAS BIOSINTESIS DE CAROTENOIDES Y GIBERELINAS

Abordamos ahora las relaciones entre las rutas biosintéticas de giberelinas y carotenoides, isoprenoides sintetizados por *G. fujikuroi* a partir de mevalonato. Se determina si la mutación de una de las rutas afecta al funcionamiento de la otra. También se estudia el efecto sobre la síntesis de giberelinas de la luz, que estimula la carotenogénesis en *Gibberella*, y de algunos inhibidores químicos de esta ruta.

3.3.1

PRODUCCION DE CAROTENOIDES POR LOS MUTANTES *GIB*

La estirpe silvestre IMI58289 excreta al medio unos 80 mg l⁻¹ de giberelinas; esta concentración varía según las condiciones de cultivo. La giberelina mayoritaria excretada por esta estirpe es la A₃ (ácido giberélico), aunque también se excretan otras giberelinas en menor concentración, como A₄, A₇ y A₉.

Las giberelinas y los carotenoides se acumulan linealmente con el tiempo en los cultivos de *Gibberella*, empezando desde el principio los carotenoides y algo más tarde las giberelinas (Fig. 4). Para facilitar la comparación, ambas concentraciones se han expresado en términos de moles del precursor común, geranilgeraniol, y se ha usado una estirpe mutante cuya producción de carotenoides es mucho mayor que la de la silvestre e independiente de la luz.

Todos los mutantes alterados en la síntesis de giberelinas (mutantes *gib*), excepto uno, acumulan carotenoides después de incubarlos en las condiciones usuales para el análisis de carotenoides a 30°C en oscuridad (Tabla III). La neurosporaxantina es el carotenoide mayoritario en todos ellos. La única excepción es la estirpe SG127, que no produce giberelinas ni carotenoides.

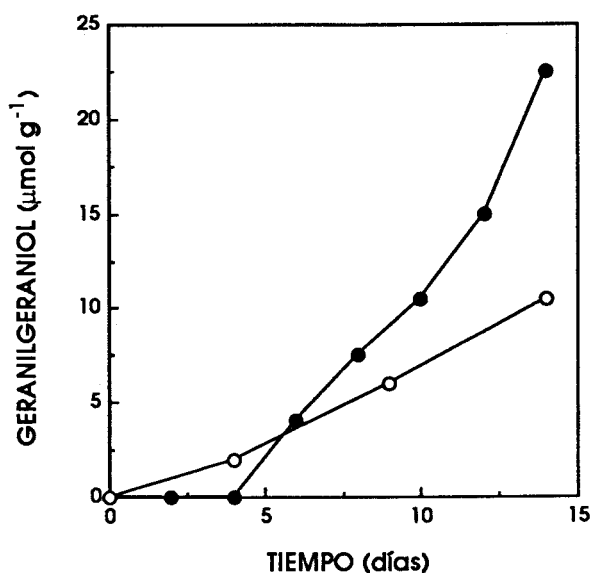


FIGURA 4. Comparación entre las síntesis de giberelinas y carotenoides a lo largo del tiempo en la estirpe SG22 cultivada a 30°C en caldo pobre en nitrógeno. El contenido está expresado en moles de geranylgeraniol usados en la síntesis de giberelinas (●, equimolar) y de carotenoides (○, dos moles de geranylgeraniol por mol de carotenoide) por gramo de peso seco de micelio.

La luz activa la carotenogénesis en *Gibberella* como en muchos otros organismos. La concentración de carotenoides varía mucho según las condiciones de cultivo: entre 1 y 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco en nuestros cultivos en la oscuridad y entre 100 y 150 en la luz. Los análisis de carotenoides después de incubar a 22°C en luz y oscuridad muestran que la carotenogénesis en los mutantes *gib* es fotoinducible (Fig. 5), igual que ocurre en la estirpe silvestre.

Cuando comparamos las síntesis de carotenoides y giberelinas de los mutantes *gib* en caldo pobre en nitrógeno (Fig. 6) se observan dos tendencias: algunos de estos mutantes acumulan más carotenoides que la estirpe silvestre y otros menos. Estos mutantes pueden estar alterados en distintos genes *gib* y, por tanto, el efecto sobre la carotenogénesis puede ser diferente.

TABLA III. Carotenoides y giberelinas en los mutantes *gib*

Estirpe	Giberelinas (mg l ⁻¹)		Carotenoides (µg g ⁻¹ peso seco)		
	6 días	12 días	Fitoeno	Carotenos intermediarios	Neurospora-xantina
Tipo silvestre					
IMI58289	22	79	1	6	3
Mutantes derivados de IMI58289					
SG121	3	10	0	11	7
SG122	7	27	2	19	12
SG123	1	15	0	9	3
SG124	2	25	0	5	3
SG127	5	15	0	0	0
SG128	6	32	0	8	4
SG129	7	23	0	3	2
SG133	15	49	0	2	1
SG134	10	57	0	6	1
SG135	4	5	1	18	6
SG136	4	8	2	22	15
SG137	0	0	0	6	1
SG138	0	0	2	19	16
SG139	0	1	2	14	9

Todos los cultivos se incubaron a 30°C en oscuridad bajo las condiciones normales usadas para la síntesis de giberelinas (caldo pobre en nitrógeno) y la producción de carotenoides (medio mínimo, cuatro días).

El bloqueo de la síntesis de giberelinas en estos mutantes no aumenta la concentración de carotenoides, como sería de esperar en el caso de una compensación de sustratos entre ambos productos; si los precursores de la síntesis de giberelinas se desviarán a la ruta de los carotenoides, la concentración de éstos sería de unos 10 mg g⁻¹ peso seco.

3.3.2

PRODUCCION DE GIBERELINAS POR LOS MUTANTES CAR

El micelio de la estirpe silvestre IMI58289 es blanco cuando se incuba en oscuridad y levemente anaranjado cuando se incuba en la luz a causa de la acumulación de carotenoides. El carotenoide mayoritario es la neurosporaxantina, que representa alrededor de un 75% del total. El resto lo forman el fitoeno y varios carotenos coloreados intermediarios de la ruta, entre ellos el licopeno, el γ -caroteno y el toruleno, que en este trabajo se engloban con el nombre de carotenos intermediarios.

Las variaciones en las concentraciones de carotenoides en los mutantes *gib* sugerían la existencia de relaciones entre las síntesis de carotenoides y de giberelinas. Como consecuencia, analizamos los mutantes alterados en la síntesis de los carotenoides (mutantes *car*). Casi todos estos mutantes difieren del tipo silvestre en la producción de giberelinas (Tabla IV). Los mutantes con mayor concentración de carotenoides sintetizan menos giberelinas que el tipo silvestre y varios de los mutantes que carecen de carotenoides sintetizan más. Los mutantes que acumulan carotenoides distintos de la neurosporaxantina pero mantienen constante la concentración total de carotenoides tienen una producción de giberelinas semejante a la de la estirpe silvestre.

Algunos mutantes revertientes para la síntesis de carotenoides obtenidos a partir de la estirpe SG22, superproductora de neurosporaxantina, sintetizaron la misma cantidad de giberelinas que la estirpe silvestre.

El mutante SG1, superproductor de carotenoides, carece prácticamente de giberelinas. Este mutante excreta al medio de cultivo grandes cantidades de un pigmento rojo de naturaleza química desconocida.

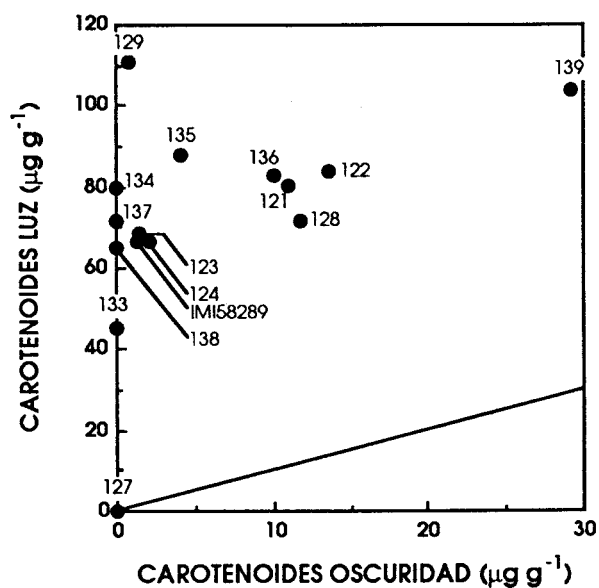


FIGURA 5. Síntesis de carotenoides en luz y oscuridad en la estirpe IMI58289 y en los mutantes *gib* tras cuatro días de incubación a 22°C en medio mínimo. La línea corresponde a concentraciones de carotenoides iguales en luz y oscuridad.

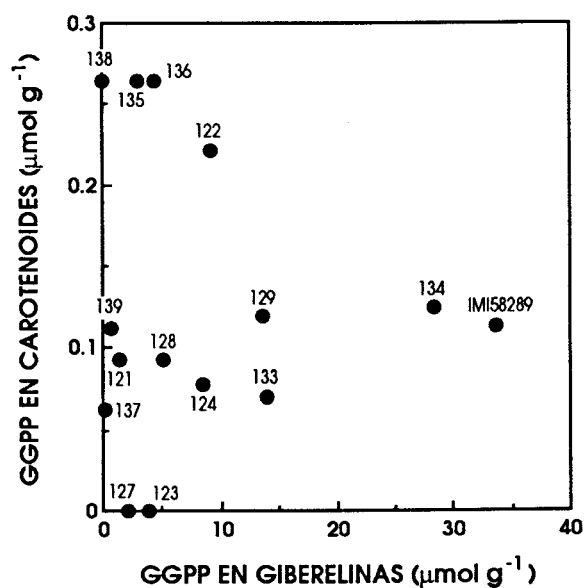


FIGURA 6. Síntesis de giberelinas y carotenoides en la estirpe silvestre IMI58289 y en los mutantes *gib* tras quince días de incubación a 30°C en caldo pobre en nitrógeno. Las concentraciones están expresadas en moles de geranylgeraniol por gramo de peso seco.

TABLA IV. Carotenoides y giberelinas en los mutantes *car*

Estirpe	Color, oscuridad / luz (carotenoide principal) ^a	Giberelinas	Crecimiento
Tipo silvestre			
IMI58289	Albino / Naranja (NX)	100 ^b	100 ^c
Mutantes derivados de IMI58289:			
SG2	Albino (ninguno)	117	97
SG4	Albino (ninguno)	118	99
SG53	Albino (ninguno)	112	97
SG54	Albino (ninguno)	97	92
SG43	Albino (fitoeno)	108	98
SG1	Naranja intenso (NX)	1	99
SG19	Naranja intenso (NX)	55	94
SG22	Naranja intenso (NX)	66	97
SG36	Naranja intenso (NX)	54	95
SG37	Naranja (NX)	44	95
SG39	Naranja intenso (NX)	42	98
SG20	Naranja pálido / Naranja (NX)	62	107
SG48	Naranja pálido / Naranja (NX)	51	99
Mutantes derivados de SG22:			
SG75	Albino (ninguno)	45	90
SG76	Albino (ninguno)	106	97
SG78	Albino (mucho fitoeno)	70	98
SG68	Rojo intenso (toruleno)	68	100
SG71	Naranja (NX)	55	98
SG72	Naranja pálido (NX)	110	97
SG73	Naranja muy intenso (NX)	46	96

^a Según Avalos *et al.*, 1987, que contiene análisis cuantitativos. Muchas estirpes presentan el mismo color cuando se cultivan en luz o en oscuridad. NX: neurospoxantina.

^b Concentración de giberelinas a los 12 días de incubación en caldo pobre en nitrógeno, en relación con la de la estirpe silvestre, que fue 76 ± 4 mg giberelinas por litro (media y su error estándar en 18 experimentos).

^c Glucosa consumida durante 12 días de incubación en relación con la de la estirpe silvestre, que fue 31 ± 1 (media y su error estándar en 17 experimentos). El medio contenía inicialmente 80 g de glucosa por litro. El peso seco de la estirpe silvestre fue 7.0 ± 0.2 g peso seco por litro (10 experimentos) y el de los mutantes 6.6 ± 0.2 (36 experimentos).

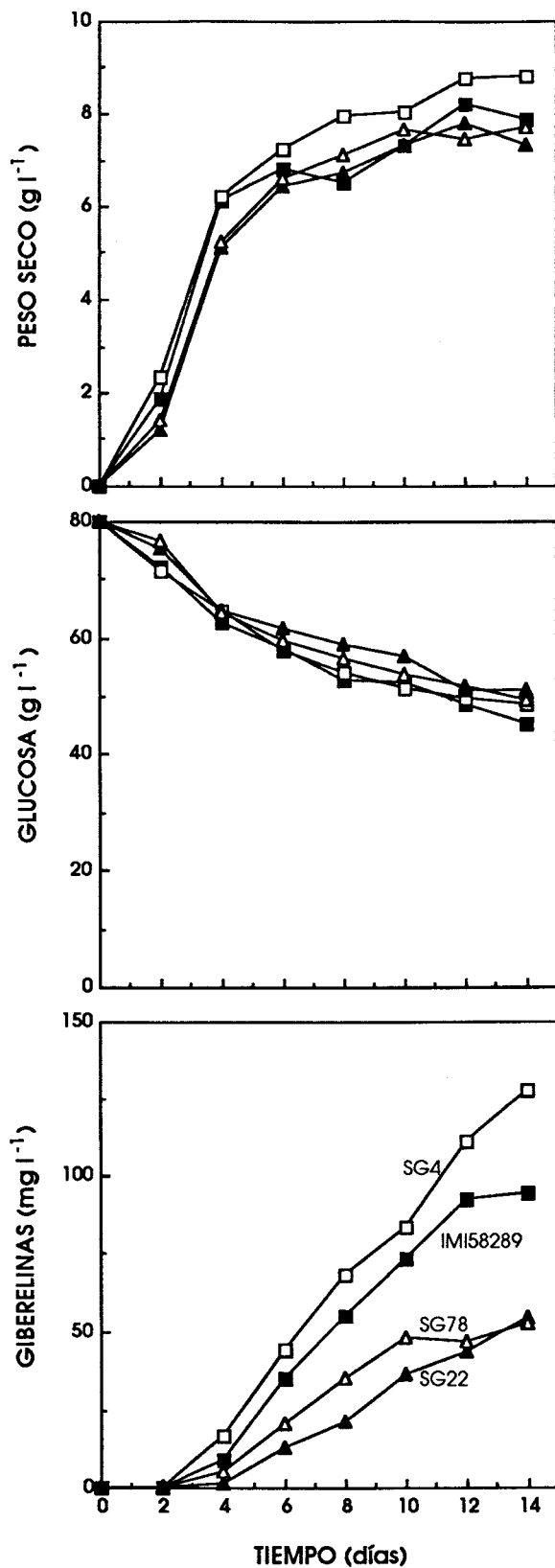


FIGURA 7. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en la estirpe silvestre IMI58289 y en los mutantes SG4, SG78 y SG22.

Los análisis de glucosa en el medio de cultivo indican que la variación en la producción de giberelinas no puede ser atribuida a diferencias en el crecimiento.

En estos estudios se usaron distintos medios y condiciones de cultivo según se fuera a analizar la síntesis de carotenoides o la de giberelinas. Para hacer un estudio comparativo tomamos un representante de cada grupo de mutantes y analizamos su producción de carotenos y giberelinas en condiciones de cultivo que permiten la síntesis de ambos (Fig. 7). Se confirma el antagonismo entre las rutas de los carotenoides y las giberelinas.

Cuando se midieron las producciones de giberelinas y carotenoides en términos de su precursor común (Fig. 8) se observó una compensación cuantitativa entre ambas rutas. La producción total es casi la misma en el tipo silvestre y los tres mutantes, aunque su distribución entre ambas rutas es muy diferente.

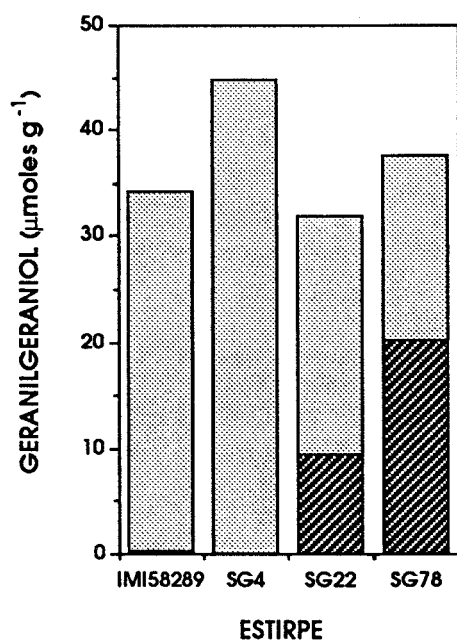


FIGURA 8. Síntesis de giberelinas y carotenoides por la estirpe silvestre IMI58289 y algunos mutantes de la carotenogénesis tras quince días de incubación a 30°C en caldo pobre en nitrógeno. El contenido está expresado en moles de geranilgeraniol por gramo de peso seco de micelio, usado en la síntesis de giberelinas (superficies punteadas) y de carotenoides (superficies rayadas). Un mol de precursor da lugar a 345 g de giberelinas (el peso molecular de la GA₃), o 267 g de fitoeno, o 265 g de carotenos intermedios, o 250 g de neurosporaxantina (la mitad de sus respectivos pesos moleculares).

3.3.3

EFFECTO DE INHIBIDORES DE LA CAROTENOGENESIS SOBRE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

El bajo contenido en carotenoides de la estirpe silvestre dificulta el análisis de los efectos de inhibidores de la carotenogénesis sobre la síntesis de giberelinas. Hemos usado en su lugar la estirpe SG22, superproductora de neurosporaxantina, en la que se detecta fácilmente la inhibición de la carotenogénesis.

La α -picolina, un inhibidor de la ciclasa del licopeno de *Gibberella* (Avalos, 1986), inhibe la síntesis de giberelinas a concentraciones de 2 g l^{-1} , ya se añada antes de inocular los cultivos (Fig. 9) o a los nueve días de crecimiento, cuando ya ha empezado la síntesis de giberelinas (Fig. 10). Los efectos de la α -picolina sobre la síntesis de giberelinas deben atribuirse a la inhibición de las enzimas responsables de algunos de los anillos que se encuentran en las moléculas de giberelinas.

La difenilamina (20 mg l^{-1}) y la β -ionona (200 mg l^{-1}) inhiben la deshidrogenasa del fitoeno de *Gibberella* cuando se cultivan en agar-mínimo (Avalos, 1986). Ambos compuestos inhiben casi totalmente el crecimiento si se añaden a caldo pobre en nitrógeno antes de su inoculación. Si se añaden a los nueve días, inhiben parcialmente el crecimiento y la síntesis de giberelinas (Fig. 10).

Los espectros de fluorescencia indican que no se produjeron cambios en la mezcla de giberelinas cuando se añadieron estos compuestos.

Aunque la ruta de las giberelinas incluye deshidrogenaciones, la difenilamina y la β -ionona, inhibidores de la deshidrogenasa del fitoeno, no parecen tener ningún efecto específico sobre la biosíntesis de giberelinas.

Los tres compuestos estimulan el consumo de glucosa a la vez que inhiben el crecimiento. El catabolismo de la glucosa parece estar desacoplado de su incorporación a giberelinas.

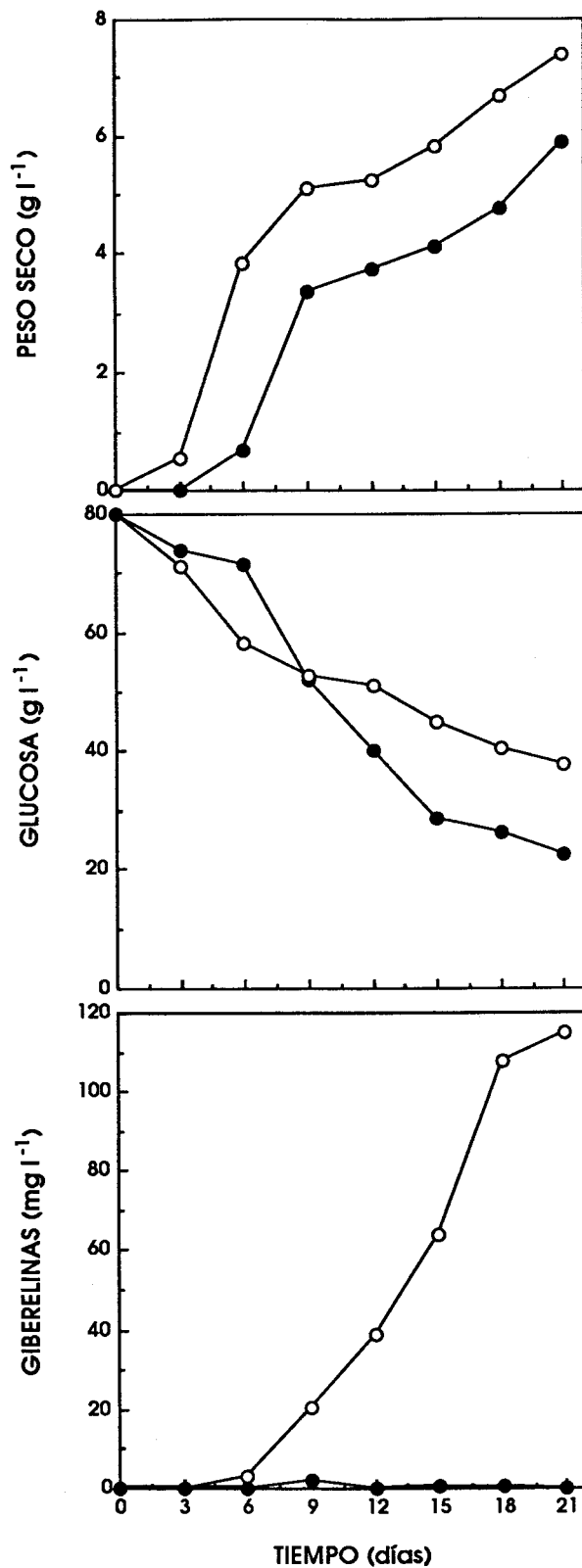


FIGURA 9. Efecto de la α -picolina sobre el peso seco de la estirpe SG22 y sobre la concentración de glucosa y de giberelinas en el medio. Cultivos con α -picolina (2 g l^{-1}) añadida al medio antes de la inoculación (●). Cultivos sin α -picolina (○).

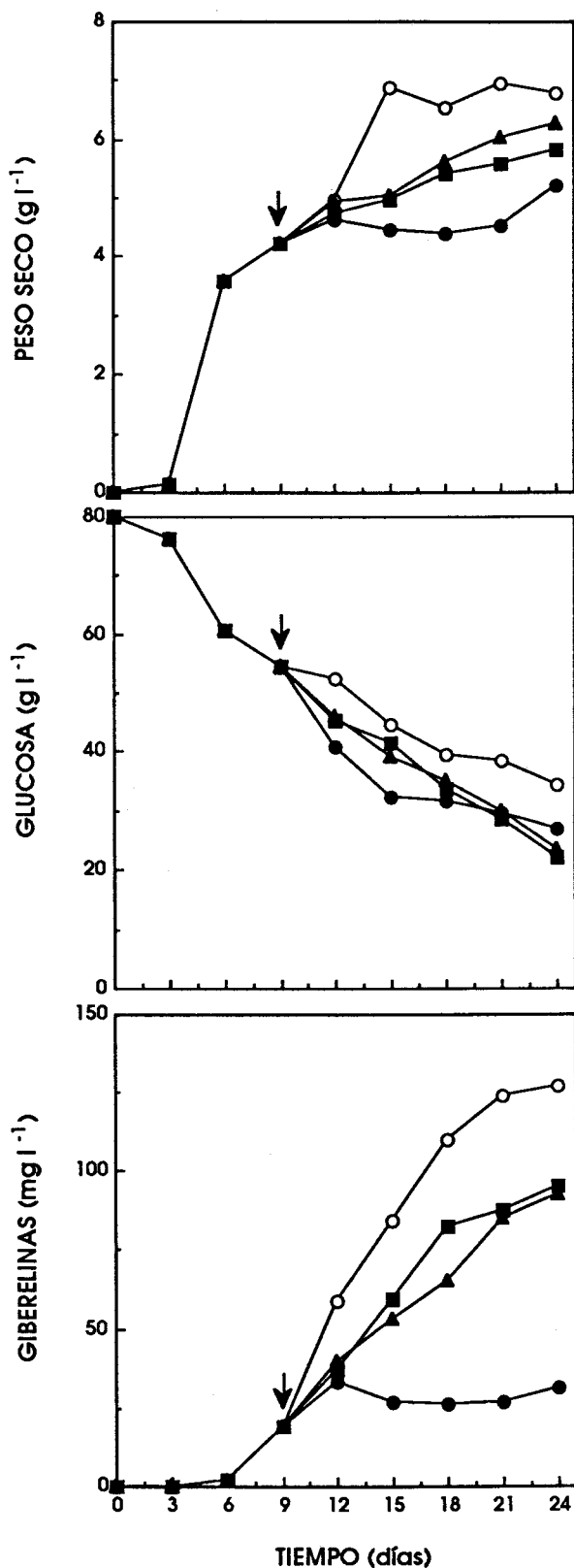


FIGURA 10. Efecto de la α -picolina (●), difenilamina (■) y β -ionona (▲) sobre el peso seco del micelio y la concentración de glucosa y de giberelinas en el medio de cultivo. Todos los inhibidores se añadieron a los nueve días de cultivo (flechas). Cultivos sin inhibidores (○).

3.3.4

EFFECTOS DE LA LUZ SOBRE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

Para ver los efectos de la luz sobre la síntesis de giberelinas, iluminamos los cultivos en caldo pobre en nitrógeno, para detectar una posible estimulación, y en caldo rico en nitrógeno, para ver si llegan a producirse giberelinas. La luz no tiene efectos sobre la síntesis de giberelinas en la estirpe silvestre ni en la estirpe SG4, un mutante blanco incapaz de sintetizar carotenoides (Fig. 11). Los experimentos no permiten excluir la fotoinducción de la giberelino-génesis porque en nuestros medios líquidos tampoco observamos fotoinducción de la carotenogénesis. Todas las observaciones sobre fotoinducción de la carotenogénesis se habían hecho en cultivos en agar-mínimo, condiciones en que no se producían giberelinas.

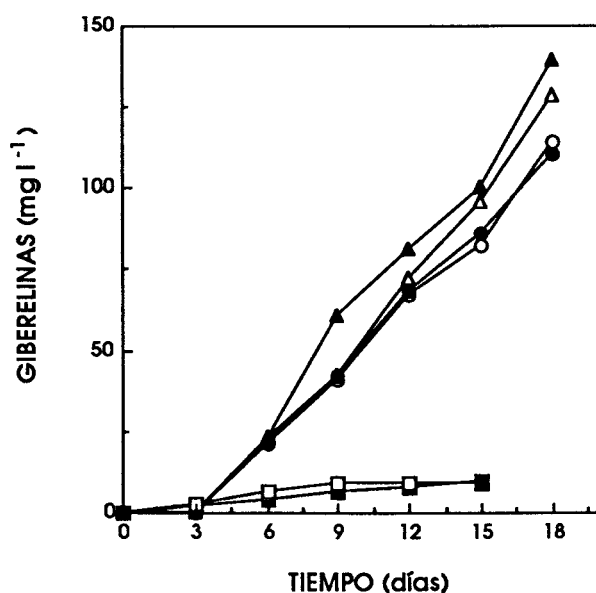


FIGURA 11. Efecto de la luz sobre la síntesis de giberelinas. Los símbolos vacíos corresponden a cultivos realizados en la luz, y los llenos a cultivos realizados en la oscuridad. Los triángulos corresponden al mutante blanco SG4 cultivado en caldo pobre en nitrógeno. Los círculos corresponden a la estirpe silvestre IMI58289 cultivada en caldo pobre en nitrógeno. Los cuadrados corresponden a la estirpe IMI58289 cultivada en caldo rico en nitrógeno.

3.4

ANÁLISIS POR HPLC Y MARCADO RADIACTIVO *IN VIVO* DE LAS GIBERELINAS

En este capítulo se describe una caracterización bioquímica preliminar de los mutantes alterados en la síntesis de giberelinas. Hemos analizado las distintas estirpes por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y las hemos incubado con [^{14}C]mevalonato sódico para identificar los compuestos excretados implicados en la ruta de los terpenoides.

3.4.1

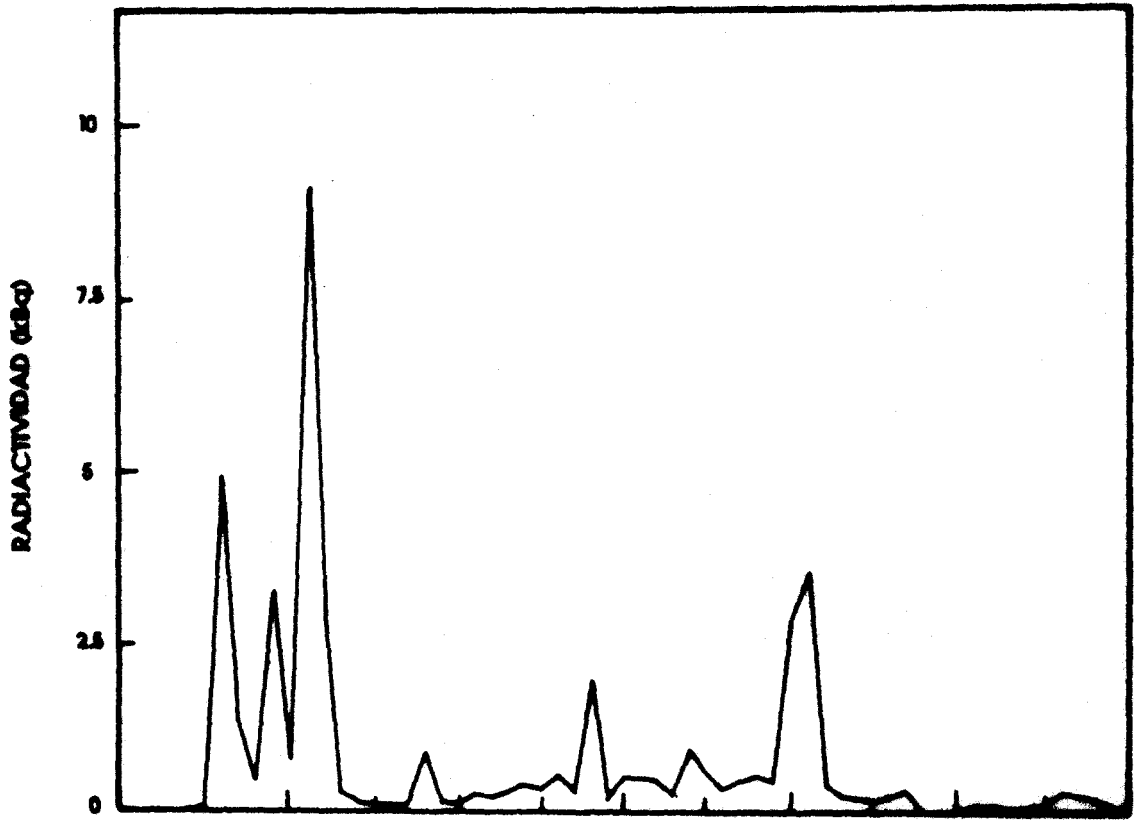
ESTIRPE SILVESTRE

Las giberelinas se separan eficazmente por cromatografía líquida de alta presión en columna Spherisorb S50DS C_{18} de fase reversa y se detectan por su absorción a 206 nm (Jensen *et al.*, 1986) (Tabla V). El ácido sórbico es una referencia interna; los coeficientes de retención R son los tiempos de retención de cada compuesto relativos al del ácido sórbico, que se toma como unidad.

El extracto del cultivo silvestre (Fig. 12) contiene principalmente ácido giberélico (GA_3 , $R=0.63$) y otros compuestos no identificados (por ejemplo $R=0.29$ y $R=0.51$). Entre los compuestos muy minoritarios se identifican provisionalmente las giberelinas GA_1 ($R=0.71$), GA_7 ($R=1.94$), GA_4 ($R=2.08$), GA_{14} ($R=2.35$) y GA_9 ($R=2.83$).

TABLA V. Cromatografía HPLC de patrones de giberelinas purificadas.

Patrones	Tiempo de retención (min)	Coficiente de retención R
GA_3 (ácido giberélico)	10.1	0.63
GA_1	11.5	0.71
Acido sórbico	16.0	1.00
GA_{13}	23.6	1.52
GA_7	30.6	1.94
GA_4	33.8	2.08
GA_{14}	37.4	2.35
GA_9	45.5	2.83



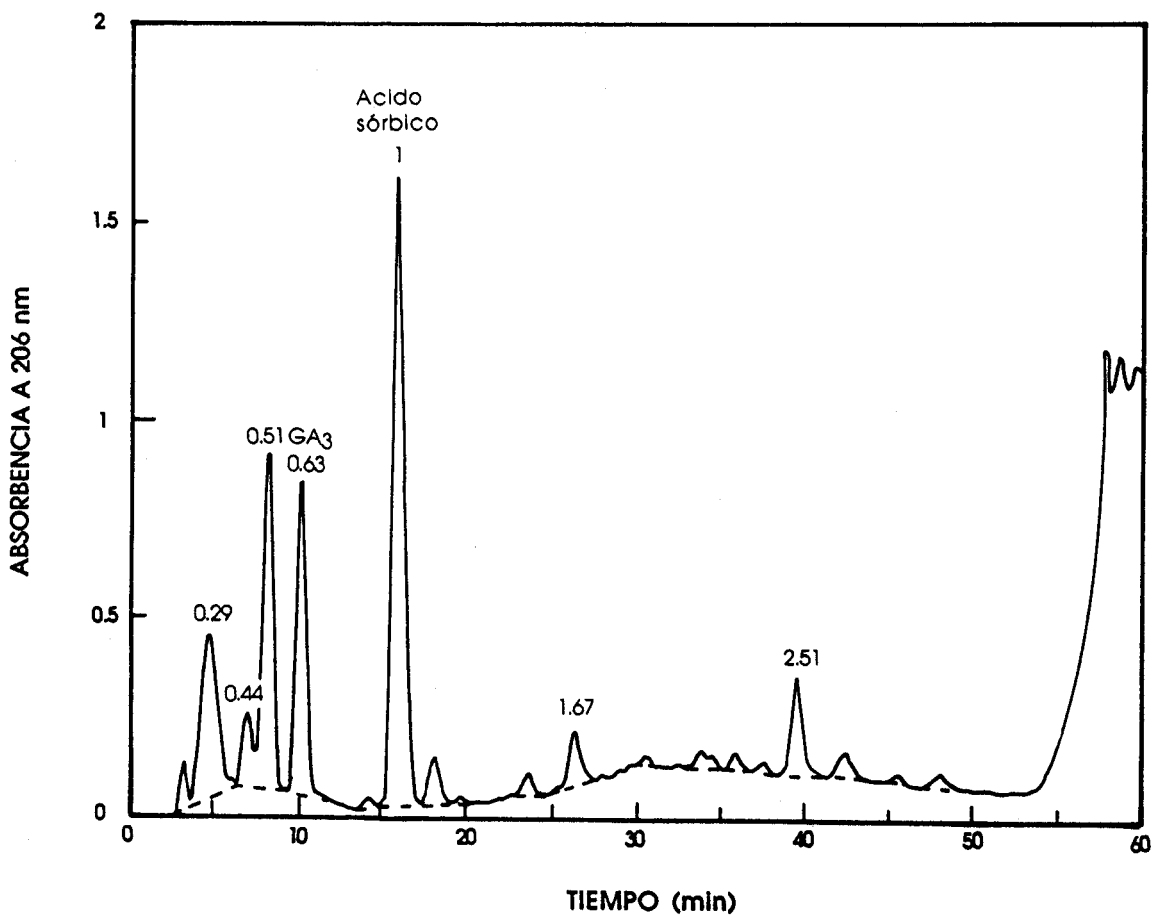


FIGURA 12. Cromatograma HPLC de un extracto del caldo de cultivo de la estirpe silvestre en las condiciones descritas en el texto. La línea de puntos corresponde a un cromatograma testigo (solo solventes). El número que aparece sobre cada pico es su coeficiente de retención. En la hoja transparente se representa la radiactividad a lo largo del cromatograma.

No pudimos identificar todos los picos del cromatograma HPLC porque no disponíamos de los patrones auténticos necesarios. Para identificar los correspondientes a terpenoides cultivamos el organismo con mevalonato radiactivo, recogimos 60 fracciones de la cromatografía HPLC (una por minuto) y medimos su radiactividad en un contador de centelleo.

Varios compuestos tienen la misma radiactividad específica que el ácido giberélico (Tabla IX); suponemos que tienen un coeficiente de extinción similar al suyo e incorporan el mismo número de moléculas de mevalonato radiactivo en su estructura. Los terpenoides de distintos grupos podrían tener radiactividades específicas distintas si se sintetizan en distintos compartimentos celulares a partir de distintas mezclas de mevalonato exógeno y endógeno.

3.4.2

MUTANTES *GIB*

Los resultados de los análisis por cromatografía HPLC y marcado radiactivo de los mutantes *gib* confirman y precisan los de las medidas de fluorescencia (Tablas VII, VIII y IX). La falta de giberelinas en la estirpe SG137 podría deberse, como antes, a su lentitud de crecimiento.

La relación entre la fluorescencia (Tabla III) y el contenido en ácido giberélico de las distintas estirpes (Tabla VI) nos permitió establecer tres grupos de mutantes (Fig. 13).

El grupo de mutantes "agiberélicos", que no sintetizan giberelinas, se compone como antes, de las estirpes SG121, SG127, SG138 y SG139 (en el origen de coordenadas de la Fig. 13). Los mutantes "alogiberélicos" sintetizan giberelinas distintas de la GA₃; este grupo comprende las estirpes SG133 y SG134, detectadas por el color alterado de su fluorescencia, y las estirpes SG123, SG129 y tal vez SG122, cuyo contenido en GA₃ no basta para explicar su fluorescencia. El grupo de mutantes "hipogiberélicos", que sintetizan menor concentración de giberelinas que la estirpe silvestre, se compone de las estirpes SG124, SG128, SG135 y SG136 y tal vez SG122 (a lo largo de la línea que une el origen de coordenadas con la estirpe silvestre IMI58289 en la Fig. 13).

Ninguno de los mutantes acumula predominantemente una de las giberelinas identificadas distinta de ácido giberélico. Varios

mutantes superan al tipo silvestre en la producción de una giberelina minoritaria: cuatro mutantes tienen más GA₁₄ que el silvestre (Tabla VIII); dos, GA₇ y uno, GA₄ (Tabla VI).

TABLA VI. Concentración (mg l⁻¹)^a de giberelinas en los cultivos de los mutantes *gib*

Giberelinas Coef. de ret.	GA ₃ R0.63	GA ₇ R1.94	GA ₄ R2.08	Suma
Tipo silvestre				
IMI58289	67.9	-	5.2	78.2
Mutantes derivados de IMI58289				
SG121	4.1	-	-	4.7
SG122	9.9	-	-	11.9
SG123	3.9	-	2.8	7.7
SG124	22.4	8.6	-	32.2
SG127	-	-	-	-
SG128	26.2	-	-	30.0
SG129	8.2	7.8	-	16.8
SG133	28.3	-	-	32.3
SG134	39.2	-	11.1	51.7
SG135	8.6	-	-	9.4
SG136	20.0	-	-	21.5
SG137	-	-	-	-
SG138	-	-	-	-
SG139	-	-	-	-

^a Las concentraciones corresponden a mg l⁻¹ asumiendo que su coeficiente de extinción a 206 nm es el mismo que el del ácido giberélico. Solo se representan los valores ≥ 2.5 mg l⁻¹. La suma corresponde a la suma total de las giberelinas de las que se dispuso de patrones (Tabla V).

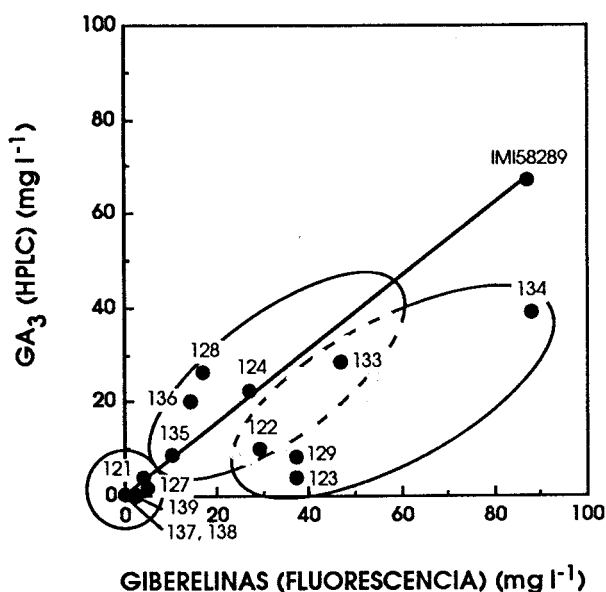


FIGURA 13. Comparación entre la concentración de giberelinas calculada por fluorescencia y la concentración de ácido giberélico (GA₃) calculado por cromatografía HPLC en la estirpe silvestre y los mutantes *gib*. La línea une el origen de coordenadas con las medidas correspondientes a la estirpe silvestre.

A la vista de los resultados de los análisis por cromatografía HPLC y marcado radiactivo expuestos en las Tablas VII y VIII distinguimos tres grupos de compuestos:

1. *Compuestos no terpenoides.* No se marcan radiactivamente tras incubar el organismo con [¹⁴C]mevalonato sódico y se encuentran en todos los mutantes. Pertenecen a este grupo los compuestos con R=0.20 y R=0.44.

2. *Terpenoides constantes.* Se marcan radiactivamente con [¹⁴C]mevalonato sódico pero son producidos en cantidades semejantes por todas mutantes. Pueden ser terpenoides ajenos a la ruta biosintética de las giberelinas o precursores de las giberelinas en el primer bloqueo mutacional disponible. Pertenecen a este grupo los compuestos con R=0.29 y R=0.51.

3. *Terpenoides que varían significativamente en los mutantes.* Se marcan radiactivamente en presencia de [¹⁴C]mevalonato sódico y

varían mucho de unos mutantes a otros. Pertenecen a este grupo los compuestos con R=1.67, R=2.51 y R=2.08 (GA₄) que se encuentran en la estirpe silvestre de *Gibberella* y R=2.15, R=2.59, R=1.94 (GA₇) y R=2.35 (GA₁₄) que aparecen en algunos mutantes *gib* pero son escasos o inexistentes en la estirpe silvestre. Todos ellos tienen radiactividades específicas similares a las de las giberelinas por lo que presumiblemente están implicados en su biosíntesis.

TABLA VII. Compuestos sin identificar^a presentes en el medio de cultivo de la estirpe silvestre IMI58289 y de los mutantes *gib*.

R	0.20	0.29	0.44	0.51	1.67	2.15	2.51	2.59
Tipo silvestre								
IMI58289	7.5	54.2	14.2	71.9	14.6	-	26.3	-
Mutantes derivados de IMI58289								
SG121	4.8	50.5	5.0	43.8	-	-	5.0	-
SG122	4.7	40.2	13.1	46.3	2.5	8.4	6.0	-
SG123	9.8	93.8	5.2	68.3	2.9	-	3.9	-
SG124	3.1	38.3	4.3	36.3	9.5	18.6	13.2	-
SG127	6.6	63.2	14.3	42.3	2.6	-	-	-
SG128	10.9	16.5	5.1	46.1	9.0	8.9	17.4	-
SG129	5.3	51.3	5.0	74.0	7.9	20.3	11.5	-
SG133	4.4	46.3	5.2	70.4	9.4	6.9	23.8	56.8
SG134	6.9	55.5	10.1	94.8	9.1	-	18.9	-
SG135	11.6	55.3	8.3	66.5	2.6	3.9	5.1	-
SG136	9.1	46.8	21.3	50.5	5.1	-	7.5	-
SG137	7.2	48.9	5.4	43.3	-	-	-	-
SG138	5.6	12.4	5.5	28.5	2.6	-	-	-
SG139	11.9	35.4	5.2	38.3	-	-	2.5	-
Media	7.3	47.2	8.4	54.7	5.1	5.4	10.0	3.8
C.V.	36	38	57	32	82	112	82	374

^a Las concentraciones de los compuestos corresponden a mg l⁻¹ asumiendo que su coeficiente de extinción a 206 nm es el mismo que el del ácido giberélico. Solo se representan los valores ≥ 2.5 mg l⁻¹. Los coeficientes de variación (C.V.) están expresados en tantos por ciento.

La radiactividad específica de las distintas giberelinas (calculada suponiendo que todas las giberelinas tienen el coeficiente de extinción de la GA₃) puede presentar pequeñas variaciones debido a diferencias en el coeficiente de extinción; la GA₃ y GA₇ tienen mayor coeficiente de extinción que las demás porque tienen más dobles enlaces; su radiactividad específica debe ser ~~menor~~ mayor

El compuesto R=0.44 varió mucho en las distintas estirpes pero no se marcó radiactivamente; este compuesto podría ser un precursor de la ruta de las giberelinas que dejase de sintetizarse antes de los seis días de cultivo (momento en que se añadió el [¹⁴C]mevalonato).

TABLA VIII. Radiactividad total (kBq) en los compuestos que aparecen en la Tabla VII.

R Giberelina asignada	0.29	0.51	0.63	1.67	1.94	2.08	2.15	2.35	2.51	2.59
			GA ₃		GA ₇	GA ₄		GA ₁₄		
Tipo silvestre										
IMI58289	6.7	4.3	13.0	2.3	-	0.9	-	-	7.0	-
Mutantes derivados de IMI58289										
SG121	-	0.8	1.7	0.9	-	-	0.5	-	1.4	-
SG122	5.9	1.2	3.1	1.1	0.8	-	0.8	-	2.4	-
SG123	1.1	0.9	1.9	-	-	-	-	-	1.3	-
SG124	1.0	5.3	6.3	2.5	2.8	-	1.8	2.0	4.9	-
SG127	0.7	0.8	1.1	0.5	-	-	-	-	1.0	-
SG128	1.9	7.4	8.9	2.0	1.7	-	1.0	1.2	9.1	-
SG129	1.3	1.9	3.9	1.7	2.5	-	3.4	-	3.5	-
SG133	0.8	3.1	8.1	3.6	1.3	-	0.8	1.5	6.4	13.1
SG134	4.1	3.0	8.0	2.0	-	0.7	-	0.6	4.3	-
SG135	4.9	2.1	3.3	1.1	-	-	0.5	-	2.1	-
SG136	18.4	0.7	4.0	0.8	-	-	-	-	1.7	-
SG137	8.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SG138	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SG139	6.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Media	4.1	2.1	4.3	1.3	0.7	0.1	0.6	0.4	3.0	0.9
C.V.	111	99	88	80	135	257	153	180	89	374

Solo se representan los valores ≥ 0.5 kBq. La GA₁₄ no aparece en las Tabla VII por su baja concentración. Los coeficientes de variación (C.V.) están expresados en tantos por ciento.



Las absorbencias de los compuestos R=0.29 y R=0.51 varían poco de unas estirpes a otras mientras que su radiactividad total es muy variable. La explicación parece ser el solapamiento en el cromatograma HPLC de dos compuestos con el mismo tiempo de retención; la absorción mayoritaria a 206 nm correspondería a un compuesto no radiactivo que enmascararía al radiactivo. La radiactividad total de estos compuestos en las distintas estirpes es proporcional a la del ácido giberélico.

TABLA IX. Radiactividad específica (Bq mg⁻¹) correspondiente a los compuestos que aparecen en la Tabla VII

R	0.29	0.51	0.63	1.67	1.94	2.08	2.15	2.51	2.59
Giberelina asignada			GA ₃		GA ₇	GA ₄			
Tipo silvestre									
IMI58289	113	55	192	158	-	175	-	275	-
Mutantes derivados de IMI58289									
SG121	-	15	414	-	-	-	-	-	-
SG122	126	22	300	440	-	-	91	400	-
SG123	14	15	487	-	-	-	-	333	-
SG124	29	171	275	268	317	-	91	367	-
SG127	15	26	-	204	-	-	-	-	-
SG128	128	177	342	222	-	-	116	526	-
SG129	24	24	450	215	300	-	167	303	-
SG133	15	40	258	367	-	-	116	267	233
SG134	71	29	192	225	-	64	-	225	-
SG135	119	42	367	423	-	-	128	417	-
SG136	393	10	192	141	-	-	-	217	-
SG137	177	-	-	-	-	-	-	-	-
SG138	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SG139	183	-	-	-	-	-	-	-	-
Media	108	52	315	266	308	119	118	328	233
C.V.	93	107	31	38	2	46	21	26	-

Las concentraciones de los compuestos corresponden a mg l⁻¹ si su coeficiente de extinción a 206 nm fuese el del ácido giberélico.
Los coeficientes de variación (C.V.) están expresados en tantos por ciento.

3.5

REGULACION DE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

En este capítulo hemos abordado algunos aspectos de la regulación de la síntesis de giberelinas en el tipo silvestre de *G. fujikuroi*, especialmente aquéllos relacionados con la regulación por compuestos nitrogenados.

3.5.1

EFFECTOS DEL NITROGENO

Efectos de la fuente de nitrógeno

La síntesis de giberelinas es diferente según la fuente de nitrógeno empleada aunque la concentración total de átomos de nitrógeno en el medio permanezca constante (Tabla X).

Todas las fuentes de nitrógeno permiten un crecimiento vegetativo similar; tampoco observamos grandes diferencias en la producción de giberelinas salvo en el caso del NO_3Na y glutamato, en los que la producción es significativamente menor (Fig. 14).

TABLA X: Fuentes de nitrógeno empleadas para la producción de giberelinas^a.

Fuente de nitrógeno	Peso molecular	Fórmula	Concentración (g l^{-1})
Nitrato amónico	80.05	NO_3NH_4	1.00
Nitrato sódico	83.50	NO_3Na	2.08
Cloruro amónico	53.50	ClNH_4	1.33
Asparragina	132.12	$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$	1.65
Glicocola	75.07	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$	1.87
Glutamato sódico	170.13	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$	4.25
Glutamina	146.15	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	1.82
Urea	60.06	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	0.75

^a Las concentraciones indicadas corresponden a 0.37 g l^{-1} de nitrógeno.

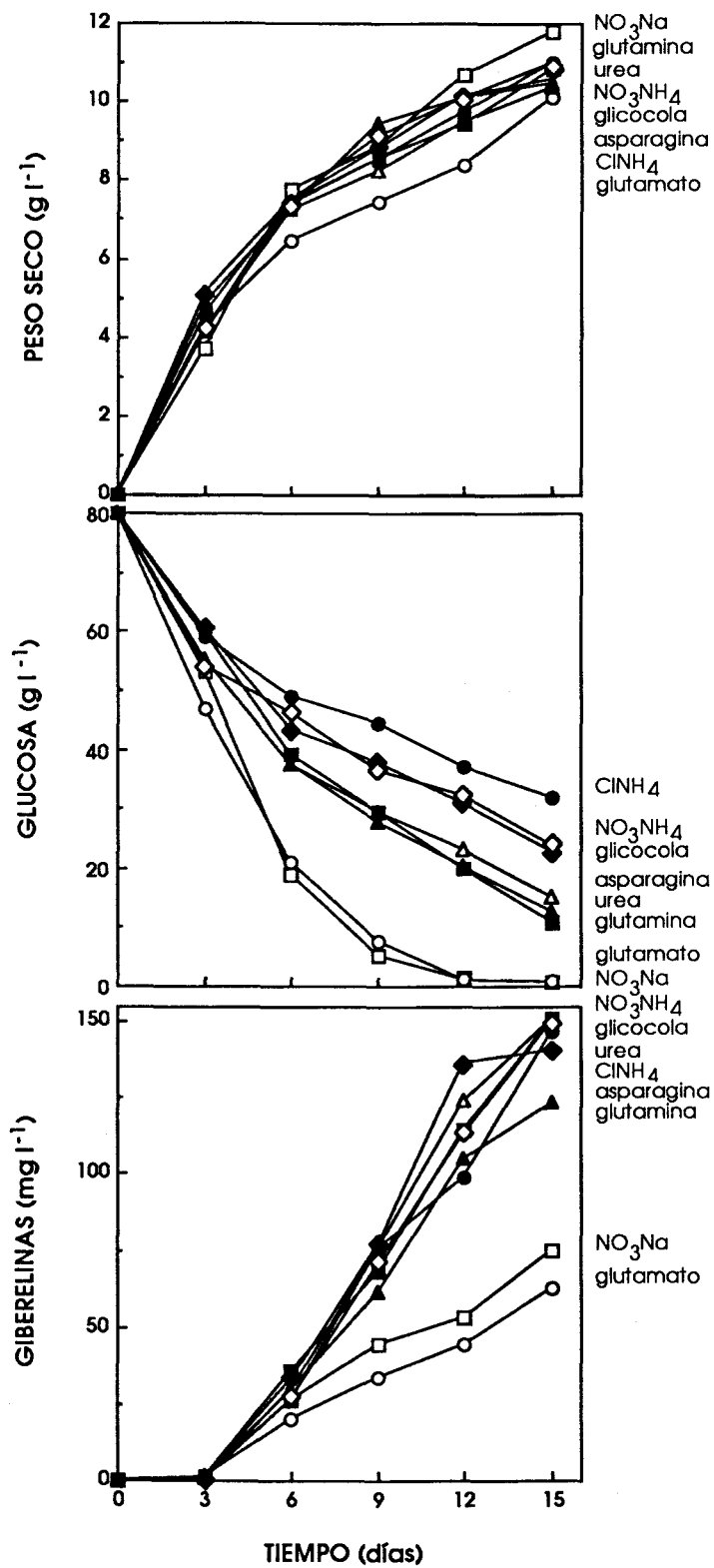


FIGURA 14. Variación temporal del peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en el caldo de cultivo con distintas fuentes de nitrógeno a las concentraciones indicadas en la Tabla X.

Efectos de la concentración de nitrógeno

Para estudiar los efectos de la concentración de nitrógeno sobre la síntesis de giberelinas cultivamos el organismo en caldos con distinta concentración inicial de nitrógeno. Como fuente de nitrógeno usamos ClNH_4 , NO_3NH_4 o NO_3Na a la misma concentración del elemento (en gramos de nitrógeno/litro de medio).

La producción de giberelinas depende de la concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo (Fig. 15).

En los tres casos estudiados observamos una concentración inicial de nitrógeno en el medio de cultivo (concentración óptima) a la cual la síntesis de giberelinas es máxima. Esta concentración varía según la fuente de nitrógeno usada. La concentración óptima de NO_3Na es menor que la de NO_3NH_4 , y ésta es menor que la de ClNH_4 .

La producción máxima de giberelinas en caldo que contiene NO_3Na como fuente de nitrógeno es menor que en los que contienen las otras dos fuentes empleadas. Una posible toxicidad del NO_3Na a través de la toxicidad del NO_2^- producido como intermediario de su utilización no es aceptable: el crecimiento vegetativo y el consumo de glucosa es mayor con NO_3Na que con las otras fuentes.

Efectos de la adición de nitrógeno

Cultivamos el organismo en caldo pobre en nitrógeno y añadimos a distintos tiempos 1 g l^{-1} de NO_3NH_4 para transformarlo en caldo rico en nitrógeno.

La síntesis de giberelinas se detiene inmediatamente tras añadir NO_3NH_4 al medio de cultivo (Fig. 16). Este efecto inhibitorio también tiene lugar cuando se añaden otros compuestos nitrogenados (NO_3Na , ClNH_4 o asparragina) al medio (J. Avalos, comunicación personal).

En caldo pobre en nitrógeno el organismo crece muy despacio a partir de los seis días de cultivo. La adición de NO_3NH_4 da lugar a la reiniciación del crecimiento (aumento del peso seco y del consumo de glucosa, Fig. 16). Esto parece indicar que la causa de la detención del crecimiento es el agotamiento del nitrógeno en el caldo de cultivo.

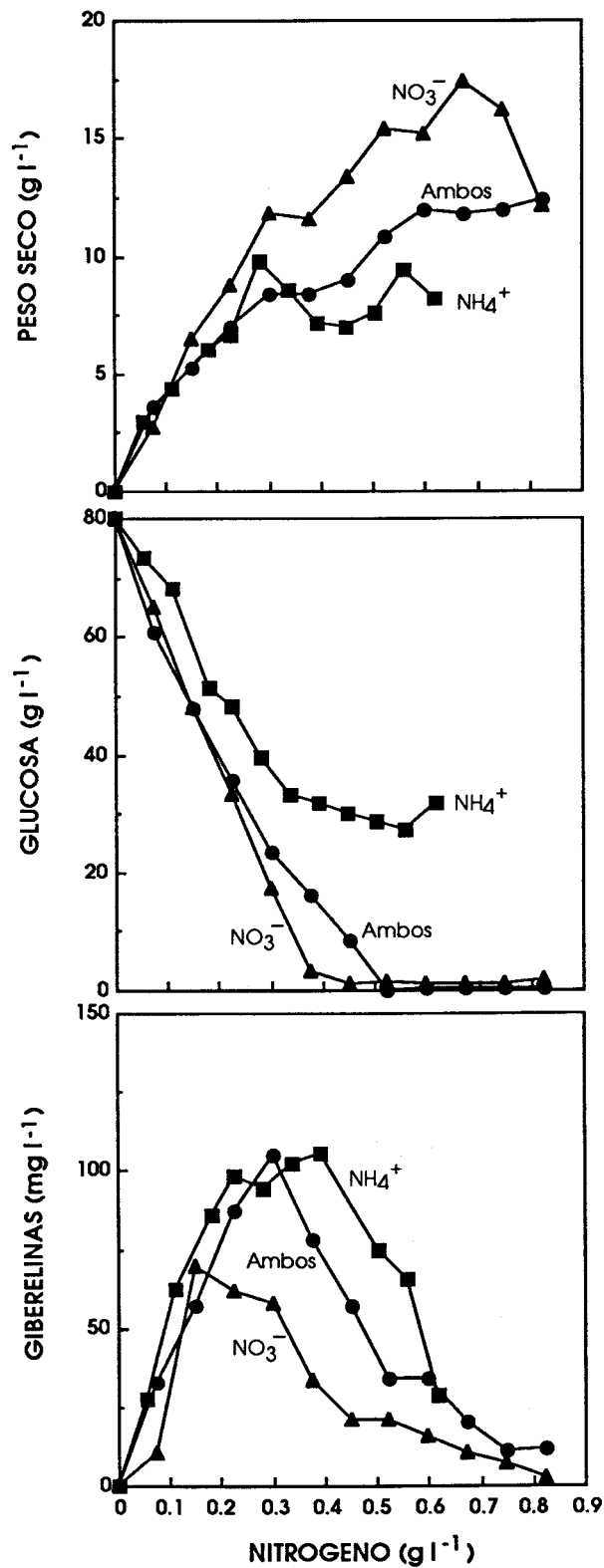


FIGURA 15. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas a los quince días de cultivo en caldos con distintas concentraciones de ClNH_4 (■), NO_3NH_4 (●) o NO_3Na (▲).

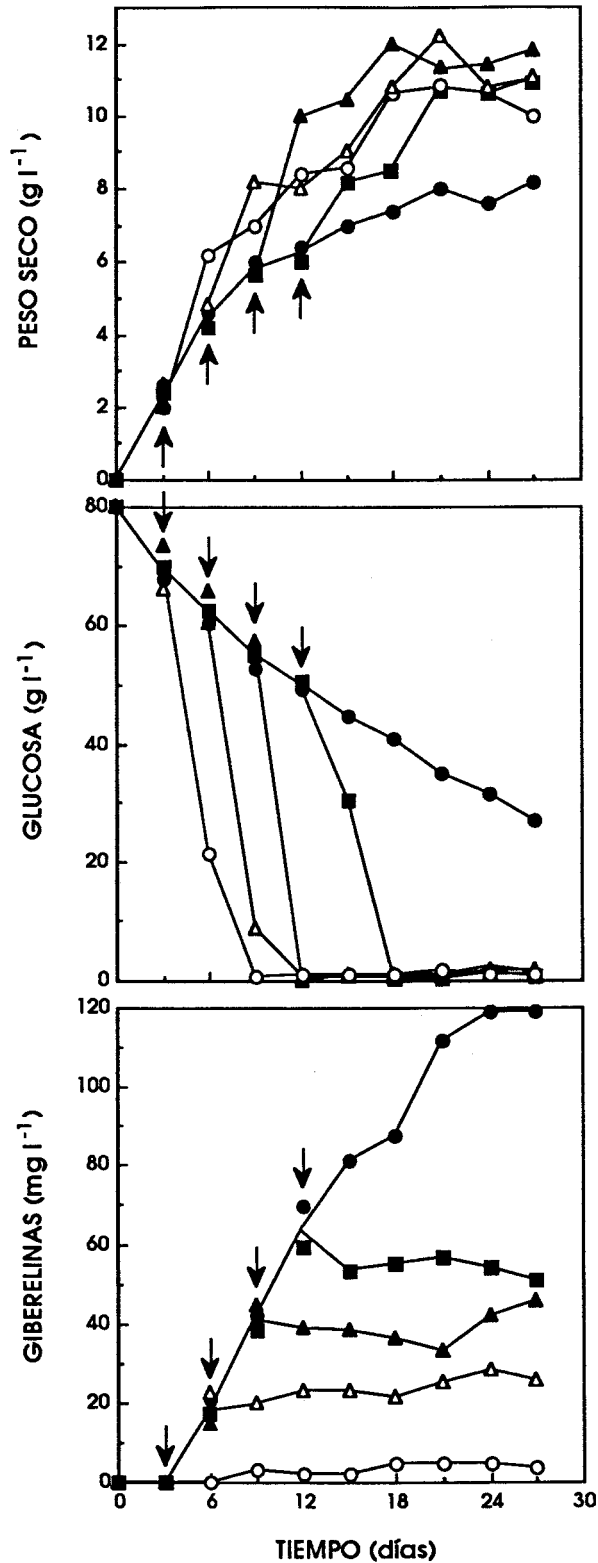


FIGURA 16. Variación temporal del peso seco del micelio y la concentración de glucosa y de giberelinas en el medio tras añadir NO_3NH_4 (4 g l^{-1}) a cultivos en caldo pobre en nitrógeno a los tres (○), seis (△), nueve (▲) o doce (■) días. Cultivo testigo sin adición de NO_3NH_4 (●).

3.5.2

EFFECTOS DEL CARBONO SOBRE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

Efectos de la fuente de carbono

La síntesis de giberelinas depende de la fuente de carbono empleada aunque la concentración total de átomos de carbono en el medio permanezca constante (Tabla XI).

El máximo crecimiento vegetativo se alcanza con lactato como fuente de carbono, pero en estas condiciones *Gibberella* no sintetiza giberelinas. La máxima producción de giberelinas se obtuvo con manitol o maltosa como fuentes de carbono (Fig. 17).

TABLA XI: Fuentes de carbono empleadas para la producción de giberelinas^a.

Fuente de carbono	Peso molecular	Fórmula	Concentración (g l ⁻¹)
Glucosa	180	C ₆ H ₁₂ O ₆	80.0
Galactosa	180	C ₆ H ₁₂ O ₆	80.0
Xilosa	150	C ₅ H ₁₀ O ₅	80.0
Manitol	182	C ₆ H ₁₄ O ₆	80.8
Lactato cálcico	218	C ₆ H ₁₀ CaO ₆	96.8
Lactosa	342	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	76.0
Maltosa	342	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	76.0

^a Las concentraciones indicadas corresponden a 32 g l⁻¹ de carbono.

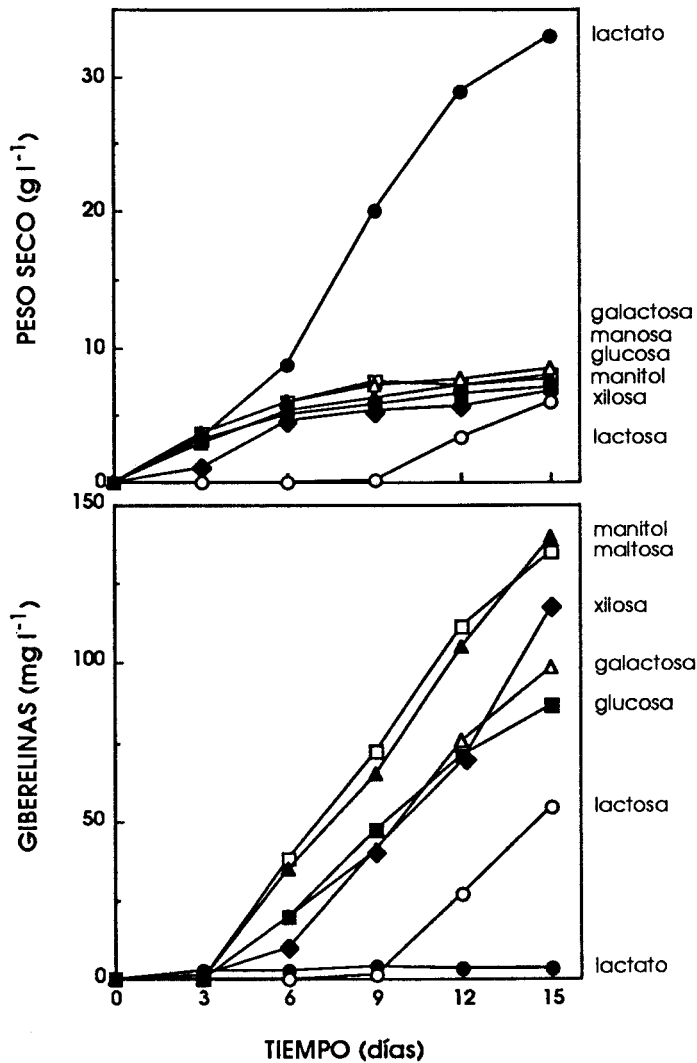
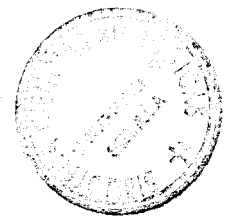


FIGURA 17. Peso seco del micelio y concentración de giberelinas en el medio a los quince días de cultivo en caldo pobre en nitrógeno con distintas fuentes de carbono a las concentraciones indicadas en la Tabla XI.

Efectos de la concentración de carbono

Para estudiar el efecto de la concentración inicial de carbono sobre la síntesis de giberelinas cultivamos el organismo en caldos con distintas concentraciones de glucosa manteniendo constante la concentración de nitrógeno ($0.8 \text{ g l}^{-1} \text{ NO}_3\text{NH}_4$, Fig. 18 izquierda) o manteniendo constante la relación entre carbono y nitrógeno (100 g de glucosa por cada gramo de NO_3NH_4 , Fig. 18 derecha).

En ambos casos, el crecimiento vegetativo, el consumo de glucosa y la producción de giberelinas dependen de la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo. Con una concentración constante de nitrógeno las tres variables alcanzan sus valores máximos con 60 g l^{-1} de glucosa. Las concentraciones iniciales de glucosa mayores de 60 g l^{-1} inhiben la producción de giberelinas (Fig. 18 izquierda).

Cuando se mantiene constante la relación entre carbono y nitrógeno el crecimiento vegetativo y el consumo de glucosa aumentan con la concentración de nutrientes. La escasez de nitrógeno impide que la glucosa se consuma totalmente, pero el porcentaje de glucosa consumida es menor a concentraciones altas de nutrientes. La síntesis de giberelinas es escasa en medios muy ricos, con más de 100 g l^{-1} de glucosa y 1 g l^{-1} de NO_3NH_4 (Fig. 18 derecha).

3.5.3

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FOSFATO

La producción de giberelinas en caldo pobre en nitrógeno depende de la concentración inicial de fosfato en el medio de cultivo (Fig. 19). Las concentraciones muy bajas y muy altas inhiben la síntesis de giberelinas; la máxima producción se alcanza con 0.5 g l^{-1} de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

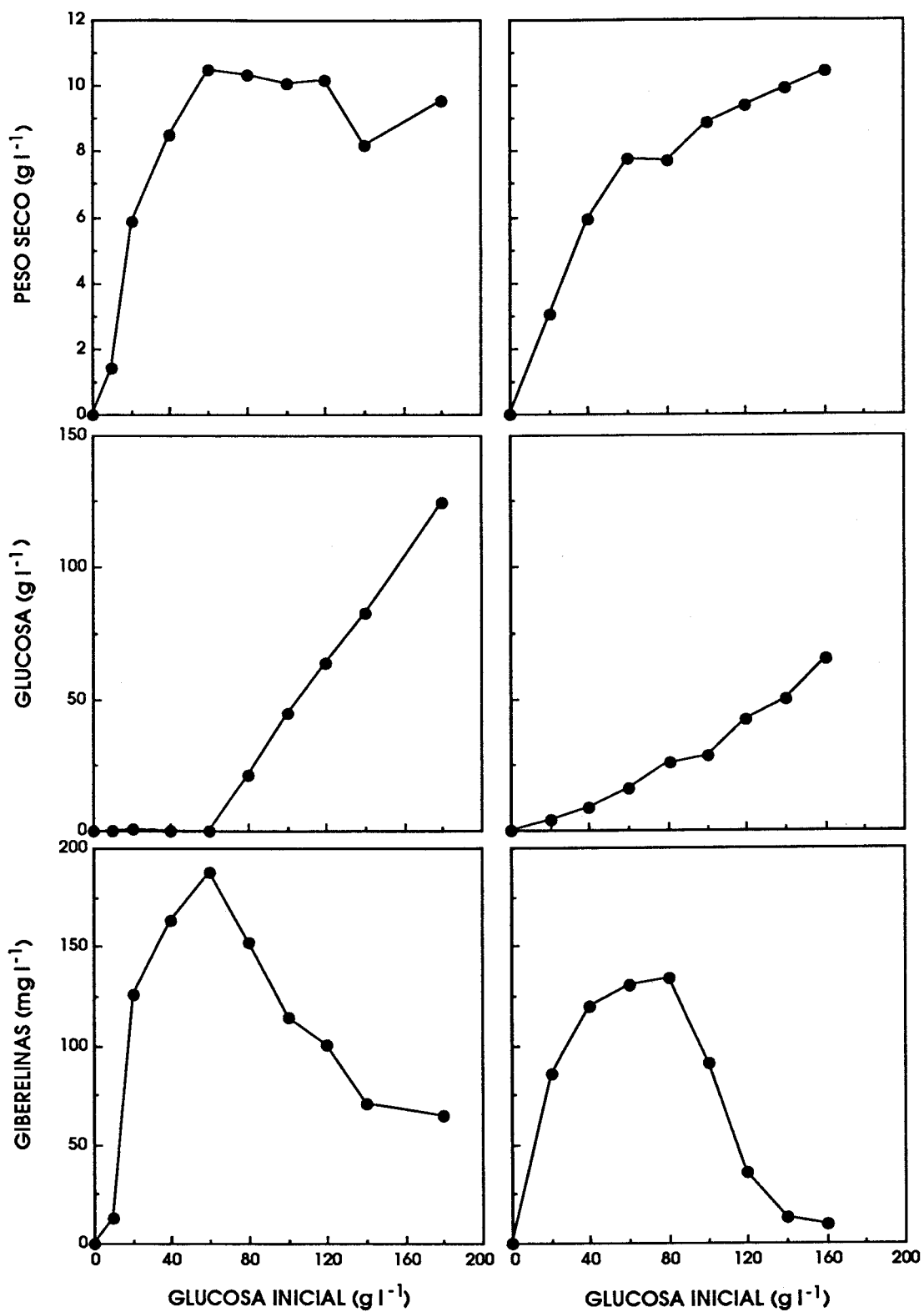


FIGURA 18. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en el caldo de cultivo a los quince días con distintas concentraciones iniciales de glucosa. A la izquierda, concentración fija de 0.8 g l^{-1} de NO_3NH_4 ; a la derecha, concentración variable de NO_3NH_4 (1 g por cada 100 g de glucosa).

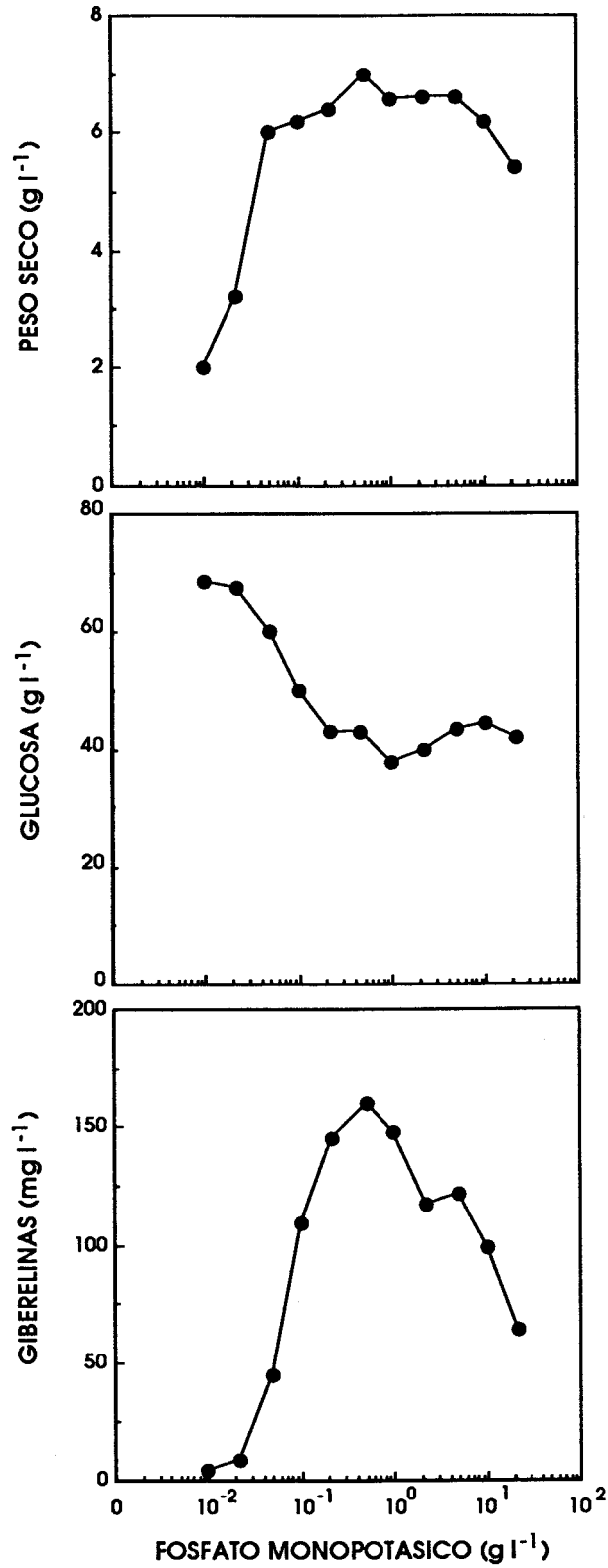


FIGURA 19. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas a los quince días de cultivo en caldo pobre en nitrógeno con distintas concentraciones iniciales de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

3.5.4

SINTESIS DE GIBERELINAS CON CONCENTRACIONES LIMITANTES DE FOSFATO

La represión de la síntesis de giberelinas por el nitrógeno podría deberse a un efecto directo de un compuesto nitrogenado o a un efecto indirecto; en este último caso, la señal inductora de la síntesis de giberelinas podría ser la disminución de la velocidad de crecimiento al escasear el nitrógeno.

Para distinguir entre ambas hipótesis limitamos el crecimiento de *Gibberella* con bajas concentraciones de nitrógeno (Fig. 20 izquierda) o de fósforo (Fig. 20 derecha).

La síntesis de giberelinas ocurre a concentraciones limitantes de nitrógeno en presencia de abundante fósforo (Fig. 20 izquierda), pero no en concentraciones limitantes de fósforo en presencia de abundante nitrógeno (Fig. 20 derecha). Se concluye que la síntesis de giberelinas no se induce por cualquier limitación del crecimiento y se sugiere que sea un efecto específico de la escasez de fuente de nitrógeno

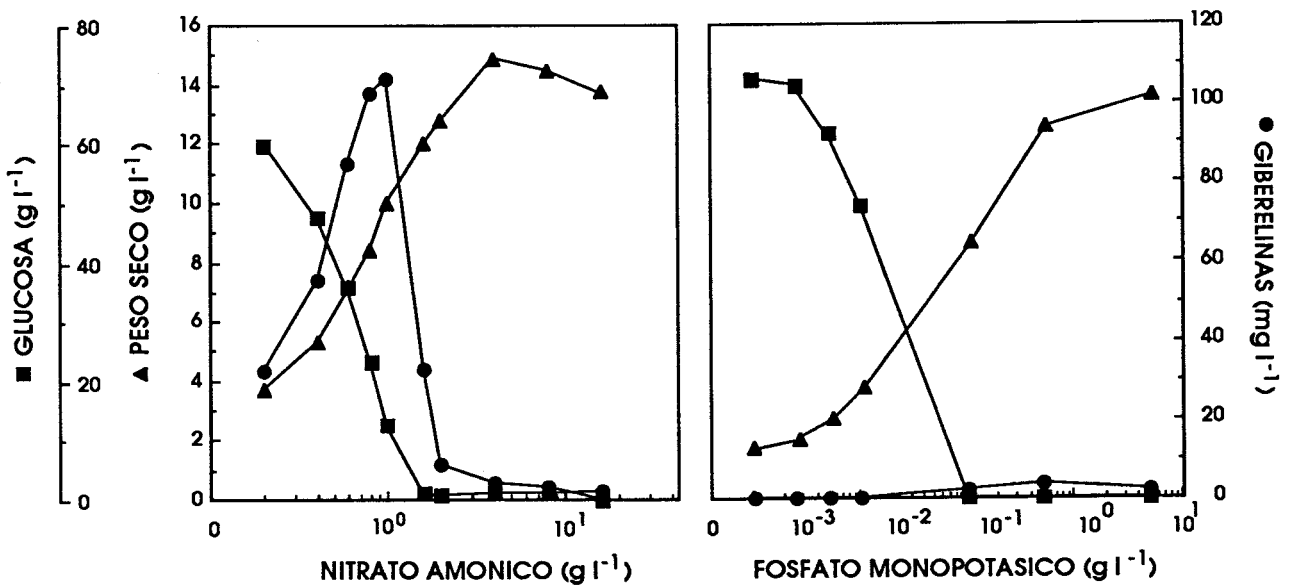


FIGURA 20. Peso seco del micelio (▲) y concentración de glucosa (■) y de giberelinas (●) a los quince días de cultivo en caldo con 5 g l⁻¹ PO₄H₂K y distintas concentraciones de NO₃NH₄ o en caldo rico en nitrógeno con distintas concentraciones de PO₄H₂K.

3.5.5

INDUCCION DE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

Los resultados expuestos hasta ahora sugieren que la síntesis de giberelinas ocurre cuando las células disponen de carbono pero no de nitrógeno. Si esta hipótesis es correcta, la adición de glucosa podría favorecer la síntesis de giberelinas. Los micelios cultivados en ausencia de nitrógeno deberían interrumpir la síntesis de giberelinas al ponerlos en presencia de nitrógeno. Los micelios cultivados con exceso de nitrógeno deberían empezar a sintetizar giberelinas al eliminar el nitrógeno.

Adición de glucosa

La adición de glucosa estimula la síntesis de giberelinas en cultivos que las están sintetizando (Fig 21). El incremento es mayor en el medio con mayor concentración inicial de nutrientes, posiblemente porque contiene más micelio. El peso seco y el consumo de glucosa aumentan tras la adición de glucosa.

Pérdida del nitrógeno

Se transfirió micelio cultivado en caldo rico en nitrógeno durante nueve días a soluciones con $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (5 g l^{-1}) y glucosa (20 ó 40 g l^{-1}) o a su medio original. Los micelios sintetizan giberelinas en soluciones de glucosa sin nitrógeno. La producción es particularmente alta en la solución con 40 g l^{-1} de glucosa (Fig. 22). Una vez consumida toda la glucosa de la solución, la síntesis de giberelinas continúa, presumiblemente a partir de materiales de reserva.

El peso seco del micelio y el consumo de glucosa siguieron aumentando después de la transferencia; la ausencia de nitrógeno en el medio sugiere que el organismo consume la glucosa para sintetizar polisacáridos de reserva; el principal polisacárido estructural, la quitina, contiene nitrógeno.

Otra forma de poner de manifiesto el papel del nitrógeno es el intercambio de micelios y medios (Fig. 23). Los resultados confirman que la producción de giberelinas depende esencialmente del medio de cultivo y no de la procedencia del micelio.

Los micelios cultivados en caldo rico en nitrógeno inducen la síntesis de giberelinas cuando se transfieren a caldo sin nitrógeno (Fig. 23 izquierda). Esta inducción no se produce inmediatamente después de la transferencia; el micelio probablemente necesita algún tiempo para sintetizar las enzimas responsables de la síntesis de giberelinas.

Los micelios cultivados en caldo pobre en nitrógeno detienen la síntesis de giberelinas cuando se transfieren a medio con nitrógeno (Fig. 23 derecha). Observamos una síntesis residual de giberelinas de aproximadamente el 12% de la que se produce en caldo pobre en nitrógeno.

3.5.5

EFFECTOS DE LA CICLOHEXIMIDA

La cicloheximida inhibe la síntesis de proteínas en muchos organismos eucariotas. En *Gibberella* una concentración de cicloheximida de 50 mg l^{-1} inhibe completamente el crecimiento de la estirpe silvestre IMI58289 (resultados no mostrados).

La producción de giberelinas cesa inmediatamente después de la adición de cicloheximida a cultivos de la estirpe silvestre en caldo pobre en nitrógeno (Fig. 24).

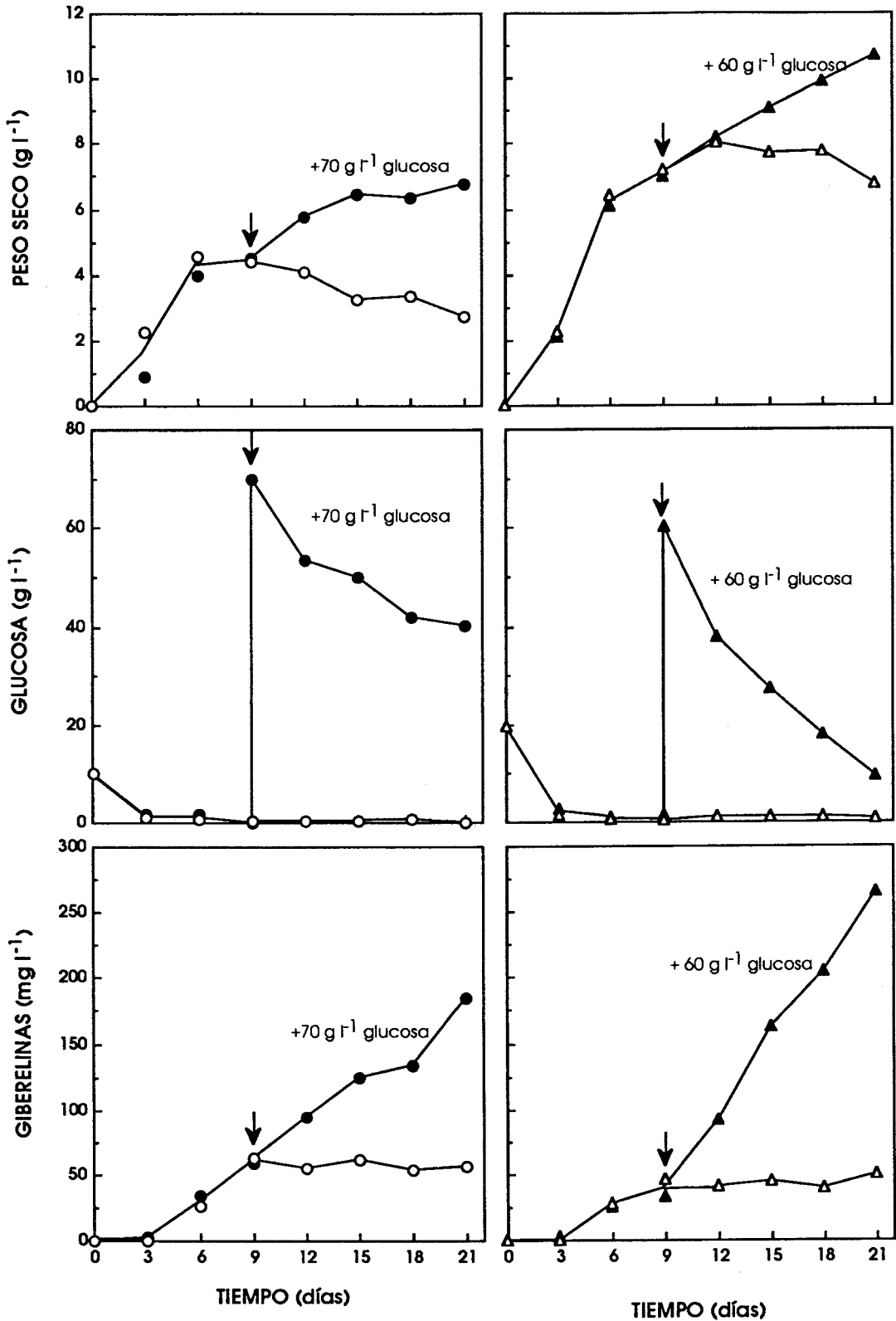


FIGURA 21. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en caldo con 10 g l^{-1} de glucosa y 0.5 g l^{-1} de NO_3NH_4 (círculos, izquierda) o con 20 g l^{-1} de glucosa y 1 g l^{-1} de NO_3NH_4 (triángulos, derecha). A los nueve días (flechas) se añadieron las cantidades indicadas de glucosa (símbolos negros).

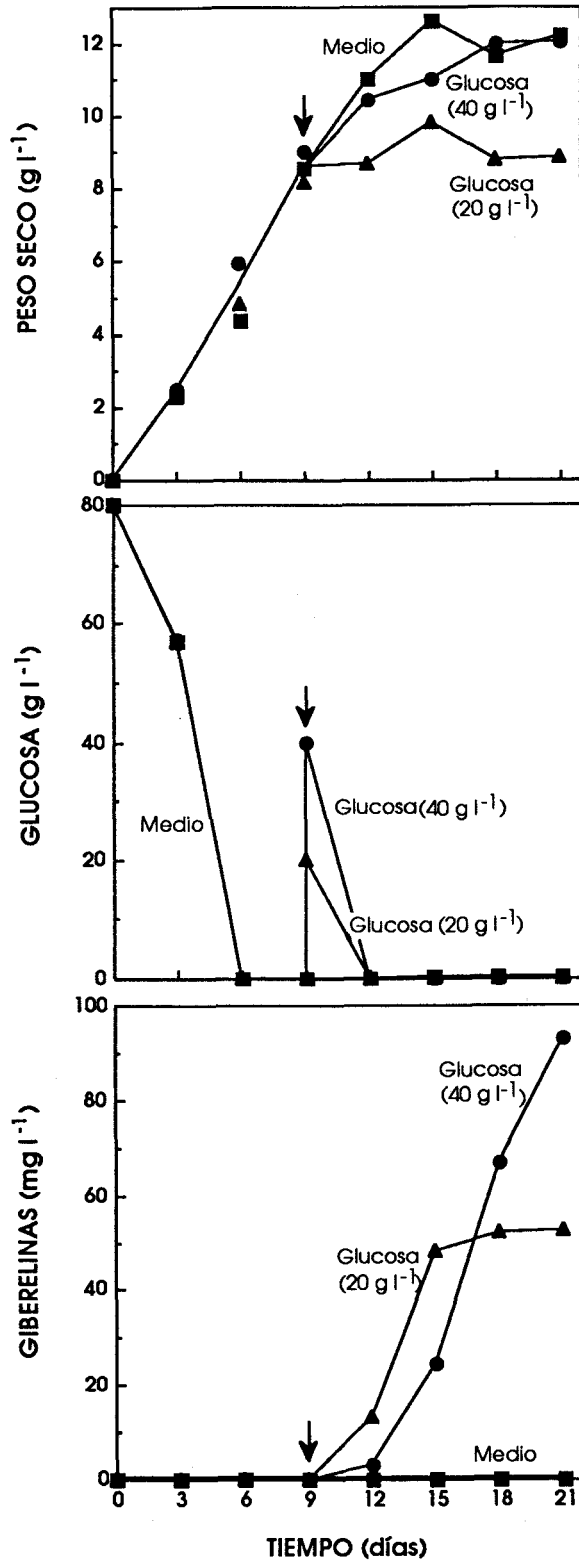


FIGURA 22. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en el caldo de cultivo de micelio cultivado en caldo rico en nitrógeno. A los nueve días (flechas) se lavaron los micelios y se resuspendieron en el mismo medio en que se encontraban o en soluciones con 5 g l⁻¹ de PO₄H₂K y glucosa a las concentraciones indicadas.

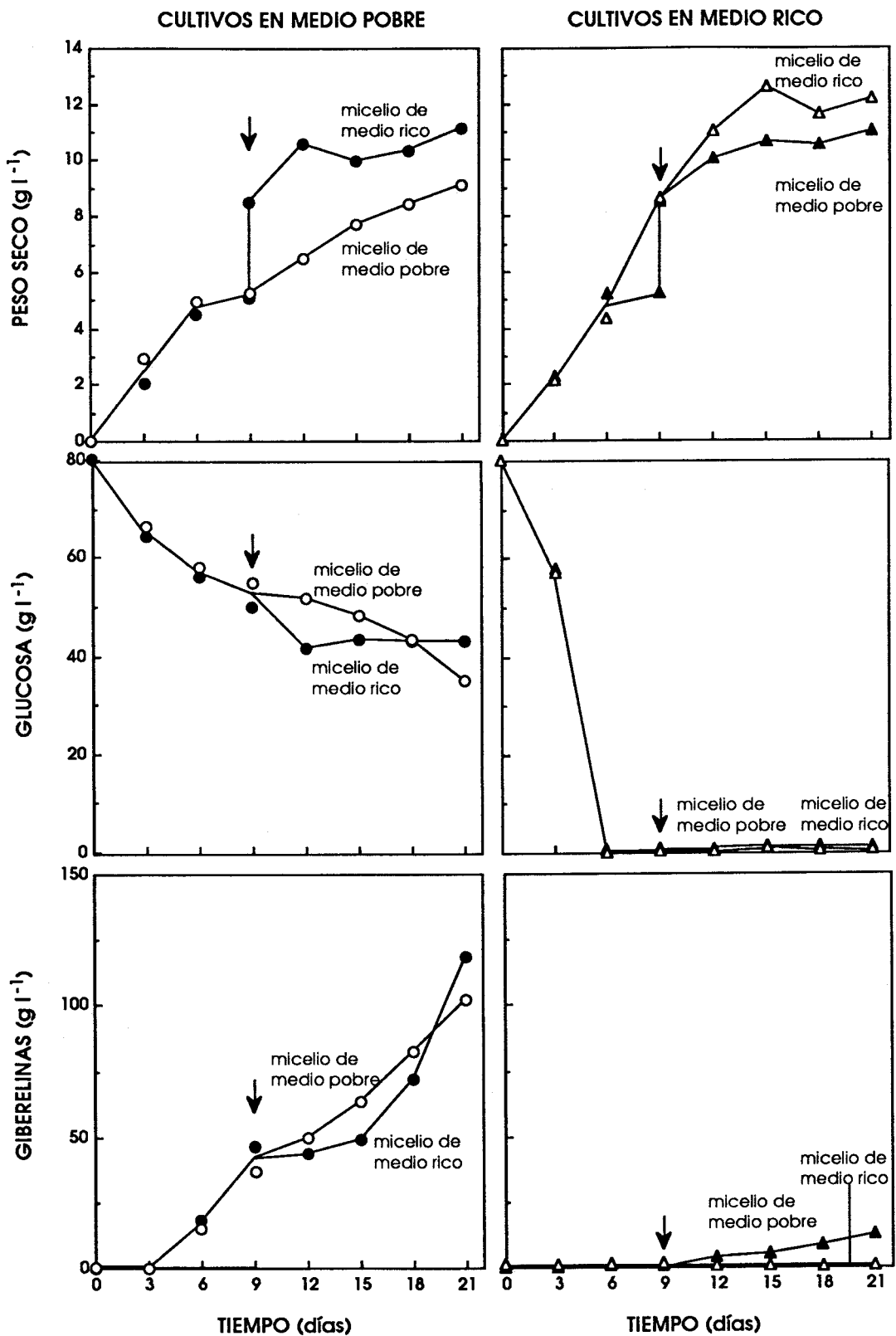


FIGURA 23. Peso seco del micelio y concentración de glucosa y de giberelinas en caldo pobre en nitrógeno (izquierda) y en caldo rico en nitrógeno (derecha). A los nueve días (flechas) se extrajeron los micelios de los cultivos y los medios recibieron los mismos micelios que tenían antes (símbolos claros) o micelios cultivados en el otro tipo de medio (símbolos oscuros).

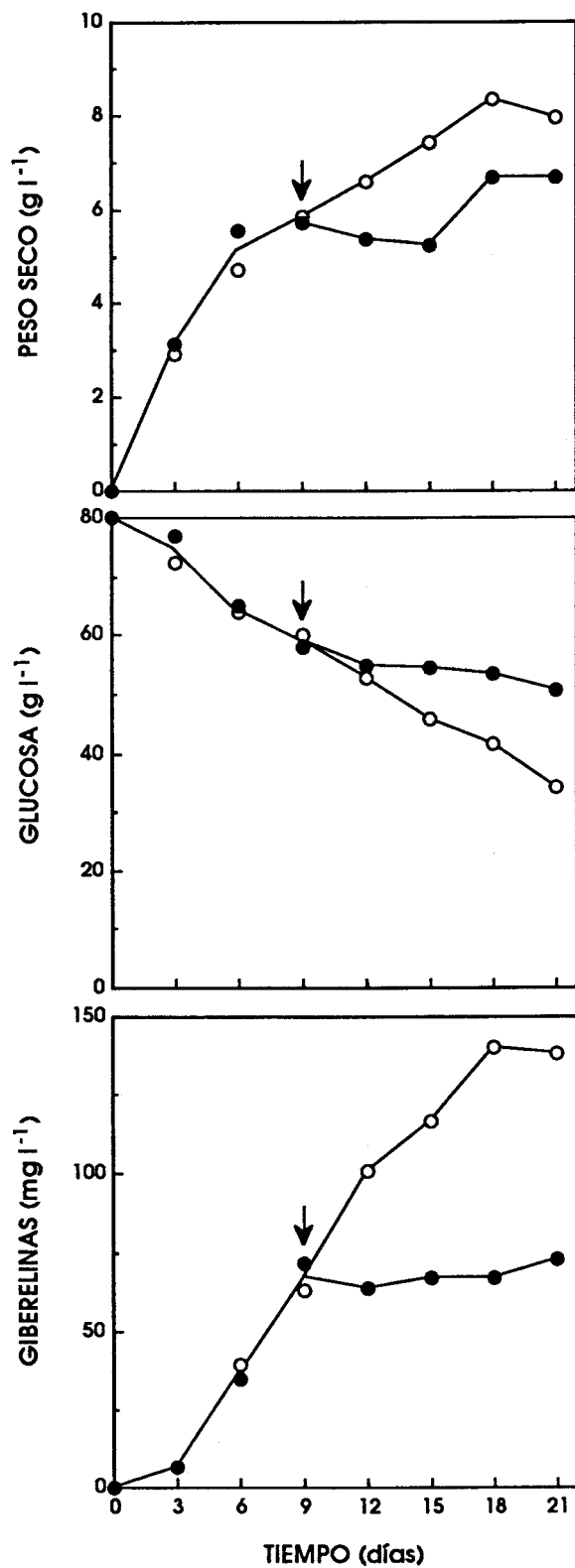


FIGURA 24. Peso seco del micelio y concentración glucosa y de giberelinas en caldo pobre en nitrógeno tras añadir 50 g l^{-1} de cicloheximida a los nueve días de incubación (●). Cultivo testigo sin adición de cicloheximida (○).



3.5.6

MEDIO OPTIMO PARA LA PRODUCCION DE GIBERELINAS

La producción de giberelinas depende de las condiciones de cultivo. Para conseguir altas concentraciones de giberelinas en un cultivo único diseñamos un caldo con las concentraciones óptimas de los nutrientes para la producción de giberelinas. Este caldo contenía 0.8 g l^{-1} de NO_3NH_4 (aproximadamente 10 mM), 60 g l^{-1} de manitol (0.33 M) y 0.5 g l^{-1} de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ (3.67 mM). En estas condiciones se sintetizan a los quince días 180 g l^{-1} giberelinas, aproximadamente el doble que en caldo pobre en nitrógeno.

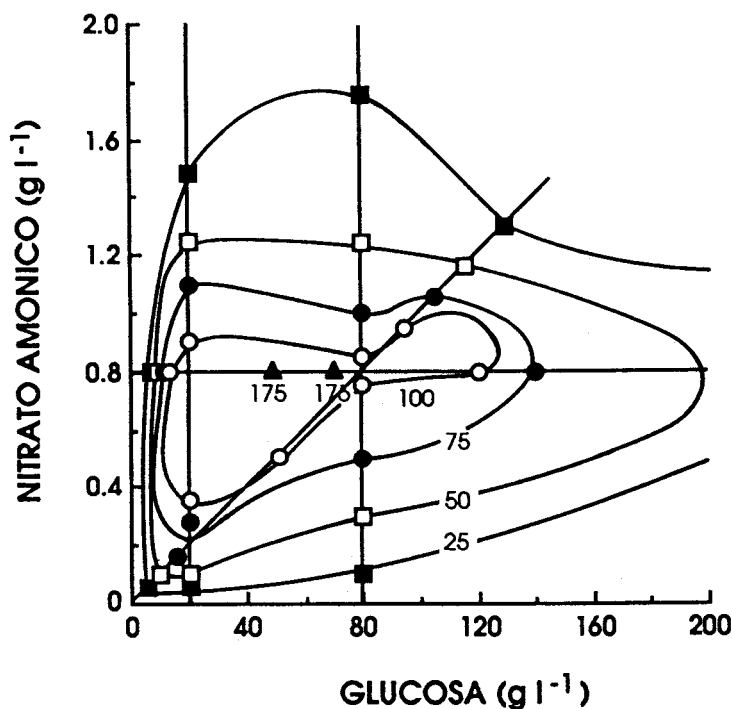


FIGURA 25. Concentración de giberelinas con distintas concentraciones de glucosa y de NO_3NH_4 (líneas rectas). Las líneas de nivel se han extrapolado de los resultados de las Fig. 15 y 18 y de otros no mostrados. Los triángulos corresponden a la máxima concentración de giberelinas alcanzada en estas condiciones.

DISCUSION GENERAL

Dos nuevos métodos fundamentan esta tesis, un sencillo análisis fluorimétrico de las giberelinas y un ensayo rápido de la producción de giberelinas en pequeños cultivos. Los resultados del primero han sido verificados con muestras conocidas de ácido giberélico puro y por comparación con los resultados de la cromatografía HPLC. Una de sus ventajas es que no requiere pasos previos de purificación, con lo que se evitan las consecuentes pérdidas de giberelinas.

El escrutinio rápido nos ha permitido aislar trece mutantes *gib*, que difieren del tipo silvestre en la producción de giberelinas. Estos mutantes se reparten en tres grupos: mutantes agiberélicos (carentes de giberelina A₃), mutantes hipogiberélicos (con menos giberelina A₃ que la estirpe silvestre) y mutantes alogiberélicos (productores de compuestos distintos de los de la estirpe silvestre). En la población escrutada no conseguimos detectar ningún mutante que produzca más giberelinas que la estirpe silvestre IMI58289. Esta estirpe fue tomada como punto de partida precisamente por su alta producción de giberelinas (unos 20 mg de giberelinas por gramo de peso seco). No se descarta que existan mutantes superproductores, pero para encontrarlos probablemente habría que escrutar decenas de miles de colonias procedentes de esporas mutagenizadas.

Las giberelinas no parecen tener ningún papel importante en el crecimiento de *Gibberella* en nuestras condiciones de cultivo: varios mutantes no producen giberelinas pero crecen y consumen glucosa de manera similar a la estirpe silvestre. Sería interesante estudiar la infección del arroz por estos mutantes.

Relación entre las síntesis de carotenos y de giberelinas

Los mutantes *gib* aislados en esta Tesis y los mutantes *car*, alterados en la síntesis de carotenos, nos permitieron estudiar las posibles relaciones entre las síntesis de ambos grupos de terpenoides.

Avalos (1987) ya había notado diferencias en la producción de giberelinas de varios mutantes *car*. Sus análisis de carotenos y de giberelinas se hicieron con distintas condiciones de cultivo, lo que imposibilitaba su comparación cuantitativa.

Los análisis de carotenos y giberelinas en mutantes *car* empleando las mismas condiciones de cultivo confirmaron los resultados de Avalos. El incremento de la carotenogénesis en los mutantes superproductores de neurosporaxantina queda compensado cuantitativamente con una bajada en la síntesis de giberelinas. En la dirección opuesta ocurre lo mismo, ya que los mutantes albinos sin carotenos aumentan la síntesis de giberelinas.

Esta compensación entre las rutas de carotenos y giberelinas no ocurre en los mutantes carentes de giberelinas. La utilización de la misma cantidad de precursores, les llevaría a producir unos 10 mg de neurosporaxantina por gramo de micelio.

Los carotenos son sintetizados por un gran complejo enzimático en *Phycomyces* (Cerdá-Olmedo, 1987) y probablemente en *Gibberella* (Avalos, 1987). Nuestros resultados sugieren que al bloquear el funcionamiento del complejo (mutantes *car*) el pirofosfato de geranilgeraniol se desvía hacia la ruta de las giberelinas. Para que esto ocurra los carotenoides y las giberelinas deben sintetizarse en el mismo compartimento celular.

En *Phycomyces* los carotenos y los esteroides se sintetizan en compartimentos distintos; en este caso, las mutaciones que causan superproducción de carotenos no afectan a la concentración de esteroides (Bejarano, 1988).

Los carotenoides se producen al principio del crecimiento de *Gibberella* mientras que las giberelinas se empiezan a sintetizar a partir del tercer o cuarto día de cultivo. Las alteraciones en los mutantes *car* afectan a los primeros días de la ruta de las giberelinas; los mutantes blancos sintetizan más giberelinas que la estirpe silvestre solo al principio de su síntesis.

Al bloquear la ruta de las giberelinas los precursores no se desvían hacia la de los carotenoides; estos precursores pueden encontrarse en forma de compuestos intermedios o metabolizarse por otras rutas competidoras.

El mutante SG127 no acumula carotenos ni giberelinas. Este mutante puede tener bloqueado un paso común a la síntesis de ambos compuestos. Este paso sería presumiblemente la transferencia de un residuo de prenilo al pirofosfato de farnesilo para dar pirofosfato de geranilgeraniol. Si para cada enzima hay un solo gen, las mutaciones en pasos anteriores de la ruta no serían viables, ya

que impedirían la síntesis de los esteroides. También cabe la posibilidad de que una mutación regulatoria afecte a ambas rutas.

Existe un mutante superproductor de neurosporaxantina (SG1) que no excreta giberelinas al medio de cultivo. Este mutante excreta al medio varios compuestos de naturaleza desconocida, entre ellos grandes cantidades de uno de color rojo. La interpretación de este mutante debe posponerse hasta la identificación de estos compuestos.

La α -picolina, un inhibidor de la ciclase del licopeno en *Gibberella*, inhibe la síntesis de giberelinas. Como la biosíntesis de giberelinas incluye varios pasos de ciclación, probablemente la α -picolina inhiba uno de estos pasos. En este caso, las dos inhibiciones serían el resultado de la acción de la α -picolina sobre dos ciclasas distintas.

Regulación de la síntesis de giberelinas

Las giberelinas se empiezan a sintetizar a partir de los tres días de cultivo, cuando ya ha empezado a disminuir la velocidad de crecimiento de *Gibberella*. En nuestras condiciones de cultivo la limitación del crecimiento se debe a la escasez de fuente de nitrógeno en el medio.

La síntesis de giberelinas no es inducida por la limitación del crecimiento del organismo, ya que no es inducida por la escasez de fosfato. La síntesis de giberelinas depende de la disponibilidad de fuente de nitrógeno. La giberelinogénesis podría ser reprimida en presencia de suficiente nitrógeno o activada en su ausencia. Los resultados de esta tesis no permiten distinguir entre ambas hipótesis.

La regulación por nitrógeno es reversible. Si privamos de nitrógeno un micelio, éste empieza a sintetizar giberelinas. La adición de nitrógeno detiene la síntesis de giberelinas.

Las giberelinas se siguen sintetizando hasta por lo menos nueve días después de agotarse la glucosa del caldo de cultivo. Los carbonos necesarios pueden proceder de polisacáridos de reserva; un indicio de la acumulación de estas reservas es el consumo de glucosa en ausencia de fuente de nitrógeno (Fig. 22). En condiciones en las que la relación carbono/nitrógeno es muy baja, es probable que no se sintetizen polisacáridos de reserva; en este caso, la síntesis de

giberelinas comienza al agotarse la fuente de nitrógeno y se detiene al agotarse la glucosa del medio (Fig. 21).

La síntesis de giberelinas en soluciones de glucosa (Fig. 22) sugiere una disponibilidad previa de las enzimas, que tendrían vida media muy larga. Contra esta hipótesis arguye el rápido cese de la síntesis de giberelinas tras añadir cicloheximida, que sugiere que al menos una proteína necesaria para la síntesis de giberelinas debe tener una vida media corta. Una posible solución a esta paradoja es la síntesis de proteínas con los aminoácidos procedentes de degradar otras proteínas. No se pueden descartar efectos indirectos de la cicloheximida sobre la síntesis de giberelinas.

Caracterización preliminar de los mutantes *gib*

No tenemos indicios de que alguno de los mutantes *gib* acumule cantidades importantes de compuestos intermediarios de la ruta al bloquear ésta. No podemos descartar la acumulación de algunos precursores de la GA₃ en los mutantes *gib*, ya que las condiciones de análisis no permitieron detectar algunos ni cuantificar correctamente otros. Por ejemplo, algunos precursores, como el kaureno, no se excretan el medio de cultivo.

Cuando analizamos los mutantes *gib* por cromatografía HPLC y marcado radiactivo clasificamos los compuestos que aparecían en el cromatograma en tres grupos según se marcaran o no a partir del [¹⁴C]mevalonato y según su variabilidad en las distintas estirpes.

El primer grupo está formado por compuestos no terpenoides. El segundo por terpenoides que no varían de unos mutantes a otros; a este grupo pertenecen los terpenoides ajenos a la ruta de las giberelinas y compuestos de esta ruta previos a los bloqueos de todos los mutantes. Este grupo no incluye carotenoides ni esteroides, que no se excretan al medio de cultivo, ni cicloneerodiol, que es muy apolar y no se encontraría en los extractos utilizados. El tercer grupo de compuestos está formado por los terpenoides que varían mucho de unos mutantes a otros; estos compuestos presuntamente pertenecen a la ruta de síntesis de las giberelinas (Tabla XII).

La Tabla XII resume los resultados de las Tablas VI, VII y VIII y agrupa los mutantes *gib* en siete grupos funcionales según su capacidad de sintetizar los compuestos presentes en el caldo de cultivo de la estirpe silvestre. La comparación de los compuestos

pertenecientes al tercer grupo nos permite ordenarlos dentro de una hipotética ruta biosintética de las giberelinas (Fig. 26). Para ello se supone que el paso afectado por la mutación está detrás de los compuestos que el mutante acumula en cantidad similar al tipo silvestre y delante de los compuestos que el mutante acumula en menor cantidad que el tipo silvestre. El defecto del mutante del grupo A, que no sintetiza giberelinas ni carotenoides, estaría antes de la bifurcación de ambos terpenoides. Los mutantes del grupo B sintetizan carotenoides pero ninguno de los compuestos intermedios presentes en la estirpe silvestre; estarían bloqueados al principio de la ruta de las giberelinas, pero después de la bifurcación de giberelinas y carotenoides. Los mutantes de los grupos C, D, E y F sintetizan algunos de los compuestos intermedios presentes en la estirpe silvestre; los datos de estos mutantes son irreconciliables con una ruta de tipo lineal. El mutante del grupo G sintetiza todos los compuestos intermedios presentes en la estirpe silvestre; su defecto se localizaría en la parte final de la ruta.

Atendiendo a los compuestos que no aparecen en la estirpe silvestre pero sí en algunos de los mutantes, el grupo D se divide en dos subgrupos según la capacidad de sintetizar el compuesto con $R=2.15$; el grupo E se subdivide en tres subgrupos según la capacidad de sintetizar el compuesto con $R=2.59$ y la GA7.

El desconocimiento de la estructura química de los compuestos excretados por las distintas estirpes no nos permite asignar cuáles son las funciones enzimáticas alteradas en los grupos de mutantes.

El mutante del grupo A (SG127), sin carotenoides ni giberelinas, no tiene homólogos en plantas, donde este tipo de mutantes sería inviable. Los mutantes del grupo B (SG121, SG123 y SG138) alterados en los primeros pasos de la ruta de las giberelinas podrían ser homólogos del mutante B1-41 de *Gibberella* y de los mutantes alterados en los genes *na* del guisante, *d5* y *an₁* del maíz y *dx* del arroz. Los mutantes alterados en los pasos posteriores de la ruta podrían ser homólogos del mutante R9 de *Gibberella* y de los mutantes alterados en los genes *le* del guisante, *d1*, *d2* y *d3* del maíz y *dy* del arroz. No hemos encontrado ningún mutante homólogo del *gigas* de cebada, que causaría superproducción de giberelinas.

Los mutantes que excreten al medio giberelinas intermediarias de la ruta en cantidades suficientes permitirían estudiar los efectos

de estos intermediarios en las plantas y algunos de ellos podrían tener interés industrial. Estos mutantes también podrían transformar compuestos sintéticos o semisintéticos añadidos al caldo de cultivo en otros nuevos con posibles aplicaciones biotecnológicas.

TABLA XII. Compuestos del tercer grupo presentes en la estirpe silvestre

Grupo funcional	Mutantes	Coeficiente de retención R				
		0.29	0.51	1.67	2.08	2.51
A	SG127	-	-	-	-	-
B	SG121 SG123 SG138	-	-	-	-	-
C	SG129	-	-	+	-	-
D	SG122 SG136 SG139	+	-	-	-	-
E	SG124 SG128 SG133	-	+	+	-	+
F	SG135	+	+	-	-	-
G	SG134	+	+	+	+	+

Significado de los símbolos

+: El mutante acumula cantidades similares a las del silvestre.

-: El mutante acumula cantidades inferiores a las del silvestre.

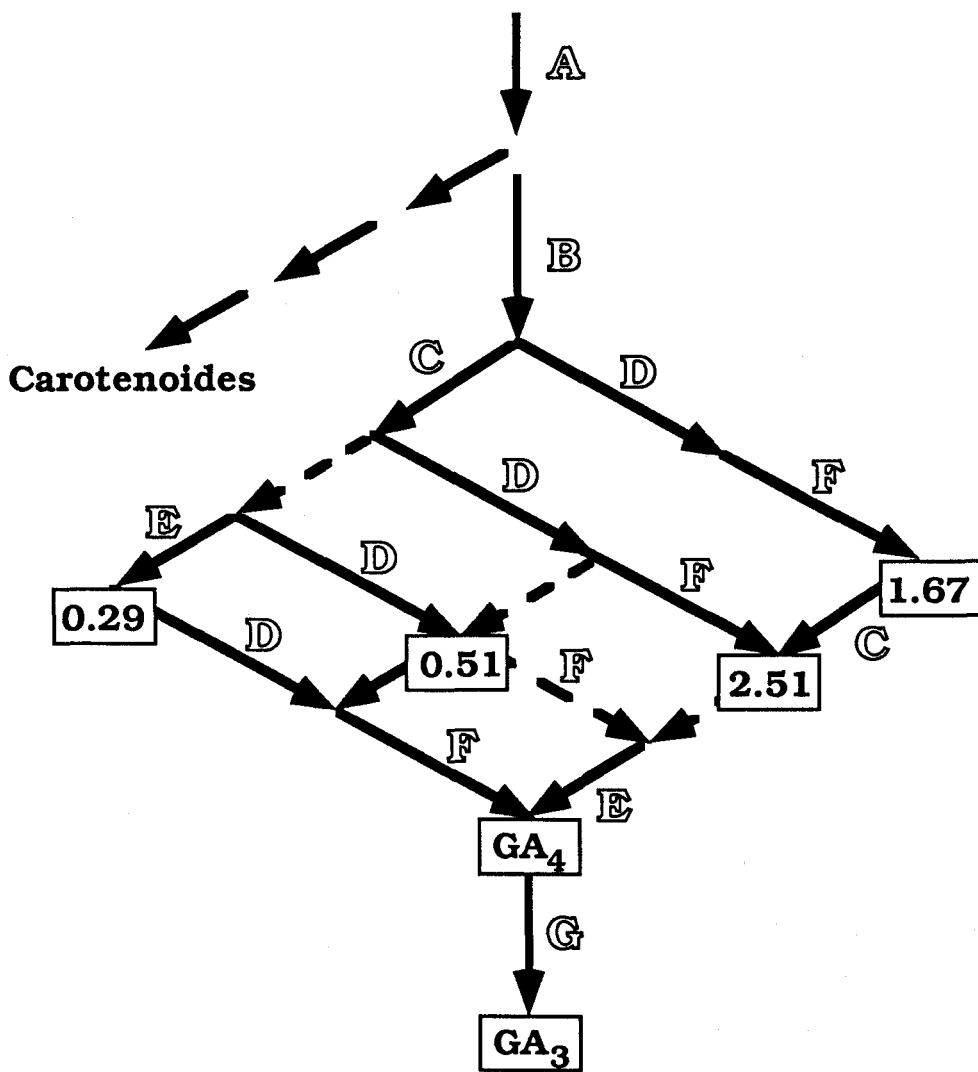
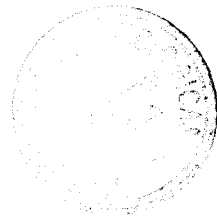


FIGURA 26. Posible ordenación biosintética de los compuestos excretados por las distintas estirpes y localización de los grupos de mutantes. Las letras huecas designan funciones o grupos de ellas defectuosas en los mutantes del grupo designado con la misma letra en la Tabla XII.

CONCLUSIONES



1. Se ha desarrollado un método simplificado para medir giberelinas.

2. Se ha desarrollado un método rápido para escrutar cultivos y detectar mutantes alterados en la síntesis de giberelinas.

3. Se han aislado trece mutantes *gib*, alterados en la síntesis de giberelinas, tras escrutar cultivos procedentes de esporas expuestas a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

4. Existen dos mutantes alterados en la síntesis de carotenos y giberelinas. El mutantes SG127, que fue aislado como mutante agiberélico, no sintetiza carotenos; el mutante SG1, que fue aislado como superproductor de neurosporaxantina, no sintetiza giberelinas.

5. Los mutantes *car* difieren del tipo silvestre en la producción de giberelinas. El flujo total de los precursores comunes a ambas rutas se mantiene constante: el bloqueo de la carotenogénesis provoca una estimulación de la síntesis de giberelinas y la estimulación de la carotenogénesis la disminuye.

6. Los precursores que no se dedican a la producción de ácido giberélico en los mutantes *gib* no se destinan a la producción de carotenoides. Estos mutantes pueden acumular precursores de las giberelinas u otros terpenoides.

7. Ninguno de los mutantes *gib* acumula cantidades importantes de las giberelinas intermediarias de las que se dispuso de patrones al bloquear la ruta.

8. La síntesis de giberelinas no se induce por la limitación del crecimiento de *Gibberella*, sino por el agotamiento de la fuente de nitrógeno. El nitrógeno regula la síntesis de giberelinas: la síntesis de giberelinas ocurre en ausencia de nitrógeno y la adición de nitrógeno detiene la síntesis de giberelinas.

9. Las síntesis de giberelinas ocurre en soluciones de glucosa. Una vez agotada la glucosa, la síntesis de giberelinas puede continuar a partir de material de reserva.

BIBLIOGRAFIA

- Aasen, A. J. y Jensen, S. L. (1965) "Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxantin". *Acta Chem. Scand.* **19**: 1843-1853
- Adams, G., Johnson, N., Leslie, J. F. y Hart, L. P. (1987) "Heterokaryons of *Gibberella zeae* formed following hiphal anastomosis or protoplast fusion". *Exp. Mycol.* **11**: 339-353
- Avalos, J., Casadesús, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1983) "Mutantes de *Gibberella fujikuroi*". *Resúmenes de la II Reunión Científica de Microbiología Industrial* **5**: 9-17
- Avalos, J., Casadesús, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1985) "*Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine". *Appl. Env. Microbiol.* **49**: 187-191
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1986) "Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **25**: 1837-1841
- Avalos, J. (1987) "Modificación de la biosíntesis de carotenoides de *Gibberella fujikuroi*". Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1987) "Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*". *Curr. Genet.* **11**: 505-511
- Avalos, J., Mackenzie, A., Nelkie, D. y Bramley, P. M. (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, E. L. (1990) "Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *FEMS Microbiol. Let.* **66**: 295-298
- Barendse, G. W. M., Kepczynski, J., Karssen, C. M. y Koornneef, M. (1986) "The role of endogenous gibberellins during fruit and seed development: Studies on gibberellin-deficient genotypes of *Arabidopsis thaliana*". *Physiol. Plant.* **67**: 315-319
- Barrero, A. F., Sánchez, J. F., Oltra, E., Tamayo, N., Cerdá-Olmedo, E., Candau, R. y Avalos, J. (1991) "Fusarin C and 8Z-Fusarin C from *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* (en prensa)
- Beale, M. H., Bearder, J. R., Down, G. H., Hutchison, M., MacMillan, J. y Phinney B. O. (1982) "The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **21**: 1279-1287

- Beale, M. H., Bearder, J. R., MacMillam, J., Matsuo, A. y Phinney B. O. (1983) "Diterpene acids from *Helianthus* spp. and their microbiological conversion by *Gibberella fujikuroi* mutant B1-41a". *Phytochem.* **22**: 875-882
- Bearder, J. R., MacMillam, J. y Phinney B. O. (1973) "3-hydroxylation of gibberellin A₁₂-aldehyde in *Gibberella fujikuroi* strain Rec-193A". *Phytochem.* **12**: 2173-2179
- Bearder, J. R., MacMillam, J. y Phinney B. O. (1973) "Conversion of gibberellin A₁ into gibberellin A₃ by the mutant R-9 of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **12**: 2655-2659
- Bearder, J. R., MacMillam, J. Wels, C. M., Chaffey M. B. y Phinney B. O. (1974) "Position of the metabolic block for gibberellin biosynthesis in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **13**: 911-917
- Bearder, J. R., MacMillam, J., Phinney B. O., Hanson, J. R., Rivett, D. E. A. y Willis, C. L. (1982) "Gibberellin A₁₃ 7-aldehyde: A proposed intermediate in the fungal biosynthesis of gibberellin A₃". *Phytochem.* **21**: 2255-2230
- Bearder, J. R. (1983) "In vivo diterpenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 251-387
- Borrow, A., Brian, P. W., Chester, V. E., Curtis, P. J., Hemming, H. G., Henehan, C., Jefferys, E. G., Lloyd, P. B., Nixon, I. S., Norris, G. L. F. y Radley, M. (1955) "Gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *Gibberella fujikuroi*: some observations on its production and isolation". *J. Sci. Food Agric.* **6**: 340-348
- Borrow, A., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B. y Nixon, I. S. (1961) "The metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture". *Can. J. Microbiol.* **7**: 227-276
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., Rothwell A., Rothwell B., Swait, J. C. (1964) "The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred cultured". *Can. J. Microbiol.* **10**: 407-444
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., Rothwell A., Rothwell B., Swait, J. C. (1964) "The effect of varied temperature on the kinetics of the metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture". *Can. J. Microbiol.* **10**: 445-466

- Booth, C. (1971). "The genus *Fusarium*". Commonwealth Agricultural Bureaux, London.
- Brückner, B., Blechschmidt, D., Sembdner, G., y Schneider, G. (1989) "Fungal gibberellins" en "Biotechnology of vitamins, pigments and growth factors". Vandamme, E. J. ed. Elsevier Science Publishers ltd., London and New York. pp: 383-429
- Bu'lock, J. D., Detroy, R. W., Hostálek, Z. y Munim-al-Shakarchi, A. (1974) "Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Trans. Br. mycol. Soc.* **62**: 377-389
- Candau, R., Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) "In vivo channelling of substrates in an enzyme aggregate for β -carotene biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88** (en prensa)
- Cerdá-Olmedo, E. (1987) "Carotene" en "*Phycomyces*". Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. eds. C. S. H., Cold Spring Harbor, New York. pp: 199-222
- Coolbaugh, R. C. y Moore, T. C. (1969) "Apparent changes in rate of kaurene biosynthesis during the development of pea seeds". *Plant Physiol.* **44**: 1364-1367
- Coolbaugh, R. C., Heil, D. R. y West, C. A. (1982) "Comparative effects of substituted pyrimidines on growth and gibberellin biosynthesis". *Plant Physiol.* **69**: 712-716
- Coolbaugh, R. C. (1983) "Early stages of gibberellin biosynthesis" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 53-98
- Correll J. D., Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1987) "Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests". *Phytopatol.* **77**: 1640-1646
- Correll J. D., Leslie, J. F. y Klittich, C. J. R. (1987). "Observations on the heritability of heretokaryon self-incompatibility in *Gibberella zeae*". *Phytopatol.* **77**: 1710-1711
- Correll J. D., Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1989) "Heterokaryon self-incompatibility in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)". *Mycol. Res.* **93**: 21-27
- Cross, B. E., Galt, R. H. B., Hanson, J. R., Curtis, P. J., Grove, J. F. y Morrison, A. (1963) "New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites". *J. Chem. Soc.*, 2937-2943

- Cross, B. E., Galt, R. H. B. y Hanson, J. R. (1964) "The biosynthesis of the gibberellins. Part I. (-)-Kaurene as a precursor of gibberellic acid". *J. Chem. Soc.*, 295-300
- Cross, B. E. y Norton, K. (1965) "The biosynthesis of gibberellic acid". *Chem. Commun.* **21**: 535-536
- Cross, B. E., Norton, K. y Stewart, J. C. (1968) "An attempt to find evidence for the existence of (+)-gibberellic acid". *Phytochem.* **7**: 83-84
- Cross, B. E. y Myers, P. L. (1969) "The effect of the plant growth retardants on the biosynthesis of diterpenes by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **8**: 79-83
- Cross, B. E., Stewart, J. C. y Stoddart, J. L. (1970) "6 β , 7 β -Dihydroxykaurenoic acid: Its biological activity and possible role in the biosynthesis of gibberellic acid". *Phytochem.* **9**: 1065-1071
- Cross, B. E. y Filippone, P. (1981) "The microbiological production of analogues of mould metabolites. Part 3. Production of a gem-difluoro-derivative of gibberellin A₇ and 16,16-difluoro-7-hydroxy-17-norkaurenolide by *Gibberella fujikuroi*". *J. Chem. Res.*, 166-167
- Crozier, A. (1983) "The biochemistry and physiology of gibberellins". Vol. I y II. Praeger, New York.
- Curtis, P. J. y Cross, B. E. (1954) "Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*". *Chem. Ind.*, 1066
- Darken, M. A., Jensen, A. L. y Shu, P. (1959) "Production of gibberellic acid by fermentation". *Appl. Microbiol.*, **7**: 301-303
- Davies, B. H. (1976) "Carotenoids" en "Chemistry and biochemistry of plant pigments", vol II; Goodwin, T. W. ed. Academic Press. London. pp: 38-165.
- Davies, P. J., Birnberg, P. R., Maki, S. J. y Brenner, M. L. (1986) "Photoperiod modification of [¹⁴C]gibberellin A₁₂ aldehyde. Metabolism in shoots of pea, line G2". *Plant Physiol.* **81**: 991-996
- Deikman, J. y Jones, D. F. (1985) "Control of α -amylase mRNA accumulation by gibberellic acid and calcium in barley aleurone layers". *Plant Physiol.* **78**: 192-198
- Dennis, D. T. y West, C. A. (1967) "Biosynthesis of gibberellins". *J. Biol. Chem.* **242**: 3293-3300

- Echols, L. C., Maier, V. P., Poling, S. M. y Sterling, P. R. (1981) "New bioregulators of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **20**: 433-437
- Ellis, J. J. (1988) "Section *Liseola* of *Fusarium*". *Mycologia* **80**: 255-258
- Elson, G. W., Jones, D. F., MacMillan, J. y Suter, P. J. (1964) "Plant hormones. IV. Identification of the gibberellins of *Echinocystis macrocarpa* Greene by thin layer chromatography". *Phytochem.* **3**: 93-101
- Erokhina, L. I. y Solokova, E. V. (1966) "Selection of *Fusarium moniliforme* Sheld (producer of gibberellins) with application of mutagenic factors". *Genetika* **1**: 109-115
- Erokhina, L. I. y Efremov, B. D. (1970) "Biochemical mutants of *Fusarium moniliforme* (Sheld.)". *Genetika* **6**: 170-172
- Fall, R. R. y West, C. A. (1971) "Purification and properties of kaurene synthetase from *Fusarium moniliforme*". *J. Biol. Chem.* **246**: 6913-6928
- Fuska, J., Kuhr, I., Podojil, M. y Sevcik, V. (1961) "The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*". *Fol. Microbiol.* **6**: 18-21
- Gaskin, P., Hutchison, M., Lewis, N., MacMillan, J. y Phinney B. O. (1984) "Microbiological conversion of 12-oxygenated and other derivatives of ent-kaur-16-en-19-oic acid by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **23**: 559-564
- Geissman, T. A., Verbiscar, A. J., Phinney B. O. y Cragg, G. (1966) "Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **5**: 933-947
- Graebe, J. E. (1987) "Gibberellin biosynthesis and control". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**: 419-465
- Green, T. R., Dennis, D. T. y West, C. A. (1975) "Compartmentation of isopentenyl pirophosphate isomerase and prenyl transferase in developing castor bean endosperm". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **64**: 976-982
- Goodwin, T. W. y Mercer, E. I. (1963) "The regulation of sterol and carotenoid metabolism in germinating seedlings". *Biochem. Soc. Symp.* **24**: 37-41
- Gordon, W. L. (1960) "Distribution and prevalence of *Fusarium moniliforme* Sheld (*Gibberella fujikuroi* Saw) Wr. producing

- substances with gibberellin-like biological properties". *Nature* **186**: 698-700
- Goth , R. V. y Johnston, S. A. (1981) "Induction of macroconidial formation in *Fusarium moniliforme*". *Mycologia* **73**: 282-287
- Hardie, D. G. (1975) "Control of carbohydrase formation by gibberellic acid in barley endosperm". *Phytochem.* **14**: 1719-1722
- Harris G. M. y Partipilo, S. (1984) "Self-autolysis generates protoplasts of *Gibberella fujikuroi*". *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.* **84**: Abstract K4
- Harris, G. M. (1982) "Protoplasts from *Gibberella fujikuroi*". *Phytopatol.* **72**: 1403-1407
- Hedden, P., MacMillan, J. y Phinney, B. O. (1974) "Fungal products. Part XII. Gibberellin A₁₄-aldehyde, an intermediate in gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. I*, 587-592
- Hedden, P., Phinney, B. O., MacMillan, J. y Sponsel, V. M. (1977) "Metabolism of kaurenoids by *Gibberella fujikuroi* in the presence of the plant growth retardant, N,N,N-trimethyl-1-methyl-(2',6',6'-trimethylcyclohex-2'-en-1'-yl)prop-2-enylammonium iodide". *Phytochem.* **16**: 1913-1917
- Hedden, P., MacMillan, J. y Phinney, B. O. (1978) "The metabolism of gibberellins". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**: 149-192
- Hedden, P. y Phinney, B. O. (1979) "Comparison of *ent*-isokaurene synthesis in cell-free systems from etiolated shoots of normal and *dwarf-5* maize seedlings". *Phytochem.* **18**: 1475-1479
- Hedden, P. (1983) "*In vitro* metabolism of gibberellins" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 57-94
- Hedden, P. (1987) "Gibberellins" en "Principles and practice of plant hormone analysis" vol I; Rivier, L. y Crozier, A. eds. Academic Press, London.
- Hori, S. (1898) "Some observations on *bakanae* disease of the rice plant". *Mem. Agr. Res. Sta. (Tokio)* **12**: 110-119
- Huttly, A. K. y Baulcombe, D. C. (1989) "A wheat α -amy2 promoter is regulated by gibberellins in transformed oat aleurone protoplasts". *EMBO J.* **8**: 1907-1913
- Ingram T. J. y Reid, J. B. (1987) "Internode length in *Pisum*". *Plant Physiol.* **83**: 1048-1053

- Jacobsen, J. V. (1983) "Regulation of protein biosynthesis in aleurone cells by gibberellin and abscisic acid" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 159-188
- Jacobsen, J. V. y Beach, L. R. (1985) "Control of transcription of α -amylase and rRNA genes in barley aleurone protoplasts by gibberellin and abscisic acid". *Nature* **316**: 275-277
- Jefferys, E. G. (1973) "The gibberellin fermentation". *Adv. Appl. Microbiol.* **13**: 283-315
- Jensen, E., Crozier, A. y Monteiro, A. M. (1986) "Analysis of gibberellins and gibberellin conjugates by ion-suppression reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.* **367**: 377-384
- Johnson, S. W. y Coolbaugh, R. C. (1990) "Light-stimulated gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Plant Physiol.* **94**: 1696-1701
- Jones, D. F., MacMillan, J. y Radley, M. (1963) "Plant hormones III. Identification of gibberellic acid in immature barley and immature grass". *Phytochem.* **2**: 307-314
- Jones, K. C., West, C. A. y Phinney B. O. (1968) "Isolation, identification and biological properties of gibberellin A₁₄ from *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **7**: 283-281
- Jones, R. L. (1973) "Gibberellins: Their physiological role". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**: 571-598
- Jones, D. F. y Zeevaart, J. A. D. (1980) "The effect of photoperiod on the levels of seven endogenous gibberellins in the long-day plant *Agrostemma githago* L.". *Planta* **149**: 274-279
- Jones, D. F. y Pharis, R. P. (1987) "Production of gibberellins and bikaverin by cells of *Gibberella fujikuroi* immobilized in carrageenan". *J. Ferm. Tech.* **65**: 717-722
- Kathariou, S., y Spieth, P. T. (1982) "Spore killer polymorphism in *Fusarium moniliforme*". *Genetics* **102**: 19-24
- Kaufman, P. B., Ghosheh, N. S., Lee, M., Carlson, T. J., Jones, D. J., Rigot, W., Bigelow, W. C. y Kraus, S. (1981) "Effect of gibberellic acid on silica content and distribution in sugarcane". *Plant Physiol.* **68**: 314-317
- Kim, C. K. (1981) "Ecological studies of *bakanae* disease of rice caused by *Gibberella fujikuroi*". *Korean J. Plant Prot.* **20**: 146-150

- Klittich, C. J. R., Correll J. D. y Leslie, J. F. (1988) "Inheritance of sectoring frequency in *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)". *Exp. Mycol.* **12**: 289-294
- Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1988) "Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)". *Genetics* **118**: 417-423
- Kommedahl, T., Windels, C. E., y Stucker, R. E. (1979) "Occurrence of *Fusarium* species in roots and stalks of symptomless corn plants during the growing season". *Phytopatol.* **69**: 961-966
- Koranski, D. S., McCown, B. A., Strukmeyer, B. E. y Beck, G. E. (1979) "Gibberellin-growth retardant interactions on the growth and flowering of *Clerodendrum thomsoniae*". *Physiol. Plant.* **45**: 88-92
- Kuhlman, E. G. (1983) "Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*". *Mycologia* **74**: 759-768
- Kumar, P. K. R. y Lonsane B. K. (1987) "Gibberellic acid by solid state fermentation: Consistent and improved yield". *Biotechnol. Bioen.* **30**: 267-271
- Kurosawa, E. (1926) "Experimental studies on the nature of the substance excreted by the *bakanae* fungus". *Trans. Natl. Hist. Soc. Formosa* **16**: 213-227
- Lang, A. (1970) "Gibberellins: Structure and metabolism". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **21**: 537-570
- Link, (1809) citado en Booth, C. (1971), *Mag. Ges. naturf. Freunde, Berlin* **3**: 10
- Lew, F. T. y West, C. A. (1971) "(-)-kaur-16-en-7 β -ol-oic acid, an intermediate in gibberellin biosynthesis". *Phytochem.* **10**: 2065-2076
- Looney, N. E. y Lidster, P. D. (1980) "Some growth regulator effects on fruit quality, mesocarp composition and susceptibility to postharvest surface marking on sweet cherries". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **105**: 130-134
- Looney, N. E., Pharis, R. P. y Noma, M. (1985) "Promotion of flowering in apple tree with gibberellin A₄ and C-3 epigibberellin A₄". *Planta* **165**: 292-294
- Maki, S. J., Brenner, M. L., Davies, P. J. y Krirk, T. P. (1986) "Identification of pea gibberellins by studying [¹⁴C]GA₁₂-aldehyde metabolism". *Plant Physiol.* **81**: 984-990

- Marín-Sánchez, J. P. y Jiménez-Díaz, R. M. (1981) "Enfermedades del arroz en las marismas del Guadalquivir". *Boletín del Servicio de Defensa contra Plagas e Inspección Fitopatológica* **7**: 3-56.
- Marín-Sánchez, J. P. y Jiménez-Díaz, R. M. (1982) "Two new *Fusarium* species infecting rice in southern Spain". *Plant Disease* **66**: 332-334.
- Marín, J. P. (1985) "Micosis del trigo en Andalucía Occidental". *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Serie Agrícola* **28**: 105-117
- Marín, J. P. (1986) "Hongos asociados con el mal del trigo en Andalucía occidental". *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales* **3**: 409-431
- Marx, G. A. (1983) "Developmental mutants in some annual seed plants". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **34**: 389-417
- Metzger, J. D. (1983) "Role of endogenous plant growth regulators in seed dormancy of *Avena fatua*". *Plant Physiol.* **73**: 791-795
- Ming, Y. N., Lin, P. C. y Yu, T. F. (1966) "Heterokaryosis in *Fusarium fujikuroi* (Saw.) Wr.". *Scientia Sinica* **15**: 371-378
- Mitchell, J. E. y Angel, C. R. (1951) "The growth stimulating properties of a metabolic product of *Fusarium moniliforme*". *Phytopatol.* **41**: 26-27
- Mitchell, J. E., Skaggs, D. P. y Anderson, W. P. (1951) "Plant growth stimulating hormones in immature bean seeds". *Science* **114**: 159-161
- Murillo, F. J. y Cerdá-Olmedo, E. (1976) "Regulation of carotene synthesis in *Phycomyces*". *Mol. Gen. Genet.* **148**: 19-24
- Murillo, F. J., Torres-Martínez, S., Aragón, C. M. G. y Cerdá-Olmedo, E. (1981) "Substrate transfer in carotene biosynthesis in *Phycomyces*". *Eur. J. Biochem.* **119**: 511-516
- Murontsev, G. S. y Dubovaya, L. P. (1964) "On the use of oil and fatty acids as carbon source in gibberellin biosynthesis". *Mikrobiologia* **33**: 1048-1054
- Nadeau, R. y Rappaport, L. (1972) "Metabolism of gibberellin A₁ in germinating bean seeds". *Phytochem.* **11**: 1611-1616
- O'Neill, S. D., Keith, B. y Rappaport, L. (1986) "Transport of gibberellin A₁ in cowpea membrane vesicles". *Plant Physiol.* **80**: 812-817

- Paleg, L. G. (1960) "Physiological effects of gibberellic acid. I. On carbohydrate metabolism and amylase activity of barley endosperm". *Plant Physiol.* **35**: 293-299
- Paleg, L. G. (1960) "Physiological effects of gibberellic acid. II. On starch hydrolyzing enzymes of barley endosperm". *Plant Physiol.* **35**: 902-906
- Patterson, R. J. y Rappaport, L. (1974) "The conversion of gibberellin A₁ to gibberellin A₈ by a cell-free enzyme system". *Planta* **119**: 183-191
- Pharis. R. P. y King, R. W. (1985) "Gibberellins and reproductive development in seed plants". *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**: 517-568
- Pharis. R. P. , Ross, S. D. y McMullan, E. (1980) "Promotion of flowering in the *Pineaceae* by gibberellins". *Physiol. Plant.* **50**: 119-126
- Phinney, B. O. (1956) "Biochemical mutants in maize: Dwarfism and its reversal with gibberellins". *Plant Physiol.* **31** (Suppl), XX
- Phinney, B. O. (1956) "Growth response of single-gene dwarf mutants in maize to gibberellic acid". *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **42**: 185-189
- Phinney B. O. y West, C. A. (1960) "Gibberellins as native plant growth regulators". *Ann. Rev. Plant Physiol* **11**: 411-436
- Phinney B. O. y Spector, C. (1967) "Genetics and gibberellin production in the fungus *Gibberella fujikuroi*". *Annals N. Y. Acad. Sci.* **144**: 204-210
- Phinney B. O. (1983) "The history of gibberellins" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 19-52
- Picard, C. (1965) "Contribution à la connaissance de la vernalisation, de ses particularités et de sa signification chez *Oenothera biennis* L. var. *sulfurea* de Vries". *Ann. Sci. Nat. Bot.* **6**: 197-314
- Pitel, D. W., Vining, L. C. y Arsenault, G. P. (1971) "Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after gibberellin A₁". *Can. J. Biochem.* **49**: 194-200
- Porter, J. W. y Lincoln, R. E. (1950) "*Lycopersicon* selections containing a high of carotenes and colorless polyenes. II. The mechanism of carotene biosynthesis". *Arch. Biochem. Biophys.* **27**: 390-403

- Puhalla, J. E. y Spieth, P. T. (1983) "Heterokaryosis in *Fusarium moniliforme*". *Exp. Mycol.* **7**: 328-335
- Puhalla, J. E. y Spieth, P. T. (1985) "A comparison of heterokaryosis and vegetative incompatibility among varieties of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)". *Exp. Mycol.* **9**: 39-47
- Radley, M. (1956) "Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants". *Nature* **178**: 1070-1071
- Rappaport, L. (1979) "Applications of gibberellins in agriculture" en "Plant growth substances"; Skoog, F. ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp: 377-391
- Reid, D. M. (1983) "Gibberellin and phytochrome" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 297-332
- Reid, J. B. (1986) "Gibberellin mutants" en "Plant gene research, a genetic approach to plant biochemistry". Blonstein, A. D. y King, P. J. eds. Springer-Verlag, Wien. pp: 1-34
- Reid, J. B. (1990) "Phytohormone mutants in plant research". *J. Plant Growth Regul.* **9**: 97-111
- Rood, S. B., Pharis, R. P., Koshioka, M. y Major, D. J. (1983) "Gibberellins and heterosis in maize. I. Endogenous gibberellin-like substances". *Plant Physiol.* **71**: 639-644
- Rood, S. B., Blake, T. J. y Pharis, R. P. (1983) "Gibberellins and heterosis in maize. II. Response to gibberellic acid and metabolism of [³H]gibberellin A₂₀". *Plant Physiol.* **71**: 645-651
- Rood, S. B., Buzzell, R. I., Mander, L. N. y Pearce, D. y Pharis, R. P. (1988) "Gibberellins: a phytohormonal basis for heterosis in maize". *Science* **241**: 1216-1218
- Sakai-Wada, A. y Nakata, M. (1987) "Effect of gibberellic acid on the ultrastructure and α -amylase activity of aleurone cells of *Avena sativa* L.". *Plant Cell Physiol.* **8**: 1465-1476
- Sánchez-Fernández, R., Unkles, S. E., Campbell, E. I., Macro, J. A., Cerdá-Olmedo, E. y Kinghorn, J. R. (1991) "Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *A. niger niaD* gene-encoding reductase". *Mol. Gen. Genet.* **225**: 231-233
- Sembdner, G., Schneider, G. y Scriber, K. (1988) "Methoden zur Pflanzenhormonanalyse". G. Fischer, Jena.
- Shechter, I. y West, C. A. (1969) "Biosynthesis of gibberellins. IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate". *J. Biol. Chem.* **244**: 3200-3209

- Sidhu, G. S. (1983) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. I. Inheritance of certain cultural traits". *Can. J. Gen. Cytol.* **25**: 93-96
- Sidhu, G. S. (1983) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. II. Natural occurrence and significance of heterokaryosis in sorghum isolates". *Can. J. Bot.* **61**: 3314-3319
- Sidhu, G. S. (1983) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. III. Significance of heterokaryosis in natural occurring corn isolates". *Can. J. Bot.* **61**: 3320-3325
- Sidhu, G. S. (1983) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. IV. Natural occurrence of compatibility alleles at the mating locus". *Can. J. Gen. Cytol.* **25**: 605-608
- Sidhu, G. S. (1984) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. V. Spore killer alleles in *G. fujikuroi*". *J. Heredity* **75**: 237-238
- Sidhu, G. S. (1984) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. VI. Abundance of spore-killer alleles in asexually reproducing natural isolates". *Genetics* **107**: 599
- Sidhu, G. S. (1986) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. VIII. Vegetative compatibility groups". *Can. J. Bot.* **64**: 117-121
- Sidhu, G. S. (1985) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. IX. Vegetative compatibility groups". *Phytopatol.* **75**: 1309
- Sidhu, G. S. (1985) "Characteristics and natural occurrence of *Gibberella fujikuroi* mating groups A and D on sorghum and corn hosts". *Can. J. Bot.* **63**: 562-563
- Sircar, P. K., Dey, B., Sanyal, T., Ganguly, S. N. y Sircar, S. M. (1970) "Gibberellic acid in the floral parts of *Cassa fistula*". *Phytochem.* **9**: 735-736
- Sokolova, E. V. (1969) "Study of the variability of the character of gibberellin formation changed mutants of *Fusarium moniliforme*". *Genetika* **5**: 100-108
- Spector, C. y Phinney B. O. (1966) "Gibberellin production: genetic control in the fungus *Gibberella fujikuroi*". *Science* **153**: 1397-1398
- Spector, C. y Phinney B. O. (1968) "Gibberellin biosynthesis: genetic studies in *Gibberella fujikuroi*". *Physiol. Plant.* **21**: 127-136
- Sponsel, V. M., Hoad, G. V. y Beeley, L. J. (1977) "The biological activities of some new gibberellins (GAs) in six plant bioassays". *Planta* **135**: 143-147
- Steffens, G. L., Byun, J. K. y Wang, S. Y. (1985) "Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. I. Growth

- parameter alterations in apple seedlings". *Physiol. Plant.* **63**: 163-168
- Steffens, G. L. (1988) "Gibberellin biosynthesis inhibitors: comparing growth retarding effectiveness on apple". *Plant Growth Regul.* **7**: 27-36
- Stoddart, J. L., Tapster, S. M. y Jones, T. W. A. (1978) "Temperature dependence of the gibberellin response in lettuce hypocotyls". *Planta* **141**: 283-288
- Stodola, F. H., Raper, K. B., Fennell, D. I., Conway, H. F., Sohns, V. E., Landford, C. T. y Jackson, R. W. (1955) "The microbiological production of gibberellins A and X". *Arch. Biochem. Biophys.* **54**: 240-245
- Stuart, D. A. y Jones, R. L. (1977) "Roles of extensibility and turgor in gibberellin- and dark-stimulated growth". *Plant Physiol.* **59**: 61-68
- Széisi, A. y Hornok, L. (1986) "Genetic distance in fungus genus *Fusarium* measured by comparative computer analysis of isoelectrofocusing esterase profiles". *Acta Phytopathol. Entomol. Hungar.* **21**: 215-230
- Takahashi, N. (1988) "Chemistry of plant hormones" 3^a edición. C.R.C. Press. Boca Raton, Florida.
- Tepe, J. B. y Holzer, F. J. (1967) "Gibberellic acid". *Anal. Methods Pestic.* **67**: 413-422
- Terui, K. y Okagami, N. (1988) "Loss of short-day requirement for dormancy breaking of bulbis from gibberellic acid-treated plants in *Sedum bulbiferum*". *Plant Science* **58**: 129-134
- Upper, C. D. y West, C. A. (1967) "Biosynthesis of gibberellins. II. Enzymic ciclyzation of geranylgeranyl pyrophosphate to kaurene". *J. Biol. Chem.* **242**: 3285-3292
- Valadon, L. R. G. y Mummery, R. S. (1969) "Biosynthesis of neurosporaxantin". *Microbios* **1A**: 3-8
- Varty, K., Arreguín, B., Gómez, M., López, P. J. y Gómez, M. A. (1982) "Effects of abscisic acid and ethylene on the gibberellic acid-induced synthesis of α -amylase by isolated wheat aleurone layers". *Plant Physiol.* **73**: 692-697
- Vass, R. C. y Jefferys, E. G. (1979) "Gibberellic acid" en "Economic microbiology, Vol. 3. Secondary products of metabolism" Rose, A. H. ed. Academic Press. London, New York, San Francisco. pp:421-433

- Verbiscar, A. J., Cragg, G., Geissman, T. A. y Phinney B. O. (1967) "Studies on the biosynthesis of gibberellins II. The biosynthesis of gibberellins from (-)kaurenol, and the conversion of gibberellins [^{14}C]GA₄ and [^{14}C]GA₇ into [^{14}C]GA₃ by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **6**: 807-814
- Wang, S. Y., Byun, J. K. y Steffens, G. L. (1985) "Controlling plant growth via the gibberellin biosynthesis system. II. Biochemical and physiological alterations in apple seedlings". *Physiol. Plant.* **63**: 169-175
- Weaver, R. J. (1958) "Effects of gibberellic acid on fruit set and berry enlargement in seedless grapes of *Vitis vinifera*". *Nature* **181**: 851-852
- West, C. A. y Phinney, B. O. (1956) "Properties of gibberellin-like factors from extracts of higher plants". *Plant Physiol.* **31** (Suppl): XX
- Williams, M. W. y Stahly, E. A. (1969) "Effects of cytokinins and gibberellins on shape of "Delicious" apple fruits". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **94**: 17-19
- Yabuta, T. y Sumiki, Y. (1944) "Biochemistry of the *bakanae* fungus of rice. Part 18: Action of gibberellin on the growth of buds of *Paulownia tomentosa*". *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **14**: 1526
- Zeevaart, J. A. D. (1983) "Gibberellins and flowering" en "The biochemistry and physiology of gibberellins" Vol II; Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 333-374

AGRADECIMIENTOS

A Enrique Cerdá Olmedo, director de esta Tesis. Su constante apoyo, interés y dedicación han hecho posible la realización de este trabajo.

A Peter M. Bramley, en cuyo laboratorio fueron realizados los análisis preliminares de los mutantes *gib*.

A los miembros del Departamento de Química Orgánica de Granada por su ayuda.

A Carlos Domenech por sus comentarios y sugerencias.

A Javier y Dudu por enseñarme en mis comienzos.

A Antonio Marín por su existencia.

A Maricarmen por soportar estoicamente a todos y cada uno de nosotros y por salvar la colección de *Gibberella*.

A Rocío por hacerme perder el tiempo. A Viki, Bina y Rafaflores por diluir a Enrique.

A mi aliado ACC por el pacto de no agresión. A Miguel, por su comentario. A Quique por su ayuda con los ordenadores. A Maripepa por prácticamente todo. A Enca por sus tartas y a Cayo por sus postales.

A Rafa Maldonado, por haber respetado mi integridad física, aunque no mental. A Andrés por tamponar a Rafa. A Amando, que en realidad no ha hecho nada, pero bueno... A Edu, por no parecer titular.

A Antoñito Hidalgo, el estresado, no sé muy bien por qué. A Jesús que Cruz, por entretener a Antoñito Hidalgo.

A Pepe Casadesús por no explicarnos la etimología de la palabra fideo y por limpiar con Centella el ordenador. A María José por el año que estuvo aquí.

A mis compañeros de la carrera, sobre todo a Regla que le gusta mucho ver su nombre impreso y a Sonia, por aparecer en el momento oportuno y recordarme todo lo que les tengo que agradecer.

A Pepe Córdoba y Luis por fregar los tubos.

A todos aquéllos que contribuyeron a mi estabilidad mental.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHILE

Ma de las Reyes Caudau Chacon
Produccion de Jiberelinas por Jabbrella
Fujkuroi

APTO CUM LAUDE

POR UNANIMIDAD
28

junio

91

El Vicerrector




El Decano


El Presidente

El Secretario

El Decano

