

R. 11713

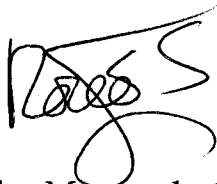
TD-546

El Jefe de Trabajos de Grado,  
Rocío Sánchez Fernández

**TRANSFORMACION Y BIOSINTESIS  
DE GIBERELINAS EN *GIBBERELLA FUJIKUROI***

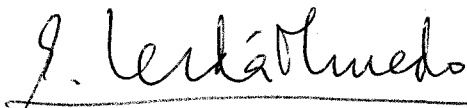
Trabajo realizado en el Departamento de Genética  
de la Universidad de Sevilla para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas por la Licenciada

**Rocío Sánchez Fernández**




Sevilla, Marzo de 1993

Directores:



Prof. Enrique Cerdá Olmedo  
Catedrático de Genética



Dr. Javier Avalos Cordero  
Profesor Titular de Genética

**INDICE**

## 1. INTRODUCCION

1.1. <i>Gibberella fujikuroi</i> . . . . .	8
1.2. Los terpenoides de <i>Gibberella</i> . . . . .	9
1.2.1. Las giberelinas. . . . .	11
Biosíntesis de giberelinas. . . . .	12
Producción de giberelinas por <i>Gibberella</i> . . . . .	14
Alteraciones de la producción. . . . .	15
Regulación de la producción de giberelinas por <i>G. fujikuroi</i> . . . . .	16
Aplicaciones de las giberelinas. . . . .	17
1.2.2. Los carotenoides de <i>Gibberella</i> . . . . .	18
1.2.3. Relación entre las síntesis de carotenoides y giberelinas en <i>G. fujikuroi</i> . . . . .	19
1.3. Genética de <i>Gibberella</i> . . . . .	20
1.3.1. Ciclo sexual. . . . .	20
1.3.2. Ciclo parasexual. . . . .	21
Obtención de protoplastos. . . . .	22
Heterocariosis. . . . .	22
Transformación. . . . .	23

## 2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Estirpes. . . . .	28
2.2. Plásmidos. . . . .	29
2.3. Medios de cultivo. . . . .	30
2.3.1. Medios de cultivo para <i>Gibberella</i> . . . . .	30
2.3.2. Medios de cultivo para <i>E. coli</i> . . . . .	31
2.4. Tampones y soluciones. . . . .	32
2.4.1. <i>Gibberella</i> . . . . .	32
2.4.2. <i>E. coli</i> . . . . .	33
2.4.3. Tampones y soluciones utilizados para la manipulación <i>in vitro</i> de ADN. . . . .	33
2.5. Métodos de Biología Molecular. . . . .	34
2.5.1. Transformación de <i>E. coli</i> . . . . .	34
2.5.2. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> . . . . .	35
2.5.3. Cuantificación de ADN. . . . .	36
2.5.4. Manipulación enzimática del ADN. . . . .	36

2.5.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.	36
2.5.6. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. . . . .	37
2.5.6. Detección de secuencias de ADN mediante hibridación por el método de Southern. . . . .	37
2.6. Inoculación y condiciones de cultivo de <i>Gibberella</i> . . . . .	38
2.6.1. Conservación de las estirpes . . . . .	38
2.6.2. Obtención de microconidios. . . . .	38
2.6.3. Producción de giberelinas. . . . .	39
2.6.4. Obtención de protoplastos. . . . .	39
2.7. Tratamientos mutagénicos. . . . .	40
2.7.1. Mutagénesis. . . . .	40
2.7.2. Selección de mutantes. . . . .	40
2.8. Medidas de peso seco y giberelinas. . . . .	41
2.8.1. Medida de peso seco. . . . .	41
2.8.2. Medida de giberelinas. . . . .	41

### 3. RESULTADOS

3.1. Transformación de <i>Gibberella fujikuroi</i> . . . . .	43
3.1.1. Obtención de protoplastos de <i>Gibberella</i> . . . . .	43
3.1.2. Aislamiento de mutantes afectados en la asimilación de nitrato. . . . .	49
3.1.3. Transformación de <i>G. fujikuroi</i> con ADN exógeno. . . . .	51
3.2. Regulación por nitrógeno de la biosíntesis de giberelinas. . . . .	57
3.2.1. Producción de giberelinas por los mutantes de la ruta de asimilación de nitrato. . . . .	57
Mutantes de la reductasa del nitrato. . . . .	59
Mutantes de la reductasa del nitrito. . . . .	63
Dobles mutantes. . . . .	65
Mutantes auxótrofos de asparragina. . . . .	65
3.2.2. Rezumancia de los mutantes <i>nia</i> . . . . .	68
3.2.3. Efecto de fuentes de nitrógeno orgánicas sobre la producción de giberelinas. . . . .	75

4. DISCUSION	
4.1. Biología molecular de <i>Gibberella</i> .....	79
4.2. Regulación de la biosíntesis de giberelinas. . . . .	83
5. CONCLUSIONES.....	87
6. BIBLIOGRAFIA.....	90
AGRADECIMIENTOS.....	104

# **1. INTRODUCCION**

## 1.1. *GIBBERELLA FUJIKUROI*

Se denomina *Fusarium* a un género de hongos imperfectos (Link 1809) caracterizado por sus conidios no septados y fusiformes. Los fitopatólogos aislan con frecuencia ejemplares de este género, especialmente en climas templados y tropicales. La intensa atención que ha recibido se debe a que incluye muchas especies patógenas de plantas de interés comercial, como el arroz, el maíz o la caña de azúcar.

La clasificación del género *Fusarium* en especies ha sido dificultada históricamente por la ausencia de ciclo sexual y la escasez de rasgos morfológicos fácilmente observables. Ello explica que se hayan definido más de mil especies, muchas de ellas correspondientes a nuevos aislamientos en especies vegetales en las que no se había encontrado *Fusarium*. Los criterios actuales de clasificación, basados en la morfología de las esporas (macroconidios, de 20-100 X 2-5  $\mu\text{m}$ , o microconidios, de 2-12 X 1-3  $\mu\text{m}$ ), la tasa de crecimiento en agar y la pigmentación, reducen el número de especies a unas cincuenta (Kommedahl 1979; Marín 1986; Széisi y Hornok 1986; Ellis 1988).

De acuerdo con los criterios aludidos, la especie *F. moniliforme* se caracteriza por la presencia de microconidios de unos 5-12 X 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  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 y Lonsane 1987).

Las formas del género *Fusarium* que son capaces de llevar a cabo el ciclo sexual (es decir, lo que se conoce como estado perfecto) se transfieren al género *Gibberella* (Wollenweber 1931). El estado perfecto de *Fusarium moniliforme* se denomina *Gibberella fujikuroi* y pertenece a la clase *Pyrenonyctes* de la subdivisión *Ascomycotina* (división *Eumycota*). También pertenecen a esta subdivisión otros hongos muy usados en trabajos genéticos y fisiológicos, como los de los géneros *Aspergillus* y *Saccharomyces*. *G. fujikuroi* comprende estirpes patógenas de muy diversas plantas, como el pino, la caña de azúcar, el sorgo, el maíz y el arroz. Normalmente se reproduce de forma asexual mediante la producción de conidios. En

ciertas condiciones de laboratorio se puede reproducir sexualmente añadiendo conidios de una estirpe de sexo (+) al micelio de otra de sexo (-). Varios días después se producen unas estructuras denominadas peritecios, que contienen en su interior las ascosporas (productos meióticos). Los peritecios son de forma globosa o cónica, tienen un tamaño de 250-350  $\mu\text{m}$  de alto X 220-300  $\mu\text{m}$  de diámetro y son de color azul oscuro. Las ascas son elipsoidales y tienen de 4 a 8 ascosporas desordenadas uniseriadas o biseriadas en disposición oblicua. Las ascosporas, de 14-18 X 4,5-6  $\mu\text{m}$ , son hialinas, elipsoidales y suelen presentar 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 subespecie *intermedia*, es patógena del arroz y tiene la capacidad de producir giberelinas, compuestos pertenecientes a la familia de los terpenoides.

## 1.2. LOS TERPENOIDES DE *GIBBERELLA*

Los terpenos son compuestos químicos en cuya estructura se observa la repetición de una unidad básica de cinco carbonos: el isopreno (2-metil-1,3-butadieno). Los monoterpenos ( $\text{C}_{10}$ ) proceden de la condensación de un compuesto de cinco carbonos, el pirofosfato de isopentenilo (IPP), con un isómero de este. Nuevas adiciones de IPP a la cadena, o la duplicación por condensación de dos moléculas iguales generan los sesquiterpenos ( $\text{C}_{15}$ ), los diterpenos ( $\text{C}_{20}$ ), los triterpenos ( $\text{C}_{30}$ ) y los tetraterpenos ( $\text{C}_{40}$ ). Los terpenos modificados por reacciones de adición, ciclación, oxidación u otras se llaman terpenoides y están representados en la naturaleza por varios miles de compuestos muy variados, desde pequeñas moléculas, como el mentol, a grandes polímeros, como el caucho.

Además de los terpenoides esenciales para su vida, como los esteroides, (componentes de las membranas), la ubiquinona (compo-



nente de la cadena respiratoria) y el dolicol (mediador de la glucosilación de proteínas), *G. fujikuroi* sintetiza otros terpenoides, entre los que cabe destacar los carotenoides y las giberelinas.

Todos los terpenoides se sintetizan a partir de un precursor común, el hidroximetilglutaril coenzima A, que inicialmente se reduce a mevalonato (Figura 1).

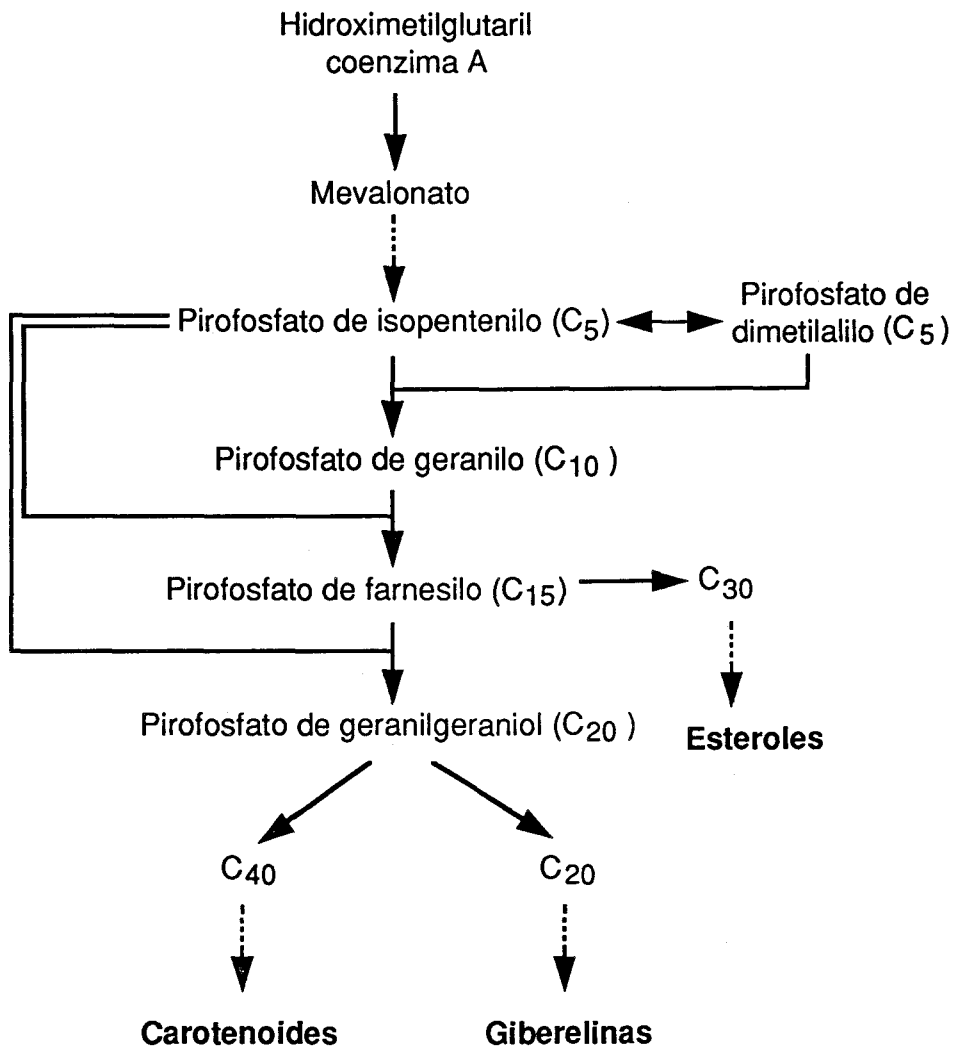


Figura 1. Esquema de la biosíntesis de esteroides, carotenos y giberelinas.

### 1.2.1. Las giberelinas

Las giberelinas son hormonas vegetales reguladoras del crecimiento. Su descubrimiento parte de la identificación de un hongo como causante de una enfermedad del arroz conocida en Japón como *bakanae*. Esta enfermedad se caracteriza por un crecimiento anormal de las plántulas (Hori 1898). Las investigaciones encaminadas a identificar el agente fúngico causante de las alteraciones en el crecimiento culminaron tres décadas después con el descubrimiento de un principio activo en los filtrados de cultivos de este hongo (Kurosawa 1926); este compuesto se identificó inicialmente como una "toxina" que produce el alargamiento de los tallos de las plántulas de arroz, daña el crecimiento de la raíz e interfiere con la formación de la clorofila. Tal compuesto producía síntomas similares en otras plantas y era especialmente estable, ya que conservaba su actividad tras 4 horas a 100 °C.

Entre 1927 y 1940 aparecieron más de 50 publicaciones dedicadas al estudio de las propiedades biológicas y químicas de la "toxina". En 1934 se purificó una sustancia cristalina que carecía de actividad biológica y que fue posteriormente identificada como ácido fusárico, un derivado del ácido picolínico (Yabuta 1934). La introducción de cambios en la composición del medio de cultivo permitió la obtención de extractos con alta actividad biológica, de los que pudo aislarse una sustancia cristalina que se denominó "giberelina" (Yabuta *et al.* 1935).

El interés por estas sustancias se extendió pronto al mundo occidental (Mitchell y Angel 1951), donde de forma independiente, Curtis y Cross (1954) en Gran Bretaña y Stodola *et al.* (1955) en EEUU purificaron dos sustancias que denominaron ácido giberélico y giberelina X, respectivamente. Los análisis químicos posteriores de estas sustancias demostraron que se trataba del mismo compuesto, que se denominó definitivamente ácido giberélico (Revisión, Phinney 1983).

Aunque las giberelinas se descubrieron como metabolitos secundarios de *G. fujikuroi*, su presencia está muy extendida en el mundo vegetal (Phinney 1956; Phinney y West 1960; Tepe y Holzer 1967; Cross *et al.* 1968); la pequeña concentración a la que ejercen

su acción explica el retraso en el descubrimiento de su presencia en las plantas. En 1951 se describió la presencia de sustancias estimuladoras del crecimiento en extractos de semillas inmaduras de soja y cebada (Mitchell *et al.* 1951; Goodwin y Mercer 1963; Jones *et al.* 1963), y posteriormente se descubrió la existencia de giberelinas en plantas superiores adultas (Radley 1956; West y Phinney 1956; Elson *et al.* 1964).

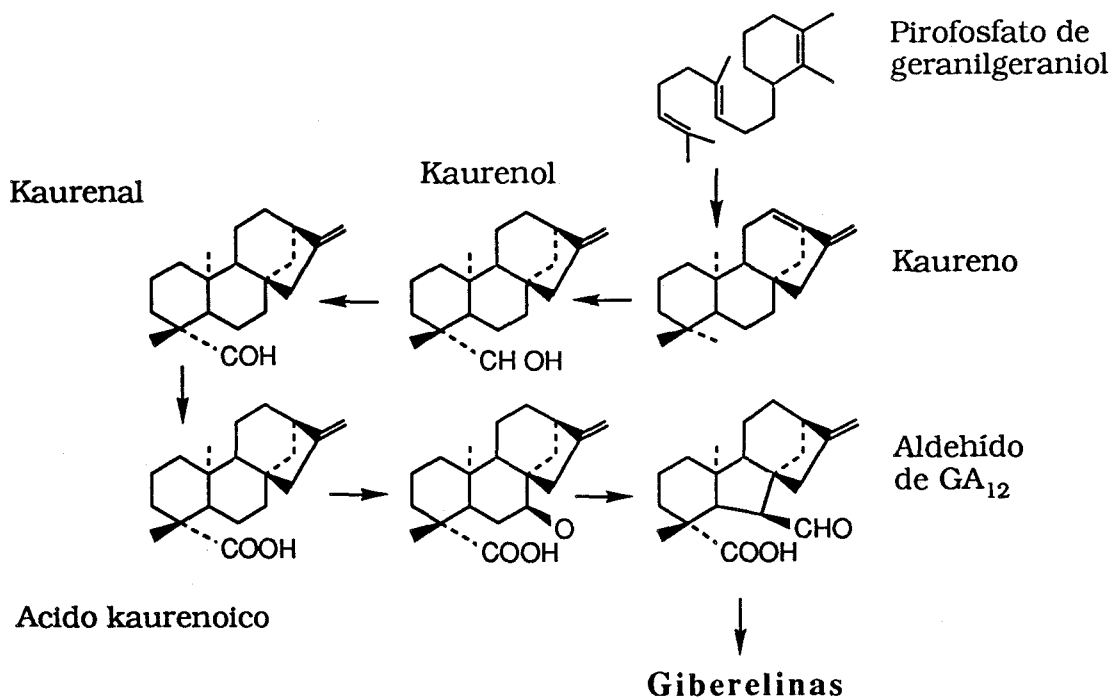
Al contrario que las plantas y otros hongos, *Gibberella* produce cantidades muy considerables de giberelinas, lo que explica su uso para la obtención de dicho compuesto a escala industrial. La giberelina más abundante en *G. fujikuroi* es el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), aunque también están presentes en menor cantidad otras giberelinas, entre ellas GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>13</sub> y GA<sub>14</sub> (Hedden *et al.* 1978; Hedden 1983, 1987).

En la actualidad se conocen más de setenta giberelinas, muchas de ellas descubiertas en *Gibberella* y otras presentes solamente en las plantas (Jones 1973; Crozier 1983; Graebe 1987).

## Biosíntesis de giberelinas

Como se muestra en la Figura 2, las giberelinas se sintetizan a partir del pirofosfato de geranilgeraniol (Shechter y West 1969), que se convierte en *ent*-kaureno mediante la formación de cuatro anillos (Upper y West 1967). Posteriormente el *ent*-kaureno sufre varios pasos de oxidación para dar ácido kaurenoico (Verbiscar *et al.* 1967; Jones *et al.* 1968; Fall y West 1971). La primera giberelina propiamente dicha, es decir, con efectos sobre el crecimiento vegetal, es el aldehído de GA<sub>12</sub>. Este compuesto posee la estructura característica de las giberelinas, dos anillos pentagonales y dos hexagonales. Las demás giberelinas derivan del aldehído de GA<sub>12</sub> por distintas reacciones (Cross *et al.* 1964; Cross y Norton 1965; Geissman *et al.* 1966; Dennis y West 1967; Lang 1970; Cross y Filippone 1981; Coolbaugh 1983; Bearder *et al.* 1982; Revisión: Takahashi 1988).





**Figura 2.** Síntesis del aldehído de GA<sub>12</sub> a partir del pirofosfato de geranilgeraniol.

La mayoría de la información disponible en la actualidad sobre la biosíntesis de giberelinas se basa en el empleo de sustratos marcados radiactivamente (Maki *et al.* 1986) y en los ensayos biológicos (Varty *et al.* 1982). De esta forma ha sido posible la detección de varios mutantes afectados en la síntesis de giberelinas. Uno de ellos es un mutante espontáneo, denominado R-9 (Bearder *et al.* 1973); un segundo mutante, B1-41a, fue obtenido mediante tratamiento con radiación ultravioleta (Bearder *et al.* 1974). El análisis genético de estos mutantes permitió identificar los dos primeros genes específicos de la biosíntesis de giberelinas; uno de ellos controla la oxidación de *ent*-kaurenal a *ent*-kaurenico por lo que los mutantes en este gen no producen giberelinas (Bearder *et al.* 1974). El otro gen es responsable de la de hidroxilación que

da lugar a la síntesis de GA<sub>1</sub> o GA<sub>3</sub> a partir de GA<sub>4</sub> o GA<sub>7</sub>, respectivamente; las estirpes alteradas en este gen acumulan por tanto los intermediarios GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>. La estirpe R-9 es un mutante del primer gen, mientras que B1-41a lo es del segundo (Cross *et al.* 1963; Spector y Phinney 1968; Pitel *et al.* 1971).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha desarrollado un método rápido y sencillo que permite estimar el contenido de giberelinas de una muestra de cultivo (Candau *et al.* 1991). La aplicación de este método, basado en la reacción de las giberelinas con el ácido sulfúrico para dar un derivado fluorescente, ha permitido el aislamiento de numerosos mutantes. Los mutantes encontrados se diferencian en la producción de giberelinas, tanto cuantitativa como cualitativamente (Fernández Martín, comunicación personal).

### **Producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi***

La biosíntesis de giberelinas es un ejemplo clásico de metabolismo secundario, donde la producción empieza cuando se desequilibra o cesa el crecimiento. La producción de giberelinas tiene lugar en unas condiciones de cultivo caracterizadas normalmente por una elevada relación carbono/nitrógeno. Durante la fase de crecimiento equilibrado, la captación de glucosa, nitrógeno y otros nutrientes permanece constante. La fase siguiente (fase de almacenamiento) se alcanza cuando se agota la escasa fuente de nitrógeno. En dicha fase, el peso seco del micelio continúa aumentando debido a la acumulación de lípidos y de hidratos de carbono a expensas de la fuente de carbono presente aún en el medio. Esta fase se caracteriza por el rápido inicio de la producción de giberelinas (Borrow *et al.* 1961, 1964).

Las fuentes de carbono que se emplean habitualmente son la glucosa y la sacarosa. Otras fuentes de carbono, como el glicerol (Brückner y Blechschmidt 1991) y el manitol (Candau *et al.* 1992) se han descrito como muy apropiadas. Las concentraciones muy altas de fuente de carbono (en particular de glucosa) inhiben la síntesis de giberelinas (Borrow *et al.* 1964; Candau *et al.* 1992). Para evitar la inhibición se han desarrollado procesos de alimentación en los que se añade progresivamente glucosa durante la fase

de producción, de modo que la concentración se mantenga siempre por debajo de los 40 g/l. Otra forma de evitar la inhibición por glucosa es usar como fuente de carbono aceites vegetales (Murontsev y Dubovaya 1964), polímeros de carbohidratos, como el almidón, o mezclas de fuentes de carbono de asimilación rápida y lenta (Darken *et al.* 1959; Fuska *et al.* 1961; Borrow *et al.* 1964; Vass y Jefferys 1979).

La fuente de nitrógeno es un factor decisivo en la síntesis de giberelinas, tanto por la naturaleza de la fuente empleada como por la cantidad utilizada. Favorecen la síntesis de giberelinas el sulfato amónico, el cloruro amónico y las fuentes de nitrógeno que se asimilan lentamente, como la glicocola y el tartrato amónico; el acetato amónico es mucho menos efectivo (Fuska *et al.* 1961; Jefferys 1973).

Los medios de cultivo de *Gibberella* también contienen fuentes de magnesio, potasio, fósforo y azufre. Los elementos traza suelen ser aportados como impurezas de los ingredientes comerciales (Vass y Jefferys 1979).

Para alcanzar una producción máxima de giberelinas se recomienda cultivar el organismo en dos etapas, una de crecimiento a 31-32 °C y otra de producción a 29 °C; el aporte de oxígeno es imprescindible para la producción de giberelinas (Borrow *et al.* 1955, 1961, 1964; Jefferys 1973).

## **Alteraciones de la producción de giberelinas**

Las condiciones de cultivo modifican la producción de giberelinas. Por ejemplo, la composición de la mezcla de giberelinas producida varía con el pH del medio. En las condiciones habituales de cultivo predomina el ácido giberélico. En medios alcalinos disminuye el ácido giberélico en favor de GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub>, GA<sub>14</sub> y GA<sub>16</sub>. Este efecto del pH se atribuye a una mayor disociación a alto pH de los intermediarios expulsados al medio de cultivo, lo que hace que no puedan volver a entrar en el micelio para ser metabolizados (Bearder 1983).

Cuando el hongo se cultiva con una fuente de nitrógeno compleja, como péptidos, se producen cantidades relativamente

altas de GA<sub>1</sub>, GA<sub>16</sub> y GA<sub>47</sub> en comparación a las producidas en medios sintéticos (McInnes *et al.* 1977). Este efecto se ha atribuido a la inhibición por nitrógeno inorgánico de la deshidrogenación de GA<sub>4</sub> a GA<sub>7</sub>; las fuentes de nitrógeno complejas liberan nitrógeno lentamente, que inhibiría la 1,2-deshidrogenasa de la GA<sub>4</sub> y se acumularían GA<sub>1</sub>, GA<sub>47</sub>, GA<sub>16</sub> y GA<sub>4</sub> (Bearder 1983).

Por último, el zinc y el cobre estimulan preferentemente la síntesis de GA<sub>4</sub> (investigadores japoneses citados por Brückner *et al.* 1989).

### **Regulación de la producción de giberelinas por *Gibberella***

Se han propuesto dos modelos alternativos que explican la relación entre la biosíntesis de giberelinas y la supresión del crecimiento. El primero propone la existencia de una sustancia inhibidora de la síntesis de giberelinas que desaparece al detenerse el crecimiento. El otro propone una sustancia activadora de la síntesis de giberelinas que se empieza a sintetizar al detenerse el crecimiento. Ambos modelos son equivalentes y producirían los efectos observados en la producción de giberelinas (Bu'lock *et al.* 1974).

La producción de giberelinas no está necesariamente ligada a la detención del crecimiento: cuando el crecimiento se detiene por agotamiento de otros nutrientes (por ejemplo, las fuentes de carbono o fósforo), no hay síntesis de giberelinas. Recientemente se ha demostrado que el factor desencadenante de la biosíntesis de giberelinas es el agotamiento de la fuente de nitrógeno, pero todavía no es posible decidir entre regulación por activación o por inhibición (Candau *et al.* 1992).

La regulación por nitrógeno de la síntesis de giberelinas parece ser un mecanismo común a todas las estirpes de *Gibberella*, ya que en todos los casos descritos los medios de cultivo adecuados para la producción tienen en común un contenido muy bajo de nitrógeno frente a una elevada concentración de carbono. Existen sin embargo diferencias entre estirpes: cierta estirpe silvestre seleccionada por su elevada producción de giberelinas sigue produciéndolas en presencia de nitrógeno, aunque en menor cantidad

(Brückner y Blechschmidt 1991). Esto sugiere que pueda tratarse de una estirpe parcialmente desregulada.

Parte de los experimentos descritos en esta tesis van encaminados a profundizar en el mecanismo de regulación por nitrógeno.

## Aplicaciones de las giberelinas

Las giberelinas se utilizan en agricultura, horticultura y procesos industriales. Su aplicación en estos campos se basa en su actividad reguladora del crecimiento vegetal, sustituyendo o intensificando la actividad de las hormonas endógenas (Sponsel *et al.* 1977; Reid 1990). De las más de setenta giberelinas conocidas, solo se usan comercialmente el ácido giberélico y, más raramente, las mezclas de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>.

El ácido giberélico se emplea principalmente en la industria cervecera y en la agricultura. Sus usos en la agricultura son muy diversos. Su principal aplicación es la producción de uva, donde regula la época de recolección, incrementa el rendimiento y mejora la calidad de la cosecha (Rappaport 1979). Su aplicación a las variedades sin semillas, con bajas cantidades de giberelinas endógenas, tiene como resultado un aumento de tamaño (Weaver 1958). El ácido giberélico se usa en otros cultivos, como ejemplo el de los cerezos, donde permite obtener frutos mayores y más firmes, reduciendo las picaduras en la piel y las magulladuras durante el transporte y almacenamiento (Looney y Lidster 1980); patatas, donde rompe la dormancia, permitiendo la recogida de dos o tres cosechas en una estación, acelera la aparición de raíces e incrementa el número de tallos y tubérculos producidos (Metzger 1983); y cítricos, donde mejora la calidad de la fruta, prolongando la vida media del fruto, reduciendo el riesgo de enfermedades e incrementando el tamaño y el número total de frutos (Coggins y Henning 1988). También se aplica a menor escala a otros cultivos (Sircar *et al.* 1970; Koranski *et al.* 1979; Kaufman *et al.* 1981; Zeevart 1983; Rood *et al.* 1983, 1988; Steffens *et al.* 1985; Wang *et al.* 1985; Steffens 1988; Terui y Okagami 1988).

En la industria cervecera el ácido giberélico acelera el malteado (Paleg 1960; Hardie 1975). 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  $\alpha$ -amilasa y diastasa, que degradan los hidratos de carbono de las paredes y las proteínas y el almidón presentes en el endospermo. La adición de pequeñas cantidades de GA<sub>3</sub> acelera la producción y liberación de las enzimas, acortando el malteado de uno a tres días (Jacobsen 1983; Jacobsen y Beach 1985; Deikman y Jones 1985; Sakai-Wada y Nakata 1987; Huttly y Baulcombe 1989).

Las giberelinas A<sub>4</sub> y A<sub>7</sub> poseen actividades biológicas específicas diferentes de las del ácido giberélico (Thomas 1985; Looney *et al.* 1985; Meador y Taylor 1987). Debido a que la separación de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> es muy cara, ambas giberelinas se venden y se aplican mezcladas.

Uno de los efectos más espectaculares, y probablemente de mayor interés, de la mezcla GA<sub>4</sub>/GA<sub>7</sub> es la inducción de la floración en ciertas especies de coníferas, especialmente en las pertenecientes a la familia *Pinaceae* (Pharis *et al.* 1980; Pharis y King 1985). Este efecto puede tener importancia económica y comercial en el futuro, ya que algunos de los bosques más importantes del planeta tienen problemas de regeneración a causa de la poca frecuencia de buenos años en la producción de semillas (hay que tener en cuenta que en algunos árboles de este tipo la floración se da aproximadamente cada 10 años). La producción de piñas también aumenta con el tratamiento hormonal en muchas especies de *Pinaceae*, como *Picea glauca* (Ho 1988), *Picea mariana* (Ho 1988), *Picea sitchensis* (Tompsett y Fletcher 1979) y *Pinus banksiana* (Cecich 1983).

### 1.2.2. Los carotenoides de *Gibberella*

Los carotenoides son tetraterpenos, formados por tanto por ocho unidades isoprenoideas (un total de cuarenta átomos de carbono). En la actualidad se conocen más de 400 carotenoides naturales, que se han encontrado en bacterias, algas, hongos, plantas superiores y animales. Estos últimos son incapaces de sintetizarlos, por lo que los obtienen a partir de la dieta (Davies 1965).

Hay varios tipos de carotenoides: los hidrocarbonados o carotenos, y los que contienen oxígeno, llamados xantofilas. Los

apocarotenoides son compuestos derivados de los carotenoides por pérdida secundaria de átomos de carbono.

*Gibberella fujikuroi* sintetiza principalmente neurosporaxantina (ácido 4'-apo- $\beta$ -caroten-4'-oico) (Aasen y Jensen 1965), y cantidades menores de otros carotenos, como  $\beta$ -caroteno, licopeno, toruleno y fitoeno (Avalos y Cerdá Olmedo 1987).

El análisis de diversos mutantes ha permitido profundizar en los detalles estructurales y regulatorios de la ruta de síntesis de los carotenos. Así, desde un punto de vista bioquímico, el comportamiento de ciertos mutantes rezumantes sugiere que en *Gibberella* una misma enzima lleva a cabo las cinco deshidrogenaciones entre fitoeno y toruleno (Avalos y Cerdá-Olmedo 1987). La regulación muestra semejanzas y diferencias con otros organismos: está regulada por la luz, pero carece de regulación por producto final (Avalos y Cerdá Olmedo 1986, 1987; Avalos y Schrott 1990), mecanismo que regula la síntesis de  $\beta$ -caroteno en *Phycomyces blakesleeanus* (Murillo y Cerdá-Olmedo 1976). El análisis de mutantes ha llevado a proponer un mecanismo de regulación mediado por dos productos génicos, un represor y un correpresor fotosensibles. Ciertos experimentos realizados *in vitro* indican que el represor actúa sobre la síntesis de las enzimas de la carotenogénesis (Avalos *et al.* 1988).

### 1.2.3. Relación entre las síntesis de carotenoides y giberelinas en *G. fujikuroi*

Los carotenoides se producen durante el crecimiento de *Gibberella*, mientras que las giberelinas se empiezan a sintetizar cuando cesa el crecimiento.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que el incremento de la carotenogénesis en mutantes superproductores de neurosporaxantina se compensa aproximadamente con una bajada en la síntesis de giberelinas (Candau *et al.* 1991). En la dirección opuesta ocurre lo mismo, ya que los mutantes albinos aumentan la síntesis de giberelinas.

Esta compensación entre las rutas de carotenoides y giberelinas no ocurre en los mutantes carentes de giberelinas; el desvío a

la ruta de los carotenoides de los precursores de las giberelinas incrementaría la producción de neurosporaxantina unas 100 veces.

En *Phycomyces* los carotenoides son sintetizados por un gran complejo enzimático (Cerdá Olmedo 1987) y probablemente en *Gibberella* también. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio sugieren que al bloquear el funcionamiento del complejo (mutantes *car*), los precursores se desvían hacia la ruta de las giberelinas. Para que esto ocurra los carotenoides y las giberelinas deberían sintetizarse en el mismo compartimento celular.

### 1.3. GENETICA DE *GIBBERELLA*

*Gibberella fujikuroi* es un hongo heterotálico. Se han descrito cuatro grupos de cruzamiento, que son intrafértiles e interestériles (Kathariou 1981; Kuhlman 1983). Generalmente, los aislamientos obtenidos de plantas de distintas especies son incompatibles, es decir, pertenecen a distintos grupos de cruzamiento (Hsieh *et al.* 1977).

El ciclo sexual parece ser poco frecuente en la naturaleza y difícil de reproducir en el laboratorio. La mutación, la parasexualidad y la heterocariosis pueden contribuir más que el ciclo sexual a la generación de la variabilidad genética de este organismo. En particular, la heterocariosis puede ser especialmente apropiada en los casos en que sea necesaria una adaptación rápida y oportunista (Sidhu 1983).

#### 1.3.1. Ciclo sexual

La genética de *G. fujikuroi* fue iniciada por Gordon, que pudo cruzar ocasionalmente algunas de las estirpes de su extensa colección, demostrando que el hongo era heterotálico y que el sexo estaba controlado por un par de alelos (Gordon 1960).

En el laboratorio la obtención de peritecios era un fenómeno errático y azaroso hasta que se descubrió que el ciclo sexual puede inducirse añadiendo al medio de cultivo tallos de *Citrus medica* (Spector y Pinney 1966, 1968). De esta forma, los peritecios apare-

cen a las 3-6 semanas. El número máximo de ascosporas por asca es de 8.

Los cruces entre estirpes productoras y no productoras de giberelinas de la colección de Gordon dan siempre una segregación 1:1. Otros caracteres genéticos, como el sexo, el color, la morfología y la velocidad de crecimiento, también dan segregaciones 1:1 (Spector y Phinney 1966, 1968; Phinney y Spector 1967).

Las dificultades para reproducir el ciclo sexual en condiciones controladas han hecho que se preste una mayor atención a otras formas de inducir variabilidad genética, como la mutagénesis. Son numerosos los tratamientos mutagénicos que se han empleado con éxito en *G. fujikuroi*, como rayos  $\gamma$ , radiación ultravioleta, metanosulfonato de etilo, N-nitrosourea, etilamina, y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Imshenetsky y Ulyanova 1962; Sokolova 1969; Erokhina y Sokolova 1966; Erokhina y Efremov 1970; Avalos *et al.* 1983, 1985; Kölblin *et al.* 1990).

La estirpe IMI58289 de *Gibberella* empleada en este trabajo es muy adecuada para la inducción y aislamiento de mutantes, ya que al producir exclusivamente conidios uninucleados permite la expresión de mutaciones recesivas y el aislamiento de las células que las contienen (Avalos *et al.* 1985).

La mutación y la selección es actualmente el método más importante de mejora de la producción de giberelinas. Sin embargo, debido a que la mayoría de este tipo de investigaciones se lleva a cabo en laboratorios industriales, los datos que se hayan obtenido no han sido publicados.

### 1.3.2. Ciclo parasexual

Además de la mutagénesis, la recombinación parasexual es también un método muy adecuado para la producción de estirpes mejoradas. Aquí se incluyen la formación de heterocariontes, su diploidización y segregación y la transformación. En ambos casos las técnicas más eficientes pasan por la formación eficaz de protoplastos viables.

## Obtención de protoplastos

En hongos filamentosos los protoplastos se obtienen degradando la pared celular con las enzimas líticas adecuadas. Según la composición química de la pared, cada hongo requiere la utilización de distintas enzimas, no siempre disponibles comercialmente.

El primer método de obtención de protoplastos de *G. fujikuroi* estaba basado en la incubación del micelio con una mezcla estabilizada y liofilizada de preparaciones enzimáticas obtenidas a partir del caracol *Helix pomatia* (Harris 1982). De esta forma se obtienen muchos protoplastos, pero no son viables; es decir, no regeneran su pared celular en medios osmoestabilizados y no sirven para experimentos de transformación o fusión.

La utilización de enzimas líticas del hongo *Trichoderma harzianum* produce protoplastos viables, pero exige preparaciones enzimáticas no comerciales y de obtención laboriosa, lo que dificulta el proceso (Brückner *et al.* 1990).

Uno de los objetivos iniciales de esta tesis fue la obtención de protoplastos viables usando enzimas comerciales.

## Heterocariosis

En *Gibberella* se pueden producir heterocariontes tanto en la naturaleza (Sidhu 1983; Ming *et al.* 1966) como artificialmente por anastomosis espontánea de hifas (Adams *et al.* 1987).

Todas las subespecies de *Gibberella* tienen genes de incompatibilidad vegetativa (genes *vic*), aunque en distinto número; hasta el momento solo se han encontrado dos alelos de cada gen *vic*. Para que dos estirpes de *G. fujikuroi* formen un heterocarionte por anastomosis de hifas es imprescindible que sus alelos *vic* sean 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; Sidhu 1985, 1986; Correll *et al.* 1987, 1989).

En el laboratorio, el método clásico de obtención de heterocariontes en hongos filamentosos es mediante anastomosis espontánea de hifas de estirpes con distintas auxotrofías y posterior selección en medio mínimo. Sin embargo, en *Gibberella*, los heterocariontes obtenidos por este sistema no son heterocariontes propiamente dichos, sino que sólo se funden una o pocas células, y el resto del micelio vive a expensas de ellas. Otro método muy empleado en el laboratorio es la fusión de protoplastos, pero hasta la fecha no se ha descrito en *Gibberella*.

En la estirpe IMI58289 de *G. fujikuroi* usada en este trabajo, no hemos observado formación de heterocariontes por anastomosis de hifas.

## Transformación

Aunque la transformación de *Bacillus subtilis* y otras bacterias es un proceso rutinario desde hace varias décadas, hasta mucho después no se obtuvieron evidencias de la misma en *Escherichia coli* (Revisión: Portugal y Cohen 1977) y eucariontes, tanto inferiores (Hinnen *et al.* 1978) como superiores (McBride y Ozer 1973). La manipulación genética de eucariontes se ha desarrollado mucho a nivel molecular, en especial en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Struhl 1983). Los experimentos en este hongo han contribuido enormemente al desarrollo de técnicas similares para hongos filamentosos (revisiones: Fincham 1989; Goosen *et al.* 1992).

Los hongos filamentosos son un grupo de eucariontes inferiores muy variado genética y funcionalmente (Smith y Berry 1983). Algunos, como *Aspergillus nidulans* o *Neurospora crassa*, han sido muy utilizados para estudiar aspectos de genética, metabolismo y desarrollo, debido a las ventajas experimentales que ofrece su análisis genético. Otros, como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum* y *Cephalosporium acremonium*, deben la atención que se les ha prestado a la producción de sustancias de interés comercial, ya sean metabolitos primarios, como ciertas enzimas, o secundarios, como antibióticos, ácidos orgánicos, etc. Un tercer grupo, que comprende una gran variedad de géneros, estaría

formado por los hongos fitopatógenos. *Gibberella fujikuroi* es a la vez un hongo industrial y un patógeno de plantas.

En general los protocolos de transformación de hongos filamentosos se basan en los de *S. cerevisiae*. Así, los primeros ejemplos de transformación publicados en *N. crassa* (Case *et al.* 1979; Schweizer *et al.* 1981), *A. nidulans* (Ballance *et al.* 1983; Tilburn *et al.* 1983) y *Podospora anserina* (Tudzynski *et al.* 1980), incluían la preparación de protoplastos mediante la digestión de las paredes celulares de estos hongos con enzimas líticas (Peberdy y Ferenczy 1985) y su tratamiento con cloruro cálcico y polietilenglicol. Estos compuestos alteran la permeabilidad de la membrana plasmática y facilitan la entrada de ADN en la célula. Posteriormente se seleccionaba la expresión del marcador introducido, obteniendo así los posibles transformantes.

Recientemente se han desarrollado otras técnicas de introducción de ADN en la célula que no requieren la formación de protoplastos, como son la permeabilización de la célula con acetato de litio (Dhawale *et al.* 1984), la electroporación (Hashimoto *et al.* 1985), la utilización de células dañadas físicamente (Constanzo y Fox 1988), el bombardeo de las células con microproyectiles envueltos en ADN (Klein *et al.* 1987; Johnston *et al.* 1988) y la microinyección (Ootaki *et al.* 1992). Sin embargo estos nuevos sistemas presentan serios inconvenientes: no suelen aumentar el número de transformantes obtenidos, son metodológicamente muy complejos (bombardeo con microproyectiles), o requieren estructuras de gran tamaño en el micelio (microinyección). Esto, unido a los buenos resultados obtenidos con los protocolos basados en el cloruro cálcico y el polietilenglicol, hace que apenas sean empleados en hongos filamentosos.

En cuanto a los marcadores seleccionables útiles en transformación, se pueden emplear tanto genes que complementan auxotrofías (Case *et al.* 1979) como genes de resistencia a inhibidores (Banks *et al.* 1983). El primer caso presenta el inconveniente de que hay que partir de mutantes afectados en los genes que se utilizan como marcadores. En el segundo caso se puede transformar directamente a la estirpe silvestre. El problema en este segundo supuesto es que todavía no existe un marcador versátil debido a la gran variabilidad genética existente entre los hongos filamentosos.

Un último factor a tener en cuenta es el origen del gen a utilizar como marcador. Es evidente la preferencia del empleo de genes del propio organismo frente a genes heterólogos, que pueden tener más dificultades de expresión. Sin embargo, la utilización de un gen homólogo exige la clonación previa del mismo, tanto si es el alelo silvestre que complementa una auxotrofia como si es un alelo mutante que confiere resistencia a algún compuesto. La utilización de genes heterólogos tiene la ventaja de que disminuye el riesgo de inestabilidad de las secuencias repetidas durante el ciclo sexual (fenómeno RIP).

Hasta la fecha, los únicos sistemas de transformación descritos en *G. fujikuroi* se basan en la utilización de ADN heterólogo, tanto por complementación de auxotrofías (Sánchez Fernández *et al.* 1991; Brückner *et al.* 1992), como por resistencia a drogas (Leslie y Dickman 1991). Aunque en el primer caso se utilizaron protoplastos y en el segundo se transformaron células completas permeabilizadas con acetato de litio, la frecuencia de transformación obtenida con ambos métodos es muy parecida (1-2 transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN).



El trabajo descrito en esta tesis se engloba en un proyecto cuyo objetivo final es la superproducción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi*. Una de las aproximaciones al problema pasa por la clonación de los genes de la ruta biosintética de las giberelinas. A tal fin decidimos por una parte, desarrollar un sistema de transformación para *Gibberella*, y por otra, estudiar la regulación de la giberelinogénesis.

En esta tesis hemos desarrollado un método fiable de obtención de protoplastos, lo cual nos ha permitido abordar la transformación de la estirpe IMI58289 de *Gibberella fujikuroi*. Por otro lado, hemos aislado una serie de mutantes afectados en distintas etapas de la vía de asimilación de nitrógeno. Estos mutantes han sido empleados en el estudio de la regulación por nitrógeno de la biosíntesis de giberelinas. Uno de ellos, afectado en el gen estructural de la reductasa del nitrato, ha sido utilizado además como receptor en los experimentos de transformación con ADN exógeno en los que utilizamos como marcador el gen estructural de la reductasa del nitrato de *A. niger* o *A. oryzae*.

## **2. MATERIAL Y METODOS**

## 2.1. ESTIRPES

La Tabla 1 enumera las estirpes de *Gibberella fujikuroi* empleadas en este trabajo, así como su fenotipo y origen. La estirpe silvestre IMI58289 procede del *Imperial Mycological Institute* (Kew, Surrey, Inglaterra). El resto de las estirpes se obtuvieron a partir de la estirpe IMI58289 por uno o dos tratamientos con el agente mutagénico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

La estirpe de *Escherichia coli* utilizada fue DH5 $\alpha$ , cuyo genotipo es: F<sup>-</sup> *endA1*, *hsdR17* (*rK*<sup>+</sup> *mK*<sup>-</sup>) *supE44* *thi-1* *gyrA96* *recA1* *relA1*  $\Delta$ *lacU169* [ $\Phi$ 80*cl lacZ* $\Delta$ *M15*]  $\lambda$ <sup>-</sup> (Hanahan 1983).

**TABLA 1:** Estirpes de *Gibberella fujikuroi* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Fenotipo	Origen
IMI58289	Silvestre	<i>Imperial Mycological Institute</i>
SG139	No produce giberelinas	IMI58289
SG140	No asimila nitrato	IMI58289
SG141	No asimila nitrato	IMI58289
SG142	No asimila nitrato	IMI58289
SG143	No asimila nitrito	IMI58289
SG144	No asimila nitrito	IMI58289
SG146	Requiere asparragina	IMI58289
SG147	Carece de cofactor de molibdeno	IMI58289
SG149	Hipersensible a nitrito	IMI58289
SG150	Requiere asparragina	IMI58289
SG151	No asimila nitrato ni nitrito	SG140
SG152	No asimila nitrato ni nitrito	SG140

## 2.2. PLASMIDOS

En la Tabla 2 se detallan los plásmidos utilizados en esta tesis, el marcador seleccionable que llevan y su origen.

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados para transformar *Gibberella*.

Vector	Marcador seleccionable	Origen del marcador	Referencia
pSTA10	<i>niaD</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Unkles <i>et al.</i> 1989.
pSTA14	<i>niaD</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Unkles <i>et al.</i> 1989.
pAN7-1	<i>hph</i>	<i>Escherichia coli</i>	Punt <i>et al.</i> 1987.
pSV50	<i>benA</i>	<i>Neurospora crassa</i>	Vollmer y Yanofsky 1986.
pLJ16	<i>argB</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Johnstone <i>et al.</i> 1985.
p3SR2	<i>amdS</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	Beri y Turner 1987.
pBS3.13	<i>Cyh</i>	<i>Schwannomyces castelii</i>	Cedido por A. Jiménez.
pPS11	<i>aph</i>	Tn903	Suárez y Eslava 1988.
pMAT107	<i>nptII</i>	Tn5	Arnau <i>et al.</i> 1988
pBMG1	<i>niaD</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Esta Tesis
pBMG2	<i>niaD</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Esta Tesis

Genes: *niaD*, reductasa del nitrato. *hph*, resistencia a higromicina. *benA*,  $\beta$ -tubulina resistente a benomilo. *argB*, biosíntesis de arginina. *amdS*, acetamidasa. *cyh*, resistencia a cicloheximida. *aph* y *nptII*, genes de resistencia a antibióticos de la familia de la kanamicina, como la geneticina (G-418).

## 2.3. MEDIOS DE CULTIVO

### 2.3.1. Medios de cultivo para *Gibberella*

#### *Medio mínimo*

Su composición por litro es: glucosa: 30 g, NaNO<sub>3</sub>: 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,5 g, KCl: 0,5 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 10 mg, CuSO<sub>4</sub>: 10 mg, FeCl<sub>3</sub>: 20 mg, MnCl<sub>2</sub>: 20 mg, NaMoO<sub>4</sub>: 20 mg y ZnSO<sub>4</sub>: 2 mg (Avalos *et al.* 1985).

#### *Medio rico*

Su composición por litro es: glucosa: 30 g, NaNO<sub>3</sub>: 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,5 g, extracto de levadura: 4 g, peptona: 8 g. En algunos casos se usó una variante del medio mínimo llamado "medio de germinación" que contiene además 1 g/l de extracto de levadura (Avalos *et al.* 1985).

#### *Medio de esporulación*

Su composición por litro es: glucosa: 1 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,5 g, KCl: 0,5 g, extracto de levadura: 1 g (Avalos *et al.* 1985).

#### *Medio para la producción de giberelinas*

Su composición por litro es: glucosa: 80 g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>: 0,48 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 1 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 10 mg, CuSO<sub>4</sub>: 10 mg, FeCl<sub>3</sub>: 20 mg, MnCl<sub>2</sub>: 20 mg, NaMoO<sub>4</sub>: 20 mg y ZnSO<sub>4</sub>: 2 mg (Geissmann *et al.* 1966).

Para analizar la regulación por nitrógeno de la biosíntesis de giberelinas se emplearon derivados de este medio variando la fuente de nitrógeno y su concentración.

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

Es una variante del medio para la producción de giberelinas que lleva 273 g/l de glucosa, 1 g/l de extracto de levadura y 1 g/l de peptona (Sánchez Fernández *et al.* 1991).

### *Medio Czapek*

Lleva por litro: sacarosa: 30 g, NaNO<sub>3</sub>: 3 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,5 g, KCl: 0,5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0,01 g (Fassatiová 1986).

### *Medios selectivos*

Los medios selectivos se osmoestabilizaron con KCl 1,2 M.

Para seleccionar transformantes capaces de asimilar nitrato se utilizó medio mínimo.

Para seleccionar transformantes capaces de asimilar acetamida se sustituyó el nitrato sódico del medio mínimo por 2,1 g/l de acetamida.

Para seleccionar transformantes resistentes a inhibidores se utilizó medio de germinación suplementado con el inhibidor correspondiente:

Geneticina: 100 µg/ml.

Benomilo: 5,8 µg/ml.

Cicloheximida: 100 µg/ml.

Para sembrar los protoplastos se utilizó agar de cobertera (medio selectivo con 8 g/l de agar).

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

### *Medio nutritivo LB*

Su composición por litro es: extracto de levadura: 5 g, peptona hidrolizada enzimáticamente ("bacto-tryptone" Difco): 1 g y NaCl: 1 g (Maniatis *et al.* 1982). Cuando era necesario, se añadía ampicilina (100 µg/ml) a partir de una solución concentrada de 100 mg/ml.

### *Medio SOC*

Se utilizó para el crecimiento de las bacterias tras la transformación, y su composición es: extracto de levadura: 5 g/l, "bacto-tryptone": 1 g/l, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM y glucosa 20 mM (Maniatis *et al.* 1982).

### *Caldo para plásmidos*

Para amplificar un plásmido, las células, previamente transformadas, se incubaron a 37 °C con agitación durante unas 12 horas en el caldo compuesto por: triptona: 12 g, extracto de levadura: 24 g, glicerol (87 % v/v): 5 ml, agua destilada: 900 ml. Tras autoclavar el medio se añadieron 100 ml de tampón fosfato potásico (pH 7,6) 1 M estéril.

En todos los casos, para solidificar los medios se utilizaron 16 g/l de agar Adsa Micro.

## **2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES**

### **2.4.1. *Gibberella***

#### *Tampón citrato-manitol-fosfato*

Los tratamientos enzimáticos para la obtención de protoplastos se llevaron a cabo en tampón citrato-manitol-fosfato (CMP), cuya composición por litro es:  $\text{PO}_4\text{NaH}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 15,6 g, citrato trisódico dihidratado: 29,4 g y manitol: 145,7 g. Las enzimas líticas se añadieron disueltas en sulfato de magnesio 0,9 M. Una vez obtenidos, los protoplastos se mantuvieron en sorbitol 1,2 M.

#### *Soluciones para la transformación*

Para centrifugar los protoplastos se utilizó una solución A, compuesta por sorbitol 1,2 M,  $\text{CaCl}_2$  50 mM y Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris-HCl) (pH 7,5) 10 mM.

Para la captación de ADN se utilizó una solución B, compuesta por polietilenglicol 4 kD 50 % (p/v),  $\text{CaCl}_2$  50 mM y Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM.

### 2.4.2. *E. coli*

En las extracciones de ADN plasmídico de bacterias se utilizaron las siguientes soluciones (Maniatis *et al.* 1982):

#### *Solución I*

Glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 25 mM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (pH 8,0) 10 mM.

#### *Solución II*

NaOH 0,2 N y dodecil sulfato sódico (SDS) 1% (p/v).

#### *Solución III*

Acetato sódico 3 M al que se ajusta el pH a 4,8 con ácido acético glacial.

### 2.4.3. Tampones y soluciones utilizados para la manipulación *in vitro* de ADN

#### *Tampón Tris-HCl*

Tris 1 M ajustado al pH requerido con HCl 1 M.

#### *Tampón TE*

Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM y EDTA (pH 8,0) 1 mM.

#### *Tampón TAE (50X)*

Tris: 242 g, ácido acético glacial: 57,1 ml, EDTA (pH 8,0) 0,5 M: 100 ml en un volumen final de 1 litro.

#### *Tampón TBE (5X)*

Tris: 54 g, ácido bórico: 27,5 g, EDTA (pH 8,0) 0,5 M: 20 ml en un volumen final de 1 litro.

#### *Tampón de carga (5X)*

Ficoll (tipo 400, Pharmacia, Suecia), 15 % y azul de bromofenol, 0,25 % (p/v).



*Soluciones para las hibridaciones por el método de Southern*

Solución despurinizante: HCl 0,5 M.

Solución desnaturalizante: NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 M.

Solución neutralizante: Tris-HCl (pH 7,5) 0,5 M y NaCl 3 M.

Solución SSC (20X): NaCl 3 M y citrato sódico (pH 7,0) 0,3 M.

Solución SSPE (20X): NaCl 3 M, EDTA (pH 7,4) 20 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,18 M.

Reactivo de Denhardt (50X): 10 g/l de ficoll, 10 g/l de polivinilpirrolidona y 10 g/l de seroalbúmina bovina.

Solución de prehibridación e hibridación: SSPE (5X), reactivo de Denhardt (5X), SDS 0,5 % (p/v) y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón previamente desnaturalizado y fragmentado (Maniatis *et al.* 1982).

## 2.5. METODOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 2.5.1. Transformación de *E. coli*

#### *Método del cloruro de calcio*

Consiste en mantener en frío y en presencia de una solución 100 mM de CaCl<sub>2</sub>, una suspensión de bacterias recogidas en fase exponencial de crecimiento (es importante que el cultivo no alcance una densidad superior a 10<sup>8</sup> células/ml). A 200 µl de estas células competentes se les añadieron 10-40 ng de ADN (disueltos en el menor volumen posible de TE), se mantuvieron en hielo al menos 30 minutos y se sometieron a un choque térmico de 2 minutos a 42 °C. A continuación se añadió 1 ml de medio SOC y se incubaron a 37 °C durante 1 hora antes de sembrarlas en cajas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml).

En todos los experimentos se utilizó un testigo sin añadir ADN y otro al que se añade un plásmido de frecuencia de transformación conocida.

#### *Electroporación*

Este método se empleó para transformar *E. coli* con mezclas de ligación. Al igual que para el sistema anterior, utilizamos un cultivo

de bacterias en la fase de crecimiento exponencial, cuyas células, tras ser enfriadas en hielo, lavadas 4 veces con agua destilada estéril y resuspendidas en glicerol 15 % (v/v), se dividieron en alícuotas de 40  $\mu$ l que, junto con 2  $\mu$ l de mezcla de ligación, fueron sometidos a electroporación en un aparato BTX modelo EM600, a 2,5 kV y 129  $\Omega$ . En estas condiciones la corriente pasa teóricamente durante 5 milisegundos.

En estos experimentos se utilizaron como testigos un plásmido de frecuencia de transformación conocida y la mezcla de ligación sin inserto.

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

### *Minipreparaciones*

Cuando se requería solo una pequeña cantidad de ADN se utilizaban cultivos de 1,5 ml a 10 ml en caldo LB con 100  $\mu$ g/ml ampicilina. El ADN se extrajo por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly 1979) pero sin adición de lisozima. Generalmente, y con el fin de eliminar el ARN de las preparaciones, estas se sometían a un tratamiento con ARNasa (Maniatis *et al.* 1982); finalmente, tras una segunda precipitación con etanol, el ADN se resuspendía en 50  $\mu$ l de TE. Entre 2 y 3  $\mu$ l de esta suspensión eran suficientes para un análisis de restricción.

### *Preparaciones a gran escala*

Cuando hacía falta aislar grandes cantidades de plásmido se seguía el mismo método que se describe en el apartado anterior salvo que se partía de 500 ml de cultivo en medio nutritivo LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.

Tras la extracción, el ADN se purificó en gradiente de cloruro de cesio-bromuro de etidio (Maniatis *et al.* 1982). El bromuro de etidio se eliminó de la solución tratando ésta con isopropanol saturado con TE y cloruro de cesio. Con el fin de eliminar el cloruro de cesio, las muestras se dializaron tres veces frente a TE durante 20 a 30 minutos a 4 °C.

En otros casos, la purificación se llevó a cabo precipitando el ADN con polietilenglicol 8 kD al 13 % (p/v).



### 2.5.3. Cuantificación de ADN

Las concentraciones de ADN se determinaron por densidad óptica, teniendo en cuenta que una solución de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN bicatenario tiene una absorbencia de 1. Alternativamente, la cantidad de ADN de una preparación se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio (Maniatis *et al.* 1982) (ver apartado 2.5.5). En estos casos, el cálculo deriva de la comparación de la fluorescencia de las bandas de ADN con la de bandas correspondientes a una cantidad conocida de ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *HindIII*.

### 2.5.4. Manipulación enzimática del ADN

Las digestiones del ADN con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Maniatis *et al.* 1982. Los tampones y condiciones de incubación empleados fueron los recomendados por la firma suministradora de las enzimas (Boehringer Mannheim, Alemania).

### 2.5.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

#### *Análisis de los fragmentos de restricción*

La resolución de fragmentos de restricción se llevó a cabo en geles de 0,6-0,8 % de agarosa, según el tamaño de los fragmentos (Maniatis *et al.* 1982) en tampón TAE. Los geles se sumergieron en el mismo tampón contenido en cubetas horizontales de electroforesis y se sometieron a un voltaje de aproximadamente 5 V/cm de longitud del gel. En los geles se empleó como patrón de tamaño ADN del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*.

#### *Revelado de los geles*

Los geles de agarosa se tiñeron sumergiéndolos 15 minutos en agua o tampón de electroforesis con 3 mg/ml de bromuro de etidio. Las bandas se hicieron visibles con un transiluminador Fotodyne

3-3002 (New Berlin, WI, USA), que emite radiación ultravioleta de 300 nm, y se fotografiaron con una cámara Polaroid MP4, película tipo 665 y un filtro Kodak Wratten 22A.

#### **2.5.6. Recuperación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Se empleó el preparado comercial "GeneClean" (Stratagene, CA, EEUU), efectivo para fragmentos de tamaño inferior a 10 kb y basado en la fusión de la agarosa con yoduro sódico y la adsorción del ADN a una matriz inerte. Tras su lavado, el ADN se recupera de la matriz por elución en un tampón de baja concentración salina, se precipita con etanol al 96 % y se resuspende en un volumen adecuado de TE.

#### **2.5.7. Detección de secuencias de ADN mediante hibridación por el método de Southern**

*Transferencia de fragmentos de ADN separados por electroforesis a filtros de nilón*

Después de ser sometido a electroforesis, el gel se trató con solución despurinizante 30 minutos, solución desnaturalizante 40 minutos, y solución neutralizante 15 minutos, todo ello a temperatura ambiente y con agitación constante. Posteriormente el ADN se transfirió a filtros de nilón Hybond-N (Amersham, Reino Unido) por capilaridad (Southern 1975) y se unió a estos incubando durante 2 horas a 80 °C.

*Marcado radiactivo de la sonda de ADN*

El ADN a utilizar como sonda se marcó con [<sup>32</sup>P]dCTP por resíntesis utilizando un equipo de "nick translation" (Boehringer Mannheim), siguiendo las instrucciones del fabricante. El exceso de nucleótidos no incorporados se eliminó mediante filtración en columnas de Sephadex "G-50 Quick Spin" (Boehringer Mannheim).

### *Hibridación*

Dado que la sonda era homóloga, la hibridación se llevó a cabo en condiciones restrictivas. Los filtros de nilón con el ADN transferido se incubaron en la solución de prehibridación a 65 °C durante 3 horas, y se hibridaron a la misma temperatura con 100 ng de sonda marcada durante 14 horas. Los filtros, tras ser lavados a temperatura ambiente con concentraciones decrecientes de SSC hasta llegar a SSC diluído 5 veces, se sometieron a autorradiografía a -70 °C en una cámara de exposición Sigma (EEUU).

## **2.6. INOCULACION Y CONDICIONES DE CULTIVO DE GIBBERELLA**

### **2.6.1. Conservación de las estirpes**

Las estirpes de *Gibberella* se conservaron congelando suspensiones de esporas a -20 °C en glicerol 10 % (v/v). Para recuperarlas, se inocularon cajas de medio de germinación con una gota de la suspensión de esporas y micelio.

Para conservar las estirpes a largo plazo se congelaron a -80 °C suspensiones de micelio esporulado.

### **2.6.2. Obtención de microconidios**

Sobre agar de esporulación se colocaron con palillos estériles siete inóculos de micelio en distribución hexagonal y se incubaron durante una semana a 30 °C a la luz. Como fuente de iluminación utilizamos una batería de cinco fluorescentes que producen una intensidad luminosa de unos 15 W/m<sup>2</sup>.

La superficie de las colonias obtenidas en medio de esporulación se lavó con 10 ml de agua estéril. Posteriormente, los microconidios se separaron de los fragmentos de micelio por filtración, y se lavaron dos veces por centrifugación en agua estéril. Las suspensiones obtenidas se utilizaron inmediatamente o se resuspendieron en una solución al 10 % (v/v) de glicerol en agua para ser conservados

a -20 °C. Para determinar el número de esporas viables se inocularon las cajas con diluciones de las suspensiones de conidios recién cosechadas o se contaron al microscopio en una cámara de Burker.

### **2.6.3. Producción de giberelinas**

Para los análisis de producción de giberelinas se emplearon matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de caldo de producción, o variantes de este con distintas fuentes de nitrógeno. Los matraces se inocularon con 1 ml de una suspensión de fragmentos de micelio y esporas. Tal suspensión se obtuvo añadiendo 10 ml de agua estéril a una caja de medio de esporulación y restregando la superficie de las colonias con una espátula estéril. Los cultivos así inoculados se incubaron a 150 rpm en un agitador orbital en oscuridad a 30 °C durante 15 ó 21 días, según los casos.

### **2.6.4. Obtención de protoplastos**

Para la obtención de protoplastos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de caldo para protoplastos. Los matraces se inocularon con 1 ml de una solución libre de micelio de aproximadamente  $10^6$  esporas por ml y se incubaron a 30 °C durante 40 horas en un agitador orbital a 150 rpm. El micelio se recogió por filtración a través de papel de filtro estéril, se lavó dos veces con medio para protoplastos fresco y se resuspendió en 10 ml de este medio. Posteriormente se sonicó (aparato Branson modelo Sonifier 250) a 50 W durante 20 segundos y se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C (5000 rpm). El precipitado se resuspendió en 2 ml de tampón CMP, al cual se añadió Novozym (Novo-Industries, S.A., Dinamarca) hasta una concentración final de 5 mg/ml, a partir de una solución de 10 mg/ml en  $\text{SO}_4\text{Mg}$  0,9 M estéril. Esta mezcla se incubó a 30 °C con agitación ocasional durante 4 horas. Una vez formados los protoplastos, se separaron de los restos de micelio por filtración a través de nilón estéril (diámetro de poro: 50  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente se añadió solución A hasta llenar un tubo de 10 ml y se centrifugó 10 minutos en una centrífuga de mesa basculante a

velocidad media. Los protoplastos (el precipitado) se resuspendieron en 0,5 ml de solución A. Se tomó un alícuota de 0,1 ml, se diluyó 10 veces con solución A y se estimó el número de protoplastos obtenidos tras un conteo en cámara de Burker (Sánchez Fernández *et al.* 1991).

## **2.7. TRATAMIENTOS MUTAGENICOS**

### **2.7.1. Mutagénesis**

En todos los tratamientos se usó una solución de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma) de 1 mg/ml. Se añadieron 0,2 ml de esta solución a 0,8 ml de esporas recién recogidas resuspendidas en agua y se incubaron a 22 °C en oscuridad durante una hora. El tratamiento se detuvo 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. La supervivencia obtenida habitualmente con este tratamiento oscila entre el 5 y el 10 % (Avalos *et al.* 1985).

### **2.7.2. Selección de mutantes**

Los mutantes de la ruta de asimilación del nitrato se buscaron directamente ensayando el crecimiento de colonias procedentes de esporas supervivientes a la mutagénesis en cajas de medio mínimo con nitrato sódico o asparragina. Las colonias que solo crecieron en medio con asparragina se transplantaron a medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno para determinar el gen en que estaban afectados (Klittich y Leslie 1988).

## **2.8. MEDIDAS DE PESO SECO Y GIBERELINAS**

### **2.8.1. Medida del crecimiento**

El crecimiento se estimó a partir del peso seco del micelio. Se filtraron muestras de 5 ml de los caldos de cultivo, se secaron durante un mínimo de 3 horas a 105 °C y se pesaron en una balanza Mettler modelo AJ100.

### **2.8.2. 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 les añadieron 0,2 ml de etanol 96 % y 2 ml de una mezcla a temperatura ambiente de etanol 96 % y ácido sulfúrico 96 % (1:1). Las muestras se mezclaron por agitación, se incubaron a 48 °C durante 30 minutos, se les añadieron 2 ml de etanol 96 % y fueron nuevamente mezcladas por agitación. En las condiciones descritas, las giberelinas reaccionan con el ácido sulfúrico produciendo un derivado fluorescente.

Las concentraciones de giberelinas se calcularon por comparación de la fluorescencia mostrada por las muestras con la mostrada en las mismas condiciones por soluciones acuosas con concentraciones conocidas de ácido giberélico (Sigma) disuelto en los 0,2 ml de etanol 96 %. Se determinó la fluorescencia emitida a 464 nm por muestras excitadas a 406 nm en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer modelo LS-3B.



### **3. RESULTADOS**

### 3.1.

#### TRANSFORMACION DE *GIBBERELLA FUJIKUROI*

El objetivo de este trabajo es la transformación de *Gibberella fujikuroi* con ADN exógeno.

La mayoría de los protocolos de transformación descritos para hongos filamentosos se basan en la utilización de protoplastos como receptores del ADN. Alternativamente intentamos la transformación con dos métodos que usan células enteras (acetato de litio y electroporación), pero no obtuvimos resultados positivos. Esto nos condujo a desarrollar un método de obtención de protoplastos viables en *Gibberella*.

Como marcadores para la transformación consideramos, por una parte, genes que cambian el fenotipo de la estirpe silvestre (por ejemplo, resistencia a un antibiótico). Para ello es necesario que el fenotipo de la estirpe silvestre difiera notablemente del esperado por la expresión de los genes exógenos. Así, determinamos la resistencia de *Gibberella* a benomilo, higromicina, geneticina, kanamicina, verrucarina, bialafos, sulfanilamida y cloruro de mercurio. También estudiamos su capacidad de utilizar acetamida como fuente de nitrógeno. Por otro lado, algunos vectores utilizados para transformación en otros hongos llevaban como marcador el gen estructural de la reductasa del nitrato de distintas especies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae* o *A. nidulans*). A fin de poder utilizar estos vectores en *Gibberella*, buscamos mutantes carentes de reductasa del nitrato.

##### 3.1.1. Obtención de protoplastos de *G. fujikuroi*

Los protocolos de obtención de protoplastos cambian mucho de un organismo a otro. Para desarrollar el método de obtención de protoplastos de *G. fujikuroi* tuvimos en cuenta las siguientes variables:

#### I. Edad y origen del micelio:

- a) Micelio cultivado en cajas durante 24 horas y separado de estas mediante membranas de diálisis.
- b) Micelio cultivado en medio líquido durante 24-48 horas.
- c) Micelio cultivado en medio líquido durante 3,5 horas (germínulas).

#### II. Medio de cultivo:

- a) Medio de germinación, tanto caldo como agar.
- b) Caldo para protoplastos.
- c) Caldo Czapek.

#### III. Naturaleza y concentración de las enzimas:

- a) Novozym.
- b)  $\beta$ -glucuronidasa.
- c) Novozym y  $\beta$ -glucuronidasa.

#### IV. Duración del tratamiento enzimático:

Entre 1 y 24 horas.

#### V. Osmoestabilizante:

- a) Sorbitol 1,2 M.
- b) Sacarosa 1 M.
- c) Manitol 0,8 M.
- d) Sulfato de magnesio 0,9 M.
- e) Cloruro potásico 1,2 M.

Probamos numerosas combinaciones de las variables descritas. Cuatro de ellas produjeron protoplastos, no muy abundantes y en todo caso inviables:

1. En las condiciones descritas en la Tabla 3 obtuvimos protoplastos, pero no eran viables, ya que en ningún caso observamos su regeneración sembrándolos en medio de germinación osmoestabilizado tanto con manitol 0,8 M como con ClK 1,2 M.

**TABLA 3.** Aparición de protoplastos respecto al tiempo, según el tratamiento enzimático utilizado. Los datos mostrados son la media de cuatro experimentos independientes y se dan en protoplastos/ $\mu$ l.

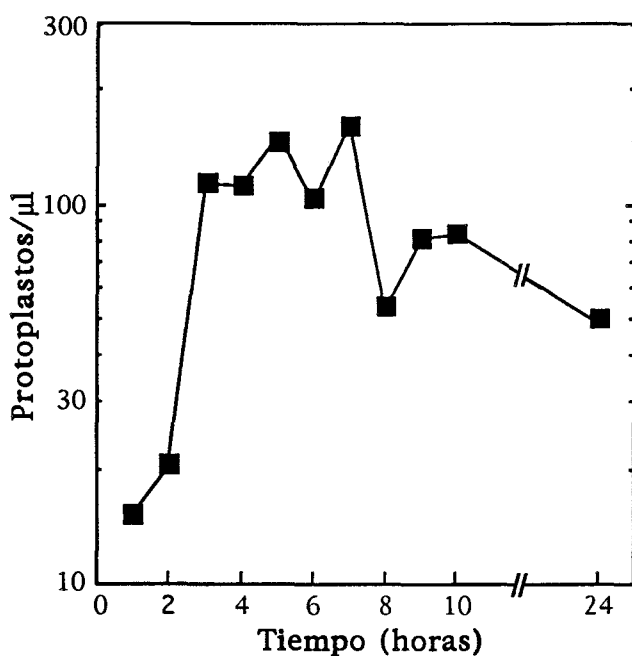
Cultivamos  $5 \cdot 10^5$  esporas de la estirpe silvestre sobre una membrana de diálisis colocada en agar de germinación, a 30 °C durante 24 horas. El micelio adherido a la membrana se depositó en tubos con 5 ml de la solución enzimática preparada en tampón CMP y se incubó a 30 °C.

Tiempo (horas)	Novozym (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	$\beta$ -glucuronidasa (24 U/ $\mu$ l)*	Ambas enzimas
1	< 6	< 6	< 6
2	< 6	< 6	< 6
3	362 $\pm$ 142	25 $\pm$ 12,7	190 $\pm$ 68,9
4	388 $\pm$ 111	90 $\pm$ 23,0	460 $\pm$ 184
5	400 $\pm$ 93,5	140 $\pm$ 23,9	340 $\pm$ 67,5

\* 1 unidad de  $\beta$ -glucuronidasa libera en 1 hora (a pH 5,0 y 37 °C) 1  $\mu$ g de fenoltaleína a partir del glucurónido de fenoltaleína.

2. Cultivo de  $2 \cdot 10^6$  esporas de la estirpe silvestre en 100 ml de caldo Czapek a 30 °C durante 48 horas en agitación (150 rpm). El micelio se recogió por filtración y se resuspendió en 6 ml de una solución de 120 U de  $\beta$ -glucuronidasa por  $\mu$ l de tampón CMP, obteniéndose al cabo de 15 horas 700  $\pm$  170 protoplastos/ $\mu$ l. Una variante que también produjo protoplastos inviables fue incubar el micelio durante 30 minutos en una solución de  $\beta$ -mercaptoetanol (2  $\mu$ l/ml) en 5 mM de EDTA pH 4,5 y lavarlo con tampón CMP antes del tratamiento enzimático. En este caso obtuvimos un rendimiento similar (600  $\pm$  128 protoplastos/ $\mu$ l).

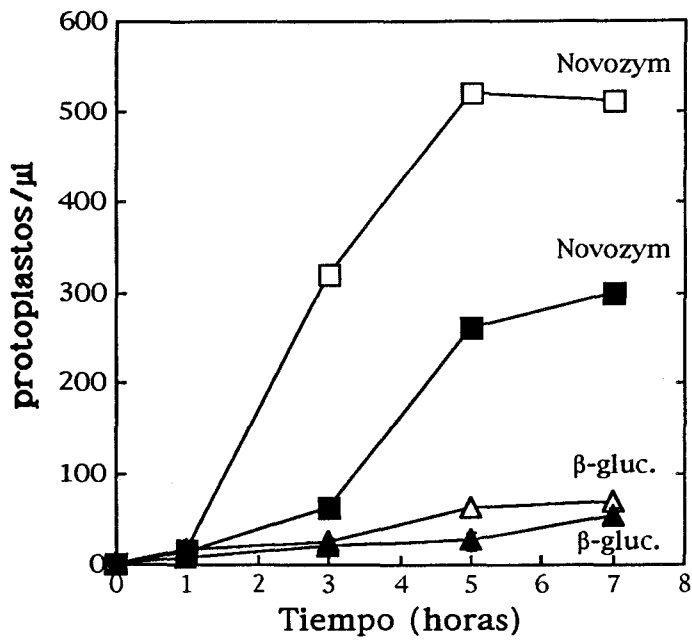
3. Cultivo de  $10^6$  esporas de la estirpe silvestre en 50 ml de caldo de germinación a 30 °C con agitación (150 rpm), durante 48 horas. El micelio fue recogido por filtración y resuspendido en una solución de  $\beta$ -glucuronidasa (120 U/ $\mu$ l) en sorbitol 1 M (volumen total: 2 ml). En la Figura 3 se muestra la cinética de aparición de protoplastos en tales condiciones. Como puede observarse, el número total aumenta considerablemente en las tres primeras horas de incubación.



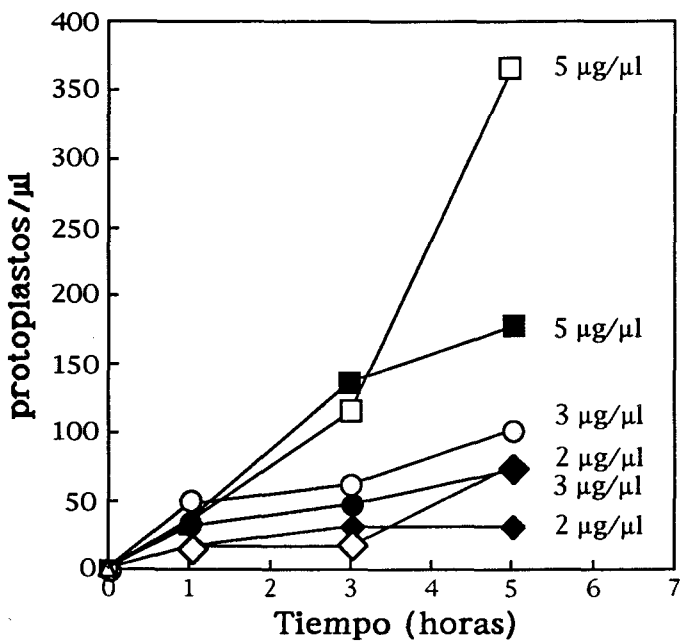
**Figura 3.** Producción de protoplastos a lo largo del tiempo tratando micelio cultivado en medio de germinación con 120 U/ $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -glucuronidasa.

4. Cultivo de  $10^6$  esporas de la estirpe silvestre en 50 ml de caldo de germinación ó 50 ml de caldo para protoplastos, a 30 °C con agitación durante 40 horas. El micelio fue recogido por filtración, resuspendido en una solución de  $\beta$ -glucuronidasa (120 U/ $\mu\text{l}$ ) o Novozym (2, 3 ó 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) e incubado durante 7 horas a 30 °C. El tratamiento con Novozym fue más eficaz que con  $\beta$ -glucuronidasa, especialmente con micelio procedente de medio para protoplastos (Figuras 4 y 5).

Los experimentos descritos permiten concluir que el tratamiento más efectivo es el que emplea como medio de incubación el caldo para protoplastos y la digestión enzimática con 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Novozym.



**Figura 4.** Protoplastos producidos con Novozym (5 μg/μl) y con β-glucuronidasa (120 U/μl) en función del tiempo de incubación a 30 °C. El micelio utilizado procedía de medio de germinación (símbolos negros) o de medio para protoplastos (símbolos blancos).



**Figura 5.** Producción de protoplastos en función del tiempo y de la concentración de Novozym. Símbolos como en la Figura 4.

Estos resultados constituyen un éxito parcial, puesto que los números de protoplastos obtenidos fueron siempre relativamente bajos. El hecho de repetirse el bajo rendimiento en condiciones diferentes sugiere una dificultad general en el acceso de las enzimas líticas a su sustrato. Para facilitar esta accesibilidad decidimos someter el micelio a un tratamiento físico previo que atacara parcialmente a la pared celular. El tratamiento elegido fue la sonicación del micelio.

De acuerdo con los experimentos anteriores, incubamos caldo para protoplastos inoculado con  $10^6$  esporas de la estirpe silvestre a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 40 horas. El micelio resultante fue recogido por filtración, resuspendido en medio para protoplastos fresco y sonicado durante 20 segundos a 50 W. Posteriormente el micelio fue concentrado por centrifugación y resuspendido en 5 ml de una solución de Novozym ( $5\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en tampón CMP. Con este protocolo conseguimos por vez primera superar los  $10^4$  protoplastos/ $\mu\text{l}$ . Los protoplastos así obtenidos muestran también por primera vez una viabilidad detectable por la capacidad de regeneración en cajas de medio osmoestabilizado (con ClK 1,2 M).

La duración de la sonicación es un factor determinante: en menos de 15 segundos se obtenían pocos protoplastos, síntoma de una insuficiente rotura del micelio. Entre 20 segundos y dos minutos de sonicación se consiguen frecuencias similares de protoplastos, pero la capacidad de regeneración disminuía al prolongarse la sonicación: con 30 segundos regeneraron del 20 al 30 % de los protoplastos; con 1 minuto sólo el 6%.

La diferencia ya observada anteriormente entre la utilización de diferentes medios de cultivo se volvía más acusada cuando el micelio era sometido a sonicación. Se obtuvieron 10 veces más protoplastos con micelio cultivado en medio para protoplastos en lugar de medio de germinación. La principal diferencia entre ambos medios es la concentración de glucosa: casi diez veces mayor en el primero que en el segundo.

La regeneración de protoplastos depende del compuesto utilizado como osmoestabilizador. Las colonias obtenidas con ClK 1,2 M poseen límites más precisos y son más compactas que con otros compuestos, como sorbitol 1,2 M, manitol 0,8 M o sacarosa 1 M, por lo que se cuentan con más facilidad.

### 3.1.2. Aislamiento de mutantes alterados en la asimilación de nitrato

Los mutantes incapaces de reducir nitrato se suelen seleccionar por su resistencia al clorato. En el tipo silvestre la reductasa del nitrato convierte el clorato en clorito, que es el verdadero tóxico. Este método se ha empleado en muchos organismos, incluido *Fusarium moniliforme* (Klittich y Leslie 1988). Sin embargo, la estirpe IMI58289 de *Gibberella fujikuroi* usada en esta tesis resiste hasta 70 g/l de clorato, lo que impide utilizar tal método de selección. Los mutantes incapaces de asimilar nitrato se detectaron por su incapacidad de crecer en medio mínimo con nitrato sódico como única fuente de nitrógeno. Para incrementar la frecuencia de mutantes se expusieron esporas de la estirpe silvestre a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en las condiciones descritas por Avalos *et al.* (1985), y se sembraron en medio mínimo con 2,2 g/l de asparragina como fuente de nitrógeno. Las colonias que crecieron con asparragina pero no con nitrato sódico después de cuatro subcultivos sucesivos fueron sometidas a un ensayo de crecimiento en distintas fuentes de nitrógeno (Tabla 4).

De 9700 colonias se aislaron 9 que no crecían con nitrato sódico. Los mutantes se clasificaron en grupos y las mutaciones se designaron como se hace en *Aspergillus* (Pateman *et al.* 1967). Tres de los mutantes estaban afectados en el gen estructural de la reductasa del nitrato (mutantes *nia-1*, *nia-2* y *nia-3*), dos en el gen estructural de la reductasa del nitrito (mutantes *nii-1* y *nii-2*), uno en alguno de los genes de la biosíntesis del cofactor de molibdeno (*cnx-1*), y otros dos eran auxótrofos de asparragina (*asn-1* y *asn-2*). Un mutante, SG149, resultó ser hipersensible a nitrito (Tabla 4).

Posteriormente y por el mismo método, se obtuvieron dos mutantes incapaces de asimilar nitrito (SG151 y SG152) a partir de la estirpe SG140.



**TABLA 4.** Caracterización fenotípica de los mutantes de la ruta de asimilación de nitrato según su crecimiento en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno.

Estirpe	NO <sub>3</sub> Na (3,0 g/l)	NO <sub>2</sub> Na (0,69 g/l)	Hipoxantina (1,2 g/l)	Asparragina (2,4 g/l)	CINH <sub>4</sub> (1,9 g/l)	Genotipo
IMI58289	+	+	+	+	+	Silvestre
SG140	-	+	+	+	+	<i>nia-1</i>
SG141	-	+	+	+	+	<i>nia-2</i>
SG142	-	+	+	+	+	<i>nia-3</i>
SG143	-	-	+	+	+	<i>nii-1</i>
SG144	-	-	+	+	+	<i>nii-2</i>
SG146	-	-	-	+	-	<i>asn-1</i>
SG147	-	+	-	+	+	<i>cnx-1</i>
SG149	+	-	+	+	+	
SG150	-	-	-	+	-	<i>asn-2</i>
SG151	-	-	+	+	+	
SG152	-	-	+	+	+	

+: Crecimiento normal; -: Crecimiento muy disminuído o inexistente.

Todos los medios tenían la misma concentración de nitrógeno (35 mM), excepto el de NO<sub>2</sub>Na, que por ser tóxico hubo de usarse a una concentración menor (10 mM).

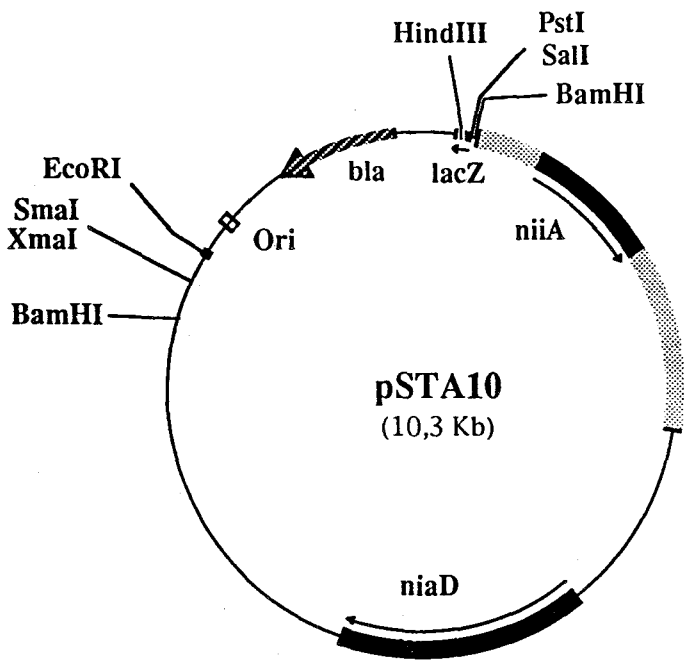
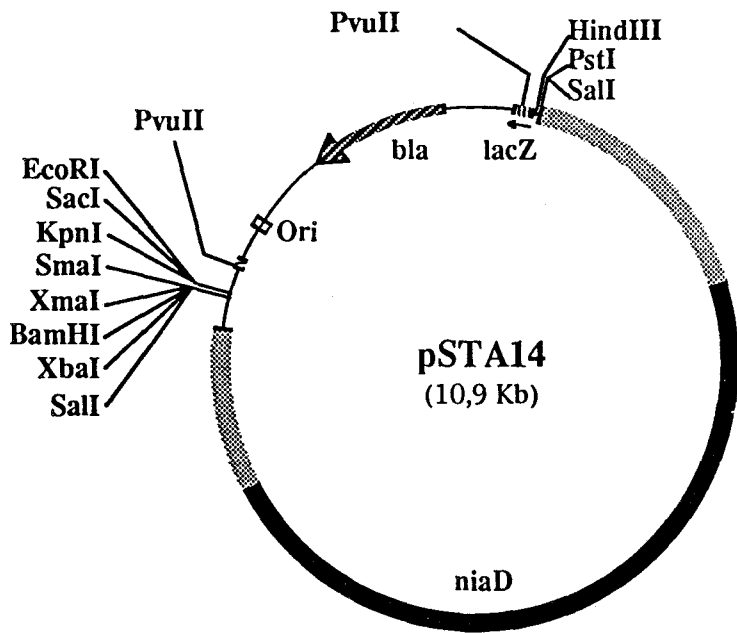
### 3.1.3. Transformación de *Gibberella fujikuroi* con ADN exógeno

El método de transformación heteróloga de *Gibberella* desarrollado en esta tesis se basa en uno de transformación homóloga descrito previamente para *Aspergillus oryzae*. Este sistema utiliza como marcador el gen estructural de la reductasa del nitrato (Campbell *et al.* 1989). Como receptores de ADN exógeno se emplearon protoplastos permeabilizados con cloruro cálcico y polietilenglicol. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio con nitrato sódico como única fuente de nitrógeno.

Como estirpe receptora se escogió el mutante de la reductasa del nitrato que presentó la frecuencia de reversión más baja, que fue SG140 (no observamos ningún crecimiento en agar con nitrato tras incubar  $10^7$  esporas a 30 °C durante una semana). Los vectores utilizados fueron pSTA10 y pSTA14, que llevan el gen *niaD* de *A. niger* y *A. oryzae* respectivamente (Figura 6).

Una vez obtenidos los protoplastos según el método descrito en el apartado 3.1.1, se resuspendieron en la solución A de transformación de forma que hubiese  $10^5$  protoplastos/ $\mu$ l. A 100  $\mu$ l de protoplastos se añadieron 12,5  $\mu$ l de la solución B de transformación y una solución de ADN disuelto en TE (volumen máximo 10  $\mu$ l). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, se añadieron 1 ml de solución B y 2 ml de solución A, se hicieron las diluciones necesarias en la solución A y se sembraron con agar de cobertera en los medios adecuados

Utilizando este protocolo, las frecuencias de transformación obtenidas con los vectores pSTA10 y pSTA14 fueron de 1-2 transformantes por  $\mu$ g de ADN (Tabla 5). No observamos ninguna colonia cuando sembramos protoplastos no expuestos a ADN en el medio selectivo (medio mínimo con nitrato sódico como única fuente de nitrógeno).

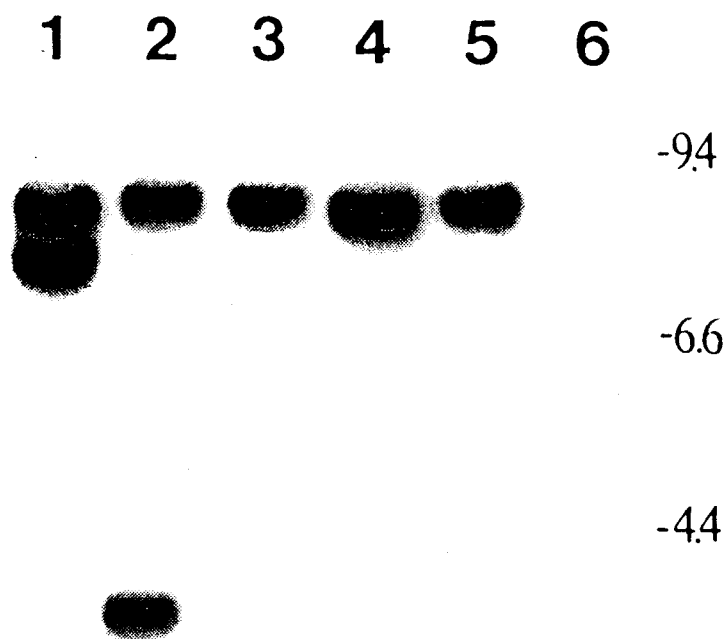


**Figura 6.** Vectores de transformación utilizados en *Gibberella*. pSTA10 lleva como marcador el gen estructural de la reductasa del nitrato de *A. niger*, y pSTA14 el de *A. oryzae*. No se indican las dianas de restricción del ADN de *Aspergillus*; pero hay dos para *XbaI*, separadas por 1,1 kb, en el en fragmento del gen *nii* que lleva pSTA10.

**TABLA 5.** Resultados de los experimentos de transformación llevados a cabo con pSTA10 y pSTA14 en *Gibberella fujikuroi*. Los números son la media de tres experimentos independientes

Vector	Cantidad de ADN ( $\mu\text{g}$ )	Número total de transformantes	Frecuencia de transformación (transf./ $\mu\text{g}$ de ADN)
pSTA10	10	$14 \pm 1$	1,4
	20	$24 \pm 4$	1,2
pSTA 14	10	$17 \pm 1$	1,7
	20	$38 \pm 5$	1,9

Cinco de los posibles transformantes obtenidos con pSTA10 se emplearon para demostrar mediante hibridación por el método de Southern la presencia en su genomio de ADN del vector. La Figura 7 muestra las bandas obtenidas al usar como sonda el plásmido pUC13 (cortado con *EcoRI*) e hibridarlo con el ADN genómico de los transformantes y de la estirpe receptora sin transformar. El plásmido pSTA10 deriva de pUC. El ADN genómico fue digerido con *XbaI*, enzima que corta el plásmido pSTA10 en dos sitios (Figura 6). Si la hibridación se realiza utilizando como sonda un fragmento *EcoRI* de 2 kb de pSTA10 que contiene el extremo 3' del gen *niaD* se obtiene exactamente el mismo patrón de bandas en todos los transformantes excepto en el 2, en el que sólo la banda de mayor tamaño muestra hibridación. En las condiciones utilizadas no se observa hibridación con el gen de la reductasa del nitrato de *Gibberella*. Esto demuestra que las colonias que crecieron en medio mínimo con nitrato amónico como única fuente de nitrógeno son auténticos transformantes, y que el gen *niaD* de *A. niger* se expresa en *Gibberella fujikuroi*.



**Figura 7.** Hibridación por el método de Southern del ADN genómico (5  $\mu$ g) de cinco de los transformantes obtenidos con pSTA14 (Carriles 1-5) y de la estirpe receptora sin transformar (Carril 6), con una sonda de pUC. El ADN genómico fue digerido con *Xba*I y separado por tamaños en un gel de agarosa al 0,7 %. Después de transferir y fijar al nilón se hibridó con pUC13 digerido con *Eco*RI y marcado radiactivamente. La hibridación se llevó a cabo a 65°C, y los lavados se hicieron con SSC diluido 5 veces.

Los patrones de bandas presentados por los transformantes 3 y 5 sugieren la integración de una sola copia. Ambas sondas, la de pUC13 y la del gen *niaD* hibridan con el mismo fragmento de 8,8 kb generado probablemente por un entrecruzamiento del plásmido pSTA10 entre los sitios *Xba*I. Los transformantes 1 y 4 presentaban dos bandas (de 8,5 y 7,8 kb las del transformante 1 y de 8,5 y 8,8 kb las del transformante 4) que hibridaban con las dos sondas, lo cual indica la integración de dos copias del plásmido pSTA10 en sitios diferentes. El transformante 2 probablemente se originó por una integración via secuencias de pUC, de forma que da dos bandas

que hibridan con pUC13 pero solo una de ellas (la de mayor tamaño) hibrida con la sonda *niaD*. Alternativamente, puede proceder de la integración de dos copias de pSTA10 en dos sitios diferentes, y una de estas copias ha perdido por delección una parte de su ADN, aquella que contiene el fragmento *EcoRI* de 2 kb utilizado como sonda.

Una vez desarrollado el sistema de transformación, se probó con otros vectores (ver apartado 2.2 del Material y Métodos), pero solo se obtuvieron resultados positivos con el plásmido pPS11, que lleva como marcador el gen de resistencia a kanamicina del transposón Tn903. En este caso la frecuencia de transformación fue también baja (obtuvimos 25 transformantes con 10 µg del vector). La ventaja de este sistema es que al llevar como marcador la resistencia a un inhibidor es posible transformar directamente a la estirpe silvestre.

La baja frecuencia de transformación obtenida en todos los casos puede deberse a problemas de expresión del gen, de integración del vector o de ambas cosas a la vez. Los problemas de integración deben existir, ya que los vectores empleados carecen de ADN homólogo a *Gibberella*. A fin de mejorar la frecuencia de transformación decidimos introducir ADN de *Gibberella* en el vector pSTA14. Previamente habíamos observado que la digestión de ADN genómico de *Gibberella* con *XbaI* daba lugar a un fondo difuso en el que destacaban unas bandas definidas. Se eligieron dos de estas bandas, de 2 y 6 kb respectivamente, como fuente de ADN para su introducción en pSTA14. Se obtuvo un plásmido con un inserto de 2 kb (pBMG1) y otro con un inserto de 6 kb (pBMG2). Uno de ellos, pBMG2, transforma *Gibberella* con una frecuencia entre cinco y diez veces mayor que el plásmido pSTA14 del que procede (Tabla 6).

**TABLA 6.** Eficacia de los vectores pBMG1 y pBMG2 en la transformación de *Gibberella fujikuroi*.

Vector	Cantidad de ADN ( $\mu\text{g}$ )	Número total de transformantes	Frecuencia de transformación (transf./ $\mu\text{g}$ de ADN)
pBMG1	10	$4 \pm 1$	0,35
	20	$7 \pm 1$	0,35
pBMG2	10	$79 \pm 3$	7,9
	20	$179 \pm 11$	8,95
	40	$366 \pm 14$	9,15

### 3.2.

## REGULACION POR NITROGENO DE LA BIOSINTESIS DE GIBERELINAS

La síntesis de giberelinas en la estirpe de *Gibberella* empleada en este trabajo no empieza hasta que se agota el nitrógeno del medio (Candau *et al.* 1992). La disponibilidad de mutantes afectados en la asimilación de nitrato ofrece una oportunidad para profundizar en la naturaleza de tal regulación, ya que debe permitir distinguir entre el agotamiento de nitrato, de nitrito y de amonio.

En este capítulo se describe el efecto de varias fuentes de nitrógeno sobre la síntesis de giberelinas en mutantes afectados en distintas etapas de la ruta de asimilación de nitrato y en la estirpe silvestre.

### 3.2.1. Producción de giberelinas por los mutantes de la ruta de asimilación de nitrato

Hemos analizado el efecto del nitrato sobre la producción de giberelinas de dos mutantes de la reductasa del nitrato (SG140 y SG141), un mutante de la reductasa del nitrito (SG144), dos dobles mutantes carentes de ambas funciones (SG151 y SG152) y un auxótrofo de asparragina (SG150). Todos los experimentos se llevaron a cabo en caldo de producción con las fuentes de nitrógeno y concentraciones de estas que se detallan en la Tabla 7. Los experimentos duraron 15 ó 21 días según los casos, y en algunos de ellos se añadió nitrógeno a los 9 días de cultivo.



**Tabla 7.** Fuentes de nitrógeno empleadas en los experimentos de producción de giberelinas por los mutantes de la ruta de asimilación de nitrato.

Compuesto	Fórmula	Peso Molecular	Concentración		Composición nitrogenada
			g/l	mM	
Nitrato amónico	NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	80,0	0,48	6,0	1 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y 1 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
			1,00	12,5	
Cloruro amónico	ClNH <sub>4</sub>	53,5	0,32	6,0	1 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
			0,64	12,0	
			0,67	12,5	
Asparagina	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,1	0,79	6,0	2 -NH <sub>2</sub>
<i>Adiciones a los 9 días:</i>					
Asparagina	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,1	3,17	24,0	2 -NH <sub>2</sub>
Cloruro amónico	ClNH <sub>4</sub>	53,5	2,55	48,0	1 NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Nitrato sódico	NO <sub>3</sub> Na	83,5	1,00	12,0	1 NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
			4,00	48,0	
Nitrito sódico	NO <sub>2</sub> Na	67,5	0,68	10,0	1 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>

## Mutantes de la reductasa del nitrato

Los mutantes alterados en la reductasa del nitrato son indistinguibles del silvestre por su crecimiento y producción de giberelinas cuando se cultivan con 12 mM de cloruro amónico (Figura 8). Esto indica que los mutantes *nia-1* y *nia-2* no tienen mutaciones fuera de la ruta del nitrato que afecten al crecimiento o a la producción de giberelinas.

Sin embargo, con 6 mM de nitrato amónico (equivalente en nitrógeno a 12 mM de cloruro amónico) estos mutantes crecen menos y producen menos giberelinas que con 12 mM de cloruro amónico. Era de esperar un descenso en el crecimiento, ya que al no poder utilizar el nitrato que forma parte del nitrato amónico solo disponen de la mitad del nitrógeno para crecer. En cambio, el descenso observado en la producción de giberelinas es más acentuado que el esperado por la bajada de peso seco (Figura 8). Aunque es posible atribuir este efecto inhibitorio al nitrato veremos más adelante que existen otras hipótesis que también explican los resultados obtenidos.

Por otra parte incubamos estos mutantes y la estirpe silvestre en medio con 12,5 mM de cloruro amónico y añadimos 12 mM de nitrato sódico a los 9 días de cultivo. Los mutantes *nia-1* y *nia-2* responden deteniendo la producción de giberelinas de forma irreversible tras la adición de nitrato. En cambio, la estirpe silvestre es capaz de asimilar el nitrato que se añadió a los nueve días, como se refleja en el incremento del peso seco y de la producción de giberelinas (Figura 9).

Cuando cultivamos los mutantes *nia-1* y *nia-2* con 12,5 mM de nitrato amónico y como testigo su equivalente en amonio de cloruro amónico (12,5 mM) la producción de giberelinas también se inhibe, pero menos que con 6 mM de nitrato amónico, a pesar de que la cantidad de nitrato en el medio es mayor (Figura 10).

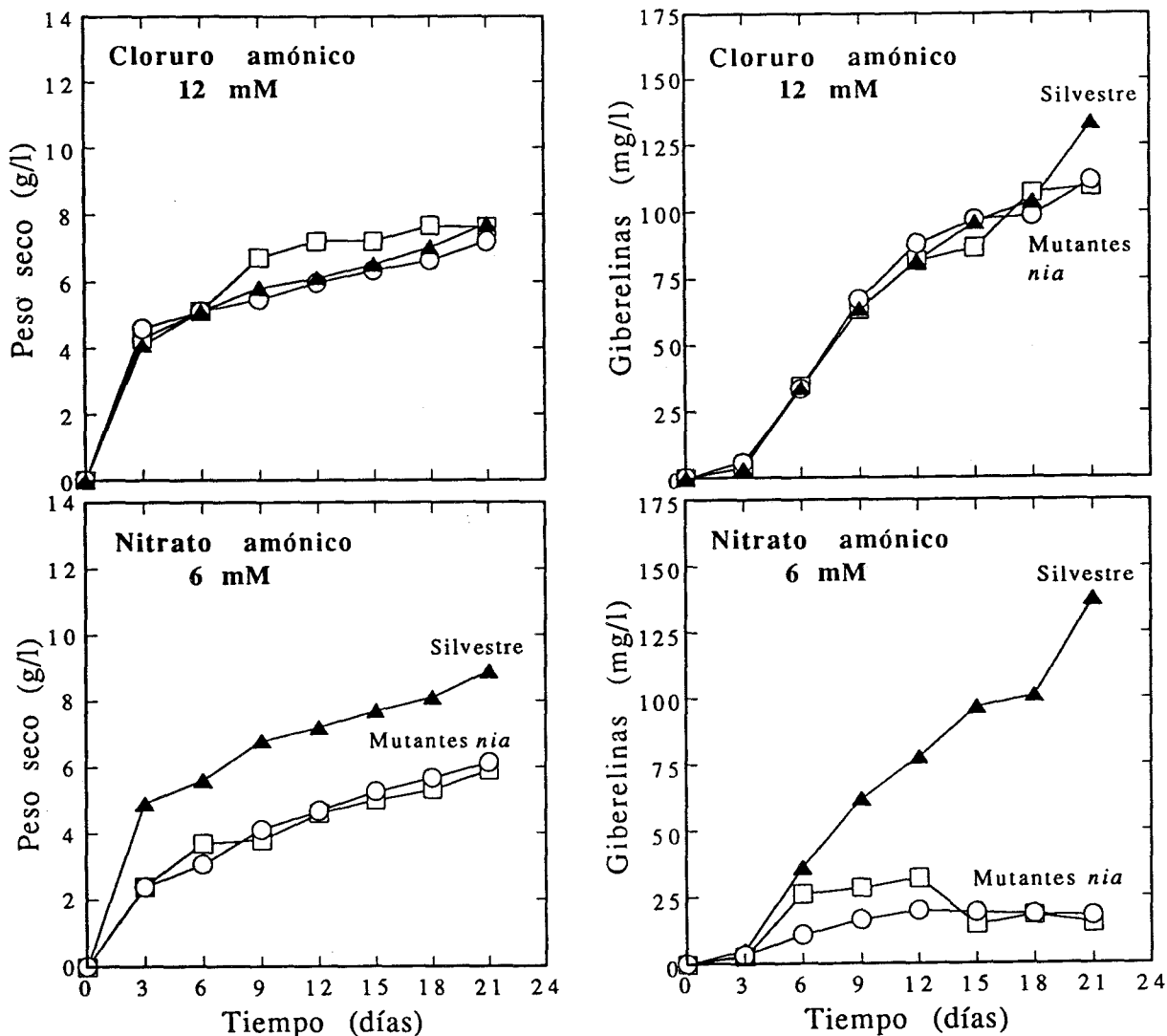
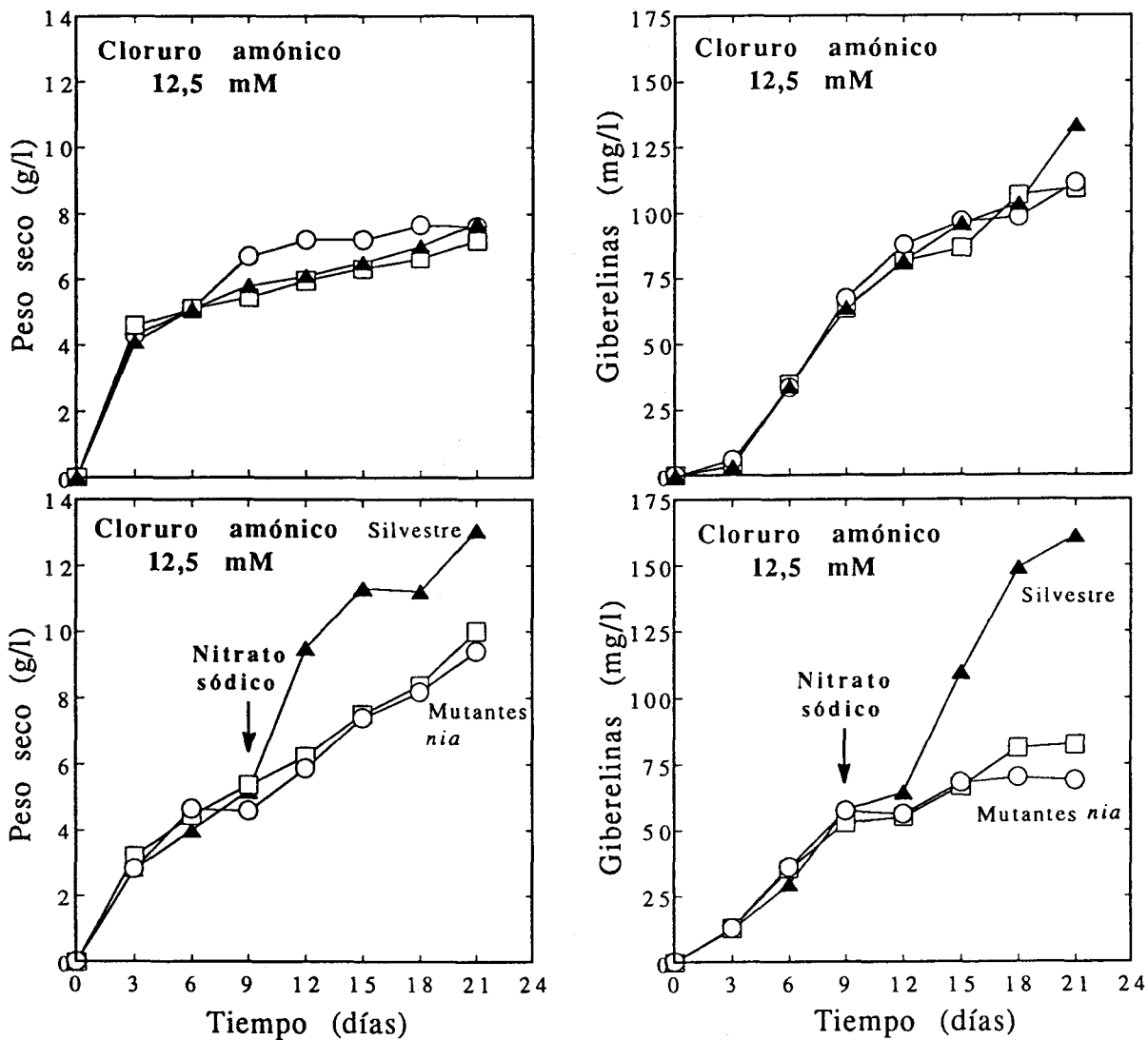
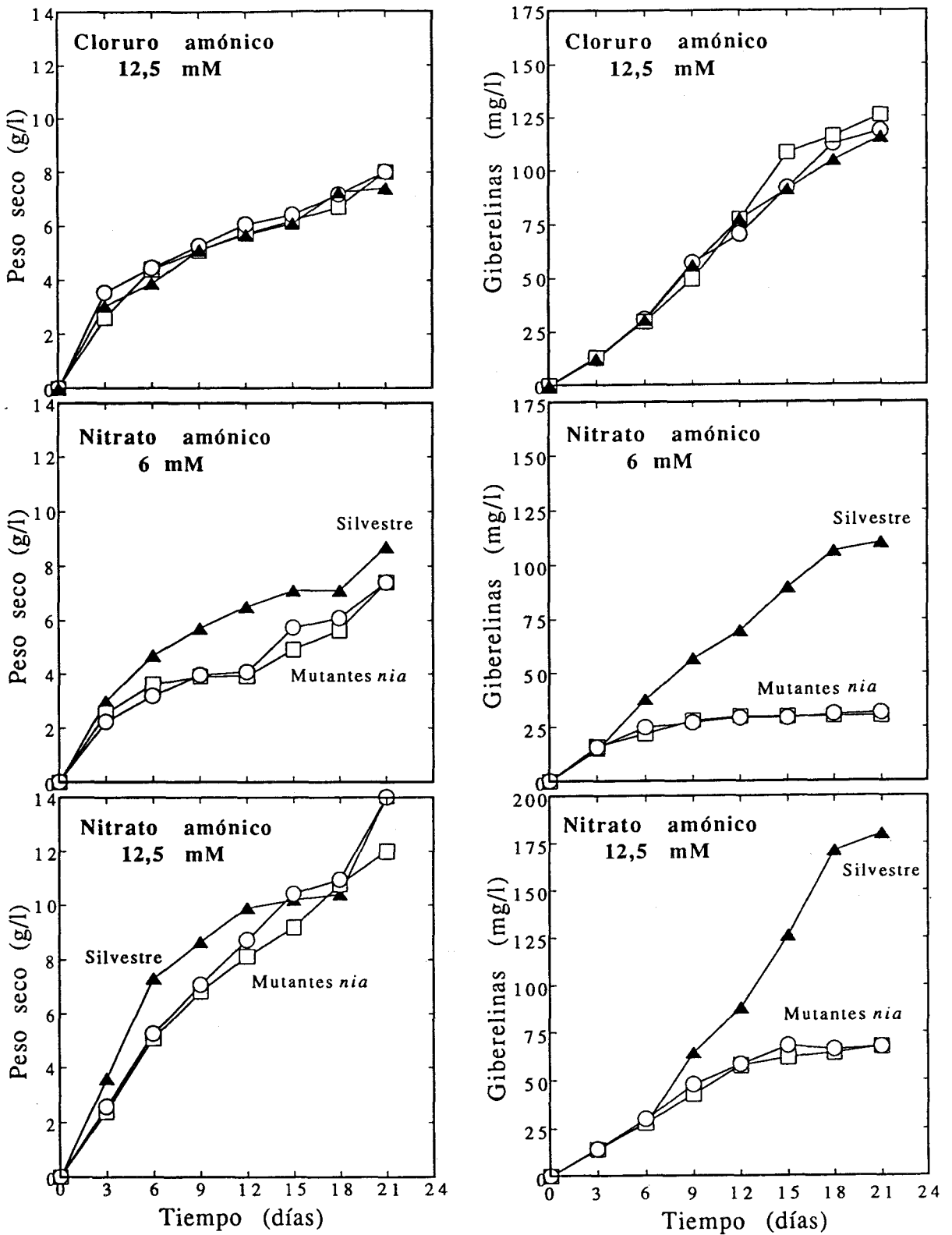


Figura 8. Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) en cultivos de la estirpe silvestre IM158289 de *G. fujikuroi* y de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141) con 6 mM de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  y con 12 mM de  $\text{ClNH}_4$ . Triángulos, estirpe silvestre; cuadrados, SG140; círculos, SG141.



**Figura 9.** Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) en cultivos de la estirpe silvestre IMI58289 de *G. fujikuroi* y de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141) con 12,5 mM de  $\text{ClNH}_4$  y añadiendo 12mM de  $\text{NO}_3\text{Na}$  a los 9 días de cultivo. Triángulos, estirpe silvestre; cuadrados, SG140; círculos, SG141.



**Figura 10.** Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de la estirpe silvestre IMI58289 de *G. fujikuroi* y de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141), en cultivos con 6 y 12,5 mM de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  y con 12,5 mM de  $\text{ClNH}_4$ . Triángulos, estirpe silvestre; cuadrados, SG140; círculos, SG141.

## Mutantes de la reductasa del nitrito

El mutante *nii-2*, carente de actividad reductasa del nitrito, produce menos giberelinas que la estirpe silvestre en todas las condiciones probadas. Aún así se observa claramente que la producción con nitrato amónico es bastante menor que la producción con cloruro amónico. Por tanto en este caso también puede pensarse en un posible efecto inhibitorio del nitrato (Figura 11).

Sin embargo el peso seco del mutante *nii* cultivado con nitrato amónico es bastante menos del 50 % del de la estirpe silvestre en las mismas condiciones ( $13,0 \pm 1,8$  %). Además el peso seco del mutante *nii* con nitrato amónico es solo el  $26,9 \pm 2,8$  % del presentado por la misma estirpe con cloruro amónico.

El crecimiento con cloruro amónico también es menor que el de la estirpe silvestre en las mismas condiciones ( $63,0 \pm 0,8$  %), por lo que el envenenamiento por nitrito no es la única causa del pobre crecimiento de este mutante. Es decir, debe tener otras alteraciones genéticas además de la que le impide asimilar nitrito.

En resumen, aunque la adición de nitrito sódico a los 9 días de cultivo detiene la giberelinogénesis, no podemos concluir que exista un efecto inhibitorio directo sobre la síntesis de giberelinas (Figura 11).

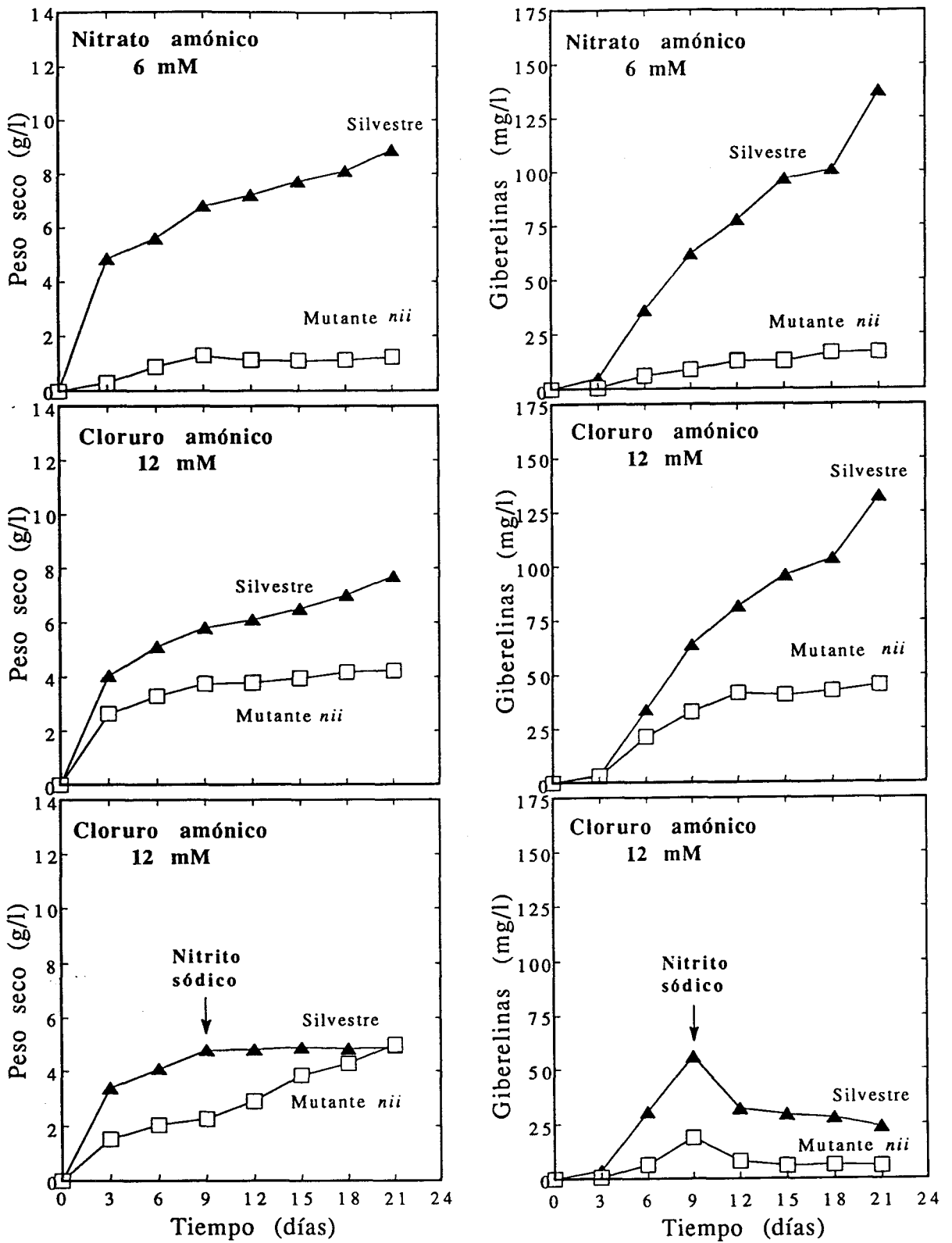


Figura 11. Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de la estirpe silvestre IMI58289 de *G. fujikuroi* y del mutante de la reductasa del nitrito SG144 en cultivos con 6 mM de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , con 12 mM de  $\text{ClNH}_4$  y añadiendo a este último 10 mM de  $\text{NO}_2\text{Na}$  a los 9 días de cultivo. Símbolos negros, estirpe silvestre; símbolos blancos, mutante *nii*.

## Dobles mutantes de las reductasas del nitrato y del nitrito

A partir de la estirpe SG140, incapaz de utilizar nitrato como fuente de nitrógeno, aislamos dos mutantes incapaces de aislar nitrito. Los nuevos mutantes (SG151 y SG152) deben poseer dos mutaciones: la que afecta a la reductasa del nitrato y otra que les impide asimilar nitrito, que puede ser una mutación en el gen estructural de la reductasa del nitrito o una mutación en un gen regulador común a ambas reductasas. De cualquier forma, para los experimentos en los que se utilizaron estos mutantes no necesitamos determinar con exactitud el gen afectado

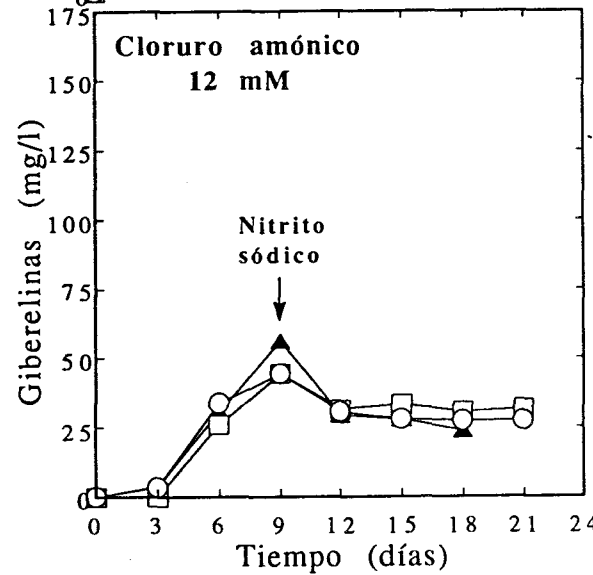
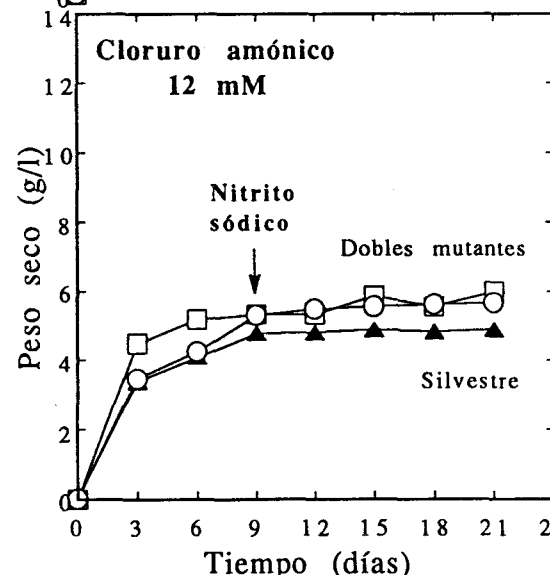
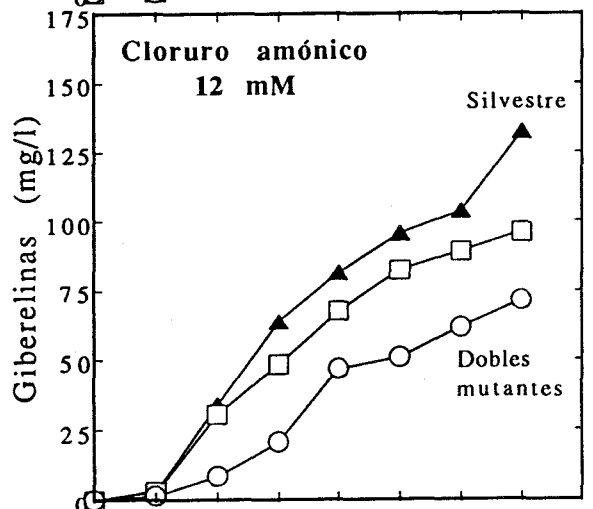
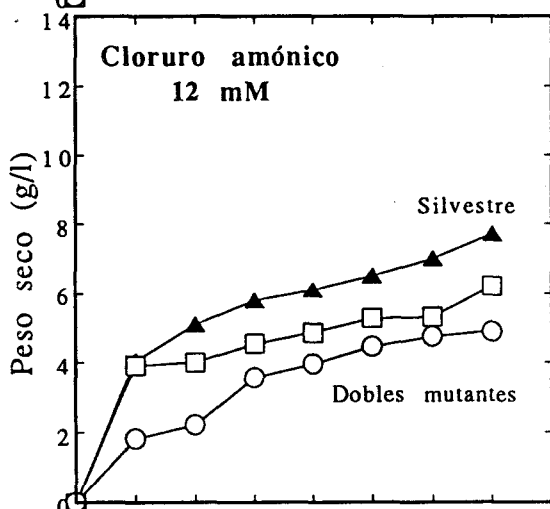
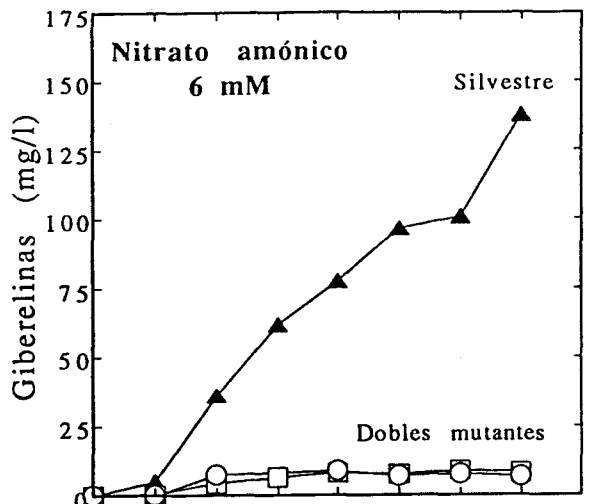
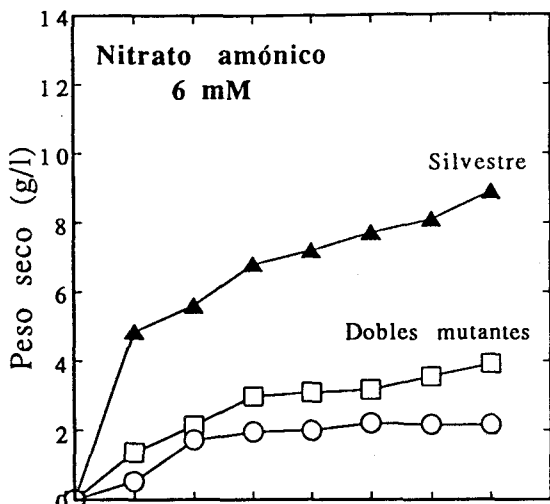
Los dobles mutantes presentan el mismo comportamiento que el mutante *nii-2*, es decir, producen menos giberelinas que el silvestre en todos los casos y la producción es aún menor con nitrato amónico. También se observa una detención de la producción de giberelinas y del crecimiento al añadir nitrito sódico a los 9 días de cultivo (Figura 12).

## Mutante auxótrofo de asparragina

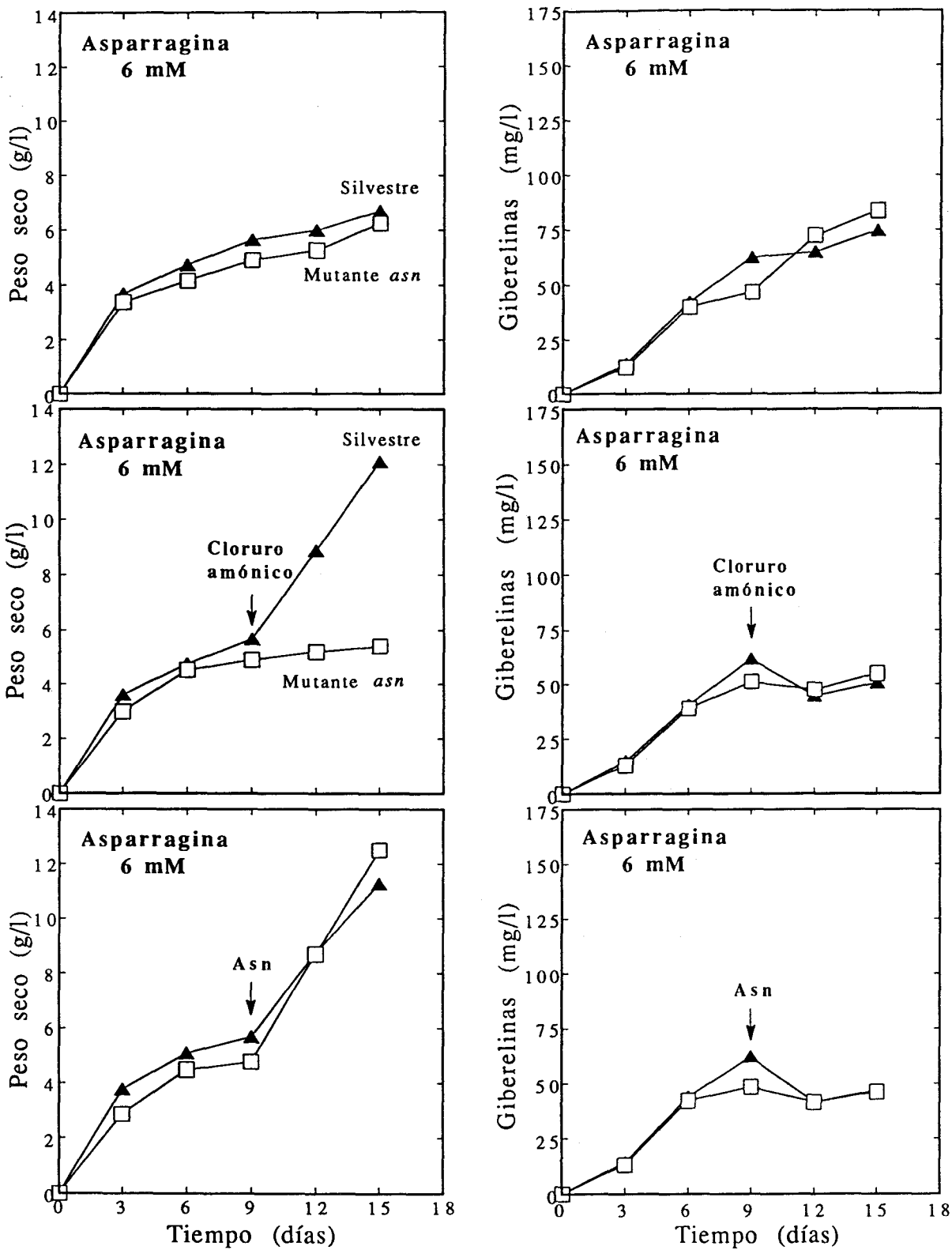
El mutante SG150, auxótrofo de asparragina, produce la misma cantidad de giberelinas que la estirpe silvestre con 6 mM de asparragina como fuente de nitrógeno. De igual forma, la producción se detiene si se añaden 48 mM de cloruro amónico ó 24 mM de asparragina a los 9 días de cultivo (Figura 13).

Al tratarse de auxótrofos de asparragina la adición de cloruro amónico a los 9 días no da lugar a un incremento del peso seco. Es decir, por primera vez hemos obtenido una detención de la síntesis de giberelinas no asociada a un incremento del peso seco. Como testigo, la adición de asparragina, que sí da lugar a crecimiento, también produce el cese de la producción de giberelinas. Este resultado indica que la asparragina no actúa como señal inhibitoria de la giberelinogénesis.





**Figura 12.** Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de la estirpe silvestre IM158289 de *G. fujikuroi* y de los dobles mutantes de las reductasas del nitrato y del nitrito SG151 y SG152 en cultivos con 6 mM de  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , con 12 mM de  $\text{ClNH}_4$  y añadiendo a este último 10 mM de  $\text{NO}_2\text{Na}$  a los 9 días de cultivo. Triángulos, estirpe silvestre; cuadrados, SG151; círculos, SG152.



**Figura 13.** Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de la estirpe silvestre IM158289 de *G. fujikuroi* y del mutante auxótrofo de asparragina SG150, en cultivos con 6 mM de asparragina y con adiciones de asparragina (24 mM) y  $\text{CINH}_4$  (48 mM) a los 9 días de cultivo. Símbolos negros, estirpe silvestre; símbolos blancos, mutante *asn*.

### 3.2.2. Rezumancia de los mutantes *nia*

Dada la relación  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  del nitrato amónico, el peso seco de los mutantes *nia-1* y *nia-2* debería ser aproximadamente la mitad del de la estirpe silvestre en las mismas condiciones y la mitad también del presentado por ellos mismos cuando crecen con cloruro amónico.

Los resultados obtenidos son, sin embargo, diferentes. Según se deduce de la Figura 8, el peso seco de los mutantes *nia* es aproximadamente el 50 % del peso seco del silvestre en las mismas condiciones solamente a los tres días de cultivo (49,3 %). Posteriormente va aumentando, y a los 21 días es ya del 67,7 % (media y desviación típica del incremento del peso seco a lo largo del tiempo:  $61,8 \pm 2,53$  %). El mismo resultado se observa comparando el crecimiento de los mutantes con las distintas fuentes de nitrógeno: el crecimiento con nitrato amónico es más del 50 % del crecimiento con cloruro amónico, concretamente el  $69,8 \pm 3,5$  %.

La diferencia de crecimiento entre los mutantes y el silvestre disminuye cuando se utilizan concentraciones de nitrógeno mayores. En la figura 10 se observa que el peso seco de los mutantes *nia-1* y *nia-2* cuando se cultivan con nitrato amónico es el  $85,6 \pm 4,78$  % del peso seco de la estirpe silvestre. A los tres días los mutantes *nia* han crecido el 70,3 % de lo que ha crecido el silvestre, y a partir de los 15 días no hay diferencia significativa de crecimiento. Lo mismo pasa cuando comparamos el crecimiento de los mutantes con nitrato amónico y con cloruro amónico ( $80,1 \pm 3,28$  %). Cuando el micelio se cultiva con 12,5 mM de nitrato amónico, la cantidad de amonio es más del doble que cuando se incuba con 6 mM, por lo que se produce una mayor cantidad de micelio rezumante y por tanto el nitrato del medio será consumido más rápidamente. Es decir, aunque con 12,5 mM de nitrato amónico se añade más nitrato que con 6 mM, este nitrato se consume a mayor velocidad y su efecto inhibitorio es menor que al añadir solo 6 mM de nitrato amónico.

El incremento en el peso seco con nitrato amónico encontrado en los mutantes *nia* se atribuyen a la asimilación por los estos

mutantes de parte del nitrato presente en el medio. Es decir, *nia-1* y *nia-2* no carecen totalmente de reductasa del nitrato.

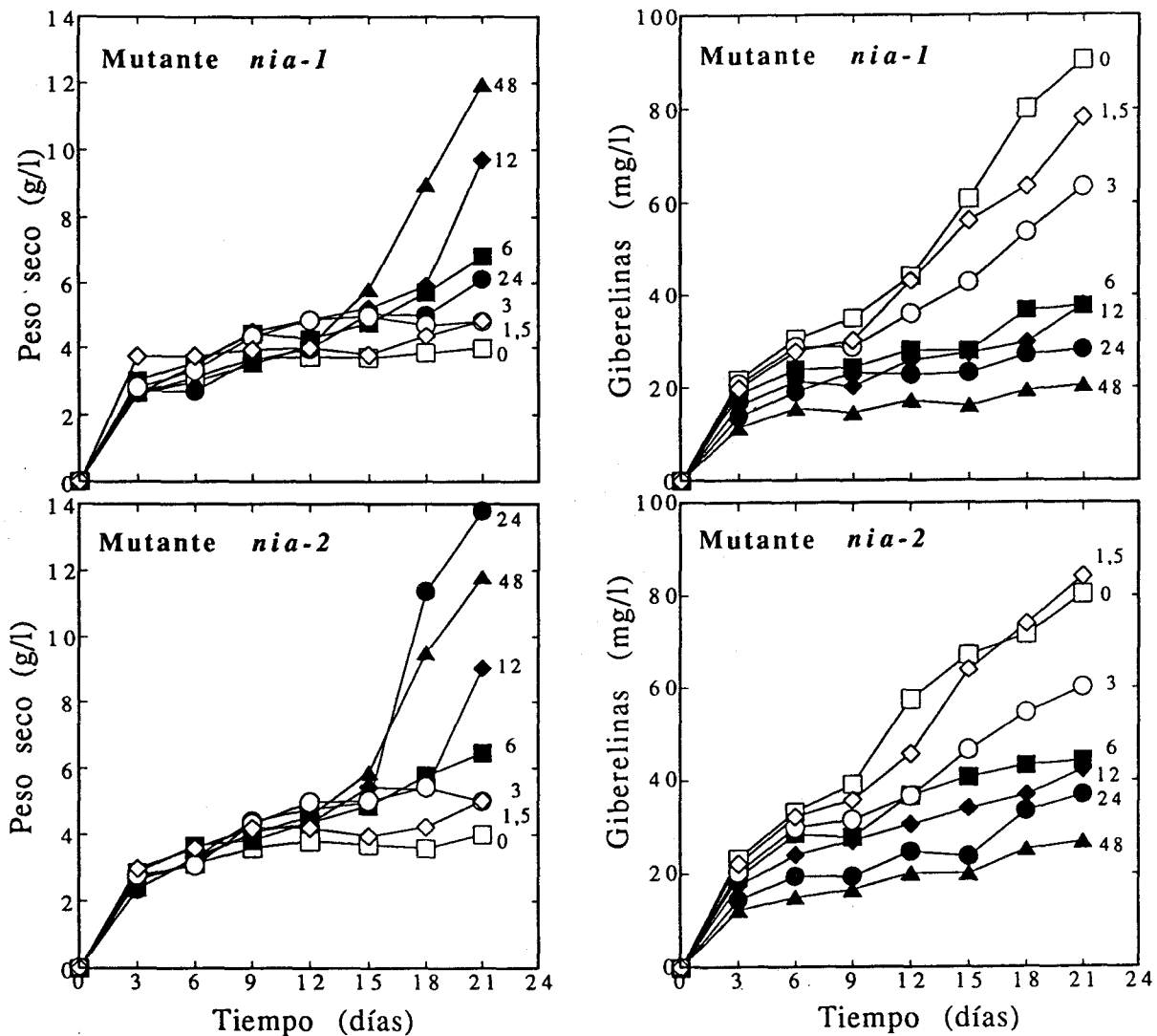
A fin de analizar el efecto de la relación  $\text{NO}_3/\text{NH}_4$  sobre la producción de giberelinas en los mutantes *nia*, utilizamos medios de cultivo en los que el nitrato era aportado por nitrato sódico, y el amonio por cloruro amónico. Utilizamos varias combinaciones de concentraciones de cloruro amónico (6 mM, 12 mM y 18,7 mM) y de nitrato sódico (0 mM, 1,5 mM, 3 mM, 6 mM, 12 mM, 24 mM y 48 mM) (Figuras 14, 15 y 16).

Los resultados muestran que la concentración mínima de nitrato sódico necesaria para reducir la producción de giberelinas a la mitad varía según la concentración inicial de cloruro amónico (Figura 17).

La interpretación de estos resultados exige considerar dos factores: por un lado, las diferencias de crecimiento causadas por las diferentes concentraciones iniciales de  $\text{ClNH}_4$ , y por otro, el efecto del nitrato sobre el crecimiento. Respecto al primer factor, se puede apreciar que el crecimiento con 6 mM de  $\text{ClNH}_4$  es menor que con 12,5 ó 18,7 mM, pero no hay diferencia significativa entre los dos últimos medios de cultivo. Esta diferencia se refleja también en la producción de giberelinas.

Con 12,5 mM de cloruro amónico el peso seco a los 21 días es de alrededor de 8 g/l, y la producción de giberelinas de 120-125 mg/l. Por tanto, la producción por gramo de peso seco es menor que con 6 mM. En este caso, la adición de 3,0 y 6,0 mM de nitrato sódico no produce un efecto inhibitorio apreciable, aunque sí un aumento de peso seco. La disminución de la producción a lo largo del tiempo se hace patente a partir de 12 mM de nitrato sódico (Figuras 14, 15 y 16).

Respecto al efecto de la adición de nitrato, produce sensibles incrementos en el crecimiento debido a la rezumancia de los mutantes.



**Figura 14.** Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141) de *G. fujikuroi*, cuando se cultivan con 6 mM de  $\text{CINH}_4$  y 0 mM, 1,5 mM, 3 mM, 6 mM, 12 mM, 24 mM y 48 mM de  $\text{NO}_3\text{Na}$ .

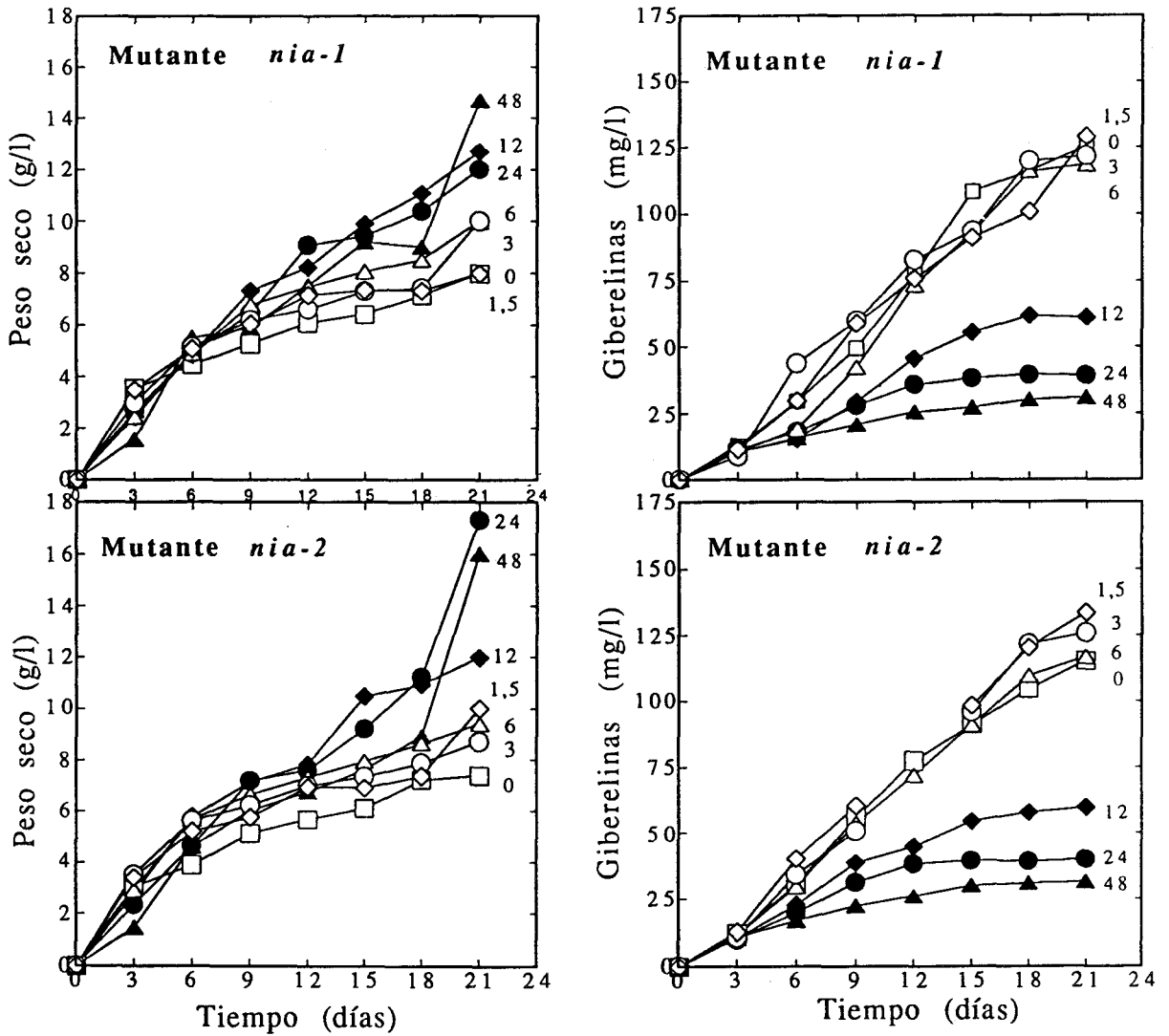


Figura 15. Variación temporal del peso seco (izquierda) y de las giberelinas (derecha) de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141) de *G. fujikuroi*, cuando se cultivan con 12,5 mM de  $\text{CINH}_4$  y 0 mM, 1,5 mM, 3 mM, 6 mM, 12 mM, 24 mM y 48 mM de  $\text{NO}_3\text{Na}$ .

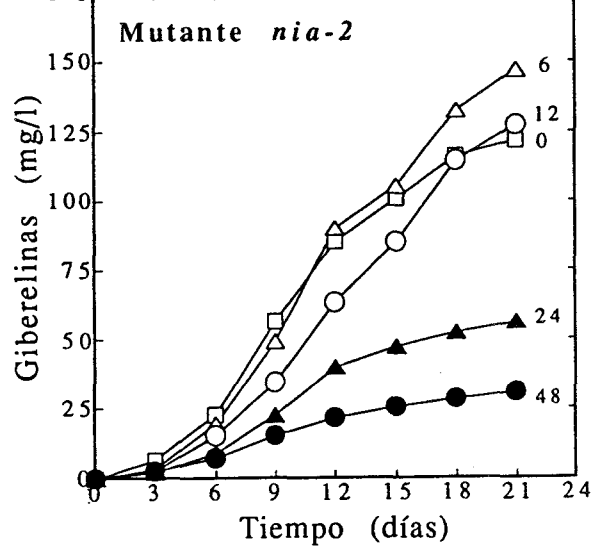
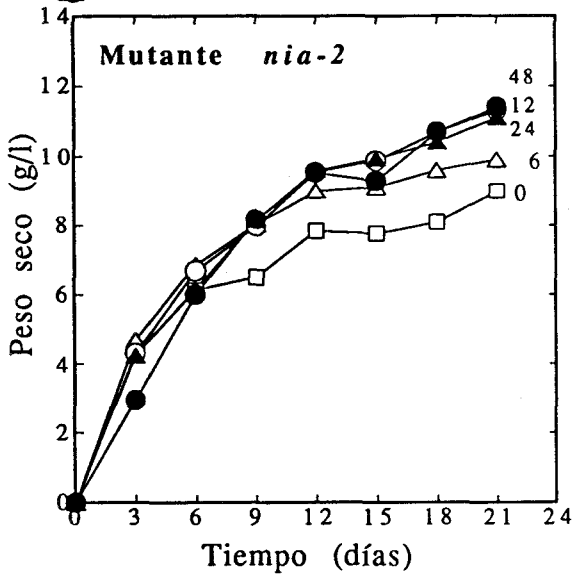
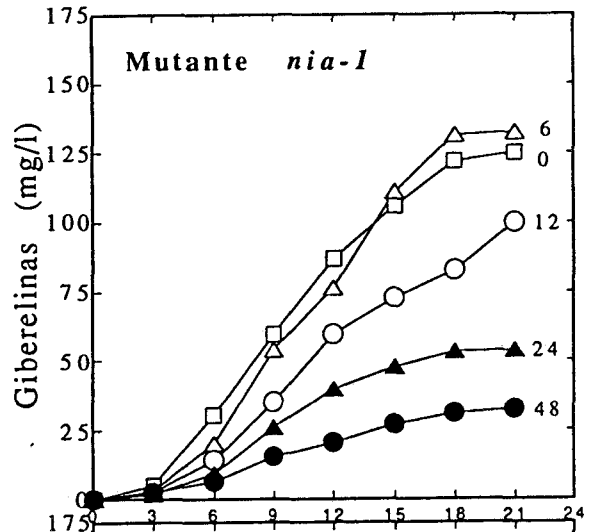
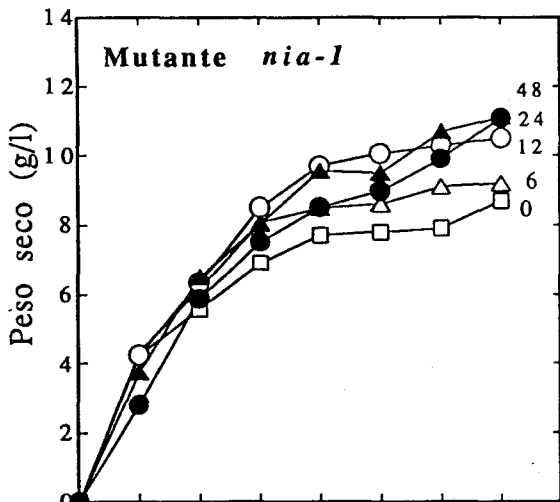


Figura 16. Variación temporal del peso seco (gráficas superiores) y de las giberelinas (izquierda) de los mutantes *nia-1* (SG140) y *nia-2* (SG141) de *G. fujikuroi*, cuando se cultivan con 18,7 mM de  $\text{ClNH}_4$  y 0 mM, 6 mM, 12 mM, 24 mM y 48 mM de  $\text{NO}_3\text{Na}$ .

El uso de concentraciones crecientes de nitrato sódico en los mutantes *nia-1* y *nia-2* (SG140 y SG141) produce incrementos del peso seco (Figuras 14, 15 y 16). Esto nos hizo pensar que estos mutantes eran ligeramente rezumantes y podían asimilar algo de nitrato, con lo cual la concentración de nitrato en el medio de cultivo iba descendiendo a lo largo del tiempo, aunque de una forma mucho más lenta que en cultivos de la estirpe silvestre. Para determinar el grado de rezumancia de estos mutantes calculamos su tasa de crecimiento (g/l/día). Comparando los testigos sin adiciones con los cultivos con cantidades crecientes de nitrato es posible determinar si hay rezumancia. De igual forma, la tasa de producción de giberelinas (mg/l/día) indica el grado de inhibición de los cultivos con concentraciones crecientes de nitrato sódico (Figura 17).

Por otra parte, en las figuras 14, 15 y 16 también observamos que, en algunos casos, el incremento de peso seco de los mutantes *nia-1* y *nia-2* tras la adición de nitrato sódico se hace especialmente patente a los 21 días de cultivo, dándose un notable incremento del peso seco del decimoquinto al vigesimoprimer día de cultivo. Este fenómeno puede atribuirse a la selección de revertientes capaces de asimilar nitrato, ya que el tiempo de incubación de estos experimentos es suficientemente largo como para permitir tal selección.



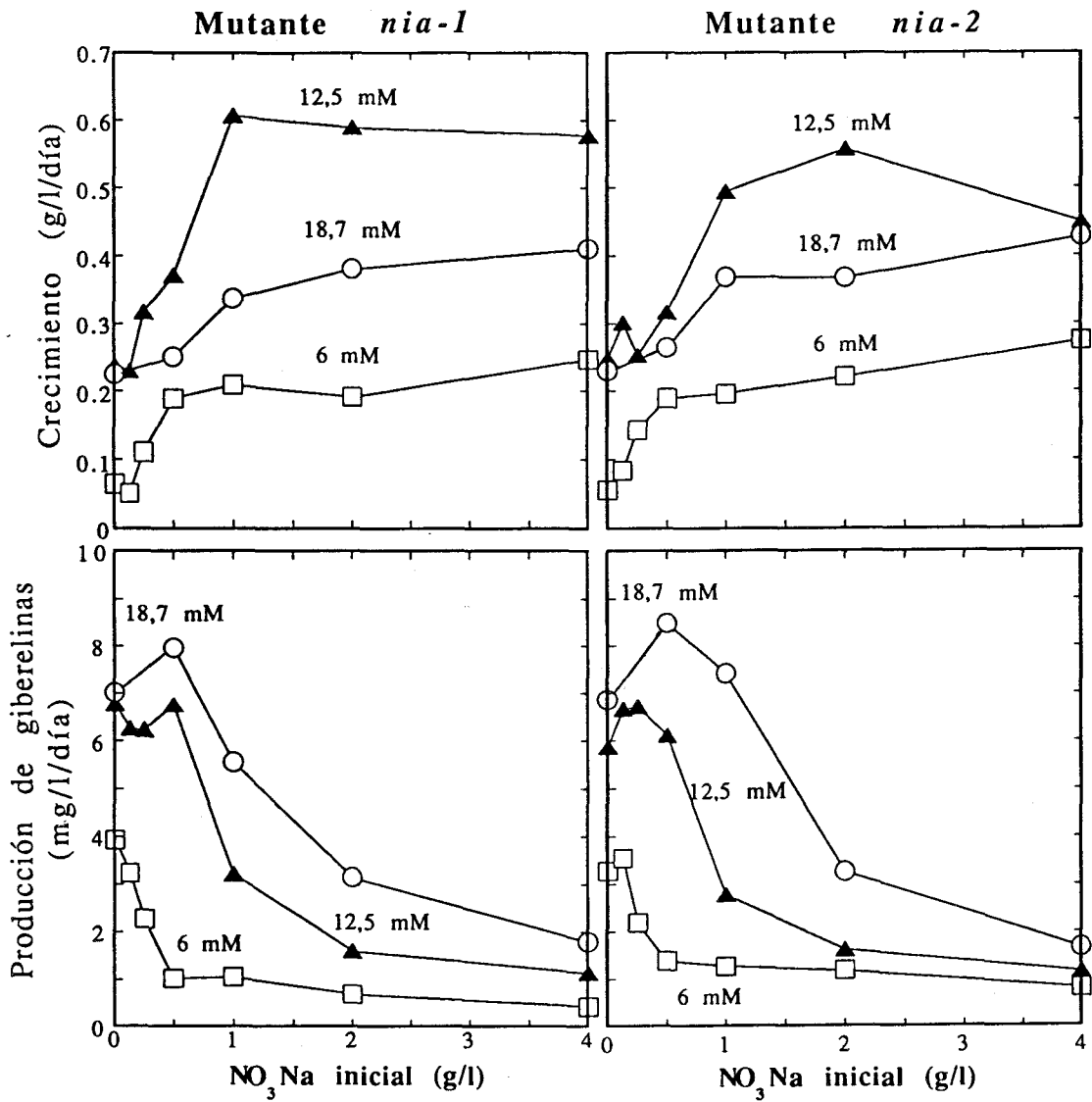


Figura 17. Tasas de crecimiento (g/l/día) y de producción de giberelinas (mg/l/día) de los mutantes *nia-1* y *nia-2* de *G. fujikuroi* con distintas concentraciones de  $\text{CINH}_4$  y  $\text{NO}_3\text{Na}$ .

### 3.2.3. Efecto de fuentes de nitrógeno orgánicas sobre la regulación de la producción de giberelinas

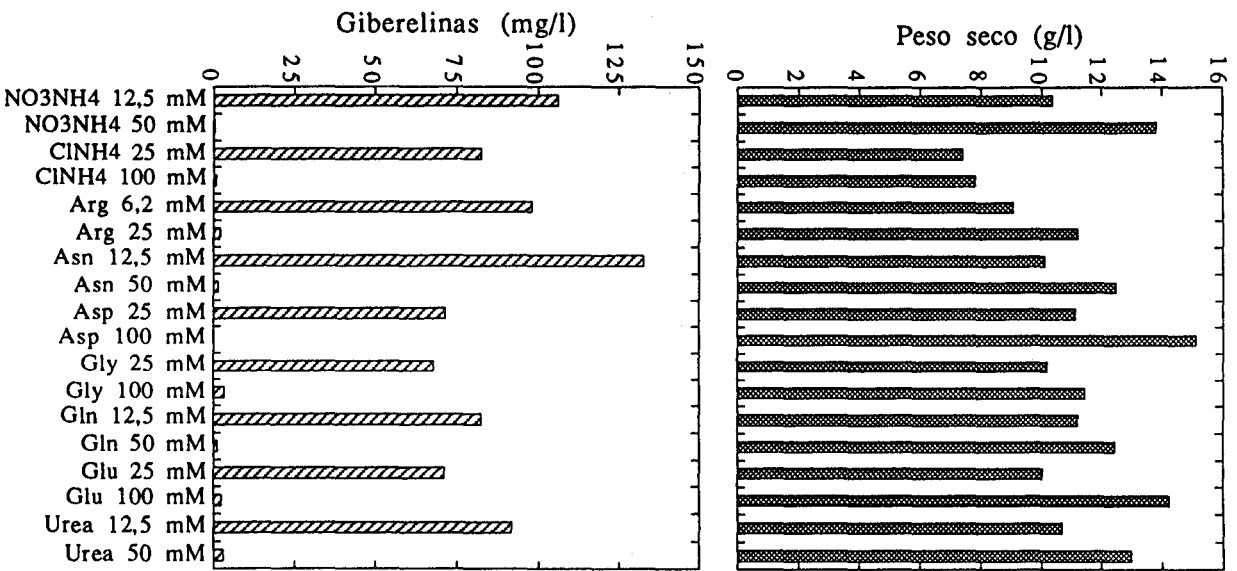
Por experimentos previos sabemos que una concentración de nitrato amónico de 12,5 mM permite una producción de giberelinas, tras 15 días de cultivo, de unos 100 mg/l. En cambio, si usamos 50 mM de este mismo compuesto, la producción de giberelinas no llega a 20 mg/l (Candau *et al.* 1992). Para determinar si este efecto es exclusivo del nitrato amónico o puede extenderse a otros compuestos nitrogenados, cultivamos la estirpe silvestre de *Gibberella* en medio ICI con distintas fuentes de nitrógeno (Tabla 8).

**TABLA 8.** Compuestos nitrogenados utilizados para el estudio de la producción de giberelinas por la estirpe silvestre con distintas fuentes de nitrógeno, a alta y baja concentración.

Compuesto	Fórmula	Peso Molecular	Concentración (mM)	
			Baja	Alta
Nitrato amónico	NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	80,05	12,5	50,0
Cloruro amónico	ClNH <sub>4</sub>	53,50	25,0	100,0
Arginina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174,20	6,2	25,0
Asparragina	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132,12	12,5	50,0
Ac. aspártico	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133,10	25,0	100,0
Glutamina	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146,50	12,5	50,0
Ac. glutámico	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,13	25,0	100,0
Glicocola	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,07	25,0	100,0
Histidina	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155,16	8,4	33,6
Leucina	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131,17	25,0	100,0
Lisina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,19	12,5	50,0
Prolina	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115,13	25,0	100,0
Treonina	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119,12	25,0	100,0
Urea	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	60,06	12,5	50,0

Todas las fuentes de nitrógeno ensayadas permiten un crecimiento vegetativo similar. El peso seco no aumenta cuatro veces al multiplicar por este número la concentración de fuente de nitrógeno porque cuando la concentración de nitrógeno supera cierto umbral otro nutriente (en este caso la glucosa) pasa a ser limitante.

Según la fuente de nitrógeno utilizada cambia la fluorescencia basal del medio, es decir, la que se obtiene como ruido de fondo, independientemente de la presencia de giberelinas. Para poder determinar con exactitud la concentración real de giberelinas en condiciones inhibitorias incubamos en paralelo un mutante agiberélico (SG139) en los mismos medios y condiciones que la estirpe silvestre. Posteriormente, para calcular la concentración de giberelinas producidas en cada caso, le restamos a la fluorescencia total del medio el valor presentado por el caldo en el que había crecido el mutante SG139. De esta forma observamos que la producción de giberelinas, que alcanza siempre niveles considerables a bajas concentraciones de nitrógeno, está totalmente inhibida a concentraciones altas, independientemente del compuesto que aporte el nitrógeno (Figura 18). También observamos que los compuestos nitrogenados más eficientes para la producción de giberelinas son la asparragina y el nitrato amónico.



**Figura 18.** Peso seco (g/l) y giberelinas (mg/l) producidos por la estirpe silvestre de *G. fujikuroi* después de 15 días de cultivo, según la fuente de nitrógeno usada. Las concentraciones a que fueron utilizados estos compuestos son equivalentes entre sí en moles de nitrógeno, como se indica en la Tabla 8.

## **4. DISCUSSION**

#### 4.1.

### BIOLOGIA MOLECULAR DE *GIBBERELLA*

Las técnicas de manipulación genética de hongos filamentosos dependen en gran medida de la utilización de protoplastos. El punto de arranque de esta tesis es el desarrollo de un método de obtención de protoplastos viables en *Gibberella fujikuroi*.

El primer método de obtención de protoplastos descrito en *Gibberella* está basado en el empleo de  $\beta$ -glucuronidasa (Harris 1982), pero no se comprobó la viabilidad de los protoplastos obtenidos. La reproducción de este método con nuestra estirpe, de un grupo diferente a la empleada por Harris, dio lugar a pocos protoplastos, e inviables. Con posterioridad a los experimentos descritos en esta tesis se ha publicado otro método basado en el empleo de enzimas líticas de *Trichoderma harzianum* y jugos gástricos de *Helix pomatia*; este método presenta dos inconvenientes: los protoplastos obtenidos muestran una baja viabilidad (3-6%) y las soluciones enzimáticas son laboriosas de preparar. Otros tratamientos enzimáticos habitualmente empleados en otros hongos filamentosos dan también rendimientos muy bajos en *Gibberella* y los protoplastos obtenidos no son viables.

El método de obtención de protoplastos descrito en esta tesis se basa en el empleo de un preparado enzimático comercial (Novozym 234) tras un tratamiento físico, la sonicación del micelio. Tal preparado se ha empleado anteriormente en una especie muy próxima a *Gibberella*, *Fusarium oxysporum*, donde el tratamiento de esporas germinadas produce más de  $10^4$  protoplastos/ $\mu$ l (Kistler y Benny 1988). Dado que nuestra estirpe de *Gibberella* produce pocas esporas no es posible aplicar el protocolo empleado en *Fusarium*. La digestión enzimática de micelio de nuestra estirpe con Novozym 234 produce un bajo rendimiento (aproximadamente 500 protoplastos/ $\mu$ l). La sonicación previa del micelio permite obtener rendimientos similares a los descritos en *Fusarium*.

En otros hongos filamentosos se obtienen muchos más protoplastos con tratamientos enzimáticos similares al empleado en *Gibberella* sin necesidad de sonicar. El aumento de más de cien veces en la formación de protoplastos producido por la sonicación

sugiere que las enzimas encuentran dificultades para acceder a sus sustratos en la pared. Este hecho indica que la estructura exterior de la pared celular de *Gibberella* es diferente a la de otros hongos.

La disponibilidad de protoplastos viables en número suficiente ha hecho posible la transformación de *Gibberella* con ADN heterólogo (Sánchez Fernández *et al.* 1991). El método de transformación desarrollado utiliza un plásmido que lleva como marcador el gen estructural de la reductasa del nitrato de *Aspergillus*. Tiene el inconveniente de que es necesario contar con mutantes incapaces de asimilar nitrato. Entre las ventajas del sistema se pueden citar la facilidad de aislamiento de tales mutantes y la sencillez del método de selección de los transformantes, ya que se emplea medio mínimo osmoestabilizado, sin ningún inhibidor o suplemento especial.

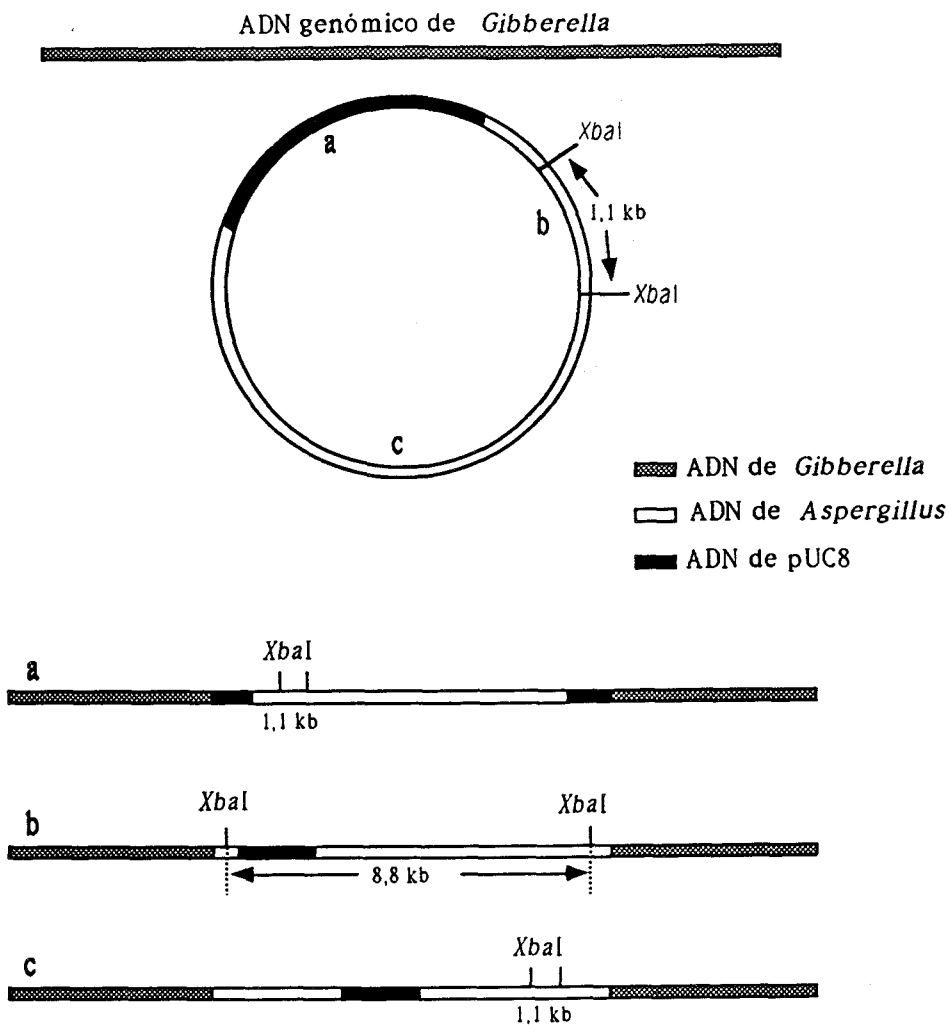
El análisis del ADN genómico de los transformantes mediante hibridación por el método de Southern con una sonda del vector indica que los transformantes poseen el plásmido integrado en su genomio. Las bandas de hibridación esperadas son diferentes según la región del plásmido por la que se haya producido la integración (Figura 19):

a) Integración por secuencias de pUC (empleado como sonda). Aparecerían dos bandas cuyos tamaños dependerían de la distancia a la que se encuentren las dianas *XbaI* genómicas más próximas al lugar de integración. Si la integración se produjera muy cerca de los límites de la secuencia pUC, solamente se detectaría una banda, ya que la otra no tendría suficiente tamaño como para dar hibridación.

b) Integración por una secuencia de 1,1 kb de *Aspergillus* enmarcada por dos sitios *XbaI* (en el extremo del gen *nii*, ver Figura 6). Se obtendría una sola banda de 8,8 kb.

c) Integración por una secuencia de *Aspergillus* diferente a la secuencia de 1,1 kb descrita en el apartado anterior. Aparecería una única banda de tamaño no predecible.

Independientemente del tipo de integración que se produzca, la banda de 8,8 kb puede formarse por integración de más de un plásmido en tándem.



**Figura 19.** Esquema de los transformantes obtenidos según el lugar de integración del vector en el genomio de *Gibberella*.

Cuatro de los transformantes (2, 3, 4 y 5 en la Figura 7) dan una banda de 8,8 kb. Dos de ellos (3 y 5) dan solo esa banda y pueden ser explicados por una integración de tipo b, aunque no podemos descartar nuevas integraciones en tándem. Los transformantes 2 y 4 pueden deberse a integración de tipo c con integraciones adicionales en tándem. El transformante 1, que presenta dos bandas, ninguna de 8,8 kb, puede proceder de una integración simple de tipo a.



Aunque parece ser frecuente la integración de más de un plásmido en los transformantes, los resultados sugieren que una sola copia del gen *niaD* de *Aspergillus* es suficiente para complementar la mutación *nia* de *Gibberella*.

Con posterioridad a este trabajo, y empleando protocolos parecidos, se han descrito dos nuevos sistemas de transformación en *Gibberella*. El primero transforma mutantes auxótrofos para arginina con un plásmido que lleva como marcador el gen *argB* de *Aspergillus nidulans*. El segundo utiliza un gen de resistencia a higromicina para transformar a la estirpe silvestre. En ambos casos la frecuencia de transformación obtenida es similar a la descrita en esta tesis (Brückner *et al.* 1992).

Las frecuencias de transformación obtenidas en *Gibberella* son relativamente bajas, pero son similares a las obtenidas con genes heterólogos en otros hongos filamentosos (Malardier *et al.* 1989). Por ejemplo, la transformación de *Fusarium oxysporum* con un gen de resistencia a higromicina produce 1-2 transformantes por  $\mu\text{g}$  de ADN añadido y, al igual que en *Gibberella*, los transformantes integran el vector en su genomio (Kistler y Benny 1988).

El bajo rendimiento obtenido en la transformación puede deberse, entre otras cosas, a dificultades en tres etapas: la entrada del ADN en los protoplastos, la integración de los plásmidos en el genomio y la expresión del gen.

a) Expresión del gen. Si el promotor del gen de la reductasa del nitrato de *Aspergillus* no funcionara en *Gibberella* solo obtendríamos transformantes cuando el gen se integrara bajo la acción de un promotor de *Gibberella*. En este caso cabría esperar diferencias de crecimiento entre los transformantes en función de la eficacia del promotor de *Gibberella*. Como el crecimiento de los transformantes es siempre idéntico al de la estirpe silvestre, concluimos que en los transformantes obtenidos el gen de la reductasa del nitrato de *Aspergillus* se está expresando a partir de su propio promotor, y que este funciona eficazmente.

Por otra parte, la transformación de *Gibberella* con un gen de resistencia a higromicina requirió el empleo de un promotor obtenido en *Gibberella pulicaris*, ya que el que llevaba el gen de resistencia en el plásmido utilizado (promotor del gen *gpdA* de *A. nidulans*)

no permitió el aislamiento de transformantes (Brückner *et al.* 1992). Esto indica que *Gibberella* no lee con la misma eficacia todos los promotores procedentes de *Aspergillus*.

b) Integración del vector en el genomio. Los plásmidos pSTA10 y pSTA14 utilizados en los experimentos de transformación carecen de ADN homólogo de *Gibberella*, por lo que cabe esperar dificultades en la integración. El incremento en la frecuencia de transformación obtenido al insertar un fragmento de ADN de *Gibberella* de 6 kb en pSTA14 sugiere que la dificultad para la integración del vector en el genomio es uno de los motivos del bajo número de transformantes obtenido.

c) Entrada del ADN en la célula. El hecho de que la frecuencia de transformación no aumente de forma espectacular al insertar en el vector un fragmento de 6 kb de ADN de *Gibberella* indica que los problemas en la integración del vector no son la única causa de la baja frecuencia de transformación. Por tanto, no podemos descartar la existencia de problemas de entrada del ADN en los protoplastos. Para comprobarlo, habría que modificar las condiciones de transformación, probando varias combinaciones de concentraciones de cloruro cálcico y polietilenglicol.

La incapacidad de los plásmidos para replicarse de forma autónoma es un motivo general de la baja frecuencia de transformación de los hongos filamentosos. En *Aspergillus* se ha incrementado drásticamente la frecuencia de transformación con el aislamiento de una secuencia de autorreplicación (Gems *et al.* 1991). Tal secuencia ha sido empleada en *Gibberella*, donde a pesar de que parece conferir una cierta capacidad de autoreplicación al vector no ha conseguido mejorar la frecuencia de transformación (Brückner *et al.* 1992).

El principal objetivo del desarrollo de un sistema de transformación en *Gibberella* es la clonación de los genes de la ruta de biosíntesis de giberelinas. Las frecuencias de transformantes obtenidas hasta ahora no permiten escrutar genotecas por complementación de mutaciones en la ruta. Se necesitarían frecuencias de transformación al menos cien veces mayores. En cambio, sí es posible el estudio de la expresión de genes previamente clonados.

## 4.2.

### REGULACION DE LA SINTESIS DE GIBERELINAS

Para la producción de giberelinas por *Gibberella fujikuroi* se necesita un medio con una alta relación carbono/nitrógeno. Recientemente se ha demostrado que la síntesis de giberelinas depende del agotamiento de la fuente de nitrógeno del medio (Candau *et al.* 1992). Se desconoce la señal que media el inicio de la síntesis de giberelinas, aunque la información disponible apunta al amonio o a un metabolito derivado de su asimilación.

Los resultados descritos en esta tesis permiten obtener información sobre la naturaleza del compuesto implicado en la regulación. Distintas fuentes de nitrógeno orgánicas producen una inhibición prácticamente indistinguible de la producida por el amonio inorgánico en la estirpe silvestre. La presencia de fuentes de nitrógeno orgánicas no implica la existencia de amonio libre, ya que estos compuestos ceden el amonio en reacciones de transaminación. Este resultado sugiere que la regulación no está mediada por el amonio, sino por un derivado de su asimilación.

Desde un punto de vista teórico, la inhibición de la síntesis de giberelinas en presencia de nitrógeno implica la existencia de un mecanismo que responda a la presencia o ausencia de una señal. Tal señal podría ser un producto aminado, abundante en presencia de nitrógeno en el medio, que posiblemente en conjunción con una proteína inhibiría o reprimiría la biosíntesis de giberelinas. Alternativamente, la señal podría ser un compuesto susceptible de ser aminado, abundante en ausencia de nitrógeno, cuyo efecto fuese inducir o activar la biosíntesis de giberelinas.

Los resultados obtenidos con el mutante auxótrofo de asparragina (Figura 13) indican que, caso de ser cierta la hipótesis de que la señal es un compuesto aminado, este no es la asparragina. Al añadir a los nueve días de cultivo cloruro amónico al mutante se obtiene la misma inhibición que al añadir asparragina. Como observamos en las gráficas de peso seco de la Figura 13 la adición de cloruro amónico no da lugar a una inducción del crecimiento; es decir, el mutante no puede fabricar la asparragina que necesita para vivir a partir del amonio suministrado. En resumen, la adición

de cloruro amónico no permite la síntesis de asparragina, pero detiene la síntesis de giberelinas. Esto indica que la asparragina no actúa como señal inhibitoria.

Si la hipótesis de que la señal es un compuesto aminado fuera cierta, sería posible averiguar su naturaleza repitiendo el mismo experimento con mutantes auxótrofos de distintos aminoácidos. Si se encontrara algún caso en el que la adición de cloruro amónico no detuviera la síntesis de giberelinas, habríamos dado con el compuesto que actúa como señal.

Cuando se usa un caldo de cultivo con la relación carbono/nitrógeno adecuada, los mutantes carentes de reductasa del nitrato producen más giberelinas si la fuente de nitrógeno es cloruro amónico que si es nitrato amónico. La única diferencia entre ambos medios de cultivo es que el nitrato perdura en el medio porque los mutantes no lo asimilan. De esto podría deducirse que el nitrato inhibe la producción de giberelinas. En este caso, las señales mediadoras de la represión por nitrógeno serían al menos dos: la ya mencionada de un producto del metabolismo del amonio, y el propio nitrato.

La hipótesis de que el nitrato inhibe la síntesis de giberelinas es difícil de aceptar por dos razones:

a) El nitrato es el primer eslabón en la ruta de asimilación del nitrógeno. Si existe un compuesto regulador posterior al nitrato, este se formará también por la asimilación del nitrato. No tendría sentido que el nitrato tuviese una función que ya cumple uno de sus derivados fisiológicos.

b) Los mutantes de la reductasa del nitrato son rezumantes; ello implica la existencia de un aporte lento pero constante de amonio a expensas de la actividad residual de la enzima. En consecuencia, la inhibición atribuida al nitrato puede atribuirse al producto de su lenta asimilación, que habría de ser efectivo a las bajas concentraciones que cabe esperar de la asimilación de nitrato por los mutantes.

Los dobles mutantes incapaces de asimilar nitrato y nitrito constituyen una doble barrera para el nitrato. Estos mutantes fueron obtenidos a partir de la estirpe *nia-1* (SG140), que es rezumante. Por lo tanto, la rezumancia de la reductasa del nitrato puede

producir una acumulación de nitrito por encima de los niveles tolerados por el organismo. Esto hace que la inhibición de la producción de giberelinas en presencia del nitrato detectada en los dobles mutantes pueda atribuirse a un efecto tóxico del nitrito. Adicionalmente, tampoco podemos descartar que la actividad reductasa del nitrito sea rezumante y se esté produciendo amonio.

Los experimentos en los que se variaban las concentraciones iniciales de amonio y de nitrato demuestran que cuando hay más micelio hace falta más nitrato para inhibir la producción de giberelinas. Este resultado apoya la atribución del efecto del nitrato a la rezumancia de los mutantes: para una misma concentración inicial de nitrato, cuanto más micelio haya, menor será la concentración residual de nitrato en el medio.

En conclusión, no hay motivos para postular más que una señal reguladora de la producción de giberelinas. Un producto de la asimilación de amonio podría ser una señal negativa y un compuesto susceptible de ser aminado podría ser una señal positiva.

## **5. CONCLUSIONES**

1. La incubación de micelio de *Gibberella fujikuroi* con el preparado enzimático comercial Novozym 234 da lugar a la formación de unos 500 protoplastos/ $\mu$ l. La sonicación del micelio previa al tratamiento enzimático incrementa la producción de protoplastos unas 100 veces.

2. Se han aislado ocho mutantes alterados en la ruta de asimilación de nitrato tras seleccionar entre esporas expuestas a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina aquellas que no crecen con nitrato sódico como única fuente de nitrógeno. Los mutantes obtenidos fueron clasificados en grupos fenotípicos en función de su capacidad para asimilar distintos compuestos nitrogenados. Tres de ellos estaban afectados en el gen estructural de la reductasa del nitrato (SG140, SG141 y SG142), dos en la reductasa del nitrito (SG143 y SG144), uno en alguno de los pasos de síntesis del cofactor de molibdeno (SG146), dos eran auxótrofos de asparragina (SG146 y SG150), y uno de ellos, el SG147, presentaba un fenotipo de hipersensibilidad a nitrito.

3. La incubación de protoplastos obtenidos a partir de un mutante de la reductasa del nitrato con plásmidos que llevan el alelo silvestre del gen *niaD* de *Aspergillus oryzae* o *A. niger* permite obtener colonias transformantes capaces de crecer con nitrato como fuente de nitrógeno.

4. El análisis de hibridación por el método de Southern del ADN de los transformantes obtenidos indica que estos se formaron por la integración del plásmido en el genomio.

5. La inserción en el vector de un fragmento de 6 kb de ADN de *Gibberella* da lugar a un incremento de cinco a diez veces en la frecuencia de transformación.

6. Los mutantes carentes de reductasa del nitrato producen menos giberelinas con nitrato amónico como fuente de nitrógeno que con cloruro amónico. Esta diferencia, que no se observa en el

tipo silvestre, es atribuible a la lenta conversión del nitrato en amonio.

7. La biosíntesis de giberelinas se inhibe por amonio y varios compuestos nitrogenados orgánicos. Esto sugiere que la biosíntesis de giberelinas está regulada negativamente por un derivado del amonio o positivamente por un compuesto susceptible de ser aminado.

8. La producción de giberelinas de los mutantes auxótrofos de asparagina indica que la asparagina no es la señal reguladora de la biosíntesis de giberelinas.



## **6. 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.
- Arnau, J., Murillo, F. J. y Torres-Martínez, S. (1988) "Expression of Tn5-derived kanamycin resistance in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*". *Mol. Gen. Genet.*, **212**: 375-377.
- 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*". *Phytochemistry*, **25**: 1837-1841.
- Avalos, J. y Cerdá-Olmedo, E. (1987) "Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*". *Curr. Genet.*, **11**: 505-511.
- Avalos, J., Mackenzie, A., 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.
- Ballance, D. J., Buxton, F. P. y Turner, J. (1983) "Transformation of *Aspergillus nidulans* by orotidine-5-phosphate decarboxilase gene of *Neurospora crassa*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**: 284-289.
- Banks, G. R. (1983) "Transformation of *Ustilago maydis* by a plasmid containing yeast 2-micron DNA". *Curr. Genet.*, **7**: 73-77.
- Bearder, J. R., MacMillan, J. y Phinney B. O. (1973) "Conversion of gibberellin A<sub>1</sub> into gibberellin A<sub>3</sub> by the mutant R-9 of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochemistry*, **12**: 2655-2659.
- Bearder, J. R., MacMillan, 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*". *Phytochemistry*, **13**: 911-917.
- Bearder, J. R., MacMillan, J., Phinney B. O., Hanson, J. R., Rivett, D. E. A. y Willis, C. L. (1982) "Gibberellin A<sub>13</sub> 7-aldehyde: A proposed intermediate in the fungal biosynthesis of gibberellin A<sub>3</sub>". *Phytochemistry*, **21**: 2225-2230.

- 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.
- Beri, R. K. y Turner, G. (1987) "Transformation of *Penicillium chrysogenum* using the *Aspergillus nidulans amdS* gene as a dominant selective marker". *Curr. Genet.*, **11**: 639-641.
- Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA". *Nucl. Acid Res.*, **7**: 1513-1517.
- 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. y 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.
- Brückner, B. y Blechschmidt, D. (1991) "The gibberellin fermentation". *Critical Rev. Biotech.*, **11**(2): 163-192.
- Brückner, B., May, R. y Loeffler, B. (1990) "Formation and regeneration of protoplasts from *Gibberella fujikuroi*". *J. Basic. Microbiol.*, **30**: 147-152.
- Brückner, B., Unkles, S. E., Weltring, K. y Kinghorn, J. R. (1992) "Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration". *Curr. Genet.*, **22**: 313-316.
- 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.

- Campbell, E. I., Unkles, S. E., Macro, J. A., van den Hondel, C. y Contreras, R. (1989) "Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase". *Curr. Genet.*, **16**: 53-56.
- Candau, R., Bejarano, E. R. y Cerdá-Olmedo, E. (1991) "In vivo channelling of substrates in an enzyme aggregate for  $\beta$ -carotene biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 4936-4940.
- Candau, R., Avalos, J. y Cerdá Olmedo, E. (1992) "Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Plant Physiol.*, **100**: 1184-1188.
- Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R. y Giles, N. H. (1979) "Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 5259-5263.
- Cecich, R. A. (1983) "Flowering in a jack pine seedling seed orchard increased by spraying with gibberellin A<sub>4/7</sub>". *Can. J. For. Res.*, **13**: 1056-1071.
- Cerdá-Olmedo, E. (1987) "Carotene". En *Phycomyces*. Cerdá-Olmedo, E. y Lipson, E. eds. Cold Spring Harbor, New York. pp: 199-222.
- Coggins, C. W. y Henning, G. L. (1988) "A comprehensive California field study of the influence of preharvest applications of gibberellic acid on the rind quality of the Valencia oranges". *Isr. J. Bot.*, **37**: 145-149.
- Constanzo, M. C. y Fox, T. C. (1988) "Transformation of yeasts by agitation with glass beads". *Genetics*, **120**: 667-670.
- 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". *Phytopatology*, **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*". *Phytopatology*, **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 Filippone, P. (1981) "The microbiological production of analogues of mould metabolites. Part 3. Production of a *gem*-difluoro-derivative of gibberellin A<sub>7</sub> 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.*, 1066-1072.
- Darken, M. A., Jensen, A. L. y Shu, P. (1959) "Production of gibberellic acid by fermentation". *Appl. Microbiol.*, **7**: 301-303.
- Davies, B. H. (1965) "Analysis of carotenoid pigments". En *Chemistry and biochemistry of plant pigments*; Goodwin, T. W. ed. Academic Press, London. pp: 489-532.
- Deikman, J. y Jones, D. F. (1985) "Control of  $\alpha$ -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.
- Dhawale, S. S., Paietta J. V. y Marzluf, G. A. (1984) "A new, rapid and efficient transformation procedure for *Neurospora*". *Curr. Genet.*, **8**: 77-79.
- 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 Sokolova, 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.
- Fassatiová, O. (1986) "Moulds and filamentous fungi in technical microbiology". En *Progress in industrial microbiology*. Vol. 22. Bushell, M. E., ed. Elsevier, Amsterdam. pp: 18-32.

- Fincham, J. R. S. (1989) "Transformation in fungi". *Microbiol. Rev.*, **53**: 148-170.
- 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.
- Gems, D., Johnstone, I. L. y Clutterbuck, A. J. (1991) "An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency". *Gene*, **98**: 61-67.
- 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.
- Goodwin, T. W. y Mercer, E. I. (1963) "The regulation of sterol and carotenoid metabolism in germinating seedlings". *Biochem. Soc. Symp.*, **24**: 37-41.
- Goosen, T., Bos, C. J. y van der Broek, H. (1992) "Transformation and gene manipulation in filamentous fungi: an overview". En *Handbook of applied mycology. Fungal biotechnology*. Vol. 4. Arora, D. K., Elander, R. P. y Mukerji, K. G., eds. Marcel Dekker Inc, New York. pp: 151-195
- 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.
- Graebe, J. E. (1987) "Gibberellin biosynthesis and control". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**: 419-465.
- Hanahan, D. (1983) "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids". *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- Hardie, D. G. (1975) "Control of carbohydrase formation by gibberellic acid in barley endosperm". *Phytochem.*, **14**: 1719-1722.
- Harris, G. M. (1982) "Protoplasts from *Gibberella fujikuroi*". *Phytopatology*, **72**: 1403-1407.
- Hashimoto, H., Morikawa, H., Yamada, Y. y Kimura, A. (1985) "A novel method for transformation of intact yeast cells by electroporation". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**: 336-339.
- Hedden, P., MacMillan, J. y Phinney, B. O. (1978) "The metabolism of gibberellins". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **29**: 149-192.
- 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.
- Hinnen, A., Hicks, J. B. y Fink, G. R. (1978) "Transformation of yeast". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**: 1929-1933.
- Ho, R. H. (1988) "Gibberellin A<sub>4/7</sub> enhances seed cone production in field-grown black spruce". *Can. J. For. Res.*, **18**: 139-143.
- 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 a-amy2 promoter is regulated by gibberellins in transformed oat aleurone protoplasts". *EMBO J.*, **8**: 1907-1913.
- Hsieh, W. H., Smith, S. N. y Snyder, W. C. (1977) "Mating groups in *Fusarium moniliforme*". *Phytopatology*, **67**:1041-1045.
- Imshenetsky, A. A. y Ulyanova, O. M. (1962) "Experimental variability in *Fusarium moniliforme* Sheld leading to the formation of gibberellins". *Nature*, **195**: 62-63.
- 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  $\alpha$ -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.
- Johnston, S. A., Anziano, P., Shark, K., Sandford, J. C. y Butow, R. A. (1988) "Transformation of yeast mitochondria by bombardment of cells with micro projectiles". *Science*, **240**: 1538-1541.
- Johnstone, I. L., Hughes, S. G. y Clutterbuck, A. J. (1985) "Cloning an *Aspergillus nidulans* developmental gene by transformation". *EMBO J.*, **4**: 1307-1311.
- 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 A<sub>14</sub> from *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.*, **7**: 283-291.
- Jones, R. L. (1973) "Gibberellins: Their physiological role". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**: 571-598.

- Kathariou, S. (1981) "Gene pool organization in *Fusarium moniliforme*". Tesis doctoral. Universidad de California, Berkeley.
- 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.
- Kistler, H. C. y Benny, U. K. (1988) "Genetic transformation of the fungal plant wilt patogen, *Fusarium oxysporum*". *Curr. Genet.*, **13**: 145-149.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. y Sandford, J. C. (1987) "High velocity micro projectiles for delivering nucleic acid into living cells". *Nature*, **327**: 70-73.
- Klittich, C. J. R. y Leslie, J. F. (1988) "Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*)". *Genetics*, **118**: 417-423.
- Kölblin, R., Brückner, B., Blechschmidt, D. y Fischer, W. (1990) "Activity of mutagens in the fungus *Gibberella fujikuroi*". *J. Basic Microbiol.*, **30**: 675-677.
- 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.
- Leslie, J. F. y Dickman, M. B. (1991) "Fate of DNA encoding Hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)". *Appl. Env. Microbiol.*, **57**: 1423-1429.
- Link (1809), citado en Boot, C. (1971). *Mag. Ges. naturf. Freunde Berlin*, **3**: 10.



- Looney, N. E. y Lidster, P. D. (1980) "Some growth regulator effects on fruit quality, mesocarp composition and susceptibility to postharvest surface making 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 A<sub>4</sub> and C-3 epi-gibberellin A<sub>4</sub>". *Planta*, **165**: 292-294.
- McBride, O. W. y Ozer, H. L. (1973) "Transfer of genetic information by purified metaphase chromosomes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**: 1258-1262.
- McInnes, A. G., Smith, D. G., Durley, R. C., Pharis, R. P., Arsenault, G. P., McMillan, J., Gaskin, P. y Vining, L. C. (1977) "Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. Gibberellin A<sub>47</sub>". *Can. J. Biochem.*, **55**: 728-735.
- Maki, S. J., Brenner, M. L., Davies, P. J. y Krirk, T. P. (1986) "Identification of pea gibberellins by studying [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>-aldehyde metabolism". *Plant Physiol.*, **81**: 984-990.
- Malardier, L., Daboussi, M. J., Julien, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. y Brygoo, Y. (1989) "Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*". *Gene*, **78**: 147-156.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Marín, J. P. (1986) "Hongos asociados con el mal del trigo en Andalucía occidental". *Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetales*, **3**: 409-431.
- Meador, D. B. y Taylor, B. H. (1987) "Effect of early season foliar sprays of GA<sub>4+7</sub> on russetting and return bloom of 'Golden Delicious' apple". *Hort. Sci.*, **22**: 412-416.
- 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.

- 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.
- Ootaki, T., Miyazaki, A., Fukui, J., Kimura, Y., Umemura, S., Okazaki, R. y Jayaram, M. (1991) "A high efficient method for introduction of exogenous genes into *Phycomyces blakesleeanus*". *Jpn. J. Genet.*, **66**: 189-195.
- 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.
- Pateman, J. A., Rever, B. M. y Cove, D. J. (1967) "Genetics and biochemical studies of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*". *Biochem. J.*, **104**: 103-111.
- Peberdy, J. F. y Ferenczy, L. (1985) *Fungal protoplasts*. Marcel Dekker ed. New York.
- 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 McMillan, 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. USA*, **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 Gibberellin*. Vol II. Crozier, A. ed. Praeger, New York. pp: 19-52.
- Pitel, D. W., Vining, L. C. y Arsenault, G. P. (1971) "Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. The sequence after gibberellin A<sub>1</sub>". *Can. J. Biochem.*, **49**: 194-200.
- Portugal, F. H. y Cohen, J. S. A. (1977) *A century of DNA: A history of the discovery of the structure and function of the genetic substance*. MIT Press, Cambridge, Mass.

- 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.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemans, M. A., Pouwels, P. H. y van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987) "Transformation of *Aspergillus* based on hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*". *Gene*, 56: 117-124.
- 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, 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 [<sup>3</sup>H]gibberellin A<sub>20</sub>". *Plant Physiol.*, 71: 645-651.
- Rood, S. B., Buzzell, R. I., Mander, L. N., 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  $\alpha$ -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 *Aspergillus niger niaD* gene encoding nitrate reductase". *Mol. Gen. Genet.*, 225: 231-233.
- Schweizer, M., Case, M. E., Dijkstra, C. C., Giles, N. H. y Kushner, S. R. (1981) "Identification and characterization of recombinant plasmids carrying the complete qa gene cluster from *Neurospora crassa* including the qa-1 regulatory gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5086-5090.
- 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. Cyt.*, 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. Cyt.*, **25**: 605-608.
- Sidhu, G. S. (1985) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. IX. Vegetative compatibility groups". *Phytopatol.*, **75**: 1309-1312.
- 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**: 562-566.
- Sidhu, G. S. (1986) "Genetics of *Gibberella fujikuroi*. VIII. Vegetative compatibility groups". *Can. J. Bot.*, **64**: 117-121.
- 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.
- Smith, J. E. y Berry, D. R. (1983) *The filamentous fungi*. Vol. 4. Edward Arnold ed. London.
- Sokolova, E. V. (1969) "Study of the variability of the character of gibberellin formation changed mutants of *Fusarium moniliforme*". *Genetika*, **5**: 100-108.
- Southern, E. M. (1975) "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis". *J. Mol. Biol.*, **98**: 503.
- 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.

- 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.
- Struhl, K. (1983) "The new yeast genetics". *Nature*, **305**: 391-397.
- Suárez, T y Eslava, A. P. (1988) "Transformation of *Phycomyces* with a bacterial gene of kanamycin resistance". *Mol. Gen. Genet.*, **212**: 120-123.
- 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*. 3ª 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.
- Thomas, T. H. (1985) "Plant growth regulators in the production and storage of outdoor and glasshouse vegetables". En *growth regulators in horticulture*. Menhenett, R. y Jackson M. B. eds. Proc. Conf. Univ. Reading. pp: 29-42.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissima, J. H., Lockington, R. A. y Davis, R. W. (1983) "Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*". *Gene*, **26**: 205-221.
- Tompset, P. B. y Fletcher, A. M. (1979) "Promotion of flowering of mature *Picea sitchensis* by gibberellin and environmental treatments. The influence of timing and hormonal concentration". *Physiol. Plant*, **45**: 112-115.
- Tudzynski, P., Stahl, U. y Esser, K. (1980) "Transformation to senescence with plasmid like DNA in the ascomycete *Podospora anserina*". *Curr. Genet.*, **2**: 181-184.
- Unkles, S. E., Campbell, E. I., Carrez, D., Grieve, C., Contreras, R., Fiers, W., van den Hondel, C. A. M. J. J. y Kinghorn, J. R. (1989) "Transformation of *Aspergillus niger* with the homologous nitrate reductase gene". *Gene*, **78**: 157-166.
- Unkles, S. E., Campbell, E. I., de Ruyter-Jacobs, Y. M. J. T., Broekhuijsen, M., Macro, J. A., Carrez, E. I., Contreras, R., Fiers, W., van den Hondel, C. A. M. J. J. y Kinghorn, J. R. (1989) "The development of a homologous transformation system for *Aspergillus oryzae* based on the nitrate assimilation pathway: a convenient and general selection system for filamentous fungal transformation". *Mol. Gen. Genet.*, **218**: 99-104.

- 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.
- 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  $\alpha$ -amylase by isolated wheat aleurone layers". *Plant Physiol.*, **73**: 692-697.
- Vass, R. C. y Jefferys, E. G. (1979). "Secondary products of metabolism". En *Economic microbiology*. Vol. 3. 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 14C-GA-4 and 14C-GA-7 into 14C-GA-3 by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.*, **6**: 807-814.
- Vollmer, S. J. y Yanofsky, C. (1986) "Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**: 4869-4873.
- 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.
- Wollenweber, H. W. (1931) "*Fusarium*-monographie fungi parasitici et saprophytici". *Z. parasitenk.*, **3**: 269.
- Yabuta, T. (1934) "Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice". *Agr. Hort.*, **10**: 17-22.
- Yabuta, T., Kambe, K. y Hayashi, T. (1935) "Biochemistry of the 'bakanae' fungus of rice. Part 1. Fusaric acid, a new product of the bakanae fungus". *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **10**: 1059-1068.
- 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**

Son muchas las personas a las que por un motivo u otro, tengo algo que agradecer.

En primer lugar a Enrique Cerdá Olmedo y Javier Avalos Cordero, Directores de este trabajo, por su esfuerzo y dedicación a la causa.

A J. R. Kinghorn, por permitirme realizar en su laboratorio de St. Andrews (Escocia) alguno de los experimentos expuestos en esta tesis.

A Carlos Domenech, por sus valiosos consejos, discusiones y sugerencias, tanto de temas científicos como generales.

A todos mis compañeros del departamento, en especial a las viejas glorias de la *pandi* (Reyes, Andrés G., Quique, Rafa Maldo, Amando y ACC) y a los *nenes* del *cluster* (Joaquín, Fernando, Félix, y hasta al Gasent) por las cervecitas kioskeras y nocturnas. A los querubines de la 115, Rafa Flores, Rafa Fdez, Nico y Santi, por convertir el laboratorio en un sitio muy divertido. A los postdocs, Bina, por hacer "toda cosa buena para mí", y Jan, el belga loco, precisamente por eso, por estar loco. A las maripuris, Pepa y Carmen Charo, por aportar al departamento el imprescindible toque femenino. A los titulares, Pepe, Tahía, Isabel, Antonio, Edu y Andrés A., y al catedrático-rector, Juan Ramón, por darnos temas de conversación y consejos de departamento. A Pepe Córdoba, por fregarme periódicamente los 28 matraces sin protestar más de lo necesario.

A mis amigos extradepartamentales, Chari, Paula, Alberto, Inma, Juanqui, Diego e Isabel, por los viajes largos y las excursiones de fin de semana.

A Miguel, por aguantarme todo este tiempo, aunque en el último momento se quitó de en medio.

A todos, muchas gracias.



Son muchas las personas a las que por un motivo u otro, tengo algo que agradecer.

En primer lugar a Enrique Cerdá Olmedo y Javier Avalos Cordero, Directores de este trabajo, por su esfuerzo y dedicación a la causa.

A J. R. Kinghorn, por permitirme realizar en su laboratorio de St. Andrews (Escocia) alguno de los experimentos expuestos en esta tesis.

A Carlos Domenech, por sus valiosos consejos, discusiones y sugerencias, tanto de temas científicos como generales.

A todos mis compañeros del departamento, en especial a las viejas glorias de la *pandi* (Reyes, Andrés G., Quique, Rafa Maldo, Amando y ACC) y a los *nenes* del *cluster* (Joaquín, Fernando, Félix, y hasta al Gasent) por las cervecitas kioskeras y nocturnas. A los querubines de la 115, Rafa Flores, Rafa Fdez, Nico y Santi, por convertir el laboratorio en un sitio muy divertido. A los postdocs, Bina, por hacer "toda cosa buena para mí", y Jan, el belga loco, precisamente por eso, por estar loco. A las maripuris, Pepa y Carmen Charo, por aportar al departamento el imprescindible toque femenino. A los titulares, Pepe, Tahía, Isabel, Antonio, Edu y Andrés A., y al catedrático-rector, Juan Ramón, por darnos temas de conversación y consejos de departamento. A Pepe Córdoba, por fregarme periódicamente los 28 matraces sin protestar más de lo necesario.

A mis amigos extradepartamentales, Chari, Paula, Alberto, Inma, Juanqui, Diego e Isabel, por los viajes largos y las excursiones de fin de semana.

A Miguel, por aguantarme todo este tiempo, aunque en el último momento se quitó de en medio.

A todos, muchas gracias.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los señores firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Rocio Sánchez Fernández

titulada "Transformación y biosíntesis de gibberelinas en Gibberella fujikuroi"

acordó otorgarle la calificación de apto cum laude  
por unanimidad

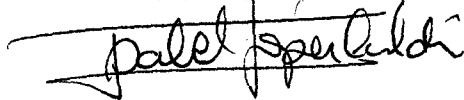
Sevilla, 26 de abril 1993

El Vocal,

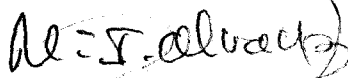


El Presidente

El Vocal,



El Secretario,



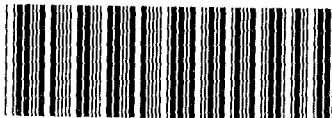
El Vocal,



El Doctorado,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672928