

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“CARACTERIZACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE
GIBERELINAS EN HONGOS DEL GÉNERO *FUSARIUM*
PERTENECIENTES AL COMPLEJO TAXONÓMICO
GIBBERELLA FUJIKUROI”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctora en Bioquímica**

Por:

CLAUDIA MARCELA TRONCOSO VILCHES

Director de Tesis

Dra. María Cecilia Rojas Garrido

**SANTIAGO- CHILE
2013**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por la candidata:

CLAUDIA TRONCOSO VILCHES

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2013.

Director de Tesis:

Dr. María Cecilia Rojas

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela (Presidente)

Dr. Victor Cifuentes

Dra. Virginia Fernández

*Lo dedico a Dios que estuvo presente en mí andar,
dejando a mi paso sabiduría y entendimiento
para lograr mi cometido, junto a mi familia y a
todos que de una u otra forma creyeron en mí.*

Claudia Troncoso Vilches

AGRADECIMIENTOS

Para mis padres (Mario y Hulda), hermana (Carla) y me pequeña hija (Amanda). Por su incesante y permanente apoyo. Por haber sido siempre el pilar fundamental en esta etapa de mi vida lo que ayudó a realizarme personal y profesionalmente.

A mi tutora, la Dra. María Cecilia Rojas Garrido por la paciencia, comprensión y apoyo que he recibido todos estos años en su laboratorio.

A mi comisión de tesis: Dra. María Antonieta Valenzuela, Dra. Virginia Fernández y Dr. Víctor Cifuentes que con sus comentarios, sugerencias y correcciones me permitieron mejorar este trabajo de tesis.

A Patricia Corrales por su ayuda y los gratos momentos compartidos.

A José Cárcamo por todo el apoyo que me ha brindado.

Por la cooperación del grupo de genética de hongos del Instituto de Botánica de la Universidad de Münster en Alemania y del grupo de bioquímica de fitohormonas del Rothamsted Research en Reino Unido.

A todas las personas que conocí en el laboratorio de Bioorgánica: Iván Ponce, María Isabel Amaya, Andrés Castillo, Pablo Bocca y Paula Fuentes, por mencionar algunos.

A los que mencioné y los que eventualmente olvidé mi más profundo agradecimiento por ayudarme a conseguir este logro.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis de Doctorado fue realizada en el laboratorio de Bioorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Este trabajo fue financiado por:

- 1 .Proyecto FONDECYT 1110127
2. Beca otorgada por el Centro FONDAP de Estudios Moleculares de la Célula 2007
3. Beca MECESUP(UCH-0606) 2008
4. Beca para Estudios de Doctorado en Chile CONICYT 2009-2011.

INDICE GENERAL

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Giberelinas: Hormonas vegetales y metabolitos secundarios	2
I.2. El complejo de especies <i>Gibberella fujikuroi</i>	4
I.3. Biosíntesis de GAs en el hongo <i>F. fujikuroi</i> y en plantas	9
I.4. Genes de la biosíntesis de GAs y su regulación	13
I.5. Hipótesis	19
I.6. Objetivo General	19
I.7. Objetivos Específicos	20
II. MATERIALES y METODOS	21
II.1. Cepas de <i>Fusarium</i> e híbridos CxD	22
II.2. Condiciones de cultivo e inducción de la síntesis de GAs	22
II.3. Metabolización de precursores de GAs	23
II.4. Extracción de ¹⁴ C-GAs desde el filtrado del cultivo y/o micelio	24
II.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	25
II.6. Cromatografía en capa fina (TLC)	25
II.7. Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido	26
II.8. Identificación de los productos por espectrometría de masas	26
II.9. Análisis de Northern Blot	27
III. RESULTADOS	28
III.1. Biosíntesis de GAs y <i>ent</i> -kaurenoides en distintas cepas de <i>F. sacchari</i> (MP-B)	29
III.2. Actividad de las oxidasas de GAs en las cepas productoras (B-12756 y B- 1797) y no productoras (B-3828 y B-1725) de <i>F. sacchari</i>	35

III.3. Giberelinas y <i>ent</i> -kaurenoides presentes en cultivos de distintas cepas de <i>F. konzum</i>	40
III.4. Utilización de precursores de GAs marcados con ¹⁴ C por la cepa I-10653 de <i>F. konzum</i> (productora de GAs) y la cepa I-10595 (no-productora)	42
III.5. Ausencia de la actividad de oxidasas de GAs en cepas de <i>F. subglutinans</i> (E-09990 y E2192)	48
III.6. Biosíntesis de GAs por híbridos entre <i>F. fujikuroi</i> y <i>F. proliferatum</i> (CxD)	50
III.6.1. Caracterización de la capacidad de biosintetizar GAs de las cepas C1995 de <i>F. fujikuroi</i> y D-4854 de <i>F. proliferatum</i> .	50
III.6.2. Actividad de oxidasas de GAs en las cepas C-1995 de <i>F. fujikuroi</i> y D-4854 de <i>F. proliferatum</i>	54
III.6.3. Caracterización de la biosíntesis de GAs en cepas híbridas entre <i>F. fujikuroi</i> y <i>F. proliferatum</i> (CxD)	62
III.6.3.1. GAs y <i>ent</i> -kaurenoides sintetizados por las cepas híbridas CxD	62
III.6.3.2. Actividad de las oxidasas de GAs en cepas CxD activas en la biosíntesis de GAs	65
IV. DISCUSIÓN	70
V. CONCLUSIONES	80
VI. REFERENCIAS	82
VII. PUBLICACIONES Y CONGRESOS	90
VII.1. PUBLICACIONES	91
VII.2. CONGRESOS	91

Lista de Figuras

Figura 1.	Estructura de las (A) giberelinas bioactivas (C ₁₉ -GAs) y (B) de sus precursores (C ₂₀ -GAs).	2
Figura 2.	Árbol filogenético de los genes de cpr de las especies de <i>Fusarium</i> dentro y fuera del complejo <i>G. fujikuroi</i> . (Malonek et al., 2005a). Las letras corresponden a las poblaciones de apareamiento.	8
Figura 3.	Vía de biosíntesis de GA ₁ y GA ₃ (destacados en amarillo) en planta superiores y en el hongo <i>F. fujikuroi</i> . Las reacciones y enzimas de plantas se muestran en rojo y para <i>F. fujikuroi</i> en celeste. Las flechas negras indican la ruta metabólica. GGS-2: geranil geranil difosfato sintasa, CPS/KS: <i>ent</i> -copalil difosfato/ <i>ent</i> -kaureno sintasa, CPS: <i>ent</i> -copalil difosfato sintasa, KS: <i>ent</i> -kaureno sintasa, KO: <i>ent</i> -kaureno oxidasa, KAO: <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa.	11
Figura 4.	Mapa físico del clúster de genes de la biosíntesis de GAs en <i>Fusarium fujikuroi</i> .	14
Figura 5.	Análisis de GC-MS del filtrado del cultivo de la cepa B-12756 de <i>F. sacchari</i> . La corriente iónica total es mostrada para un extracto de acetato de etilo después de la derivatización a metil ésteres y a trimetilsilil éteres. Los componentes principales fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los datos publicados (Gaskin and MacMillan, 1992). Peak 1: GA ₁₄ , Peak 2: GA ₄ , Peak 3: GA ₇ , Peak 4: ácido fujenoico, Peak 5: triácido fujenoico, Peak 6: ácido giberelenico, Peak 7: GA ₁₃ , Peak 8: GA ₄₇ / iso- GA ₃ / GA ₁₆ , Peak 9: 7β,18-diOH-kaurenolido, Peak 10: GA ₁ y Peak 11: GA ₃	32
Figura 6.	Análisis de TLC del filtrado de los cultivos de las cepas silvestres de <i>F. sacchari</i> (B-1721, B-1732 y B-12756) y las transformantes de B-12756 complementadas con los genes <i>ggs2</i> y <i>cps/ks</i> de <i>F. fujikuroi</i> . Se extrajeron las GAs después de 10 días en un medio limitante en N. Los estándares de GA ₃ y GA ₄₇ se muestran en los carriles 1 y 2.	34
Figura 7.	Reacciones catalizadas por la MO P450-2 y reacción lateral catalizada por la desaturasa de GAs.	38
Figura 8.	Cinética de utilización de (A) ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-kaurenoico, (B) ¹⁴ C-GA ₁₂ y (C) ¹⁴ C-GA ₄ por cultivos de <i>F.konzum</i> (cepa I-10653) o de <i>F. fujikuroi</i> (cepa IMI 58289). Se incubó la misma cantidad de micelio (10 mg peso seco/ 10 mL de cultivo) con 100.000 dpm de cada uno de los sustratos.	46

Figura 9.	Análisis de GC-MS del filtrado del cultivo de las cepas parentales, C-1995 de <i>F. fujikuroi</i> y D-4854 de <i>F. proliferatum</i> . Corriente iónica total de un extracto de acetato de etilo después de derivatización de las GAs como metil ésteres y trimetilsilil éteres. Los componentes principales fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de estándares (Gaskin and MacMillan, 1992). Peak 1: GA ₁₄ , Peak 2: GA ₄ , Peak 3: ácido fujenoico, Peak 4: triácido fujenoico, Peak 5: ácido giberelenico, Peak 6: GA ₁₃ , Peak 7: GA ₄₇ / iso- GA ₃ / GA ₁₆ , Peak 8: 12-OH-GA ₃₆ , Peak 9: 7β,18-diOH-kaurenolido, Peak 10: GA ₁ y Peak 11: GA ₃ . Los peaks en D-4858 no corresponden a GAs	53
Figura 10.	Análisis por TLC de extractos del micelio en incubaciones con ent- ¹⁴ C-kaureno de las cepas: (A) C1995 de <i>F. fujikuroi</i> , (B) SG139 de <i>F. fujikuroi</i> (no contiene genes de la biosíntesis de GAs) y (C) SG139-FfP450-4 (contiene sólo el gen de la ent-kaureno oxidasa de <i>F. fujikuroi</i>)	58
Figura 11.	Estructura de los productos formados durante la metabolización de precursores de GAs por la cepa no-productora D-4854 de <i>F. proliferatum</i>	61
Figura 12.	Análisis por TLC del extracto del micelio de incubaciones con ent- ¹⁴ C-kaureno de las cepas: (A) D4854 de <i>F. proliferatum</i> , (B) SG139 de <i>F. fujikuroi</i> (no contiene genes de la biosíntesis de GAs) y (C) SG139-FfP450-4 (contiene sólo el gen de la ent-kaureno oxidasa de <i>F. fujikuroi</i>)	61
Figura 13.	Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CxD 116 que produce GA ₃ con: (A) ¹⁴ C-GA ₁₂ , (B) ¹⁴ C-GA ₄ . Los Tr son: ¹⁴ C-GA ₁₂ , 25 min; ¹⁴ C-GA ₄ , 14 min; ¹⁴ C-GA ₁ / ¹⁴ C-GA ₃ , 6 min; ¹⁴ C-GA ₂₄ , 15 min; ¹⁴ C-GA ₄₀ , 11 min.	67
Figura 14.	Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CxD 95 que produce GA ₁ con: (A) ¹⁴ C-GA ₁₂ , (B) ¹⁴ C-GA ₄ . Los Tr son: ¹⁴ C-GA ₁₂ , 24 min; ¹⁴ C-GA ₄ , 14 min; ¹⁴ C-GA ₁ / ¹⁴ C-GA ₃ , 7 min; ¹⁴ C-GA ₂₄ , 16 min.	67
Figura 15.	Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CXD 101 que no sintetiza GAs con: (A) ¹⁴ C-GA ₁₂ , (B) ¹⁴ C-GA ₄ . Los Tr son: ¹⁴ C-GA ₁₂ , 25 min; ¹⁴ C-GA ₄ , 15 min; ¹⁴ C-GA ₁ / ¹⁴ C-GA ₃ , 5 min; ¹⁴ C-GA ₂₄ , 15 min; ¹⁴ C-GA ₉ , 19 min.	68
Figura 16.	Análisis de Northern blot de las cepas parentales e híbridas. Expresión del gen <i>cps/ks</i> que codifica a la enzima clave de la vía de biosíntesis de GAs. Las cepas crecieron por 3 días en condiciones limitantes en nitrógeno	69

Lista de Tablas

Tabla 1.	Algunas especies del complejo <i>G. fujikuroi</i> .	5
Tabla 2.	Genes de <i>Arabidopsis</i> involucrados en la biosíntesis de GAs y la función de las proteínas codificadas.	15
Tabla 3.	GAs y ent-kaurenoides sintetizados por distintas cepas de <i>F. sacchari</i> .	30
Tabla 4.	Niveles de GA ₃ en el medio de cultivo de distintas cepas de <i>F. sacchari</i> (MP-B).	32
Tabla 5.	Transformaciones de precursores de ¹⁴ C-GAs, por cultivos de cepas productoras (B-12756 y B-1797) de <i>F. sacchari</i> .	36
Tabla 6.	GAs presentes en los extractos del filtrado de cultivos de <i>F. konzum</i> (MP-I).	41
Tabla 7.	Productos de la incubación de sustratos de oxidasas de GAs (¹⁴ C) con cultivos de la cepa I-10653 de <i>F. konzum</i> .	44
Tabla 8.	Productos de metabolización de precursores de ¹⁴ C-GAs por la cepa I-10595 de <i>F. konzum</i> (no-productora de GAs).	47
Tabla 9.	Productos obtenidos en incubaciones de la cepa E0990 (<i>F. subglutinans</i>) con ¹⁴ C-GAs.	49
Tabla 10.	GAs y ent-kaurenoides sintetizados por las cepas C-1995 de <i>F. fujikuroi</i> y D-4854 de <i>F. proliferatum</i> , identificadas por GC-MS.	52
Tabla 11.	Actividad de oxidasas de GAs en la cepa C1995 de <i>F. fujikuroi</i> .	56
Tabla 12.	Metabolización de precursores de GAs por la cepa no-productora D-4854 de <i>F. proliferatum</i> .	60
Tabla 13.	Análisis de GAs y ent-kaurenoides en cepas híbridas CxD que sintetizan principalmente GA ₃ .	64
Tabla 14.	GAs y ent-kaurenoides sintetizados por cepas híbridas CxD que sintetizan principalmente GA ₁ .	65

ABREVIATURAS

AMO 1618	2-isopropil-4-dimetilamino-5-metilfenil-1-piperidinacarboxilato metil cloruro.
GA	Giberelina
GC/MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
MO	Monooxigenasa
MPs	poblaciones de apareamiento
TLC	cromatografía en capa fina
Tr	tiempo de retención

RESUMEN

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas diterpénicas sintetizadas como metabolitos secundarios por algunos hongos, entre ellos *Fusarium fujikuroi*, patógeno del arroz que produce grandes cantidades de ácido giberélico (GA₃). Esta especie forma parte del complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi* que incluye otras 10 especies relacionadas filogenéticamente denominadas poblaciones de apareamiento (A-K). Aunque todas las especies del complejo *G. fujikuroi* contienen genes de la biosíntesis de GAs la producción de estos diterpenos se ha descrito casi exclusivamente en *F. fujikuroi*, con excepción de dos cepas de *Fusarium proliferatum* y una cepa de *Fusarium konzum* que sintetiza muy bajas cantidades de GAs.

Con el objeto de investigar si existen otras especies productoras de GAs en el complejo *G. fujikuroi*, se caracterizaron varias cepas de *Fusarium sacchari* (aislado de la caña de azúcar), de *Fusarium konzum* (aislado de pastos de praderas) y de *Fusarium subglutinans* (aislado del maíz). *F. sacchari* es una especie cercanamente relacionada con *F. fujikuroi*, agrupada en el clado Asiático del complejo en tanto que *F. konzum* y *F. subglutinans* son especies filogenéticamente alejadas de *F. fujikuroi* agrupadas en el clado Americano. Las cepas de *F. sacchari* investigadas presentaron diferencias con respecto a su capacidad de sintetizar GAs. Cinco aislados (B-12756; B-1732, B-7610, B-1721 and B-1797) resultaron activos sintetizando principalmente GA₃ (2,76-28,4 µg/mL) mientras que otros dos (B-3828 and B-1725) resultaron inactivos. Las etapas catalizadas por la geranylgeranyl difosfato sintasa (GGS2) y/o la *ent*-kaureno sintasa

(CPS/KS) son limitantes en las cepas productoras ya que los niveles de GA₃ aumentaron 2,9 veces por complementación con los genes *ggs2* y *cps/ks* de *F. fujikuroi*.

Con respecto a *F. konzum*, de los seis aislados que se investigaron tres (I-10653; I-11616; I-11893) sintetizaron GAs, principalmente GA₁, un producto final diferente al de las cepas activas de *F. sacchari*. Además, los niveles de GAs sintetizados por *F. konzum* fueron muy bajos (menos de 0,1 µg/mL). Tres cepas de *F. konzum* resultaron inactivas y no presentaron actividad de ninguna oxidasa de GAs lo que sugiere que los genes respectivos no se expresan. Las dos cepas de *F. subglutinans* ensayadas no sintetizan GAs ni presentan actividad de las oxidasas. Estos resultados indican que la capacidad de sintetizar GAs está presente en otras especies del complejo *G. fujikuroi* además de *F. fujikuroi*, pero puede diferir significativamente entre cepas.

Finalmente se investigó la biosíntesis de GAs en un conjunto de 19 cepas híbridas (CxD) provenientes de un cruce entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum*, dos especies muy cercanas filogenéticamente agrupadas en el clado Asiático del complejo *G. fujikuroi*. Las dos cepas parentales (*F. fujikuroi* C-1995 y *F. proliferatum* D-4854) contienen los genes de la biosíntesis de GAs pero difieren en su capacidad biosintética: C-1995 sintetiza GAs, principalmente GA₃, mientras que D-4854 no produce GAs. Las cepas híbridas no presentaron un patrón de segregación Mendeliano 1:1 como se esperaba sino que se encontró en la progenie un patrón de tres fenotipos: 8 híbridos producen GA₃ en cantidades similares a la cepa parental C-1995 en tanto que 6 cepas resultaron inactivas para la biosíntesis de GAs. Además de los fenotipos parentales una parte de la progenie (5 cepas) produjo pequeñas cantidades de GAs, principalmente

GA₁ y presenta bajos niveles de expresión de los genes. Estos resultados evidencian que el cruce interespecies puede generar nuevos patrones de metabolitos secundarios, en este caso de GAs. El conjunto de resultados obtenidos sugiere que la capacidad de sintetizar GAs en niveles significativos estaría restringida a las especies de *Fusarium* agrupadas en el clado Asiático del complejo *G. fujikuroi*.

ABSTRACT

Gibberellins (GAs) are diterpene phytohormones synthesized as secondary metabolites by some fungi like *Fusarium fujikuroi*, a plant pathogen that produces high levels of gibberellic acid (GA₃). This *Fusarium* species belongs to *Gibberella fujikuroi*, a taxonomic species complex that includes 10 other phylogenetically related species denominated mating populations (A-K). Even when all the species within the *G. fujikuroi* complex contain GA biosynthesis genes, the production of these diterpenes has been almost exclusively found in *F. fujikuroi*, except for two *Fusarium proliferatum* strains and one *Fusarium konzum* isolate that synthesizes very low GA levels.

In order to find out if other species within the *G. fujikuroi* complex synthesize GAs, several strains of three *Fusarium* species were characterized: *Fusarium sacchari* (isolated from sugar cane), *F. konzum* (isolated from prairie grasses) and *Fusarium subglutinans* (isolated from maize). *F. sacchari* is closely related to *F. fujikuroi* and grouped in the Asian clade of the complex while *F. konzum* and *F. subglutinans* are phylogenetically distant species grouped in the American clade. Analyzed *F. sacchari* strains differed in their ability to synthesize GAs. Five isolates (B-12756; B-1732, B-7610, B-1721 and B-1797) were active and synthesized mainly GA₃ (2,76-28,4 µg/mL) while two others (B-3828 and B-1725) were inactive. The steps catalyzed by geranylgeranyl diphosphate synthase (GGS2) and/or *ent*-kaurene synthase (CPS/KS) were limiting in *F. sacchari* active strains since it was found that GA₃ levels increased by 2.9 fold upon complementation with *ggs2* and *cps/ks* genes from *F. fujikuroi*.

For *F. konzum*, six isolates were analyzed of which three (I-10653; I-11616; I-11893) synthesized GAs, mainly GA₁, a different final product than that synthesized by *F. sacchari* active strains. GA levels formed by *F. konzum* isolates were very low (less than 0,1 µg/mL). Three *F. konzum* strains were inactive in GA biosynthesis and contained no GA oxidase activities suggesting that the respective genes were not expressed. For *F. subglutinans* the two isolates assayed did not synthesize GAs and lacked activity of the GA oxidases. These results evidence that GA biosynthesis is present in other species within the *G. fujikuroi* complex besides *F. fujikuroi* but may differ significantly between isolates.

Finally, GA biosynthesis was investigated in a group of 19 hybrid strains (CxD) from an interspecies cross between *F. fujikuroi* y *F. proliferatum*, two closely related species that belong to the American clade in the *G. fujikuroi* complex. Both parental strains (*F. fujikuroi* C-1995 and *F. proliferatum* D-4854) contain the GA biosynthetic genes but differed in their ability to produce GAs: C-1995 synthesizes GAs, mainly GA₃, while D-4854 did not produce GAs. The hybrid strains did not show a Mendelian 1:1 segregation pattern as expected but we found in the progeny a three phenotype pattern: 8 CxD hybrids produced GA₃ at similar levels than the parental strain C-1995 while 6 strains were inactive for GA biosynthesis. Besides the parental phenotypes 5 progeny strains produced low GA levels, mainly GA₁ and showed low expression of the respective genes. These findings indicate that interspecies crosses may generate new profiles of secondary metabolites, like the GAs. Altogether obtained results suggest that

GA biosynthesis at significant levels would be restricted to the *Fusarium* species of the Asian clade in the *G. fujikuroi* complex.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Giberelinas: Hormonas vegetales y metabolitos secundarios

Las giberelinas (GAs) son diterpenoides tetracíclicos que funcionan como hormonas reguladoras del crecimiento en plantas superiores y son producidas como metabolitos secundarios por algunos hongos y bacterias (Fig. 1; MacMillan, 1997, 2002).

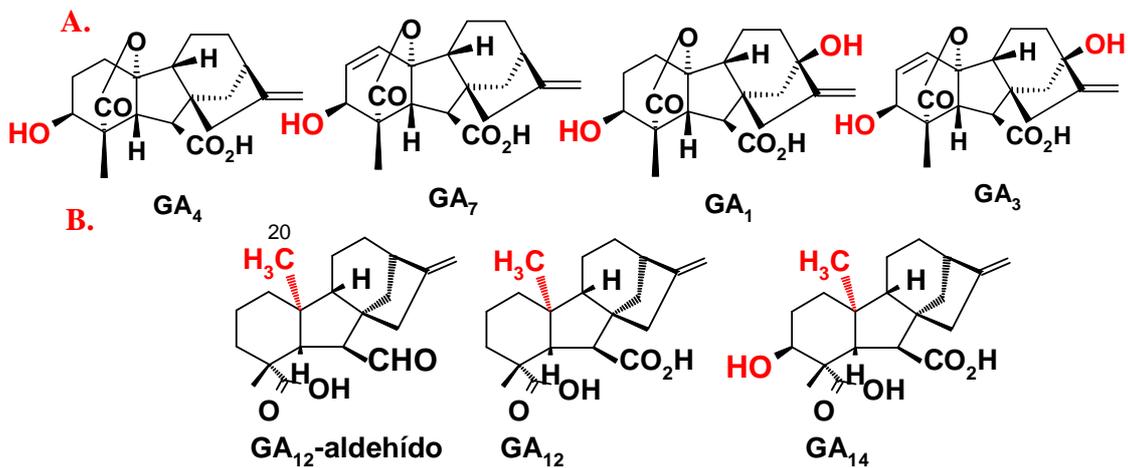


Fig. 1. Estructura de las (A) giberelinas bioactivas (C₁₉-GAs) y (B) de sus precursores (C₂₀-GAs).

Fueron identificadas por primera vez en el hongo ascomicete *Fusarium fujikuroi* (teleomorfo: *Gibberella fujikuroi*) patógeno del arroz causante de la enfermedad de superelongación descrita por primera vez en 1898 (Hori, 1898). El nombre giberelina proviene de la denominación del hongo del cual se aislaron, y a su vez *Gibberella* deriva del latín *gibbera* que se refiere a la giba o forma de joroba que presenta el peritecio de

este hongo. Los síntomas de la enfermedad que causa el hongo sobre el arroz (bakanae) son un crecimiento exagerado de los tallos por hiperelongación de los internodos, hojas amarillentas, lesiones en las raíces y granos parcialmente llenos y estériles o granos vacíos, lo que disminuía drásticamente el rendimiento de los cultivos. En 1926 el científico japonés Eiichi Kurosawa demostró que la enfermedad era producida por una sustancia secretada por el hongo (Kurosawa, 1926) la que posteriormente fue aislada como un sólido no cristalino desde el filtrado del cultivo y se le denominó giberelina A (GA). Este compuesto estimulaba el crecimiento cuando se aplicaba a las plantas de arroz (Yabuta 1935). Posteriormente la giberelina A fue fraccionada en 3 componentes, GA₁, GA₂ y GA₃ y se demostró que GA₃ correspondía al ácido giberélico, identificado estructuralmente en 1954 (Curtis y Cross, 1954; Fig. 1). Sólo en los años 50 los científicos británicos descubrieron que las GAs son reguladores naturales del crecimiento de las plantas y se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas superiores (Radley, 1956). Estas fitohormonas participan en diversos procesos del desarrollo vegetal como la elongación de tallos, la floración, germinación, crecimiento de frutos entre otros (Hedden, 1999; Sponsel, 2003).

Actualmente se han descrito 136 GAs aisladas desde plantas, hongos o bacterias (MacMillan, 2002; Sponsel y Hedden, 2004). Se denominan por la sigla GA seguida de un subíndice que indica su orden de dilucidación; por ejemplo GA₃, GA₁₄, GA₅₃. Los hongos productores de GAs son escasos y pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Sphaceloma* y *Phaeosphaeriae* (MacMillan, 2002) siendo el productor más eficiente el hongo *F. fujikuroi*. Es interesante notar que dentro del género *Fusarium* exclusivamente

algunas especies filogenéticamente relacionadas, miembros del complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi*, producen GAs (Malonek et al., 2005).

I.2. El complejo de especies *Gibberella fujikuroi*

El género *Fusarium* es polifilético y las especies que pertenecen a este género son anamorfos de diferentes géneros teleomorfos del orden Hypocreales (O'Donnell, 1996). El complejo *Gibberella fujikuroi* es un linaje monofilético rico en especies dentro de este orden (O'Donnell y Cigelnik, 1997). Consta de 11 especies sexualmente fértiles (conocidas como poblaciones de apareamiento, mating populations, MPs) y por lo menos 32 anamorfos pertenecientes al género *Fusarium* sección *Liseola* (Leslie y Summerell, 2006). Las distintas especies del complejo *G. fujikuroi* se han aislado desde una variedad de plantas hospedadoras como maíz, arroz, café, caña de azúcar, pino, entre otras, en las que producen diversas enfermedades (Leslie, 1995, 1999) debido a que sintetizan metabolitos secundarios como las micotoxinas moniliformina, fumonisinas o fusarina (Marasas et al., 1984; Nelson et al, 1992; Moretti et al, 1996) o bien fitohormonas diterpénicas (Cerdá-Olmedo et al., 1994; Malonek et al, 2005a). Algunos de estos metabolitos son producidos por varias especies del complejo en tanto que otros presentan una distribución restringida. Particularmente la producción de GAs, principalmente de ácido giberélico (GA₃) ha sido descrita casi exclusivamente en *F. fujikuroi*, patógeno del arroz (Tudzynski, 2005; Malonek et al, 2005a). Todas las especies de *F. fujikuroi* analizadas hasta la fecha producen GAs aunque pueden diferir en la concentración y composición de las GAs sintetizadas (Malonek et al, 2005a). Las

poblaciones de apareamiento del complejo se designan por letras desde la A a la K (MP-A; MP-K). En la Tabla 1 se muestra un resumen de estas especies y sus respectivos hospederos.

Tabla 1. Algunas especies del complejo *G. fujikuroi*.

Especies	Población de apareamiento(MP)	Metabolitos secundarios producidos	Planta que infecta
<i>Fusarium verticillioide</i>	MP-A	fumonisina, moniliformina, ác. Fusárico	Maíz
<i>Fusarium sacchari</i>	MP-B	ácido fusárico, ¿giberelinas?	Caña de azúcar
<i>Fusarium Fujikuroi</i>	MP-C	giberelinas , moniliformina; bovericina, bikaverina	Arroz
<i>Fusarium proliferatum</i>	MP-D	fumonisina, bovericina, moniliformina, giberelinas (1cepa)	Arroz, maíz
<i>Fusarium subglutinans</i>	MP-E	moniliformina, bovericina	Maíz
<i>Fusarium thapsinum</i>	MP-F	Molinoformina	cebada, mijo, maní
<i>Fusarium Nygami</i>	MP-G	?	Cebada
<i>Fusarium circinatum</i>	MP-H	bovericina	coníferas
<i>Fusarium Konzum</i>	MP-I	¿giberelinas?	Pastos de Pradera

Algunas especies del complejo *G. fujikuroi* son capaces de infectar a distintas plantas hospederas y presentan una amplia distribución geográfica mientras que otras especies son específicas con respecto a su hospedero y presentan una distribución restringida (Desjardins, 2003). Por ejemplo, *Fusarium proliferatum* (MP-D) ha sido aislado desde el maíz, la banana, el espárrago, el mango, el tabaco o el trigo, pero principalmente es un patógeno del maíz debido a las micotoxinas que produce (Leslie,

1995) en tanto que *F. fujikuroi* (MP-C) es predominantemente un patógeno del arroz debido a las grandes cantidades de GA₃ que sintetiza y sólo ocasionalmente se ha aislado desde el sorgo (Leslie, 1995, Desjardins, 2003).

Dentro del género *Fusarium* la presencia de genes de la biosíntesis de GAs se restringe al complejo *G. fujikuroi* (Malonek et al., 2005 a; Tudzynski, 2005) sin embargo, a pesar de que todas las especies del complejo contienen genes de GAs se ha descrito que además de *F. fujikuroi* sólo determinadas cepas de otras dos especies, *Fusarium konzum* (MP-I) y *F. proliferatum* (MP-D) presentan la capacidad de sintetizar estas fitohormonas. La cepa I-10653 de *F. konzum* aislada de pasto de pradera (Leslie et al., 2004) sintetiza GA₁ y expresa los genes respectivos a diferencia de otros aislados de *F. konzum* que no producen GAs ni expresan los genes (Malonek et al, 2005 a). Además una cepa de *F. proliferatum* aislada de las raíces de una orquídea sintetiza principalmente GA₄ y GA₇ (Tsavkelova et al., 2008) mientras que otra cepa de *F. proliferatum* aislada de *Physalis alkekengi* sintetiza principalmente GA₃ (Rim et al., 2005). El resto de cepas de *F. proliferatum* ensayadas no producen GAs (Malonek et al, 2005 a,b,c). Todas las cepas no-productoras contienen los genes de la biosíntesis de GAs, pero sus niveles de expresión son muy bajos. Además se encontraron en *F. proliferatum* múltiples mutaciones en las regiones codificante y no-codificante de varios de los genes de GAs (Malonek et al., 2005 b,c). En la cepa D00502, tres etapas iniciales de la biosíntesis de GAs están bloqueadas por estas mutaciones, a diferencia de las últimas etapas que presentan enzimas activas (Malonek et al., 2005 b,c). Una etapa diferente, correspondiente a la GA₁₄ sintasa se encuentra bloqueada en la cepa D02945 de *F. proliferatum* lo que evidencia diversidad genética entre cepas en esta especie. Para

las otras especies no productoras del complejo se ha demostrado, con diferentes aislados, que todas contienen los genes de la biosíntesis de GAs excepto *Fusarium circinatum* y *Fusarium verticilloides* que conservan sólo uno o dos de los genes respectivamente en sus genomas (Malonek et al., 2005 a; Bömke et al., 2008).

El análisis filogenético de las distintas especies de *Fusarium* mediante la secuencia de las regiones ITS del DNA ribosomal o de genes marcadores como el de β -tubulina, factor de elongación traslacional TEF o de histonas demostró que las especies del complejo *G. fujikuroi* tienen un origen monofilético y están cercanamente relacionadas (O'Donnell y Cigelnik, 1997; O'Donnell et al, 2000; Proctor et al., 2004). Los miembros del complejo de acuerdo a esto pueden agruparse en tres linajes denominados clado Asiático, clado Africano y clado Americano (O'Donnell et al., 1998; 2000). La misma clasificación aparece cuando se comparan las secuencias de genes de la biosíntesis de GAs (Malonek et al., 2005 a; Fig. 2). Las especies de *Fusarium* que producen GAs pertenecen a diferentes linajes: *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* pertenecen al clado Asiático en tanto que *F. konzum* está alejada filogenéticamente de *F. fujikuroi* y pertenece al clado Americano (Malonek et al., 2005 a, Fig. 2).

F. fujikuroi (MP-C) y *F. proliferatum* (MP-D) son dos especies cercanamente emparentadas que se pueden distinguir por medio de marcadores moleculares sin embargo no son especies completamente aisladas desde el punto de vista reproductivo. Desjardins et al. (1997) describieron que algunos aislados de campo de plantas de arroz presentaban fertilidad cruzada con cepas de *F. proliferatum* y posteriormente Leslie et al. confirmaron que *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* pueden reproducirse sexualmente entre ellas en forma ocasional para dar una progenie híbrida (Leslie et al., 2004a, 2007). También se identificó un posible híbrido interespecie desde aislados de pasto de pradera en Kansas (Leslie et al, 2004a). La capacidad de sintetizar GAs de estos híbridos no había sido descrita.

I.3. Biosíntesis de GAs en el hongo *F. fujikuroi* y en plantas

Las GAs fueron identificadas por primera vez en el filtrado del cultivo del hongo *F. fujikuroi*, sin embargo actualmente se sabe que son fitohormonas ampliamente distribuidas en las plantas superiores y responsables de la regulación de diversos procesos relacionados con su crecimiento y desarrollo (Hedden, 1999; Sponsel, 2003). Por esta razón y debido a las múltiples aplicaciones agronómicas que tienen las GAs producidas biotecnológicamente por el hongo *F. fujikuroi*, se ha estudiado y descrito en detalle su biosíntesis y regulación a nivel de las reacciones químicas, las enzimas y los genes tanto en sistemas vegetales como en el hongo *F. fujikuroi*, (MacMillan, 1997; Hedden et al., 2002; Tudzynski, 2005). Desde el punto de vista estructural las GAs son metabolitos diterpénicos con el esqueleto carbonado del *ent*-giberelano (Fig. 1). Pueden

tener 19 carbonos (GAs-C₁₉) o 20 carbonos (GAs-C₂₀) formando 5 o 4 anillos respectivamente. El quinto ciclo es un anillo lactónico (Fig. 1). Las GAs-C₁₉ derivan de las GAs-C₂₀ por eliminación del metilo en C-20 como CO₂. Todas las GAs bioactivas como fitohormonas son GAs-C₁₉: GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ (Sponsel y Hedden, 2004). Aunque las plantas y el hongo *F. fujikuroi* producen GAs estructuralmente idénticas, su biosíntesis sigue diferentes rutas con distintas reacciones, enzimas y genes (Hedden et al., 2002; Tudzynski, 2005).

Como todos los terpenoides, las GAs derivan del ácido mevalónico (MVA) a través de la unidad básica isoprenica, el isopentenil difosfato (IDP), precursores que se sintetizan a partir de la acetil-CoA. Las reacciones de alargamiento de la cadena isoprenica hasta farnesil difosfato (FDP, C₁₅) forman parte de la vía general de biosíntesis de terpenos (Fig. 3) pero a partir de FDP la vía se ramifica en forma específica para la biosíntesis de GAs. El intermediario siguiente, geranylgeranyl difosfato (GGDP) es precursor tanto de carotenoides y ubiquinona como de GAs, pero las respectivas biosíntesis están localizadas en diferentes compartimentos subcelulares con pools de sustrato independientes (Domenech et al., 1996; Giordano et al., 1999). Además la formación de GGDP es catalizada por dos GGDP sintasas diferentes (Mende et al., 1997; Tudzynski y Hölder, 1998). En la mayoría de las plantas sin embargo, al menos en los órganos verdes, el IDP no sólo proviene de la vía del MVA (ubicada en el citoplasma) sino que predominantemente proviene del metil eritritol fosfato (MEP) en los plastidios, vía que se inicia a partir de piruvato y gliceraldehido-3-fosfato (Eisenreich, 2001; Sponsel, 2002).

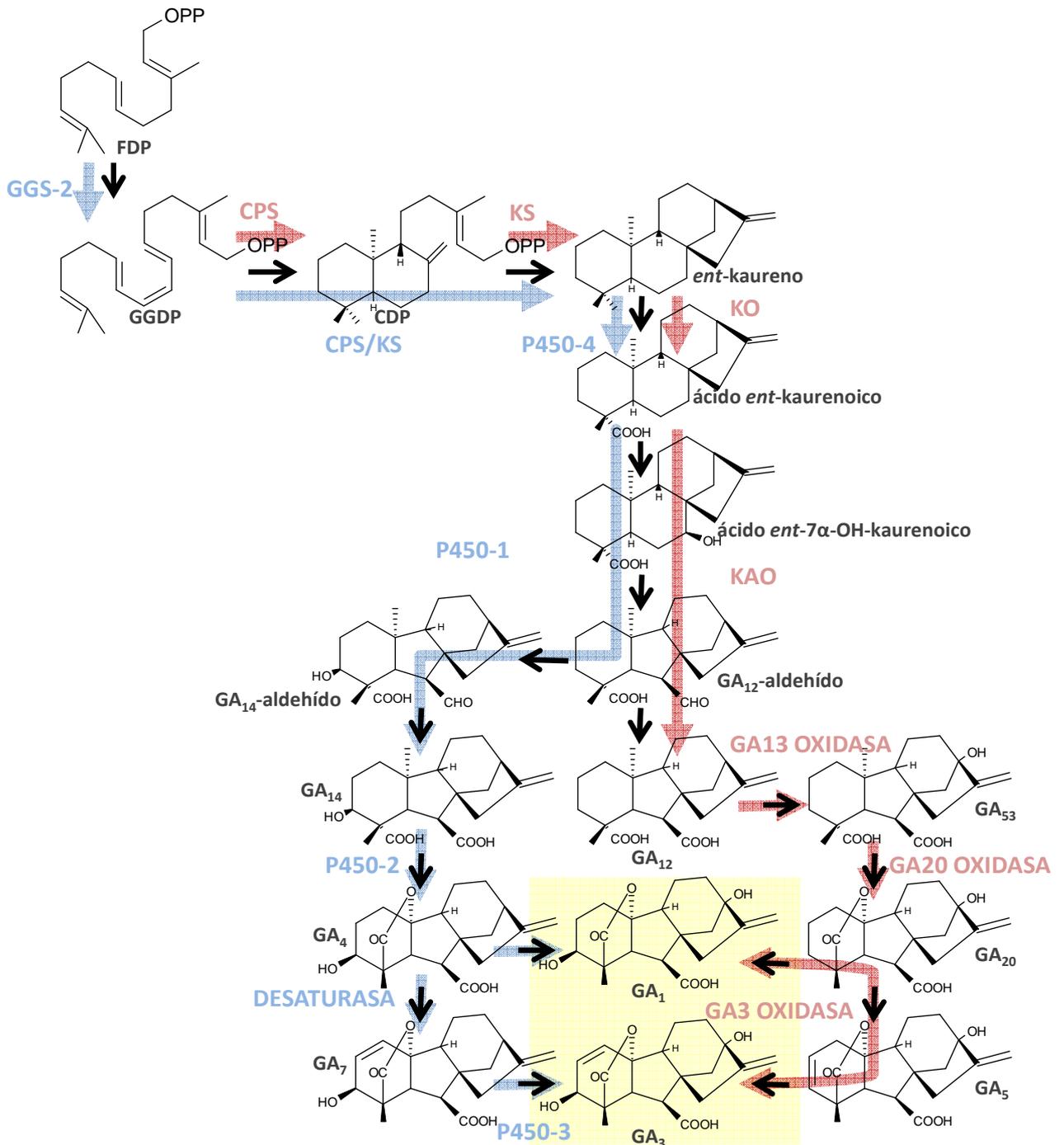


Fig. 3. Vía de biosíntesis de GA₁ y GA₃ (destacados en amarillo) en planta superiores y en el hongo *F. fujikuroi*. Las reacciones y enzimas de plantas se muestran en rojo y para *F. fujikuroi* en celeste. Las flechas negras indican la ruta metabólica. GGS-2: geranyl geranyl difosfato sintasa, CPS/KS: *ent*-copalil difosfato/ *ent*-kaureno sintasa, CPS: *ent*-copalil difosfato sintasa, KS: *ent*-kaureno sintasa, KO: *ent*-kaureno oxidasa, KAO: *ent*-kaurenoico oxidasa.

Tanto en plantas como en el hongo el GGDP es posteriormente convertido en el hidrocarburo cíclico *ent*-kaureno en dos etapas via el intermediario cíclico *ent*-copalil difosfato (CDP; Fig. 3). En las plantas las dos ciclaciones son catalizadas por enzimas diferentes, la CDP sintasa (CPS) y la *ent*-kaureno sintasa (KS) (Duncan y West, 1981; MacMillan, 1997) mientras que en *F. fujikuroi* una ciclasa bifuncional (CPS/KS) cataliza ambas reacciones (Kawaide et al., 1997; Tudzynski et al., 1998). El *ent*-kaureno luego se oxida en el metilo C-19 hasta ácido carboxílico generando ácido *ent*-kaurenoico vía *ent*-kaurenol y *ent*-kaurenal. Una monooxigenasa P450 cataliza las 3 reacciones en plantas (KO; Helliwell et al, 1998) o en el hongo (P450-4; Tudzynski et al., 2001). El ácido *ent*-kaurenoico sufre varias oxidaciones posteriores en C-7, C-6 y/o C3 catalizadas por otra monooxigenasa P450 multifuncional: la *ent*-kaurenoico oxidasa en plantas (KAO; Helliwell et al., 2001) o la GA₁₄ sintasa en *F. fujikuroi* (P450-1; Rojas et al, 2001, 2004). La monooxigenasa P450-1 convierte el ácido *ent*-kaurenoico en GA₁₄ a través de ácido *ent*-7 α -hidroxikaurenoico, GA₁₂ aldehído y GA₁₄ aldehído como intermediarios (Fig. 3) lo que indica que esta enzima puede oxidar al menos tres centros carbonados del sustrato, C-7, C-6 y C-3 (Rojas et al., 2001). Por lo tanto, en el hongo la vía se ramifica a nivel del GA₁₂ aldehído generando tanto GAs 3 β -hidroxiladas (vía principal) como GAs no hidroxiladas (vía minoritaria). En plantas la *ent*-kaurenoico oxidasa carece de actividad de 3 β -hidroxilasa por lo que no se forma GA₁₄ aldehído a diferencia de *F. fujikuroi*. La hidroxilación en 3 ocurre al final de la secuencia metabólica y es catalizada por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (Hedden et al., 2002). A partir del GA₁₂ aldehído la secuencia difiere en plantas y *F. fujikuroi*. En el hongo tanto GA₁₄ como GA₁₂ son oxidados en C-20 eliminándose el metilo en forma de

CO₂ a través de intermediarios C-20 alcohol y C-20 aldehído (Tudzynski et al., 2002). La C-20 oxidasa del hongo es una monooxigenasa multifuncional unida a la membrana del retículo endoplásmico (P450-2; Tudzynski et al., 2002) que forma las GAs-C₁₉ GA₄ o GA₉. A diferencia del hongo, en plantas la C-20 oxidasa es una dioxigenasa soluble dependiente de 2-oxoglutarato (Hedden et al., 2002).

Las últimas etapas de la biosíntesis de GA₃, el principal producto final en *F. fujikuroi*, consisten en la introducción de un doble enlace en GA₄ por una desaturasa seguida por la hidroxilación en C-13 de GA₇ (Fig. 3) por una monooxigenasa P450 (P450-3; Tudzynski et al., 2003). Recientemente se demostró que la GA₄ desaturasa fúngica es una dioxigenasa soluble dependiente de 2-oxoglutarato (Battacharya et al, 2012), la única enzima de este tipo presente en el sistema fúngico.

La giberelina GA₃, el principal producto final en el hongo es sintetizada sólo por algunas plantas a través de reacciones alternativas que involucran intermediarios 13-hidroxilados (Fig. 3). En general el principal producto final en las plantas es GA₁ (GA bioactiva 3β,13-dihidroxilada C₁₉ (Hedden et al., 2002).

I.4. Genes de la biosíntesis de GAs y su regulación

Como ocurre con los genes de diversos metabolitos secundarios fúngicos, los genes de la biosíntesis de GAs de *F. fujikuroi* se encuentran agrupados en un cluster (Tudzynski y Höltter, 1999; Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2001, 2002,2003). Siete genes agrupados en el cromosoma IV (Linnemanstöns et al., 1999) codifican para las enzimas que catalizan las 15 reacciones de la biosíntesis de GA₃ a partir de GGDP (Fig.

4). Mediante disrupción génica o administración de precursores de GAs marcados con ^{14}C a una mutante de *F. fujikuroi* que carece del cluster (SG139) complementada con genes únicos, se demostraron en forma inequívoca las funciones catalíticas asociadas a cada una de las enzimas, varias de ellas multifuncionales (Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2001, 2002, 2003). Además de un gen que codifica para la *ent*-kaureno sintasa (CPS/KS) el cluster contiene un gen que codifica para una GGDP sintasa específica para la biosíntesis de GAs (GGS-2), cuatro genes de monooxigenasas P450 (P450-1, P450-2, P450-3 y P450-4) y un gen que codifica para una desaturasa (DES) (Tudzynski, 2005). Tanto los genes *P450-4* y *P450-1* como *ggs2* y *cps/ks* forman una unidad transcripcional compartiendo un promotor bidireccional (Fig.4).

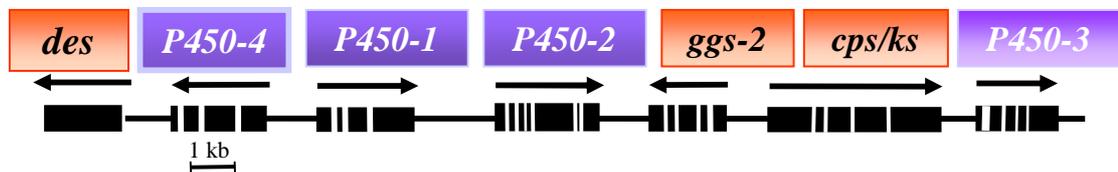


Fig. 4. Mapa físico del cluster de genes de la biosíntesis de GAs en *Fusarium fujikuroi*.

A diferencia de los genes de GAs de *F. fujikuroi* los genes de la biosíntesis de GAs de *Arabidopsis thaliana* o de otras plantas se encuentran dispersos en el genoma (Hedden et al., 2002). Además, sobre todo para las etapas finales de la secuencia biosintética existen familias multigénicas que se expresan en forma diferencial en los distintos tejidos durante el desarrollo de la planta (Hedden et al., 2002; Tabla 2).

Tabla 2. Genes de *Arabidopsis* involucrados en la biosíntesis de GAs y la función de las proteínas codificadas.

Gen	Enzima (función)
CPS	CDP sintasa (GGP a CDP)
KS	<i>ent</i> -kaureno sintasa (CDP a <i>ent</i> -kaureno)
KO	<i>ent</i> -kaureno oxidasa (<i>ent</i> -kaureno a ácido <i>ent</i> -kaurenoico)
KA01	ácido <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa (ácido <i>ent</i> -kaurenoico a GA ₁₂)
KA02	ácido <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa
GA20ox1	GA 20-oxidasa (GA ₁₂ /GA ₅₃ a GA ₉ /GA ₂₀)
GA20ox2	GA 20-oxidasa
GA20ox3	GA 20-oxidasa
GA20ox4	Sin determinar ^a
GA20ox5	Sin determinar ^a
GA3ox1	GA 3β-hidroxilasa (GA ₉ /GA ₂₀ a GA ₄ /GA ₁)
GA3ox2	GA 3β-hidroxilasa
GA3ox3	GA 3β-hidroxilasa
GA3ox4	GA 3β-hidroxilasa
GA2ox1	GA 2-oxidasa (GA ₁ /GA ₄ / GA ₉ /GA ₂₀ a GA ₈ /GA ₁₄ /GA ₅₁ /GA ₂₉ y catabolitos correspondientes)
GA2ox2	GA 2-oxidasa
GA2ox3	GA 2-oxidasa
GA2ox4	GA 2-oxidasa
GA2ox5	Probablemente pseudogen ^b
GA2ox6	GA 2-oxidasa

a. Clasificadas como GA 20-oxidasa de acuerdo a la secuencia aminoacídica predicha.

b. El gen contiene una larga inserción y aparentemente no se expresa.

En relación a la regulación de la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi* el principal mecanismo regulatorio es la represión de la expresión de los genes por compuestos nitrogenados principalmente glutamina y amonio (Muñoz y Agosin, 1993). Se ha demostrado que este último es convertido en glutamina por la glutamina sintetasa la que sería el verdadero represor de los genes de la biosíntesis de GAs (Muñoz y Agosin, 1993). El factor transcripcional AreA un factor tipo GATA-1 (Cys₂-Cys₂ Zn) participa en la regulación de la expresión de los genes mediante unión a secuencias GATA en las regiones promotoras de los genes de GAs, mediando la derrepresión en ausencia de glutamina. La existencia de dos secuencias doble GATA en la región promotora de *P450-4* es esencial para la expresión de este gen (Mihlan et al., 2003). Seis de los siete genes del cluster presentan motivos GATA en los promotores y son reprimidos por amonio en tanto que *P450-3* no presenta elementos doble GATA en su promotor y no cambia su nivel de transcritos en presencia de amonio (Tudzynski et al., 2003).

En plantas la función de las GAs como hormonas hace que presenten una regulación muy fina por factores ambientales y/o endógenos. Los niveles de GAs bioactivas se mantienen por regulación feedback por producto final de la vía metabólica (Phillips et al., 1995; Hedden, 1999). La luz (Gilmour et al., 1986; Oh et al., 2006) y la temperatura (Yamaguchi et al., 2004; Penfield et al., 2005) también son factores que regulan la biosíntesis de GAs en plantas. Particularmente la C-20 oxidasa que convierte las C20-GAs en C19-GAs bioactivas es una enzima altamente regulada (Phillips et al., 1995; Hedden, 1999). Además en plantas las GAs bioactivas pierden su actividad por hidroxilación en C-2 (Yamaguchi, 2008), por epoxidación en el doble enlace 16,17 (Zhu et al., 2006) o por metilación (Varbanova et al., 2006) o conjugación con unidades

glucosilo (Schneider et al., 1992). Curiosamente el GA₃ se degrada mucho más lento que las otras GAs bioactivas lo que explicaría el marcado efecto que produce el GA₃ del hongo sobre las plantas de arroz (Sponsel y Hedden, 2004). En los sistemas fúngicos no existen mecanismos de inactivación de GAs ya que no tienen una función hormonal.

En este trabajo de Tesis se investigó la capacidad de producir GAs y se analizaron funcionalmente las oxidasas de GAs en varias especies del complejo *G. fujikuroi* con el objeto de completar la información acerca de la distribución de esta capacidad biosintética en el género *Fusarium*. Se investigaron tres especies que contienen el cluster completo de genes de la biosíntesis de estas fitohormonas: *Fusarium sacchari* (MP-B), especie aislada de la caña de azúcar, *Fusarium konzum* (MP-I) especie aisladas de pasto de pradera y *Fusarium subglutinans* (MP-E) especie aislada del maíz. *F. sacchari* está cercanamente relacionada a *F. fujikuroi* y pertenece al clado Asiático mientras que *F. konzum* y *F. subglutinans* están lejanamente relacionadas a *F. fujikuroi* y pertenecen al clado Americano. Previamente se había descrito variabilidad genética en distintas cepas de *F. konzum* ya que se encontró una cepa productora de GA₁ y varias cepas no-productoras de esta especie (Malonek et al., 2005 a). Por otra parte, no se detectaron GAs-C₁₉ por HPLC en el medio de cultivo de varias cepas de *F. sacchari* y *F. subglutinans* crecidas en condiciones de nitrógeno limitante (Malonek et al., 2005 a). Se investigó la biosíntesis de GAs por GC-MS así como mediante la administración de precursores marcados con ¹⁴C en nuevos aislados de estas tres especies y se identificaron cepas productoras de GAs y no productoras en *F. sacchari* y *F. konzum* mientras que ninguna de las cepas de *F. subglutinans* sintetizó GAs. Finalmente se caracterizó el metabolismo de GAs en las poco frecuentes cepas de *F. fujikuroi* (MP-C) y *F.*

proliferatum (MP-D) que pueden cruzarse entre sí, así como en la progenie respectiva. Se ha encontrado que algunas de estas cepas de *F. fujikuroi* sintetizan GA₁ en vez de GA₃ lo que sugiere un bloqueo a nivel de la desaturasa en tanto que las cepas de *F. proliferatum* no sintetizan GAs pero podrían contener una desaturasa activa. Se ha demostrado que el sistema que controla la producción de GAs es funcional en *F. proliferatum* puesto que el cluster de genes de GAs de *F. fujikuroi* se expresó eficientemente y resultó funcional en esta especie (Malonek et al., 2005a). Se investigó qué GAs e intermediarios sintetiza *F. proliferatum* y la progenie lo que indicaría qué bloqueos genéticos presentan. Se esperaba que la capacidad de producir estos metabolitos segregara de manera Mendeliana en la progenie lo que podría dar información acerca de los mecanismos de intercambio genético interespecies en el género *Fusarium*.

I.5. Hipótesis

- Las especies fúngicas del complejo *Gibberella fujikuroi*, *Fusarium sacchari* y *Fusarium konzum* contienen cepas activas en la biosíntesis de giberelinas y cepas inactivas. Las cepas de *Fusarium subglutinans* no producen giberelinas.
- La cruce entre una cepa de *Fusarium fujikuroi* (que produce GA₃) y una cepa de *F. proliferatum* (que no produce GAs), genera cepas híbridas con nuevas capacidades biosintéticas con respecto a las cepas parentales.

I.6. Objetivo General

Caracterizar la biosíntesis de GAs y la funcionalidad de las oxidasas de giberelinas en distintas especies del complejo de especies *G. fujikuroi* (*F. konzum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans*) y en cepas híbridas entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum*.

I.7. Objetivos Específicos

- Investigar la biosíntesis de GAs en distintas cepas de *F. sacchari*, *F. konzum* y *F. subglutinans*. Identificar las GAs extraídas del cultivo mediante GC-MS.
- Caracterizar las actividades de las distintas oxidasas de GAs en las cepas activas administrando precursores de GAs marcados con ^{14}C e identificar los productos de metabolización por GC-MS.
- Determinar si hay algunas de las oxidasas de GAs activas en las cepas no productoras de *F. konzum*, *F. sacchari* y *F. subglutinans*.
- Caracterizar el metabolismo de GAs en cepas híbridas entre *F. fujikuroi* (MP-C) y *F. proliferatum* (MP-D).
- Comparar la capacidad de biosintetizar GAs de las cepas parentales y la progenie.

CAPÍTULO II.
MATERIALES Y MÉTODOS

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. Cepas de *Fusarium* e híbridos CxD

Las cepas de utilizadas en este estudio de *F. subglutinans*, de *F. sacchari*, de *F. konzum*, C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum* fueron proporcionadas gentilmente por la Dra. B. Tudzynski de la Universidad de Münster, Alemania. Las cepas provenientes de cruzas entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas gentilmente por el Dr. Leslie de la Universidad de Kansas. Las cepas C-1995 (*F. fujikuroi*) y D-4854 (*F. proliferatum*) pueden reproducirse sexualmente entra ellas y completar la meiosis produciendo una descendencia viable (haploide). Las cepas parentales y de la progenie utilizados en este trabajo son los descritos y parcialmente caracterizados en Leslie et al. (2004a).

II.2. Condiciones de cultivo e inducción de la síntesis de GAs

Las especies del complejo *G. fujikuroi* se mantuvieron en placas de agar papa dextrosa a 4°C desde las que se inocularon a un medio líquido que contiene 1,92 g/L de NH_4NO_3 , 80 g/L de glucosa, 5 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 % de solución de elementos traza (100 mL de esta última solución contiene : 0,01 g de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,161 g de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,01 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$) (40% ICI, Geissman et al., 1966). El cultivo se incubó durante 3 días a 28°C con agitación orbital (150 rpm). La biosíntesis de GAs se indujo

transfiriendo un inóculo a un medio de la misma composición pero que no contiene NH_4NO_3 (0% ICI) (Candau et al., 1992, Brückner y Blechschmidt, 1991)

II.3. Metabolización de precursores de GAs

El micelio obtenido de cultivo crecidos en el medio 40% ICI (Geissman et al., 1966) fueron filtrados y lavados 3 veces con el mismo medio sin NH_4NO_3 (0% ICI) para eliminar las GAs endógenas y el NH_4NO_3 . Estas interfieren en los estudios metabólicos compitiendo con los precursores radiactivos por las enzimas de la síntesis de GAs y además interfieren en la identificación por espectrometría de masas de los productos e intermediarios marcados isotópicamente. El micelio se suspendió en 5 mL de medio 0% ICI y se traspasó 1 mL de la suspensión a un matraz que contiene 9 mL del mismo medio y se agregaron los precursores marcados con ^{14}C en forma de solución metanólica (10-150 μL): *ent*- ^{14}C -kaureno, ácido $7\alpha\text{-OH-}^{14}\text{C-ent}$ -kaurenoico, $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído, $^{14}\text{C-GA}_{12}$, $^{14}\text{C-GA}_4$, $^{14}\text{C-GA}_7$, $^{14}\text{C-GA}_9$ (40.000 - 600.000 dpm para los ensayos analíticos y 150.00-400.000 dpm para los ensayos preparativos). Se añadió a cada cultivo AMO 1618, un inhibidor de la *ent*-kaureno sintasa, con el fin de evitar la interferencia de las GAs endógenas. Después de 3 días de incubación, los productos fueron purificados desde el filtrado mediante partición en acetato de etilo, extracción en fase sólida y HPLC (Urrutia et al., 2001; Rojas et al., 2001) y se identificaron por comparación con los tiempos de retención (Tr) de estándares de GAs. Para ensayos preparativos en los que la finalidad es identificar productos o intermediarios por

cromatografía de gases /espectrometría de masas (GC/MS), se utilizó entre 150000 y 400000 dpm de cada precursor. Se inhibió la síntesis endógena de GAs agregando al medio de cultivo AMO 1618 (200 μ M), inhibidor de la *ent*-kaureno sintasa (Rademacher, 1992).

II.4. Extracción de 14 C-GAs desde el filtrado del cultivo y/o micelio.

Los productos e intermediarios de la biosíntesis de GAs fueron extraídos desde el filtrado del cultivo y/o desde el micelio, después de separar las células mediante centrifugación. Las GAs son secretadas por el hongo y se encuentran en el filtrado del cultivo, sin embargo algunos intermediarios y productos poco polares, principalmente los derivados del *ent*-kaureno, pueden encontrarse en el micelio. Después de separar el filtrado, el micelio se lavó con H₂O y las fases acuosas combinadas se acidificaron hasta pH 3,0 con HCl 2N para protonar los grupos carboxilato de las GAs y permitir su extracción hacia una fase orgánica. Las fases acuosas acidificadas se sometieron a partición con acetato de etilo y la fase orgánica se evaporó a sequedad al vacío a 30°C, en un evaporador rotatorio. Las muestras se disolvieron en una solución metanólica al 10%, condiciones en que se disuelven las GAs y no los pigmentos quinónicos provenientes del cultivo y se continuó purificando las GAs mediante extracción en fase sólida en columnas C18 (SepPack, Waters). Las muestras fueron aplicadas a las columnas equilibradas con H₂O acidificada con ácido acético hasta pH 3,0 y se eluyeron con metanol después de lavar la columna con H₂O acidificada. El eluido metanólico se evaporó a sequedad bajo una corriente de N₂ y las GAs se disolvieron en metanol para

su análisis por HPLC y posteriormente por GC-MS. Alternativamente se identificaron los productos en el extracto total, principalmente en las muestras que presentaban productos inesperados o de difícil separación.

II.5. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Waters 600 equipado con una columna de fase reversa C18 de 250 x 4 mm (Symmetry, Waters). Las corridas consistieron en un gradiente lineal de 30 min de metanol en H₂O acidificada a pH 3,0 desde 60% hasta 100% metanol, seguida por 6 minutos de flujo isocrático de metanol. El flujo fue de 1 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL en las que se determinó la radiactividad por centelleo líquido. Los productos se identificaron mediante comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares de los productos esperados. Alternativamente, algunos productos fueron derivatizados para su análisis en GC/MS.

II.6. Cromatografía en capa fina (TLC)

Se realizó en cromatofolios de sílica gel G (Merck). Se aplicaron a las placas 100- 200µL de una solución metanólica de los productos de metabolización del ent-¹⁴C-kaureno. La muestra se hizo migrar 7 cm utilizando hexano como fase móvil. Luego, se raspó la sílica gel cada 1 cm y se midió la radiactividad en cada fracción por centelleo líquido. Para posterior análisis por GC-MS los productos se eluyen desde la sílica con

MeOH durante 1 hora. Para las giberelinas GA₃ y GA_{4/7} analizadas por TLC se utilizó sílica gel eluída con acetato de etilo/cloroformo/ ácido acético (60:40:5). Las placas se revelaron por luz UV.

II.7. Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido

Se utilizó líquido de centelleo que contiene 0,125 g de POPOP (1,4-bis-[2-(5-feniloxazol)]-benceno) y 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol) en 1 L de tolueno grado técnico. Esta mezcla se diluyó con 500 mL del detergente Arcopal después de su disolución para completar la solución de centelleo. Una vez colectadas las fracciones de 1mL se colocaron en viales con 4 mL de líquido de centelleo. La radiactividad de las muestras se cuantificó en el contador Packard Tri-Carb modelo 1600 TR. La eficiencia de conteo fue de un 98%.

II.8. Identificación de los productos por espectrometría de masas

La identificación de los productos de metabolización y de las GAs endógenas se realizó en el Laboratorio de Hormonas Vegetales de Rothamsted Research en el Reino Unido, facilidad proporcionada por el Dr. Peter Hedden, director del Grupo de Bioquímica de Fitohormonas. La identificación fue realizada en base a los espectros de masa y los índices de retención de Kovats, que se compararon con los de GAs estándar (Gaskin y MacMillan, 1991). Previo al análisis, las muestras fueron metiladas con

diazometano etéreo y transformadas en los trimetilsilil ésteres por calentamiento con *N*-trimetilsilil-*N*-fluoroacetamida a 90°C por 30 min (Urrutia et al., 2001).

II.9. Análisis de Northern Blot

El RNA fúngico se extrajo moliendo el micelio liofilizado en un mortero para obtener un polvo fino el que luego se dispersó en un tampón de extracción como se describe en Cenis (1992). El RNA total fue aislado con un Kit de extracción de RNA total RNAgents (Promega GmbH, Mannheim, Alemania). Las muestras de 20µg de RNA total fueron transferidas a membranas Hybond-N⁺ después de electroforesis en un gel de agarosa 1% (w/v) conteniendo formaldehido, de acuerdo a Sambrook et al. (1989). Las hibridaciones de Northern blot fueron realizadas de acuerdo al método de Church y Gilbert (1984). Las sondas marcadas con ³²P fueron preparadas utilizando el método de random oligomer-primer y las membranas fueron hibridizadas de acuerdo al protocolo de Sambrook et. al (1989).

CAPÍTULO III.
RESULTADOS

III. RESULTADOS**III.1. Biosíntesis de GAs y *ent*-kaurenoides en distintas cepas de *F. sacchari* (MP-B)**

La biosíntesis de GAs y *ent*-kaurenoides se investigó en 7 cepas de *F. sacchari* (Tabla 3) las que fueron cultivadas por 10 días en un medio líquido químicamente definido y limitante en compuestos nitrogenados. De las 7 cepas seleccionadas, dos cepas habían sido previamente investigadas, la cepa B-1725 (Malonek et al., 2005a) y la cepa B-7610 que fue reportada como una cepa productora de GAs (Kawaide, 2006). Las GAs se aislaron desde el filtrado del cultivo y se identificaron por GC-MS después de derivatizarlas como metil ésteres y trimetilsilil éteres (Tabla 3). Se encontró que las cepas B-1732, B-12756, B-7610, B-1721 y B-1797 sintetizan GAs, principalmente GA₃, a diferencia de las cepas B-3828 y B-1725 que producen solamente trazas de GA₃ y/o GA₁.

Tabla 3. GAs y *ent*-kaurenoides sintetizados por distintas cepas de *F. sacchari*

Cepas	Giberelinas	<i>ent</i> -kaurenoides	GA ₃ :GA ₁
B-1732	GA ₄ ; ácido giberelenico; GA ₁₃ ; GA ₃₆ ; iso GA ₃ ; GA ₁ ; GA ₃ (principal)	Diácido Fujenoico Triácido Fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido	1:0,55
B-12756	GA ₉ ; GA ₂₄ ; GA ₂₅ ; GA ₁₄ ; GA ₄ ; GA ₇ ; ácido giberelenico; GA ₁₃ ; GA ₃₆ ; GA ₄₇ ; iso-GA ₃ ; GA ₁₆ ; GA ₁ ; GA ₃ (principal)	Diácido Fujenoico Triácido Fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido	1:0,17
B-7610	GA ₄ ; GA ₇ ; GA ₁₃ (trazas); GA ₁ (trazas); GA ₃ (principal)	Diácido Fujenoico	1:0,14
B-1721	GA ₉ ; GA ₄ ; diácido 1,10-eno de GA ₄ ; GA ₂₅ ; GA ₂₄ ; GA ₄ ; ácido giberelenico; GA ₁₃ ; GA ₃₆ ; GA ₁ ; GA ₃ ; 2-epi-GA ₄₃ (principal)	7β-OHkaurenolido Diácido Fujenoico Triácido Fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido	1:0,37
B-1797	GA ₁₄ ; GA ₄ ; ácido giberelenico; GA ₁₃ ; GA ₃₆ ; GA ₄₇ ; iso-GA ₃ ; GA ₁₆ ; GA ₁ ; GA ₃ (principal)	Diácido Fujenoico Triácido Fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido	1:0,32
B-3828	GA ₃ (trazas)	-----*	
B-1725	GA ₃ (trazas); GA ₁ (trazas)	Diácido Fujenoico	
IMI 58289 (<i>F. fujikuroi</i>)	GA ₃ (principal), GA ₇ , GA ₄ , GA ₁ , GA ₉	7β-OH-kaurenolido Diácido Fujenoico Triácido Fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido	

* No se detectaron estos productos por GC-MS

Las cepas B-12756 y B-1732 acumularon cantidades significativas de GA₃ después de 10 días en el cultivo (28,4 µg/mL y 27,2 µg/mL respectivamente; Tabla 4), mientras que los cultivos de las cepas B-7610 y B-1721 contienen menores niveles de este producto final, 11,36 µg/mL y 2,76 µg/mL respectivamente (Tabla 4). En los cultivos de las cepas B-1732, B-7610 y B-1797 se encontraron solamente GAs 3β-hidroxiadas a diferencia de las cepas B-12756 y B-1721 que sintetizan además GAs de 19 C y 20 C no-hidroxiadas junto con GAs 3β-hidroxiadas (Tabla 3, Figura 5). Por lo tanto, además de la cepa B-7610 previamente descrita, se encontraron otras cepas de *F. sacchari* productoras de GAs, principalmente a través de la vía de 3β-hidroxiación, la principal vía de biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi*. En los cultivos de algunas de las cepas se encontraron productos que no corresponden a intermediarios de la biosíntesis de GA₃ o GA₁: el ácido giberelénico, iso-GA₃, diácido 1,10- eno de GA₄, GA₄₇ (2α-OH-GA₄), GA₁₆ (1α-OH-GA₄) y 2-epi-GA₄₃ (2α-OH-GA₁₃). El ácido giberelénico, iso-GA₃ y diácido 1,10- eno de GA₄ son probablemente productos no enzimáticos formados durante la fermentación o en la extracción a pH ácido, mientras que los productos GA₄₇, GA₁₆ y 2-epi-GA₄₃ podrían ser productos laterales de la 1,2 desaturasa de GAs (Tabla 3, Fig. 5).

Tabla 4. Niveles de GA₃ en el medio de cultivo de distintas cepas de *F.sacchari* (MP-B)

Cepas	[GA ₃] (µg/mL)**	Niveles Relativos de GA ₃
B-12756	28,4	1
B-1732	27,2	0,96
B-7610	11,4	0,4
B-1721	2,8	0,1
B-12756 T1*	53,6	1,9
B-12756 T2*	78,6	2,8
B-12756 T3*	83,2	2,9
B-12756 T7*	68,2	2,4
B-12756 T11*	30,6	1,1

* Transformantes de la cepa B-12756 complementadas con los genes *ggs2* y *cps-ks* de la cepa m567 de *F. fujikuroi*.

** Cuantificado mediante GC-MS.

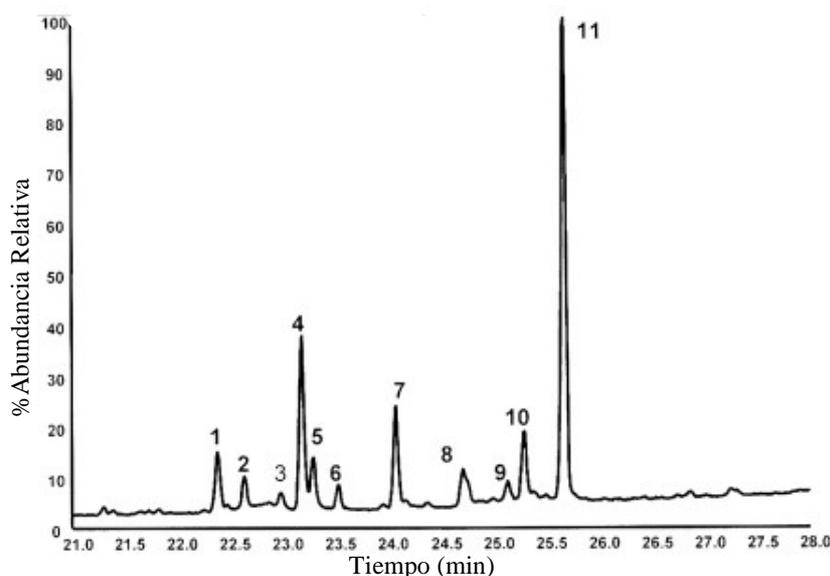


Fig. 5. Análisis de GC-MS del filtrado del cultivo de la cepa B-12756 de *F. sacchari*. Corriente iónica total para un extracto de acetato de etilo después de derivatización a metil ésteres y a trimetilsilil éteres. Los componentes principales fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los datos publicados (Gaskin and MacMillan, 1992). Peak 1: GA₁₄, Peak 2: GA₄, Peak 3: GA₇, Peak 4: ácido fujenoico, Peak 5: triácido fujenoico, Peak 6: ácido giberelenico, Peak 7: GA₁₃, Peak 8: GA₄₇/ iso-GA₃/ GA₁₆, Peak 9: 7β,18-diOH-kaurenolido, Peak 10: GA₁ y Peak 11: GA₃.

Aunque existan cepas de *F. sacchari* que sintetizan GA₃ (Tabla 3), éstas producen una menor cantidad de este producto con respecto a la cepa silvestre IMI 58289 de *F. fujikuroi* (109,2 µg/mL), lo que sugiere que en algún punto de la secuencia metabólica existen etapas lentas. Éstas podrían corresponder a las etapas iniciales catalizadas por GGS2 y/o CPS-KS, que son las etapas bloqueadas en cepas no-productoras de *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005b). Para investigar esta posibilidad, se determinó la capacidad de biosintetizar GAs en 5 transformantes de la cepa B-12756 complementadas con los genes *ggs2* y *cps-ks* de la cepa m567 de *F. fujikuroi* (Tabla 4). Para todas las transformantes se encontró un aumento significativo en la cantidad de GA₃ después de 10 días cultivo (Tabla 4). En la Fig. 6 se muestra un análisis de TLC del filtrado de los cultivos de las distintas cepas productoras de GAs y las transformantes B-12756. La cantidad de GA₃ presente en el cultivo de las transformantes es significativamente mayor que en las cepas no transformadas con los genes de *F. fujikuroi*. Particularmente, los cultivos de las cepas transformantes B-12756 T2 y T3 presentaron una mayor concentración de GA₃ (78,6 y 83,2 µg/mL) de 2,3 y de 2,9 veces mayor respectivamente, que la cepa B12756 (Tabla 4). Estos resultados indican que efectivamente las etapas catalizadas por la GGS2 y/o CPS-KS son reacciones limitantes en la biosíntesis de GA₃ en *F. sacchari*.

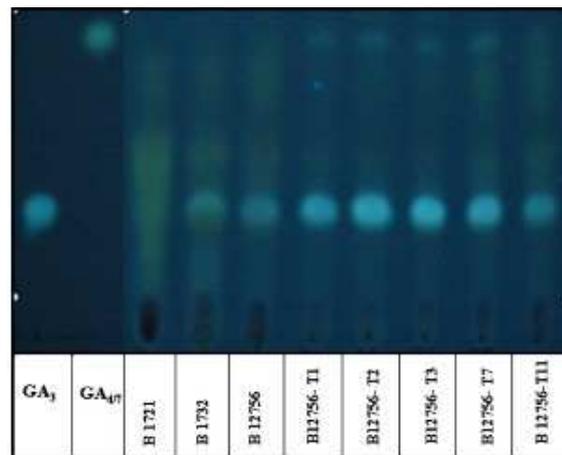


Fig.6. Análisis de TLC del filtrado de los cultivos de las cepas silvestres de *F. sacchari* (B-1721, B-1732 y B-12756) y las transformantes de B-12756 complementadas con los genes *ggs2* y *cps/ks* de *F. fujikuroi*. Se extrajeron las GAs después de 10 días en un medio limitante en N. Los estándares de GA₃ y GA₄₇ se muestran en los carriles 1 y 2.

III. 2. Actividad de oxidasas de GAs en cepas productoras (B-12756 y B-1797) y no productoras (B-3828 y B-1725) de *F. sacchari*.

Con el objeto de caracterizar la actividad de oxidasas de GAs en *F. sacchari*, se ensayaron las monooxigenasas P450-1 (GA₁₄ sintasa), P450-2 (GA 20-oxidasa) y P450-3 (GA 13-hidroxisasa) en las cepas productoras (B-12756 y B-1797) y no productoras de GAs (B-3828 y B-1725). Para el ensayo se agregaron los sustratos respectivos, marcados con ¹⁴C, a los cultivos líquidos y se aislaron e identificaron los productos de metabolización después de 3 días de incubación (Tabla 5).

Para las cepas B-12756 y B-1797, el precursor ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, sustrato de la MO P450-1, fue transformado en los productos finales de la vía 19,10γ-lactónicos: ¹⁴C-GA₃ (31% y 22%, respectivamente) y ¹⁴C-GA₁ (6% y 9%) (Tabla 5). Se acumularon además algunos intermediarios como ¹⁴C-GA₄ (22% y 33%) y ¹⁴C-GA₇ (9% y trazas) también lactonas C₁₉ hidroxiladas junto con ¹⁴C-GA₁₄, un intermediario 3β-hidroxilado C₂₀ (23% para B-12756). El producto lateral ¹⁴C-GA₁₃ (C20-carboxilato) se acumuló en baja concentración. Este es un producto final alternativo de la oxidasa del metilo 20 (Tudzynski et al. 2002) que se forma también en menor cantidad que la lactona en *F. fujikuroi*. En ambas cepas, no se formaron ¹⁴C-GAs no hidroxiladas, lo que indica que la oxidación de GA₁₂ aldehído se inicia con la hidroxilación en C3 seguida de la oxidación en C7.

Tabla 5. Transformaciones de precursores de ^{14}C -GAs, por cultivos de cepas productoras (B-12756 y B-1797) de *F. sacchari*

Cepa	Sustrato	Productos ^a (%)	Espectro de masa m/z (% abundancia relativa)
B-12756	^{14}C -GA ₁₂ aldehído	^{14}C -GA ₃ (31%)	512(18), 510(8), 504(100), 489(11), 475(6), 460(7), 445(10), 370(15), 347(14), 311(8), 238(12), 208(41)
		^{14}C -GA ₁ (6%)	514(25), 512(15), 506(100), 491(11), 448(18), 377(11), 376(12), 357(4), 313(4), 209(10), 207(17)
		^{14}C -GA ₄ (22%)	426(16), 424(9), 418(21), 394(17), 390(17), 386(20), 336(20), 328(26), 295(41), 292(62), 290(67), 289(67), 284(100), 233(52), 231(59), 230(54), 229(61), 225(90), 224(62), 131(35), 129(46)
		^{14}C -GA ₄₂ (6%)	546(4), 531(26), 529(14), 523(16), 488(22), 481(11), 456(10), 448(11), 424(18), 416(22), 384(100), 382(60), 376(68), 322(29), 293(53), 287(33), 263(30), 235(48), 131(56)
		^{14}C -GA ₇ (9%)	424(20), 416(28), 288(20), 282(37), 229(40), 228(67), 223(63), 222(100)
		^{14}C -GA ₁₄ (23%)	456(5), 441(21), 424(61), 416(31), 396(55), 388(21), 334(36), 306(76), 304(54), 298(43), 293(97), 291(86), 287(53), 263(74), 245(54), 235(100), 231(32), 131(84)
		^{14}C -GA ₁₃ (3%)	477(25), 460(30), 436(38), 408(15), 400(77), 372(18), 349(33), 342(25), 318(13), 310(66), 283(41), 282(50), 251(18), 223(125), 131(38), 129(100)
	^{14}C -GA ₁₂	^{14}C -GA ₁₅ (9%)	346(15), 314(16), 300(11), 286(42), 243(22), 241(100), 195(16)
		^{14}C -GA ₂₄ (55%)	376(3), 348(7), 344(35), 316(98), 312(35), 300(9), 298(9), 288(85), 287(63), 285(33), 284(38), 257(23), 256(67), 239(12), 229(67), 228(97), 227(100)
		^{14}C -GA ₂₅ (9%)	374(26), 314(74), 286(100), 227(52), 226(13)
^{14}C -GA ₉ (27%)		332(8), 300(100), 288(15), 272(95), 243(54), 229(56), 228(59), 217(27), 159(32)	
^{14}C -GA ₇	^{14}C -GA ₃ (27%)	506(44), 504(100), 489(7), 475(5), 460(4), 445(7), 372(11), 370(26), 355(11), 347(8), 311(10), 238(11), 208(20)	
	^{14}C -GA ₇ (73%)	No fue analizado	
^{14}C -GA ₉	^{14}C -GA ₄₀ (24%)	420(1), 405(3), 389(5), 373(100), 345(95), 329(5), 327(6), 301(87), 286(63), 271(8), 245(6), 227(49), 225(34)	
	^{14}C -GA ₁₀ (6%)	422(91), 407(22), 405(44), 391(9), 378(20), 363(50), 349(10), 347(18), 331(100), 303(24), 288(21), 273(26), 245(31), 227(28), 132(98)	

Continuación de tabla pág. 37

B-1797	$^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído	$^{14}\text{C-GA}_3$ (22%)	512(30), 510(16), 506(15), 504(100), 489(9), 475(3), 460(6), 445(9), 370(9), 347(16), 311(11), 238(9), 210(18), 208(34)
		$^{14}\text{C-GA}_1$ (9%)	514(80), 512(40), 506(100), 499(6), 497(5), 491(11), 455(12), 454(11), 448(12), 381(13), 377(11), 376(11), 319(8), 317(9), 209(16), 207(13)
		$^{14}\text{C-GA}_{13}$ (trazas)	485(9), 477(22), 442(13), 436(24), 408(33), 400(54), 378(13), 372(18), 318(30), 310(49), 288(22), 282(40), 229(19), 223(12), 131(63), 129(100)
		$^{14}\text{C-GA}_4$ (33%)	425(23), 418(17), 394(25), 386(17), 336(27), 328(18), 295(69), 292(100), 290(71), 289(56), 284(74), 237(50), 233(51), 231(83), 230(84), 229(79), 225(69), 224(53), 131(56), 129(49)
		$^{14}\text{C-GA}_{14}$ (16%)	456(3), 441(17), 424(61), 416(25), 396(47), 388(22), 334(33), 306(80), 304(57), 298(35), 293(97), 291(74), 287(56), 263(74), 245(56), 235(100), 231(47), 131(80)
		$^{14}\text{C-GA}_7$ (trazas)	424(13), 416(17), 288(29), 282(20), 229(56), 228(100), 223(71), 222(96)
	$^{14}\text{C-GA}_7$	$^{14}\text{C-GA}_3$ (25%)	506(100), 504(98), 491(9), 489(9), 447(9), 445(10), 389(8), 387(10), 372(11), 370(11), 349(14), 347(14), 223(9), 221(9), 210(34), 208(36)
		$^{14}\text{C-GA}_7$ (75%)	No fue analizado
	$^{14}\text{C-GA}_9$	$^{14}\text{C-GA}_{40}$ (7%)	405(7), 373(100), 345(95), 317(9), 301(83), 286(63), 271(11), 245(8), 227(50), 225(39)
		$^{14}\text{C-GA}_{10}$ (13%)	422(93), 407(24), 405(49), 378(22), 363(51), 347(22), 331(99), 303(26), 288(21), 273(23), 245(35), 227(29), 132(100)
$^{14}\text{C-GA}_9$ (80%)		No fue analizado	

a. Identificado en las fracciones de HPLC de los extractos de EtOAc de los filtrados de los cultivos.

La actividad de la C20 oxidasa (MO P-450-2) de la cepa B-12756 de *F. sacchari* se ensayó además directamente con el sustrato no-hidroxilado, $^{14}\text{C-GA}_{12}$, que contiene el grupo metilo en la posición C20 y con el cual se pueden detectar fácilmente por HPLC los productos de oxidación. Este sustrato fue transformado a los productos finales: $^{14}\text{C-GA}_9$ (C19; 19-isolactona, 27%) y C20 carboxilato ($^{14}\text{C-GA}_{25}$, 9%) junto a los

intermediarios C20 alcohol ($^{14}\text{C-GA}_{15}$, 9%) y C20 aldehído ($^{14}\text{C-GA}_{24}$, 55%) (Fig.7). Estos resultados difieren a lo que ocurre en *F. fujikuroi*, sistema en el cual solamente se encuentran los productos finales de oxidación sin acumulación de intermediarios parcialmente oxidados (Tudzynski et al., 2002). Probablemente esto refleja una baja actividad catalítica de la C20-oxidasa en *F. sacchari*. Es interesante que no se detectaron intermediarios C20-aldehído ni C20-alcohol (3 β -hidroxilados) desde $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído con la cepa B-12756, lo que indica que la C20-oxidasa utiliza con mayor eficiencia el sustrato 3 β -hidroxilado GA_{14} que el sustrato no hidroxilado GA_{12} .

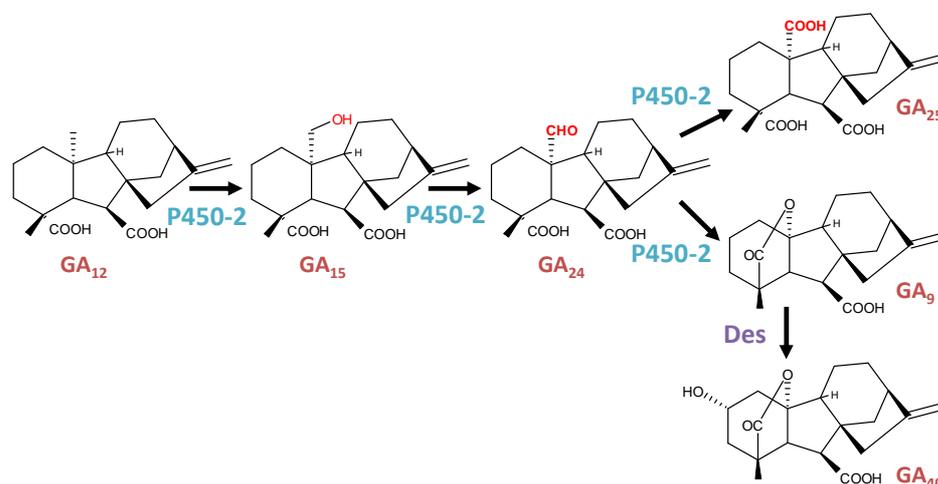


Fig.7. Reacciones catalizadas por la MO P450-2 y reacción lateral catalizada por la desaturasa de GAs.

La actividad de 13-hidroxilasa (MO P 450-3), enzima que actúa en la última etapa de la vía sobre las GAs C₁₉-lactónicas se ensayó utilizando los sustratos: $^{14}\text{C-GA}_7$ (3 β -hidroxilado, $\Delta^{1,2}$) y $^{14}\text{C-GA}_9$ (no hidroxilado). El $^{14}\text{C-GA}_7$ fue transformado parcialmente en $^{14}\text{C-GA}_3$ (25% y 27%, por las cepas B-12756 y B-1797) mientras que el $^{14}\text{C-GA}_9$ no fue utilizado por esta enzima sino que fue convertido en $^{14}\text{C-GA}_{40}$ que corresponde a un producto lateral de la desaturasa de GAs (Fig. 7) (Tudzynski et al., 2003) y $^{14}\text{C-GA}_{10}$, que se formaría por una reacción no enzimática o por la acción

inespecífica de oxidasas de otras vías (Tudzynski et al. 2003). Estos resultados junto con la acumulación de $^{14}\text{C-GA}_4$ y la baja cantidad de $^{14}\text{C-GA}_1$ encontrado en las incubaciones con $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído sugieren que la 13-hidroxilasa utiliza el $^{14}\text{C-GA}_4$ con baja eficiencia. La actividad de la 1,2 desaturasa de GAs se observó a través de los productos de oxidación de varios de los sustratos lactónicos: $^{14}\text{C-GA}_4$, $^{14}\text{C-GA}_9$ y $^{14}\text{C-GA}_{13}$. El $^{14}\text{C-GA}_4$ fue convertido principalmente a $^{14}\text{C-GA}_7$ más $^{14}\text{C-GA}_{16}$ y $^{14}\text{C-GA}_{43}$. Estos dos últimos fueron detectados como metabolitos endógenos en los cultivos de las cepas B-12756 y B-1797. El $^{14}\text{C-GA}_9$ y $^{14}\text{C-GA}_{13}$ fueron convertidos a $^{14}\text{C-GA}_{40}$ y $^{14}\text{C-GA}_{43}$, respectivamente, que son productos lateral de la desaturasa de GAs (Tudzynski et al.; 2003; Tabla 5).

A diferencia de lo que ocurre en las cepas productoras (B-12756 y B-1797), las cepas no productoras de GAs, B-3828 y B-1725 de *F. sacchari*, no presentaron actividad de las oxidasas de GAs ya que no convirtieron ninguno de los sustratos marcados con ^{14}C en las condiciones anteriores. Después de 3 días de incubación, se recuperó un 70% del $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído y el 30% restante se recuperó como productos con tiempo de retención en HPLC que no corresponden a los productos de las oxidasas de GAs sino que serían más bien productos inespecíficos del metabolismo. Por otra parte, tanto el $^{14}\text{C-GA}_4$ como $^{14}\text{C-GA}_7$ fueron recuperados intactos en la incubación. La ausencia de actividad de oxidasas de GAs en las cepas B-3828 y B-1725 de *F. sacchari* podría deberse a una baja expresión de los genes de la biosíntesis GAs, tal como se demostró previamente para los genes *cps-ks*, P450-4 y *des* de la cepa B-00278 de *F. sacchari* (Malonek et al., 2005a).

III. 3. Giberelinas y *ent*-kaurenoides presentes en cultivos de distintas cepas de *F. konzum*

Se investigó la capacidad biosintetizar GAs en 6 cepas de *F. konzum* (I-10653, I-11616, I-11893, I-10578, I-10595 e I-10678) que habían sido aisladas de pastos de praderas (Leslie, 1995). Después de una incubación de 10 días en el medio 0% ICI que no contiene compuestos nitrogenados, se encontraron cepas productoras y no productoras de GAs, tal como ocurre con las cepas de *F. sacchari* (Tabla 6). Además de la cepa I-10653, que ya se había descrito como productora de GA₁ (Malonek et al., 2005a), se encontraron otras dos cepas de *F. konzum*, I-11616 e I-11893, que sintetizan GA₁ y GA₃ aunque en baja cantidad. Es interesante que las 3 cepas activas, sintetizan un producto final diferente al producto que se obtiene en los cultivos de *F. sacchari* ó *F. fujikuroi*. En el medio de cultivo de I-11616 e I-11893 se encontró GA₁, giberelina lactónica, 3β-13 hidroxilada que difiere de GA₃ por la ausencia de la insaturación en 1,2. Este producto se genera directamente desde GA₄, por la hidroxilación en C13, a diferencia de las cepas productoras de *F. sacchari* que sintetizan principalmente GA₃ desde el precursor insaturado GA₇. Los niveles de GA₁ presentes en el cultivo fueron bajos para todas las cepas de *F. konzum* (menos de 0,1 µg/mL), considerablemente menores que los niveles encontrados en las cepas activas de *F. sacchari* lo que sugiere una menor actividad de las oxidasas de GAs. No se detectaron intermediarios de la biosíntesis de GAs en los cultivos (Tabla 6). Por otra parte el medio de cultivo de las cepas I-10578, I-10595 e I-10678 no contiene GAs ni *ent*-kaurenoides excepto trazas de GA₁ en la cepa I-10578. Estos resultados confirman la existencia de cepas productoras y

no productoras de GAs en *F. konzum* e indican una baja eficiencia para la biosíntesis de GAs para esta especie.

Tabla 6. GAs presentes en los extractos del filtrado de cultivos de *F. konzum* (MP-I)

Cepa	Giberelinas	GA ₁ :GA ₃	Actividad P450-3/ des (sustrato=GA ₄)
I-10653	GA ₄ ; GA ₇ , GA ₁₃ , GA ₄₇ ; iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ ; GA ₃	2:1	P450-3>des
I-11616	GA ₁ ; GA ₃	2:1	P450-3>des
I-11893	GA ₁ ; GA ₃	2:1	P450-3>des
I-10578	Trazas de GA ₁	No se detectaron GAs	
I-10595	No se detectaron GAs	No se detectaron GAs	
I-10678	No se detectaron GAs	No se detectaron GAs	
IMI58289 (<i>F. fujikuroi</i>)	GA ₃ ; GA ₇ , GA ₄ , GA ₁ GA ₃ :GA ₁ =1:0,01		Des>>P450-3

* Identificadas por GC-MS.

III. 4. Utilización de precursores de GAs marcados con ^{14}C por la cepa I-10653 de *F. konzum* (productora de GAs) y la cepa I-10595 (no-productora)

Los cultivos de I-10653 transformaron completamente al ^{14}C -GA₁₂ aldehído en los productos C₁₉ ^{14}C -GA₄ y ^{14}C -GA₇ (intermediarios lactónicos 3β-hidroxiados), junto con varios productos no identificados que de acuerdo a sus espectros de masas podrían ser C₂₀-GAs. De acuerdo al espectro de masas, estos productos corresponderían a ácidos tricarbónicos mono y dihidroxilados y un producto insaturado, pero que no corresponden a GAs conocidas (Tabla 7). No se encontró ^{14}C -GA₁ ni ^{14}C -GA₃ entre los productos probablemente debido a la baja actividad de la 13-hidroxiolasa (Tabla 7). Esto se confirmó por la conversión parcial del precursor ^{14}C -GA₄ en los productos finales ^{14}C -GA₁ y ^{14}C -GA₃ junto a la acumulación del intermediario insaturado ^{14}C -GA₇ (Tabla 7). La pequeña cantidad de ^{14}C -GA₁ relativa a ^{14}C -GA₃ no concuerda con los niveles de GA₁ y GA₃ endógenos y podría ser el resultado de un mayor nivel de sustrato disponible para la desaturasa en incubaciones con el sustrato exógeno ^{14}C -GA₄. El sustrato no hidroxilado ^{14}C -GA₉ fue convertido enzimáticamente a un producto más polar desconocido (20%) que no pudo ser detectado por GC-MS, recuperándose el 80% del sustrato sin transformar.

Aunque no es un intermediario de la biosíntesis de GA₁ y GA₃, el sustrato no hidroxilado ^{14}C -GA₁₂ fue transformado por la C₂₀ oxidasa en productos parcialmente oxidados, C₂₀ alcohol (^{14}C -GA₁₅) y C₂₀ aldehído (^{14}C -GA₂₄) además de los productos finales de oxidación del metilo 20, ^{14}C -GA₉ y ^{14}C -GA₂₅ (Fig.7 y Tabla 7). En el

experimento con $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído no se acumularon intermediarios de la vía 3β -hidroxilada lo que sugiere que la C20 oxidasa de *F. konzum* utiliza con mayor eficiencia al sustrato 3β -hidroxilado $^{14}\text{C-GA}_{14}$ que el sustrato no-hidroxilado $^{14}\text{C-GA}_{12}$. En *F. fujikuroi* se encontró que la C20 oxidasa utiliza tanto GA_{14} como GA_{12} sin acumulación de intermediarios (Tudzynski et al., 2012), lo que podría deberse a la alta eficiencia de esta enzima en esta especie que transforma completamente a ambos sustratos a los productos finales, condiciones que no se evidencian posibles diferencias en su utilización.

Tabla 7. Productos de la incubación de sustratos de oxidasas de GAs (^{14}C) con cultivos de la cepa I-10653 de *F. konzum*

Sustrato	Productos (%)	Espectro de masa m/z (% abundancia relativa)
$^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído	$^{14}\text{C-GA}_4$ (26%)	426(30), 424(14), 418(11), 394(31), 364(16), 336(36), 295(70), 292(100), 290(74), 284(38), 237(50), 233(47), 231(82), 230(80), 229(56), 225(27), 224(26), 131(42)
	$^{14}\text{C-GA}_7$ (20%)	424(23), 422(13), 416(7), 396(11), 290(35), 288(21), 282(12), 229(72), 228(100), 227(44), 226(53), 223(35), 222(39), 197(26)
	Desconocido 1 [M^+ 420] (4%)	428(63), 426(37), 420(14), 400(49), 392(16), 318(51), 310(28), 297(100), 295(66), 291(56), 269(70), 267(36), 263(26), 239(71), 217(70), 131(81), 129(52)
	Desconocido 2 [M^+ 492] (24%)	500(100), 498(60), 492(32), 485(10), 477(3), 369(13), 366(32), 364(12), 358(5), 340(19), 338(14), 332(9), 305(14), 299(5), 279(8), 275(6)
	Desconocido 3 [M^+ 490] (3%)- Espectro débil	498(20), 496(12), 490(6), 453(22), 400(34), 338(34), 131(100), 129(29)
	Desconocido 4 [M^+ 490] (11%)	498(100), 496(53), 490(35), 483(11), 332(13), 303(35), 259(58), 228(40)
	Desconocido 5 [M^+ 580] (12%)	588(100), 586(55), 580(28), 573(26)
$^{14}\text{C-GA}_{12}$	$^{14}\text{C-GA}_{15}$ (20%)	346(12), 314(28), 300(23), 286(78), 268(9), 241(100), 240(41), 195(49)
	$^{14}\text{C-GA}_{24}$ (35%)	376(1), 348(5), 344(17), 316(66), 312(83), 300(16), 298(23), 288(65), 285(41), 284(42), 256(67), 243(12), 239(14), 229(44), 228(100), 227(84)
	$^{14}\text{C-GA}_{25}$ (5%)	374(15), 314(76), 286(100), 227(35), 226(31)
	$^{14}\text{C-GA}_9$ (35%)	332(2), 300(38), 288(10), 272(100), 254(8), 243(47), 228(45), 226(34), 213(14), 185(16), 171(16)
$^{14}\text{C-GA}_4$	$^{14}\text{C-GA}_3$ (25%)	506(97), 504(100), 491(7), 489(7), 447(7), 445(8), 389(5), 387(8), 372(9), 370(9), 349(10), 347(11), 299(6), 297(8), 210(22), 208(30)
	$^{14}\text{C-GA}_1$ (5%)	508(98), 506(100), 493(10), 491(10), 450(20), 448(20), 377(18), 376(15), 315(9), 313(10), 209(22), 207(19)
	Acido giberelenico (5%)	520(25), 518(31), 460(36), 458(44), 410(59), 399(65), 371(100), 369(91), 311(41), 309(48)
	$\text{GA}_{16} + \text{GA}_{47}$ (2%)	Espectro mezclado: 418(19), 416(20), 386(11), 384(10), 358(12), 356(11), 300(20), 298(14), 284(31), 282(40), 224(100), 222(91), 195(23), 193(25)
	$^{14}\text{C-GA}_7$ (13%)	420(20), 418(17), 392(12), 390(15), 388(22), 386(18), 360(13), 358(12), 330(29), 328(20), 291(49), 289(44), 286(100), 284(94), 263(24), 261(21), 227(75), 226(79), 225(80), 226(64), 129(47)
	$^{14}\text{C-GA}_4$ (50%)	332(1), 300(41), 288(10), 272(100), 254(8), 243(44), 228(49), 226(35), 213(13), 185(16), 171(16)
$^{14}\text{C-GA}_9$	$^{14}\text{C-GA}_9$ (80%)	332(1), 300(41), 288(10), 272(100), 254(8), 243(44), 228(49), 226(35), 213(13), 185(16), 171(16)

En conjunto estos resultados sugieren que las oxidasas de GAs tendrían una baja actividad en la cepa I-10653 con respecto a las enzimas de *F. fujikuroi*. Esto se demostró directamente midiendo la velocidad de oxidación de los sustratos de la GA₁₄ sintasa (ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico), la C20 oxidasa (¹⁴C-GA₁₂) y la 13-hidroxilasa (¹⁴C-GA₄) en cultivos líquidos de las cepas I-10653 de *F. konzum* e IMI58289 de *F. fujikuroi*, que contenían la misma cantidad de micelio (10 mg, peso seco) (Fig. 8). Los productos y el sustrato remanente se separaron y cuantificaron a diferentes tiempos de incubación encontrándose que después de 30 minutos de incubación la mitad del ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico fue utilizado por la cepa IMI 58289 mientras que para la cepa I-10653 el 50% de conversión se obtuvo después de 3 días (Fig. 8) Por otra parte, ¹⁴C-GA₁₂ fue oxidado en un 50% por la cepa IMI58289 en 10 minutos de incubación a diferencia de I-10653 que utilizó la mitad de este sustrato en 1,5 días. Finalmente, la actividad de 13-hidroxilasa fue también considerablemente menor en la cepa I-10653 que en IMI 58289, transformándose un 12% del sustrato en 7 días comparado 2,5 horas para esta conversión en IMI58289. La baja actividad de oxidasas de GAs observada en I-10653 no se debe a una baja expresión de los genes puesto que se ha descrito que los genes de GAs se expresan en esta cepa (Malonek et al, 2005a).

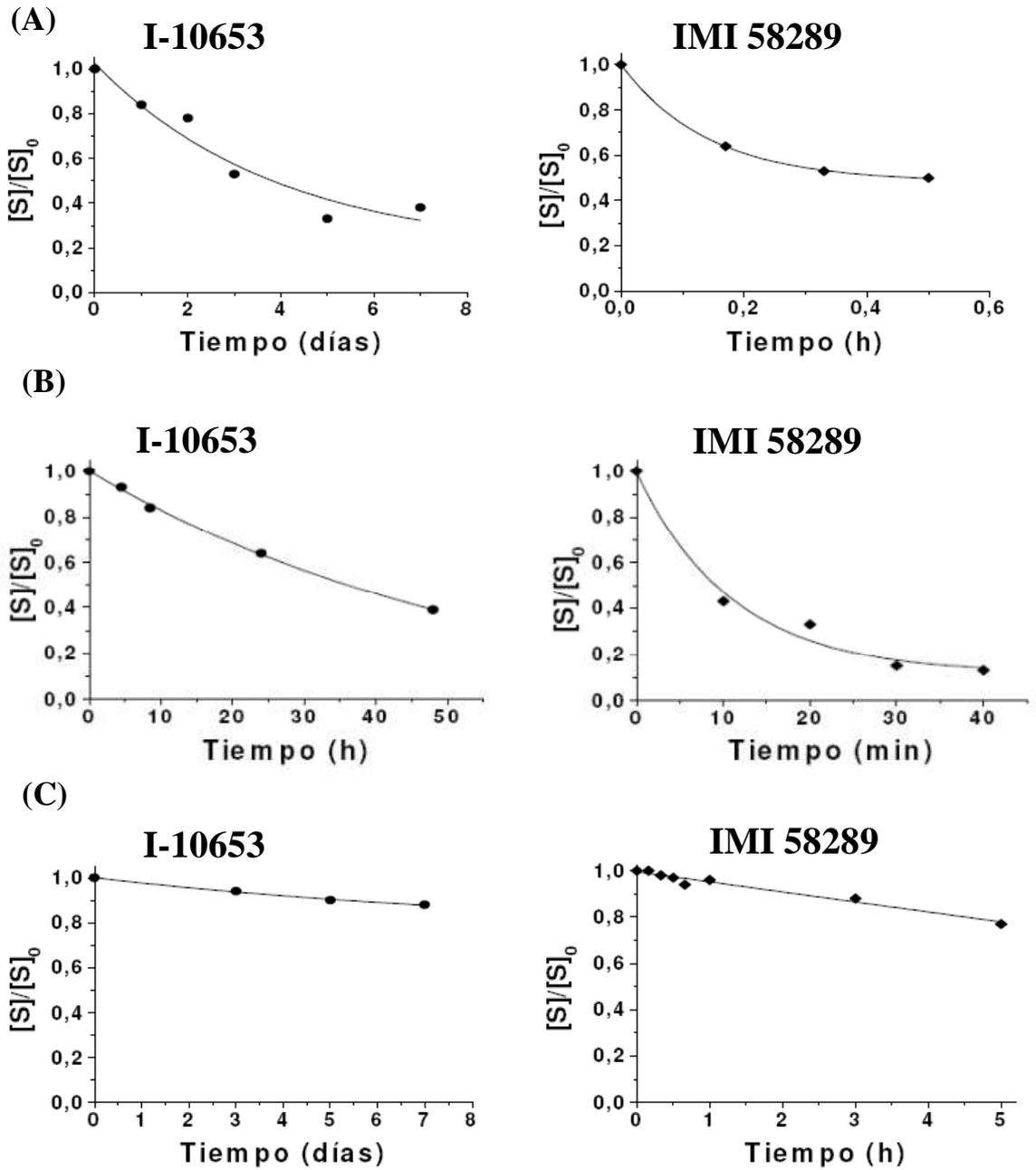


Fig. 8. Cinética de utilización de (A) ácido ent-¹⁴C-kaurenoico, (B) ¹⁴C-GA₁₂ y (C) ¹⁴C-GA₄ por cultivos de *F.konzum* (cepa I-10653) o de *F. fujikuroi* (cepa IMI 58289). Se incubó la misma cantidad de micelio (10 mg peso seco/ 10 mL de cultivo) con 100.000 dpm de cada uno de los sustratos.

A diferencia de la cepa I-10653, la cepa no productora I-10595 no dio productos de la biosíntesis de GAs a partir de distintos intermediarios o precursores: ácido *ent*-7 α OH-¹⁴C-kaurenoico, ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, ¹⁴C-GA₁₄ o ¹⁴C-GA₄ (Tabla 8). Además del sustrato remanente, el ácido *ent*-7 α OH-¹⁴C-kaurenoico se transformó en el hidrato 16,17, mientras que ¹⁴C-GA₁₄ se convirtió parcialmente en su isómero, probablemente por una reacción no enzimática durante la extracción. La única actividad de la biosíntesis de GAs evidenciada fue una pequeña conversión de ¹⁴C-GA₁₂ en el hidrato de ¹⁴C-GA₉ (15%). Es posible que la ausencia de actividad de oxidasas en I-10595 se deba a que los genes no se expresan o bien a mutaciones en los genes respectivos, aunque es poco probable que todos los genes de oxidasas de GAs presenten mutaciones.

Tabla 8. Productos de metabolización de precursores de ¹⁴C-GAs por la cepa I-10595 de *F. konzum* (no-productora de GAs)

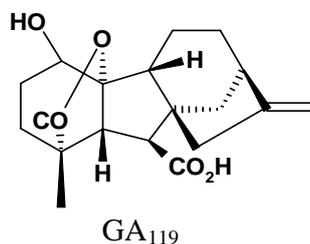
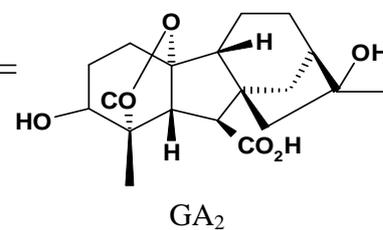
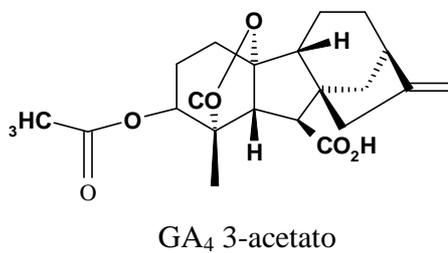
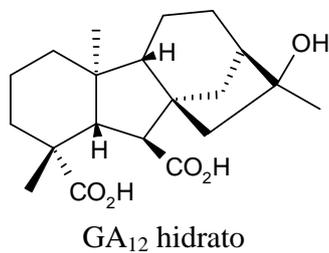
SUSTRATOS	PRODUCTOS	% DE SUSTRATO REMANENTE
Ácido <i>ent</i> -7 α OH- ¹⁴ C-kaurenoico	Ácido <i>ent</i> -7 α -OH- ¹⁴ C-kaurenoico hidratado (16-OH)	44
¹⁴ C-GA ₁₂ aldehído	No se detectaron productos por GC-MS	25
¹⁴ C-GA ₁₂	¹⁴ C-GA ₉ hidratado (16OH)	65
¹⁴ C-GA ₁₄	Iso- ¹⁴ C-GA ₁₄	90
¹⁴ C-GA ₄	Sólo se detectó el sustrato remanente	100
¹⁴ C-GA ₇	Sólo se detectó el sustrato remanente	100

III. 5. Ausencia de la actividad de oxidasas de GAs en cepas de *F. subglutinans* (E-09990 y E2192)

Las dos cepas, E-09990 y E2192, de *F. subglutinans* que fueron analizadas no presentaron GAs ni *ent*-kaurenoides en el medio de cultivo después de una incubación de 10 días en un medio inductor de la biosíntesis de estos diterpenos (Tabla 9). Cuando se agregaron los sustratos de las distintas oxidasas de GAs al cultivo (*ent*-¹⁴C-kaureno, *ent*-7 α OH-¹⁴C-kaurenico, ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, ¹⁴C-GA₁₂, ¹⁴C-GA₁₄ o ¹⁴C-GA₄) se encontró sólo el sustrato remanente más algunos productos no relacionados con la biosíntesis de GAs (Tabla 9). Por ejemplo, la totalidad del *ent*-¹⁴C-kaureno fue recuperado intacto en el extracto del micelio después de 3 días de incubación mientras que ¹⁴C-GA₁₂ y ¹⁴C-GA₁₄ sufrieron una pequeña conversión en los hidratos respectivos, por adición de H₂O al doble enlace en la posición 16, 17, una reacción inespecífica catalizada por enzimas de otras vías metabólicas. Por otra parte, el ¹⁴C-GA₄ fue transformado en el derivado 3-acetato y ¹⁴C-GA₂ (GA₄ hidrato), mientras que un 30% del ¹⁴C-GA₇ se recuperó como iso¹⁴C-GA₇, todas las reacciones no corresponden a la biosíntesis de GAs. Estos resultados sugieren que los genes de la biosíntesis de GAs no se expresan en *F. subglutinans* y concuerdan con lo descrito previamente para otras cepas de esta especie. La capacidad de sintetizar GAs estaría ausente en esta especie de *Fusarium* aislada del maíz.

Tabla 9. Productos obtenidos en incubaciones de la cepa E0990 (*F. subglutinans*) con ^{14}C -GAs.

SUSTRATO	PRODUCTOS (%)
<i>ent</i> - ^{14}C -kaureno	No se detectaron productos por GC-MS
<i>ent</i> -7 α OH ^{14}C -kaurenoico	No se detectaron productos por GC-MS
^{14}C -GA ₁₂ aldehído	No se detectaron productos por GC-MS
^{14}C -GA ₁₂	^{14}C -GA ₁₂ hidrato (12%)
^{14}C -GA ₁₄	^{14}C -GA ₁₄ hidrato (15%)
^{14}C -GA ₄	^{14}C -GA ₄ 3-acetato (30%) [$^{14}\text{C}_1$]GA ₂ (^{14}C -GA ₄ hidrato, 6%)
^{14}C -GA ₇	Iso- ^{14}C -GA ₇ (30%)
^{14}C -GA ₉	1-OH - ^{14}C -GA ₉ (GA119; 35%)



III. 6. Biosíntesis de GAs por híbridos entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* (CxD)

III.6.1. Caracterización de la capacidad de biosintetizar GAs de las cepas C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum*.

Se investigó la biosíntesis de GAs en las cepas C-1995 (*F. fujikuroi*) y D-4854 (*F. proliferatum*), que son las cepas parentales de las que provienen los híbridos estudiados con el objeto de analizar la segregación de esta capacidad biosintética en la progenie. Ambas cepas contienen el cluster de genes de GAs, aunque podrían diferir en su expresión ya que se ha descrito algunos aislados de *F. proliferatum* no expresan los genes ni producen GAs. Ambas cepas fueron cultivadas por 10 días en un medio líquido químicamente definido y limitante en compuestos nitrogenados, se aislaron las GAs desde el filtrado del cultivo y fueron identificadas por GC-MS (Tabla 10).

Se encontró que la cepa C-1995 sintetiza principalmente GA₃ junto con otras GAs 3β-hidroxiladas (GA₁₄, GA₄, GA₁₃, GA₃₆, GA₁₆, GA₄₇ y GA₁) (Tabla 10 y Fig. 9). GA₁₄, GA₄ y GA₃₆ corresponden a intermediarios de la biosíntesis de GAs mientras que GA₁, GA₃ y GA₁₃ son productos finales que no sufren metabolización posterior. Además de GAs, se encontraron en el medio de cultivo kaurenolidos y ácidos fujenoicos que son productos laterales de la GA₁₄ sintasa formados por oxidación del ácido *ent*-kaurenoico o del ácido *ent*-7α-OH-kaurenoico, respectivamente (Rojas, et al 2004.). En el medio de cultivo de la cepa C-1995 se detectaron GAs no hidroxiladas en baja cantidad: los productos finales GA₉ (GA lactónica) y GA₂₅ (C₂₀ carboxilato) así como el intermediario

C₂₀ aldehído, GA₂₄. También se encontraron los derivados hidroxilados en C₁₆ o C₁ que pueden ser productos de oxidación inespecífica o productos laterales de la desaturasa de GAs (GA₄₂: 16-OH-GA₁₄ y GA₁₆: 1-OH-GA₄) (Tabla 10). La razón entre los productos finales GA₃: GA₁ fue de 2,2:1 mientras que la razón descrita para las cepas IMI58289 y m567 (cepas silvestres de *F. fujikuroi*) es de 100:1 (Malonek et al., 2005a; Tudzynski, 2005). El ácido giberélico (GA₃) es sintetizado a partir de GA₄ vía GA₇ por la acción consecutiva de la 1,2 desaturasa (DES) y la 13-hidroxisasa de GAs (P450-3). La misma monooxigenasa P450-3 produce GA₁ a partir de GA₄, pero este producto se genera en pequeñas cantidades en la mayoría de las cepas silvestres de *F. fujikuroi* (Tudzynski et al., 2003). La baja razón de GA₃:GA₁ en C-1995 sugiere una mayor actividad de la monooxigenasa P450-3 con respecto a la desaturasa, comparada con otras cepas silvestres de *F. fujikuroi*.

A diferencia de la cepa C-1995, la cepa D-4854 de *F. proliferatum* no sintetiza GAs ni *ent*-kaurenoides (Tabla 10). Esto concuerda con lo descrito para la mayor parte de las cepas de *F. proliferatum* que no sintetizan GAs (Malonek et al. 2005a) aunque esta especie contiene algunas cepas activas como D-ET1 aislada desde raíces de una orquídea (Tsavkelova et al., 2008) (Tabla 10).

Tabla 10. GAs y *ent*-kaurenoides sintetizados por las cepas C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum*, identificadas por GC-MS.

Cepa	Giberelinas	<i>ent</i> -kaurenoides	Relación GA ₃ :GA ₁
C-1995	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso- GA ₃ , GA ₃₆ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ (principal), GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ác. fujenoico (principal) triácido fujenoico	2,2:1
IMI 58289*	GA ₃ (principal), GA ₁₃ , isolactona GA ₃ , GA ₁₆ , ácido giberelénico, GA ₇ , GA ₂₅ , GA ₁ , GA ₉ , GA ₄	ácido fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido <i>ent</i> -kaureno	100:1
D-4854	Ninguna	Ninguno	
D-0502*	Ninguna	Ninguno	
D-02945*	Ninguna	Ninguno	
D-ET1**	GA ₄ , GA ₇ (principales), GA ₉ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₁₃ , GA ₃₆ , GA ₁₆ , GA ₃ (trazas), GA ₁	<i>ent</i> -kaureno 7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico	GA ₃ << GA ₁

* Datos tomados de Malonek et. al 2005

** Datos tomados de Tsavkelova et al. 2008

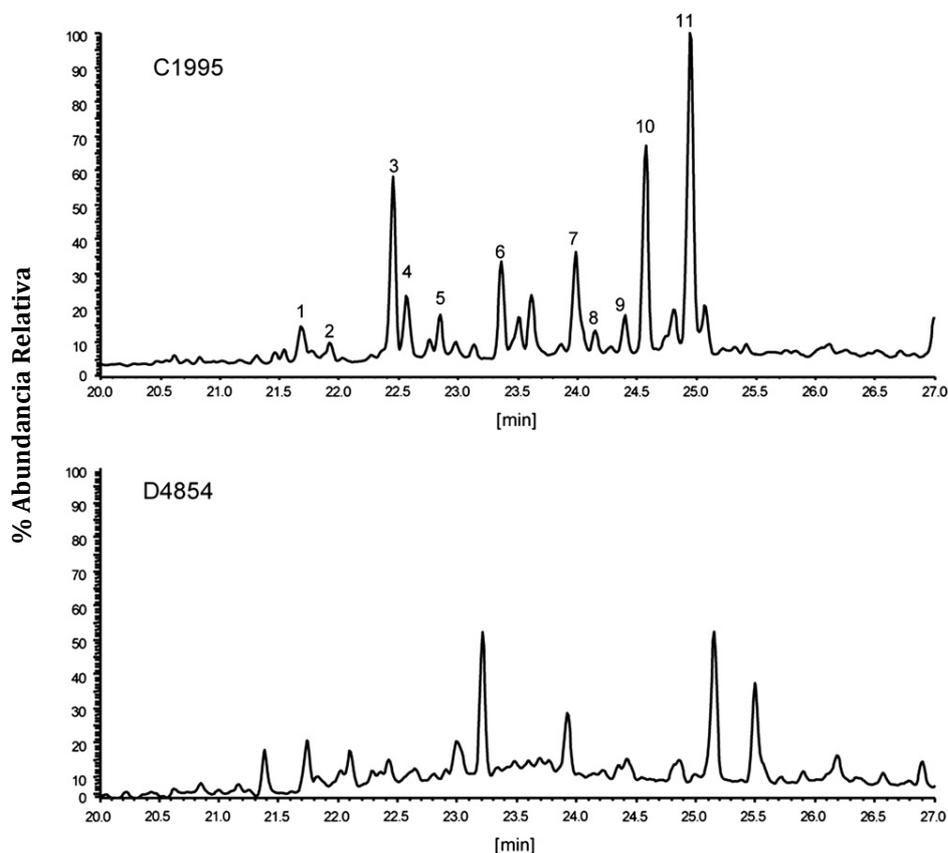


Fig. 9. Análisis de GC-MS del filtrado de cultivo de las cepas parentales, C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum*. Corriente iónica total de un extracto de acetato de etilo después de derivatización de las GAs como metil ésteres y trimetilsilil éteres. Los componentes principales fueron identificados por comparación de sus espectros de masas con los de estándares (Gaskin and MacMillan, 1992). Peak 1: GA₁₄, Peak 2: GA₄, Peak 3: ácido fujenoico, Peak 4: triácido fujenoico, Peak 5: ácido giberelenico, Peak 6: GA₁₃, Peak 7: GA₄₇/ iso- GA₃/ GA₁₆, Peak 8: 12-OH-GA₃₆, Peak 9: 7β,18-diOH-kaurenolido, Peak 10: GA₁ y Peak 11: GA₃. Los peaks en D-4858 no corresponden a GAs.

III.6.2. Actividad de oxidasas de GAs en las cepas C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum*

La cepa D-4854 no produce GAs, sin embargo podría presentar actividad de algunas de las oxidasas de GAs (Malonek et al., 2005b). Con el objeto de determinar si algunas de las oxidasas de GAs están activas, se investigó en los cultivos líquidos la metabolización de los siguientes precursores: *ent*- ^{14}C -kaureno (sustrato de la MO P450-4), ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico, ácido *ent*-7 α -OH- ^{14}C -kaurenoico o ^{14}C -GA₁₂ aldehído (sustratos de la MO P450-1), ^{14}C -GA₁₂ (sustrato de la MO P450-2), ^{14}C -GA₄ (sustrato de la MO P450-3 y desaturasa) y ^{14}C -GA₇ (sustrato de la MO P450-3). Los mismos precursores fueron agregados a cultivos de la cepa C-1995 de *F. fujikuroi* como control positivo, en presencia de un inhibidor de la *ent*-kaureno oxidasa (AMO 1618) con la finalidad de eliminar las GAs endógenas de los ensayos.

Para la cepa C-1995, se encontró que el ^{14}C -GA₁₂ aldehído fue convertido eficientemente a los productos finales ^{14}C -GA₃ y ^{14}C -GA₁ así como al intermediario 3 β -hidroxilado ^{14}C -GA₄ lo que evidencia la actividad de las 4 MOs de GAs y de la desaturasa (Tabla 11). El ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico y el ácido *ent*-7 α -OH- ^{14}C -kaurenoico, intermediarios tempranos de la biosíntesis de GAs, fueron transformados exclusivamente a productos 3 β -hidroxilados, encontrándose ^{14}C -GA₃ como producto principal. Además, se acumularon en el medio de cultivo ^{14}C -GA₁ (producto láctónico final) y ^{14}C -GA₄ (intermediario láctónico). En la incubación con ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico se detectó un 5% de ácido *ent*-7 α -OH- ^{14}C -kaurenoico, lo que sugiere que la etapa de contracción del anillo B catalizada por la MO P450-1 (GA₁₄-sintasa) es una

etapa lenta en la secuencia biosintética. Los resultados además indican que las reacciones de 13-hidroxiación y desaturación serían más lentas que la oxidación del C₂₀, ya que se acumuló el intermediario ¹⁴C-GA₄ en el filtrado (Tabla 11).

La actividad de C₂₀-oxidasa (MO P450-2) se ensayó con el sustrato no hidroxiado, ¹⁴C-GA₁₂, que presenta un metilo en C₂₀. Éste precursor fue transformado a los productos no hidroxiados ¹⁴C-GA₉, ¹⁴C-GA₄₀ (2 α -OH-GA₉), ¹⁴C-GA₂₄ (C₂₀ aldehído) y ¹⁴C-GA₂₅ (C₂₀ carboxilato), todos productos esperados para esta oxidasa. La actividad de la 13-hidroxiolasa de GAs (MO P450-3) se detectó con los sustratos lactónicos ¹⁴C-GA₄ y ¹⁴C-GA₇. El ¹⁴C-GA₄ fue convertido parcialmente a los productos finales: ¹⁴C-GA₃ (44%) y ¹⁴C-GA₁ (9%) (Tabla 11), de acuerdo al perfil de GAs endógenas, lo que indica que la etapa de desaturación es una reacción lenta en la biosíntesis de GAs.

Tabla 11. Actividad de oxidasas de GAs en la cepa C-1995 de *F. fujikuroi*.

Sustrato	Productos	Espectro de masa m/z (% abundancia relativa)
¹⁴ C-GA ₁₂ aldehído	¹⁴ C-GA ₃ (31%)	M ⁺ [512(4), 510(5), 506(14), 505(36), 504(100)], 489(8), 474(5), 460(6), 445(7), 431(5), 387(7), 370(9), 355(5), 347(120), 297(7), 238(8), 208(28), 193(14)
	¹⁴ C-GA ₁ (14%)	M ⁺ [514(18), 512(19), 510(10), 508(18), 507(40), 506(100)], 491(12), 454(4), 448(18), 389(3), 377(140), 376(15), 375(10), 313(8), 235(7), 207(13)
	¹⁴ C-GA ₃ isolactona	M ⁺ [512(7), 510(7), 508(6), 506(15), 505(37), 504(100)], 489(7), 475(16), 445(10), 431(7), 371(8), 370(9), 369(10), 311(8), 26(8), 238(14), 208(5)
	¹⁴ C-GA ₄ (18%)	M ⁺ [426(6), 424(9), 422(6), 418(22)], 400(11), 392(10), 390(14), 386(21), 358(8), 336(13), 334(11), 328(29), 300(17), 296(21), 295(22), 293(24), 292(25), 290(43), 289(63), 284(100), 261(30), 233(49), 229(48), 225(75), 224(62), 131(32), 129(42)
	3-epi- ¹⁴ C-GA ₄ (22%)	M ⁺ [426(11), 424(23), 422(18), 418(35)], 400(15), 390(23), 386(34), 379(14), 377(15), 371(30), 358(16), 343(27), 334(12), 328(24), 300(21), 295(34), 293(35), 289(100), 284(27), 261(38), 233(59), 229(51), 225(46), 201(34), 131(41), 129(47)
¹⁴ C-GA ₁₂	¹⁴ C-GA ₄₀ (16%)	M ⁺ 420(25), 405(9), 373(100), 361(48), 345(91), 301(87), 286(56), 227(61), 225(57)
	¹⁴ C-GA ₂₄ (12%)	M ⁺ 376(3), 348(7), 344(25), 316(75), 312(31), 288(69), 287(53), 285(30), 284(32), 256(38), 229(61), 228(90), 227(100),
	¹⁴ C-GA ₂₅ (33%)	374(20), 314(73), 286(100), 255(8), 227(64)
	¹⁴ C-GA ₁₂ hidrato	M ⁺ 452(7), 437(11), 435(7), 405(12), 393(10), 392(9), 363(6), 330(15), 320(5), 303(10), 288(100), 260(9), 243(19), 212(12), 201(20)
	¹⁴ C-GA ₉ (27%)	Weak spectrum: 300(95), 295(70), 272(100), 243(69)
¹⁴ C-GA ₄	¹⁴ C-GA ₃ (44%)	M ⁺ [506(33), 505(30), 504(100)], 489(7), 475(4), 460(4), 445(7), 431(5), 387(5), 370(10), 347(10), 311(6), 297(6), 268(6), 238(7), 208(24)
	¹⁴ C-GA ₁ (9%)	M ⁺ [508(66), 507(39), 506(100)], 491(10), 450(10), 448(15), 378(9), 377(14), 376(12), 357(5), 313(6), 235(5), 209(11), 207(19)
¹⁴ C-GA ₇	¹⁴ C-GA ₃ (36%)	M ⁺ [506(41), 505(23), 504(100)], 489(8), 475(4), 460(4), 445(6), 431(4), 387(6), 370(13), 349(6), 347(12), 311(7), 297(8), 238(9), 210(10), 208(24)

Finalmente, se investigó la metabolización de *ent*-¹⁴C-kaureno por la cepa C-1995. Después de 3 días de incubación, se recuperó un 35% de la radiactividad en el micelio y la radiactividad restante en el filtrado (64%). Al analizar el extracto del micelio por TLC, se observó que el 48% correspondía a ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y un 33% al sustrato remanente (Fig. 10A). Se realizó un control negativo con la cepa SG139, que no posee el cluster de genes de la biosíntesis de GAs, el que dio sólo sustrato sin metabolizar (Fig. 10B) y un control positivo con la cepa SG139 transformada con el gen *P450-4* de *F. fujikuroi*, que dio metabolización de un 72% del *ent*-¹⁴C-kaureno hasta ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico (Fig. 10C). El extracto del filtrado analizado por HPLC dio una mezcla de ¹⁴C-GA₃/¹⁴C-GA₁. La acumulación de ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico (Fig. 10A) confirma que las reacciones catalizadas por la MO P450-1 son más lentas que la síntesis de este intermediario.

En conclusión, la metabolización de precursores de la biosíntesis de GAs por la cepa C-1995 así como las GAs endógenas demostró que tanto GA₃ como GA₁ se sintetizan a través de intermediarios 3β-hidroxiados y que algunas etapas de la secuencia biosintética son lentas, como la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico, la contracción del anillo B y la hidroxilación en la posición 13 de los intermediarios GA₄ y GA₇.

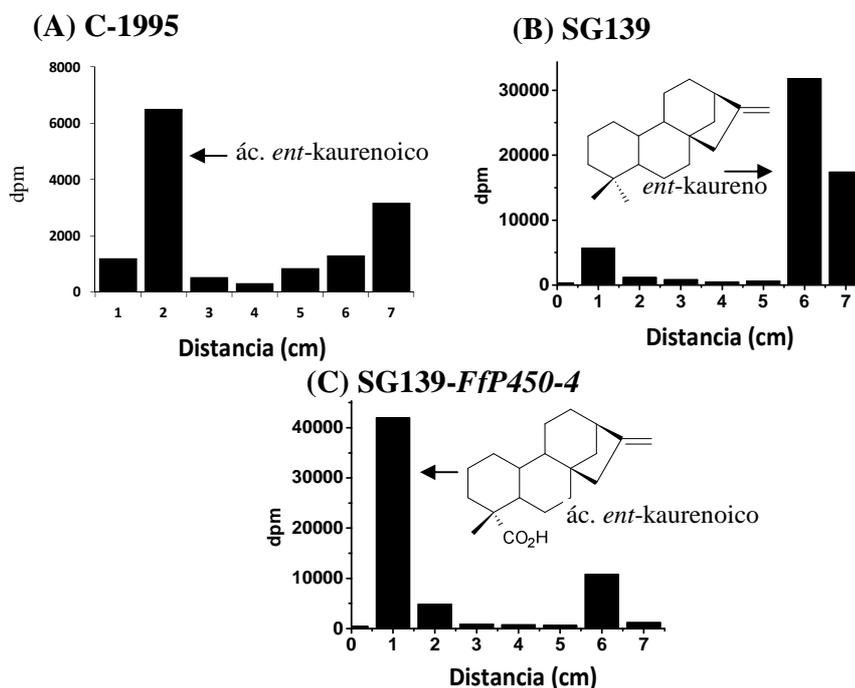


Fig. 10. Análisis por TLC de extractos del micelio en incubaciones con *ent*-¹⁴C-kaureno de las cepas: (A) C-1995 de *F. fujikuroi*, (B) SG139 de *F. fujikuroi* (no contiene genes de la biosíntesis de GAs) y (C) SG139-*Ffp450-4* (contiene sólo el gen de la *ent*-kaureno oxidasa de *F. fujikuroi*).

A diferencia de lo que ocurre con la cepa C-1995 de *F. fujikuroi*, la cepa D-4854 de *F. proliferatum* metabolizó parcialmente el ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y el ácido *ent*-7 α -OH-¹⁴C-kaurenoico encontrándose sustrato remanente en el micelio (58% para ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y 36% para ácido *ent*-7 α -OH-¹⁴C-kaurenoico). Los productos que se encontraron en el filtrado, fueron separados por HPLC, sin embargo, no pudieron ser detectados por GC-MS, lo que sugiere que corresponderían a derivados no volátiles como glucósidos o acetatos. Por otra parte, el ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, se metabolizó completamente pero dio origen sólo a productos no relacionados con la biosíntesis de GAs como 16,17-diH-16,17-OH-¹⁴C-GA₁₂ aldehído y 12-OH-¹⁴C-GA₁₂ aldehído

probablemente formados por oxidación inespecífica por enzimas de otras vía metabólicas (Tabla 12).

El sustrato de la C20 oxidasa, $^{14}\text{C-GA}_{12}$, también fue transformado completamente por los cultivos de D-4854, generando dos productos inespecíficos más polares que se identificaron como 16,17-diH-17-OH- $^{14}\text{C-GA}_{12}$ e hidrato- $^{14}\text{C-GA}_{12}$ (Tabla 12). El primero se formaría por oxidación enzimática en tanto que el segundo se generaría no enzimáticamente por las condiciones ácidas de la extracción.

No se detectó actividad de ninguna de las oxidasas que catalizan las últimas reacciones de la vía, 13-hidroxisasa o $\Delta 1,2$ -desaturasa. El $^{14}\text{C-GA}_4$, sustrato de ambas enzimas se transformó sólo en epi- $^{14}\text{C-GA}_4$, producto de isomerización no enzimática, en tanto que el $^{14}\text{C-GA}_7$, sustrato de la MO P450-3 no formó el producto de 13-hidroxisación ($^{14}\text{C-GA}_3$) sino que se transformó en la isolactona- $^{14}\text{C-GA}_7$, producto de un reordenamiento no enzimático durante la incubación (Tabla 12 y Fig. 11). La *ent*-kaureno oxidasa se encontró inactiva en esta cepa ya que el *ent*- ^{14}C -kaureno agregado no se metabolizó (Fig. 12).

Estos resultados demuestran que la cepa D-4854 no presenta actividad de oxidasas de GAs, lo que podría deberse a que los genes no se expresan o bien a mutaciones, aunque es poco probable que todos los genes de oxidasas presenten mutaciones.

Tabla 12. Metabolización de precursores de GAs por la cepa no-productora D-4854 de *F. proliferatum*.

Sustrato	Productos (%)	Espectro de masa m/z (% abundancia relativa)
¹⁴ C- GA ₁₂ aldehído	16,17-diH-16,17-OH- ¹⁴ C ₁ -GA ₁₂ aldehído (16,7%)	487(4), 486(2), 485(3), 413(100), 411(64), 409(13), 405(34)
	12-OH- ¹⁴ C ₄ - GA ₁₂ aldehído (39%)	M ⁺ 526(4), 394(7), 336(4), 305(19), 304(17), 276(11), 245(15), 217(100), 215(56), 211(43), 210(31), 209(52), 207(23), 185(24), 157(84), 155(41), 151(30), 111(38)
¹⁴ C-GA ₁₂	Hidrato- ¹⁴ C ₁ -GA ₁₂ (25,1%)	M ⁺ 452(9), 437(12), 435(6), 405(12), 393(12), 392(11), 363(5), 330(15), 320(7), 303(12), 288(100), 260(9),243(20), 212(12), 201(18)
	isomero- ¹⁴ C ₁ -GA ₁₂ (44%)	M ⁺ 362(19), 334(24), 330(100), 302(61), 287(28), 271(23), 270(27), 259(33), 255(28), 243(67), 242(30), 227(31)
	¹⁴ C ₁ -GA ₁₂	330(19), 302(100), 300(9), 287(20), 271(8), 243(31), 242(25), 227(17)
¹⁴ C-GA ₄	3-epi- ¹⁴ C ₁ -GA ₄ (94,1%)	M ⁺ [420(52), 418(42)], 388 (17), 386(14), 373(47), 371(35), 345(44), 343(36), 330(32), 328(22), 291(100), 289(96), 286(35), 284(47), 263(36), 261(36), 235(56), 233(57), 227(58), 225(76), 131(38), 129(98)
	¹⁴ C ₁ -GA ₄	M+[420(20), 418(18)], 402(19), 400(14), 388 (41), 386(32), 330(26), 328(19), 291(48), 289(42), 286(100), 284(95), 235(35), 233(31), 227(79), 226(79), 225(87), 224(62), 131(26), 129(74)
¹⁴ C-GA ₇	isolactona ¹⁴ C ₁ -GA ₇ (75,5%)	M ⁺ 418(12), 386(9), 374(52), 358(91), 356(23), 343(18), 314(37), 313(43), 300(53), 284(26), 283(56), 244(52),225(71), 224(100), 223(60)
	¹⁴ C ₁ -GA ₇	M ⁺ 418(17), 403(4), 386(9), 374(5), 358(12), 343(10), 331(9), 328(7), 315(12), 313(11), 300(14), 299(13),284(29), 259(35), 244(13), 243(18), 225(73), 224(100), 173(55), 155(32), 129(26)

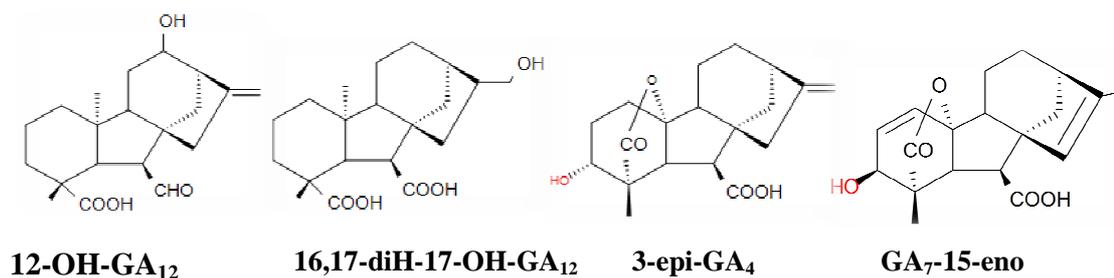


Fig. 11. Estructura de los productos formados durante la metabolización de precursores de GAs por la cepa no-productora D-4854 de *F. proliferatum*.

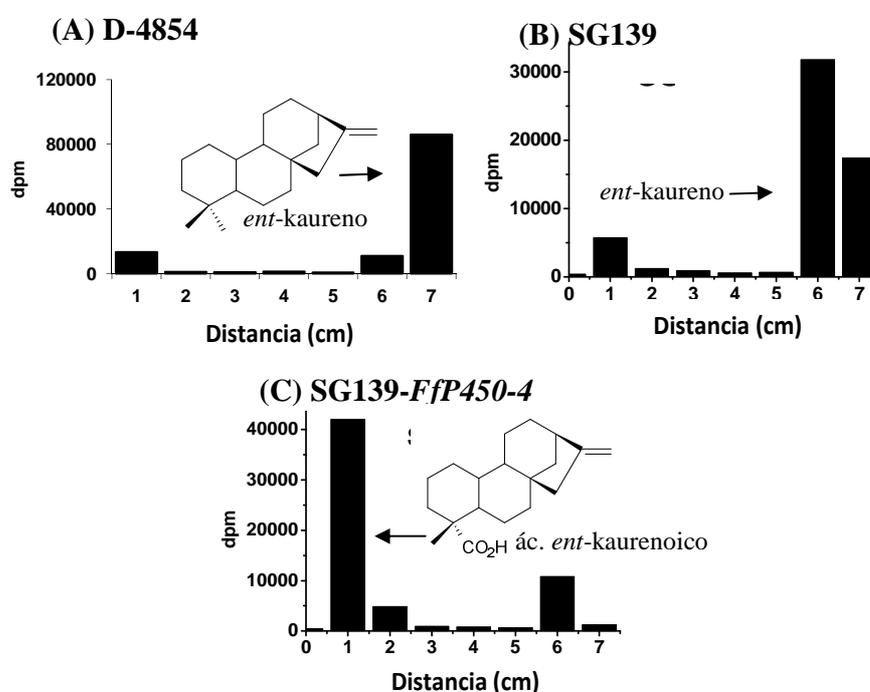


Fig. 12. Análisis por TLC del extracto del micelio de incubaciones con *ent*-¹⁴C-kaureno de las cepas: **(A)** D-4854 de *F. proliferatum*, **(B)** SG139 de *F. fujikuroi* (no contiene genes de la biosíntesis de GAs) y **(C)** SG139-Ffp450-4 (contiene sólo el gen de la *ent*-kaureno oxidasa de *F. fujikuroi*).

III.6.3. Caracterización de la biosíntesis de GAs en cepas híbridas entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* (CxD)

Las cepas C-1995 de *F. fujikuroi* y D-4854 de *F. proliferatum* pueden cruzarse en condiciones de laboratorio y generar híbridos (CxD), en los cuales se investigó la biosíntesis de GAs. Se analizó en 19 cepas híbridas tanto la presencia de GAs en el medio de cultivo como la actividad de las distintas oxidasas de GAs y se comparó ésta información con las características de las cepas parentales.

III.6.3.1. GAs y *ent*-kaurenoides sintetizados por las cepas híbridas CxD

Después de 10 días de incubación de los híbridos en un medio líquido con nitrógeno limitante, se aislaron las GAs y *ent*-kaurenoides desde el filtrado del cultivo y se identificaron por GC-MS. El análisis de los extractos respectivos mostró que 13 cepas CxD sintetizan GAs (Tablas 13 y 14) a diferencia de las 6 restantes cuyos extractos no contenían GAs ni *ent*-kaurenoides.

Resulta interesante que las cepas CxD pueden dividirse en tres grupos: un conjunto de cepas que sintetiza GAs en cantidad similar a la cepa parental C-1995, el segundo no produce GAs al igual que la cepa parental D-4854 y el tercer conjunto de híbridos que produce en baja cantidad de GAs. Las cepas CxD 96, 102, 107, 114, 116, 117, 119 y 123 pertenecen al primer grupo y sintetizan GA₃ como producto principal (Tabla 13), con una razón de GA₃: GA₁ entre 8/22:1 mayor que para la cepa silvestre C-1995 de *F. fujikuroi*. En el segundo grupo está formado por 5 cepas (CxD 95, 97, 100,

108 y 122) que sintetizan GA₁ en mayor cantidad que GA₃ con un razón de alrededor de 10:1 (Tabla 14). Los 2 productos, que son 19,10 γ -lactónicos y 3 β ,13-dihidroxiados, difieren en un doble enlace (Δ 1,2) presente en el GA₃. El precursor común de ambos es GA₄, intermediario que es utilizado por la 13-hidroxiilasa para dar GA₁ o bien por la desaturasa para dar GA₇, precursor de GA₃. Por lo tanto, la formación de GA₁ o de GA₃ está determinada por las actividades relativas de la 13-hidroxiilasa y de la desaturasa de GAs. La cepa parental C1995 sintetiza principalmente GA₃ aunque en menor proporción con respecto a GA₁ (GA₃: GA₁= 2:1) comparada con las cepas híbridas del primer grupo (GA₃: GA₁= 23:1) lo que indica que presenta una menor actividad de la desaturasa (Tabla 13). El último grupo de las cepas híbridas está formado por CxD 98, 99, 101, 103,118, 121 para las que no se detectaron GAs ni *ent*-kaurenoides en los extractos del filtrado del cultivo.

Tabla 13. Análisis de GAs y *ent*-kaurenoides en cepas híbridas CxD que sintetizan principalmente GA₃.

Cepa	Giberelinas*	<i>ent</i> -kaurenoides*	Relación GA ₃ :GA ₁
CXD 102	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ , GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico triácido fujenoico	8:1
CxD 116	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ , GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico triácido fujenoico	22:1
CxD 117	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ , GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico triácido fujenoico	19:1
CxD 96	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ , GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico triácido fujenoico	23:1
CxD 107	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃ (muy alto), GA ₄₂	7β,18-diOHkaurenolido ácido fujenoico triácido fujenoico	17:1
CxD 114	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , iso-GA ₇ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₃₆ , GA ₄₂ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃	7β,18-diOHkaurenolido ác. Fujenoico triácido fujenoico	10:1
CxD 119	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , iso-GA ₇ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico (principal), GA ₁₃ , GA ₃₆ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃	7β,18-diOHkaurenolido ác. fujenoico (principal) triácido fujenoico	GA ₃ >>GA ₁
CxD 123	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , iso-GA ₇ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₃₆ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃	7β,18-diOHkaurenolido ác. Fujenoico triácido fujenoico	15:1
C-1995	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₇ , ácido giberelénico, GA ₁₃ , GA ₃₆ , GA ₄₂ , GA ₄₇ , iso-GA ₃ , GA ₁₆ , GA ₁ , GA ₃	7β,18-diOHkaurenolido ác. Fujenoico triácido fujenoico	2.2:1

*Identificados por GC-MS

Tabla 14. GAs y ent-kaurenoïdes sintetizados por cepas híbridas CxD que sintetizan principalmente GA₁.

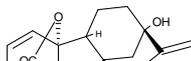
Cepa	Giberelinas*	ent-kaurenoïdes*	Relación GA ₁ :GA ₃
CxD 95	GA ₁₃ , GA ₁ , GA ₃	ácido fujenoico	10:1
CxD 100	GA ₁₃ , GA ₁ , GA ₃ (Baja cantidad)	ác. fujenoico	GA ₁ >GA ₃
CxD 108	GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₆ , GA ₁ GA ₃ (Baja cantidad)	ác. fujenoico (muy poco)	GA ₁ >GA ₃
CxD 97	GA ₁₃ , GA ₁ , GA ₃ (traza)		GA ₁ >>GA ₃
CxD 122	GA ₉ , GA ₂₅ , GA ₂₄ , GA ₁₄ , GA ₄ , GA ₁₃ , GA ₄₇ , GA ₁₆ , GA ₁ (muy alto), GA ₃ , GA ₄₂	ácido fujenoico 7β,18-diOHkaurenolido triácido fujenoico	9:1

*Identificados por GC-MS

III.6.3.2. Actividad de las oxidasas de GAs en cepas CxD activas en la biosíntesis de GAs

Con el objeto de investigar si los diferentes niveles de GAs se deben a distintos niveles de actividad de las enzimas de la vía biosintética, se ensayaron las distintas oxidasas en los cultivos con ¹⁴C-GA₁₂ y ¹⁴C-GA₄ como sustratos para las cepas híbridas del grupo que produce principalmente GA₃ y del grupo que produce bajos niveles GA₁. Luego de 3 días de incubación en un medio sin nitrógeno, las GAs fueron aisladas, purificadas mediante HPLC y derivatizadas para su identificación por GC-MS.

Se encontró que las cepas que producen principalmente GA₃ convirtieron un 47-88% del precursor ¹⁴C-GA₄ a ¹⁴C-GA₃ mientras que el ¹⁴C-GA₁₂ fue completamente transformado por los cultivos hasta ¹⁴C-GA₂₄ y ¹⁴C-GA₄₀ (2OH-GA₉) productos más oxidados en el C₂₀ (Fig. 13). Para el grupo que produce principalmente GA₁, se encontró un comportamiento diferente ya que solo un 4 - 7% del ¹⁴C-GA₄ fue transformado a ¹⁴C-GA₁, en tanto que el ¹⁴C-GA₁₂ fue parcialmente convertido a productos más oxidados en el C-20 (40%). Por lo tanto, la C20-oxidasa y 13-hidroxilasa presentan una baja actividad en las cepas que producen GA₁ (Fig. 14). Para las cepas que no producen GAs, se encontró que el ¹⁴C-GA₁₂ fue convertido en los siguientes productos ¹⁴C-GA₁₅, ¹⁴C-GA₂₄, ¹⁴C-GA₂₅ y ¹⁴C-GA₉ (Fig. 15), lo que indica la C20 oxidasa está activa. Al utilizar ¹⁴C-GA₄ como sustrato, se observó una pequeña conversión a los productos finales ¹⁴C-GA₃ y/o ¹⁴C-GA₁. El conjunto de estos resultados sugieren que algunas de las cepas que no sintetizan GAs, presentarían algunas oxidasas activas, por lo que la ausencia de síntesis de GAs podría deberse al bloqueo de algunas de las etapas iniciales de la vía metabólica como se ha descrito en cepas inactivas de *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005a). Se encontró además que varias cepas que no producen GAs, no presentan actividad de las oxidasas de GAs, recuperándose el sustrato intacto después de 3 días de incubación. Este conjunto de resultados indica que existe variabilidad entre cepas que no sintetizan GAs ya que algunas cepas presentarían oxidasas activas, mientras que otras no presentan actividad de ninguna de las oxidasas de GAs.



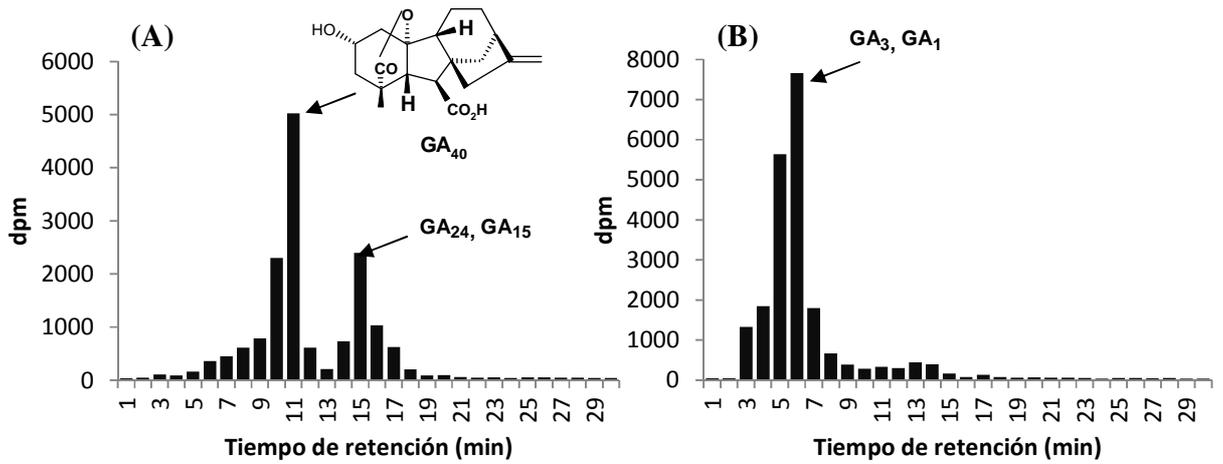


Fig. 13. Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CxD 116 que produce GA₃ con: (A) ^{14}C -GA₁₂, (B) ^{14}C -GA₄. Los Tr son: ^{14}C -GA₁₂, 25 min; ^{14}C -GA₄, 14 min; ^{14}C -GA₁/ ^{14}C -GA₃, 6 min; ^{14}C -GA₂₄/ ^{14}C -GA₁₅, 15 min; ^{14}C -GA₄₀, 11 min.

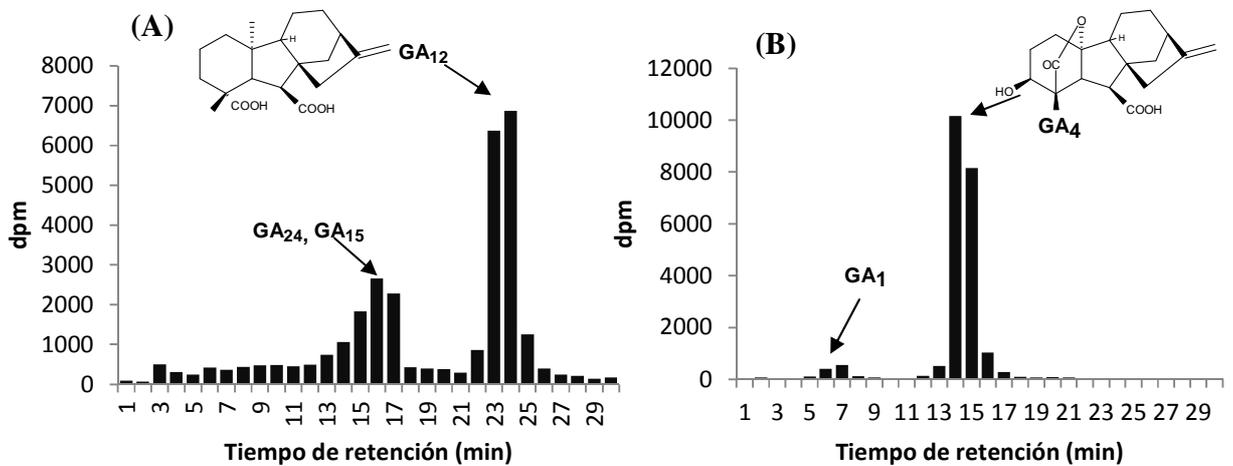


Fig. 14. Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CxD 95 que produce GA₁ con: (A) ^{14}C -GA₁₂, (B) ^{14}C -GA₄. Los Tr son: ^{14}C -GA₁₂, 24 min; ^{14}C -GA₄, 14 min; ^{14}C -GA₁/ ^{14}C -GA₃, 7 min; ^{14}C -GA₂₄/ ^{14}C -GA₁₅, 16 min.

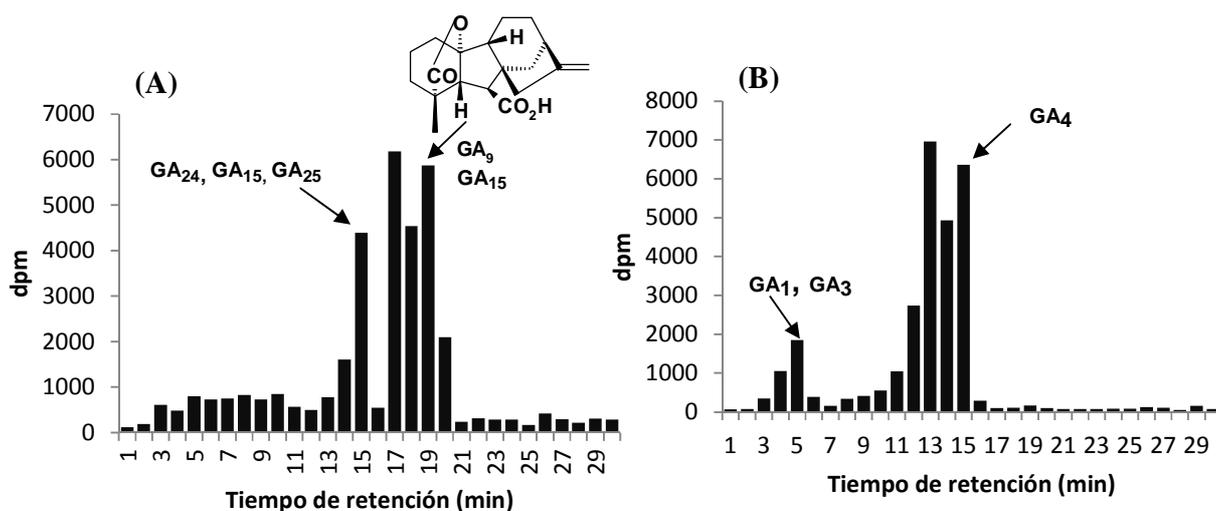


Fig. 15. Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de la cepa CxD 101 que no sintetiza GAs con: (A) ¹⁴C-GA₁₂, (B) ¹⁴C-GA₄. Los Tr son: ¹⁴C-GA₁₂, 25 min; ¹⁴C-GA₄, 15 min; ¹⁴C-GA₁/¹⁴C-GA₃, 5 min; ¹⁴C-GA₂₄/¹⁴C-GA₁₅, 15 min; ¹⁴C-GA₂₅, 15 min; ¹⁴C-GA₉, 19 min.

Para determinar si los distintos niveles de GAs producidos por los diferentes híbridos se deben a diferentes niveles de expresión de los genes de biosíntesis de GAs, se realizó un análisis de Northern Blot con las cepas parentales y los híbridos CxD. Este análisis demostró que los niveles de transcrito para el gen *cps/ks*, que codifica para la enzima específica de la biosíntesis de GAs, *ent*-copalildifostato/ *ent*-kaureno sintasa, son muy diferentes en las distintas cepas. La cepa parental C-1995 y el híbrido CxD 107 que sintetiza GA₃, presentaron niveles altos de expresión, mientras que en la cepa parental D-4854 así como en las cepas no productoras de GAs (CxD 98, 99, 118) no se detectó el transcrito de *cps/ks* (Fig. 16)

El nivel de expresión de este gen tampoco fue detectable en las cepas que producen bajos niveles de GAs como CxD 108 o 122 lo que sugiere que las bajas

actividades enzimáticas y bajos niveles de GAs producidas podrían deberse a una expresión reducida de los genes.

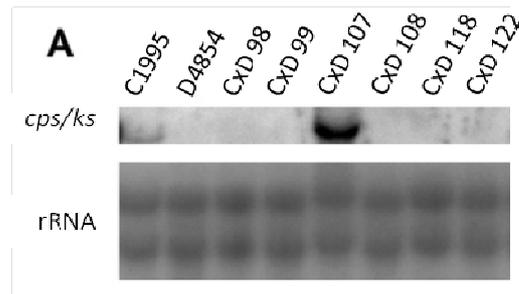


Fig. 16. Análisis de Northern blot de las cepas parentales e híbridas. Expresión del gen *cps/ks* que codifica a la enzima clave de la vía de biosíntesis de GAs. Las cepas crecieron por 3 días en condiciones limitantes en nitrógeno.

CAPÍTULO IV.
DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

La caracterización de la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios por sistemas fúngicos es de gran interés puesto que los hongos son eficientes productores de estos compuestos, que son secretados al medio de cultivo desde donde pueden aislarse fácilmente. Particularmente el ácido giberélico (GA₃), fitohormona utilizada ampliamente para el mejoramiento de cultivos agrícolas y hortícolas, se produce en gran escala por fermentación del hongo *F. fujikuroi* (Tudzynski, 2005) patógeno del arroz que en cultivos líquidos puede llegar a producir cantidades del orden de g/L de GA₃. *F. fujikuroi* forma parte del clado Asiático del complejo *G. fujikuroi*, complejo taxonómico de especies filogenéticamente relacionadas del género *Fusarium*. Hasta la fecha este es el sistema fúngico descrito con mayor capacidad de sintetizar GAs y en él se han descrito y caracterizado en detalle los genes, enzimas y reacciones químicas de la biosíntesis de estas fitohormonas (Hedden et al., 2002; Bömke y Tudzynski 2009). En este trabajo de Tesis se caracterizaron otras dos especies del complejo *G. fujikuroi* que presentan cepas productoras de GAs: *F. sacchari* aislada de la caña de azúcar o de los campos de sorgo en Asia (Leslie, 1995) y *F. konzum* aislada de pastos de praderas en Norte América (USA) (Zeller et al., 2003). Además de las especies productoras, ambas especies presentan cepas que no producen GAs evidenciando variabilidad genética para esta capacidad biosintética, a diferencia de lo descrito para *F. fujikuroi*, especie en la que todas las cepas descritas hasta la fecha, producen GAs. Previamente se habían descrito algunas cepas inactivas de *F. sacchari* (Malonek et al., 2005 a) y en esta Tesis se amplió la lista de cepas estudiadas y se encontró que algunas son activas en la biosíntesis de

GAs mientras que otras sintetizan sólo trazas de estas fitohormonas y no metabolizan los sustratos de las oxidasas de GAs agregados externamente al medio de cultivo. Las cepas productoras de *F. sacchari* acumularon cantidades significativas de GA₃ en el medio de cultivo aunque más bajas a las que se encuentran en los cultivos de la cepa silvestre de *F. fujikuroi* IMI 58289. Complementando la cepa B-12756 de *F. sacchari* con genes de la biosíntesis de GAs de *F. fujikuroi* se demostró que las etapas catalizadas por la geranylgeranyl difosfato sintasa (GGS2) y/o la *ent*-kaureno sintasa (CPS/KS) son limitantes en *F. sacchari* lo que explicaría la menor eficiencia en la producción de GAs. De hecho, los niveles de GA₃ en los cultivos de B-12756 aumentaron 2,9 veces por complementación con los genes *ggs2* y *cps/ks* de *F. fujikuroi*.

F. sacchari pertenece al clado Asiático del complejo *G. fujikuroi* al igual que *F. fujikuroi* lo que sugiere que la capacidad de sintetizar GAs estaría principalmente asociada a miembros de este grupo en el complejo. De hecho para otra especie del clado Asiático, *F. proliferatum*, se han descrito dos cepas que sintetizan GAs (Rim et al., 2005; Tsavkelova et al., 2008) a diferencia de otras cepas que no producen estas fitohormonas (Malonek et al., 2005 a). El aislado ET1 de *F. proliferatum* obtenido de las raíz de una orquídea produce niveles bajos de GA₃ y niveles más altos de los precursores GA₄ y GA₇ (Tsavkelova et al., 2008) mientras que *F. proliferatum* KGL 0401 produce altas cantidades de GA₃ y de otras GAs (Rim et al., 2005). Resulta interesante que las cepas productoras son endófitos aislados de raíces mientras que las cepas no-productoras son patógenos del maíz. Además de las especies anteriores, se ha sugerido que *F. mangiferae*, una especie de *Fusarium* que genera una enfermedad de malformación en el mango que disminuye el rendimiento de las cosechas, produciría GAs (Leslie y

Summerell, 2006; Marasas et al., 2006). *F. mangiferae* está cercanamente relacionado a *F. fujikuroi* y a *F. sacchari* y pertenece al clado Asiático. Su patogenicidad se ha atribuido a la biosíntesis de GAs y/o citokininas, aunque esto no se ha demostrado directamente (Leslie y Summerell, 2006).

Además de *F. sacchari*, se encontró en este trabajo que algunas cepas de *F. konzum*, una especie lejanamente relacionada a *F. fujikuroi* y perteneciente al clado Americano, sintetizan GAs. Tres de las cepas ensayadas I-10653, I-11616, I-11893 producen principalmente GA₁ a diferencia de los aislados de *F. sacchari* que sintetizan principalmente el producto final GA₃. Otra diferencia entre ambas especies es la baja cantidad de GAs que se encontró en los cultivos de las 3 cepas activas de *F. konzum* (menos que 0,1 µg/mL). En concordancia con esto, se demostró que las oxidasas de GAs de la cepa I-10653 presentan una actividad reducida con respecto a la cepa IMI 58289 de *F. fujikuroi* lo que podría deberse a una baja expresión de los genes o bien a la presencia de mutaciones como en las cepas no productoras de *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005 b,c). Se había descrito anteriormente que los genes *cps/ks* y *des* de *F. konzum* I-10653 se expresan aunque en un nivel más bajo que en *F. fujikuroi* a diferencia de la cepa no productora I-10595 en la que los genes no se expresan en absoluto (Malonek et al., 2005 a). De hecho no se encontró actividad de oxidasas de GAs en cultivos de la cepa I-10595. Por último, para *F. subglutinans*, otro miembro del clado Americano estudiado en esta Tesis se encontró que las dos cepas ensayadas no sintetizan GAs ni *ent*-kaurenoides y no presentan actividad de ninguna de las oxidasas de GAs lo que

coincide con la ausencia de expresión de los genes que había sido descrita para estas cepas (Malonek et al., 2005 a).

El hecho de que *F. sacchari*, *F. konzum* y *F. proliferatum* presenten cepas productoras y no-productoras de GAs sugiere que estas especies se encuentran en el proceso evolutivo de perder sus capacidad de sintetizar estas fitohormonas diterpénicas. Para *F. proliferatum* y *F. konzum* la biosíntesis de otros metabolitos secundarios como las micotoxinas también presenta variabilidad genética (Leslie et al., 2004). Varios aislados de *F. konzum* caracterizados se agruparon en productores y no-productores de fumonisinas y fusaproliferina mientras que se encontró que algunas cepas de *F. proliferatum* sintetizaban fumonisinas, fusaproliferina y beauvericina mientras que otras no sintetizan estas micotoxinas (Leslie et al., 2004). Se demostró que las cepas no-productoras de *F. konzum* no transformaron a ninguno de los precursores de GAs marcados con ^{14}C lo que indica ausencia de actividad de las oxidasas al igual que para las cepas no productoras de *F. sacchari*. En conclusión, la capacidad de biosintetizar GAs dentro del complejo *G. fujikuroi* estaría principalmente presente en los miembros del clado Asiático: *F. fujikuroi*, *F. sacchari*, y *F. proliferatum*, todas especies cercanamente relacionadas desde el punto de vista filogenético, a pesar que los genes de la biosíntesis de GAs están presentes prácticamente en todas las especies del complejo.

Para *F. sacchari* y *F. konzum* la capacidad de sintetizar GAs podría también estar relacionada con el tipo de interacción que mantienen con sus plantas hospederas como en *F. proliferatum*. Aunque todas las cepas de *F. proliferatum* contienen los genes de la biosíntesis de GAs sólo los endófitos aislados de raíces de una orquídea o de raíces de *Physalis alkekengi* producen GAs mientras que las cepas patogénicas aisladas de

maíz no presentan esta capacidad biosintética (Malonek et al., 2005 a; Rim et al., 2005; Tsavkelova et al., 2008). Además de GAs, el aislado ET1 de *F. proliferatum* produce cantidades significativas de auxinas a diferencia de otras cepas no endofíticas de esta especie, lo que sugiere que la biosíntesis de fitohormonas sería importante para este tipo de interacción con las plantas hospederas (Tsavkelova et al., 2008). Es interesante que para *F. fujikuroi* recientemente se ha propuesto que las GAs sintetizadas podrían ser un factor de virulencia hacia la planta puesto que se ha demostrado que interfieren con la vía del ácido jasmónico que forma parte de los mecanismos de defensa frente a hongos necrotróficos como *F. fujikuroi* (Navarro et al., 2008).

Dentro del clado Asiático, *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* son las dos especies más cercanamente relacionadas que son casi imposibles de diferenciar a través de características morfológicas y sólo se pueden distinguir mediante marcadores moleculares (Geiser et al., 2005; Tsavkelova et al., 2008). A pesar de esto, ambas especies se encuentran asociadas a huéspedes diferentes, *F. fujikuroi* se asocia principalmente a las plantas de arroz en las que produce la enfermedad de superelongación en tanto que *F. proliferatum* se asocia con una diversidad de plantas como maíz, mango, espárrago, trigo o pino provocando distintas enfermedades. El espectro de metabolitos secundarios sintetizado por los hongos, incluyendo las GAs, podría determinar la especificidad de su interacción por un determinado hospedero puesto que pueden actuar como factores de virulencia tóxicos de acuerdo a la sensibilidad de la planta. Como *F. proliferatum* se puede aislar desde plántulas de arroz infectadas junto con *F. fujikuroi* y *F. verticillioides* cabe preguntarse si las 3 especies son responsables de la enfermedad de superelongación o bien *F. proliferatum* y *F.*

verticillioides son endófitos o patógenos que causan otros síntomas diferentes a los de esta enfermedad. *F. verticillioides* no produce GAs ya que contiene sólo dos genes de los 7 que participan en su biosíntesis por lo que esta especie no estaría involucrada en la enfermedad de superelongación. Para *F. proliferatum* la situación no es tan clara sin embargo ya que aunque todos los aislados descritos contienen el cluster de genes de GAs existen cepas productoras de GAs y otras no-productoras de estas fitohormonas lo que evidencia que la presencia del cluster no asegura su funcionalidad. *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* son especies diferentes desde el punto de vista biológico y genético pero se asemejan mucho y pueden distinguirse sólo mediante marcadores moleculares (Geiser et al., 2005; Tsavkelova et al., 2008). La separación entre estas dos especie parece ser incompleta puesto que se ha reportado que algunos aislados son fértiles entre sí y producen una progenie híbrida (Desjardins et al., 1997; Leslie et al., 2004 b). Este no es el único caso dentro del complejo *G. fujikuroi* puesto que se ha encontrado fertilidad cruzada también entre ciertos aislados de *F. circinatum* y *F. subglutinans* lo que indica que representan intermediarios entre-especies generados durante la evolución (Steenkamp et al., 2001). La progenie del cruce entre *F. fujikuroi* C1995 y *F. proliferatum* D4854 que se analizó en esta Tesis proviene de un experimento en condiciones de laboratorio. Todas las cepas híbridas CxD contienen los marcadores de las dos cepas parentales y se analizó en ellas la capacidad de biosintetizar GAs. Tanto la cepas C1995 como la cepa D4854 contienen el cluster completo de genes de la biosíntesis de GAs, sin embargo, C1995 produce GAs en tanto que D4854 no sintetiza GAs ni *ent*-kaurenoides. Esto sugiere que en algún punto de la evolución ambas especies producían GAs, sin embargo, como los hongos tienen que adaptarse a distintas

condiciones ambientales y a diferentes plantas hospederas, ciertas condiciones específicas gatillarían la producción de GAs y otras no.

En nuestros experimentos se encontró para las cepas CxD un patrón de segregación inesperado, de 3 fenotipos: 8 cepas CxD producían principalmente GA₃ como producto final a un nivel similar a C1995 y 11 aislados CxD no producían GAs o bien las producían en cantidades traza. A primera vista esto podría parecer un patrón de segregación Mendeliana 1:1, sin embargo el segundo grupo de 11 aislados CxD se pudo dividir en dos subgrupos. Un subgrupo de 6 cepas que no producía GAs al igual que la cepa parental D4854 mientras que el segundo subgrupo de 5 cepas CxD mostraba un nuevo patrón de GAs sintetizadas. Estas últimas cepas híbridas producían una muy pequeña cantidad de GAs con GA₁ como producto final en vez de GA₃ y presentaban un nivel de expresión muy bajo para los genes biosintéticos, en el límite de detección por análisis de Northern blot. La organización de los genes de GAs en las cepas CxD no productoras y productoras de cantidades traza es la misma pero la actividad de oxidasas de GAs, ensayada con los respectivos sustratos marcados con ¹⁴C, pudo demostrarse sólo en el último subgrupo. De manera que la progenie CxD se puede dividir en tres grupos: dos grupos con el fenotipo parental y un grupo con un fenotipo no-parental. La actividad reducida de las enzimas de la biosíntesis de GAs en el último grupo de híbridos podría atribuirse a algún regulador positivo localizado fuera del cluster y heredado de *F. fujikuroi* que permitiría una leve activación de los genes de GAs. Además, el hecho de que estas cepas produzcan GA₁ en vez de GA₃ sugiere una mutación en el gen de la desaturasa, como se ha descrito para otras cepas de *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005c).

En conclusión, D4854 y algunas cepas CxD no producen GAs o sus precursores, mientras que un grupo de cepas CxD que heredó el cluster de la cepa parental que no produce GAs produce bajas cantidades de GA₁. Esto indica que el cluster de genes de GAs de D4854 no está totalmente silente sino que puede ser activado aunque en forma ineficiente por un regulador presente en *F. fujikuroi* C1995. Éste podría ser un regulador global como Velvet que se demostró que regula positivamente la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi* (Wiemann et al., 2010). La capacidad de sintetizar GAs no segrega con un patrón Mendeliano en los aislados provenientes de ascosporas individuales de un cruce interespecífico entre *F. fujikuroi* y *F. proliferatum* sino que entre la progenie hay cepas que producen un nuevo perfil de GAs que no corresponde ni a *F. fujikuroi* ni a *F. proliferatum*.

A pesar que todas las especies del complejo *G. fujikuroi* contienen el cluster completo de genes de la biosíntesis de GAs excepto *F. verticillioides* y *F. circinatum* que contienen dos y un gen respectivamente, la biosíntesis de estas fitohormonas diterpénicas se ha demostrado en niveles significativos sólo para *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* (algunas cepas) y *F. sacchari* (algunas cepas), todas especies cercanamente relacionadas desde el punto de vista filogenético. De hecho las pocas cepas de *F. konzum* que sintetizan GAs, lo hacen de forma muy ineficiente. Esto sugiere que la capacidad de sintetizar GAs estaría restringiría a las especies del clado Asiático del complejo *G. fujikuroi* las que utilizarían estas fitohormonas como parte de su interacción con la planta hospedera.

La futura caracterización de otras especies del complejo *G. fujikuroi* que contengan los genes de la biosíntesis de GAs, tanto a nivel de la expresión de los genes

como de las actividades enzimáticas y los productos de la secuencia metabólica, permitirá completar la información disponible actualmente acerca de la distribución de esta capacidad biosintética en hongos del género *Fusarium*.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- La capacidad de biosintetizar GAs se encuentra en dos especies del complejo taxonómico *G. fujikuroi* además de la especie previamente descrita *F. fujikuroi*: *F. sacchari* (especie aislada de la caña de azúcar) y *F. konzum* (especie aislada de pastos de pradera). Ambas especies presentan cepas que sintetizan GAs 3 β -hidroxiladas, aunque el producto final es diferente (GA₃ o GA₁ respectivamente) así como la cantidad de GAs producida, la que es significativa sólo en las cepas de *F. sacchari*. La actividad de las oxidasas de GAs están muy reducidas en las cepas activas de *F. konzum*.
- La capacidad de biosintetizar GAs no está presente en *F. subglutinans* (especie aislada del maíz). Las cepas de esta especie, así como las cepas inactivas de *F. sacchari* y *F. konzum* no presentan actividad de oxidasas de GAs, lo que sugiere que los genes no se expresarían.
- Las cepas híbridas (CxD) provenientes de un cruce entre la cepa C-1995 de *F. fujikuroi* (que sintetiza GA₃) y la cepa D-4854 de *F. proliferatum* (que no sintetiza GAs pero que contiene los genes para su biosíntesis) presentan tres fenotipos: dos fenotipos parentales (8 híbridos sintetizan GA₃ y 6 híbridos no sintetizan GAs) y un nuevo fenotipo (5 cepas CxD sintetizan muy bajas cantidades de GA₁ y contienen los genes de la cepa D-4854). En este último caso el cluster de genes de D4854 estaría levemente activado por un regulador proveniente de C-1995.
- El cruce interespecies puede generar un perfil de GAs diferente al de *F. fujikuroi* y *F. proliferatum*.

CAPÍTULO VI
REFERENCIAS

VI. REFERENCIAS

- Battacharya, A.**, Kourmpetli, S., Ward, D.A., Thomas, S.G., Gong, F., Powers, S.J., Carrera, E., Taylor, B., de Cáceres González, F.N., Tudzynski, B., Phillips, A.L., Davey, M.R., Hedden, P., **2012**. Characterization of the fungal gibberellin desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. *Plant Physiol* 160(2), 837-45.
- Bömke, C.**, Rojas, M.C., Gong, F., Hedden, P., Tudzynski, B., **2008**. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola* Appl. Env. Microbiol. 74 (17), 5325-5339.
- Bömke, C.**, Tudzynski, B., **2009**. Diversity, regulation and evolution of the gibberellins biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry* 70, 1876-1983.
- Brückner, B.** and Blechshmidt, D. (1991) The gibberellin fermentation. *Crit. Rev. Biotech.* 11, 163-192
- Candau R.**, Avalos J, Cerdá-Olmedo E. (1992) Regulation of Gibberellin Biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.*: 100 (3), 1184-1188
- Cenis, J.L.**, **1992**. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* 20(9), 2380.
- Cerdá-Olmedo, E.**, Fernández-Martin, R., Avalos, J., **1994**. Genetics and gibberellin production in *Gibberella fujikuroi*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65, 217-225.
- Church, G.M.**, Gilbert, W., **1984**. Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81, 1991-1995.
- Curtis, P.J.** y Cross, B.E., **1954**. Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.*, 1066.
- Desjardins, A.E.**, Plattner, R.D., Nelson, P.E., **1997**. Production of fumonisin B₁ and moniliformin by *Gibberella fujikuroi* from rice from various geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1838-1842.
- Desjardins, A.E.**, **2003**. *Gibberella* from a (*venaceae*) to x (*eae*). *Annu. Rev. Phytopathol.* 41, 177-198.
- Domenech, C.E.**, Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo E., **1996**. Separate compartments for the production of sterols, carotenoids and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Eur. J. Biochem.* 239, 720-725.

- Duncan, J.D.** y West, C.A., **1981**. Properties of kaurene synthetase from *Marah macrocarpus* endosperm. Evidence for the participation of separate but interacting enzymes. *Plant Physiol* 68, 1128-1134.
- Eisenreich, W.**, Rohdich, F., Bacher, A., **2001**. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Sci* 6, 78-84.
- Gaskin, P.**, MacMillan, J. (1991) GC/MS of gibberellins and related compounds: methodology and a library of reference spectra. Cantocks Enterprises, Ltd. University of Bristol, U.K..
- Geiser, D.M.**, Ivey, M.L., Hakiza, G., Juba, J.H., Miller, S.A., **2005**. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 97, 191-201.
- Geissman, T.A.**, Verbiscar, A.J., Phinney, B.O., Cragg, G. (1966) Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochemistry* 5, 933-47.
- Gilmour, S.J.**, Zeevart, J.A.D., Schwenen, L., Graebe, J., **1986**. Gibberellin Metabolism in Cell-Free Extracts from Spinach Leaves in Relation to Photoperiod. *Plant Physiol*. 82, 190-195.
- Giordano, W.**, Avalos, J., Fernández-Martin, R., Cerdá-Olmedo, E., Domenech, C.E. **1999**. Lovastatin inhibits the production of gibberellins but not sterol or carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Microbiol* 145, 2997-3002.
- Hedden, P.**, **1999**. Recent advances in gibberellin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50, 553-563.
- Hedden, P.**, Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., Tudzynski, B., **2002**. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *J. Plant Growth Reg.* 20, 317-331.
- Helliwell, C.A.**, Sheldon, C.C., Olive, M.R., Walker, A.R., Zeevaart, J.A., Peacock, W.J., Dennis, E.S., **1998**. Cloning of the Arabidopsis ent-kaurene oxidase gene GA3. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9019-9024.
- Helliwell, C.A.**, Chandler, P.M., Poole, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., **2001**. The CYP88A cytochrome P450, ent-kaurenoc acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellins biosynthesis pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2065-2070.
- Hori, S.**, **1898**. Some observations on "Bakanae" disease of the rice plant. *Mem. Agric.Res. Sta. (Tokyo)* 12, 110-119.

-
- Kawaide, H.**, Imai, R.T., Sassa, R., Kamiya, Y., **1997**. *ent*-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria sp.*L487. J. Biol. Chem. 272, 21706-21712
- Kurosawa, E.**, **1926**. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the bakanae fungus. Nat Hist Soc Formosa 16, 213-227.
- Leslie, J.F.**, **1995**. *Gibberella fujikuroi*: Available populations and variable traits. Can. J. Bot. 73, S282-S291
- Leslie, J.F.**, **1999**. Genetic status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Plant Pathol. J. 15, 259-269.
- Leslie, J. F.**, Zeller, K., Wohler, M., Summerell, B.A., **2004a**. Interfertility of two mating populations in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Europ. J. Plant Pathol. 110 (5-6), 611-618
- Leslie, J.F.**, Zeller, K.A., Logrieco, A., Mulè, G., Moretti, A., Ritieni, A., **2004b**. Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas. Appl. Environ. Microbiol. 70, 2254-2262.
- Leslie, J.F.**, Anderson, L.L., Bowden, R.L., Lee, Y.W., **2007**. Inter- and intra-specific genetic variation in *Fusarium*, Int J Food Microbiol 119, 25-32.
- Leslie, J.F.** y Summerell, B.A., **2006**. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Oxford.
- Linnemanstöns, P.**, Voss, T., Hedden, P., Gaskin, P., Tudzynski, B., **1999**. Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol. 65(6), 2558-2564
- MacMillan, J.**, **1997**. Biosynthesis of the gibberellin plant hormones. Nat. Prod. Res. 14, 221-243
- MacMillan, J.**, **2002**. Occurrence of gibberellins in vascular plants, fungi and bacteria. J. Plant Growth Regul 20, 387-442.
- Malonek, S.**, Bömke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M. C., Hedden, P., Tudzynski, B., **2005a**. Distribution of gibberellin biosynthetic genes and gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex. Phytochemistry, 66, 1296-1311.
- Malonek, S.**, Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B., **2005b**. Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, *P450-1* and *P450-4* of

- the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D). *Appl. Env. Microbiol.*, 71(3), 1462-1472
- Malonek, S.,** Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B., **2005c.** Restoration of gibberellin production in *Fusarium proliferatum* by functional complementation of enzymatic blocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6014-6025.
- Marasas, W.F.O.,** Nelson, P.E., Toussoun, T.A., **1984.** Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press: University Park, Pennsylvania.
- Mende, K.;** Homann, V. and Tudzynski, B., **1997.** The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi*: isolation and expression. *Mol. Gen. Genet.* 255, 96-105
- Mihlan, M.,** Homann, V., Liu, T.-W.D., Tudzynski, B., **2003.** AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol. Microbiol.* 47, 975-991
- Moretti, A.,** Logrieco, A., Bottalico, A., Ritieni, A., Fogliano, V., Randazzo, G., **1996.** Diversity in beauvericin and fusaproliferin production by different populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Sydowia* 48, 44-56
- Muñoz, G.A. y** Agosin, E., **1993.** Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol* 59, 4317-4322
- Navarro, L.,** Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harbend, N.P., Jones, J.D.G., **2008.** DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology* 18, 650-655.
- Nelson, P.E.,** Plattner, R.D., Shackelford, D.D., Desjardins, A.E., **1992.** Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section *Liseola*, and by some related species. *Appl Environ Microbiol* 58, 984-989.
- O'Donnell, K.,** **1996.** Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *Sydowia* 48, 57-70.
- O'Donnell, K.,** Cigelnik, E., **1997.** Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 7, 103-116.
- O'Donnell, K.,** Cigelnik, E., Nirenberg, H.I., **1998.** Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90, 465-493

-
- O'Donnell, K.**, Nirenberg, H.I., Aoki, T., Cigelnik, E., **2000**. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41, 61-78
- Oh, E.**, Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Bae, G., Chung, W.L., Choi, G., **2006**. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47, 124-139.
- Penfield, S.**, Josse, E.M., Kannangara, R., Gilday, A.D., Halliday, K.J., Graham, I.A., **2005**. Cold and light control seed germination through the bHLH transcription factor SPATULA. *Curr. Biol.* 15, 1998-2006.
- Phillips, A.L.**, Ward, D.A., Uknes, S., Appleford, N.E.J., Lange, T., Huttly, A.K., Gaskin, P., Graebe, J.E., Hedden, P., **1995**. Isolation and expression of three gibberellins 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108, 1049-1057.
- Proctor, R. H.**, Plattner, R.D., Brown, D.W., Seo, J.A., Lee, Y.W., **2004**. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthesis genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycol. Res.* 7, 815-822
- Rademacher, W.** (1992) Inhibition of Gibberellin Production in the Fungi *Gibberella fujikuroi* and *Sphaceloma manihoticola* by Plant Growth Retardants. *Plant Physiol.* 100(2), 625-629.
- Radley, M.**, **1956**. Occurrence of substances similar to gibberellic acid in higher plants. *Nature* 178: 1070-1071
- Rim, S.O.**, Lee, J.H., Choi, W.-., Hwang, S.K, Suh, S.J., Lee, I.J., Rhee, I.K., Kim, J.G., **2005**. *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellin-producing fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15, 809-814.
- Rojas, M.C.**, Hedden, P., Gaskin, P., Tudzynski, B., **2001**. *P450-1* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5838-5843.
- Rojas, M.C.**, Urrutia, O., Cruz, C., Gaskin, P., Tudzynski, B., Hedden, P., **2004**. Kaurenolides and fujenoic acids are side products of the P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 65, 821-830.
- Schneider, G.**, Jensen, E., Spray, C.R., Phinney, B.O., **1992**. Hydrolysis and reconjugation of gibberellins A20 glucosyl ester by seedlings of *Zea mays* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 8045-8048.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sponsel, V.M., 2003. Gibberellins. In: Norman A.W. (eds) Encyclopedia of hormones, vol 2. Academic, pp 29-40.

Sponsel, V.M., 2002. The deoxyxylulose phosphate pathway for the biosynthesis of plastidic isoprenoids: early days in our understanding of the early stages of gibberellin biosynthesis. *J. Plant Growth Regul.* 20, 332-345.

Sponsel, V.M., Hedden, P., 2004. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: Davies, P.J. (Ed.), Plant Hormones. Biosynthesis, Signal transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 63-94.

Steenkamp, E.T., Coutinho, T.A., Desjardins, A.E., Wingfield, B.D., Marasas, W.F., Wingfield, M.J., 2001. *Gibberella fujikuroi* mating population E is associated with maize and teosinte. *Mol. Plant Pathol.* 2, 215-221.

Tsavkelova, E.A., Bömke, C., Netrusov, A.I., Weiner, J., Tudzynski, B., 2008. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. *Fungal Genetics and Biology* 45, 1393-1403.

Tudzynski, B., 2005. Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes and impact on biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 597-611.

Tudzynski, B., Hölter, K., 1998. Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster. *Fungal Genet. Biol.* 25, 157-170.

Tudzynski, B., 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbiol Biotechnol* 52, 298-310

Tudzynski, B., Kawaide, H., Kamiya, Y., 1998. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Curr. Genet.* 34, 234-240.

Tudzynski, B., Hedden, P., Carrera, E., Gaskin, P., 2001. The *P450-4* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3514-3522.

Tudzynski, B., Rojas, M.C., Gaskin, P., Hedden, P., 2002. The *Gibberella fujikuroi* gibberellin 20-oxidase is a multifunctional monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 277, 21246-21253.

Tudzynski, B., Mihlan, M., Rojas, M.C., Linnemannstöns, P., Gaskin, P., Hedden, P., 2003. Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster

of *Gibberella fujikuroi*. *des* and *P450-3* encode GA₄ desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J. Biol. Chem.* 278, 28635-28643.

Urrutia, O., Hedden, P., Rojas M.C. (2001) Monooxygenases involved in GA₁₂ and GA₁₄ synthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 56, 5005-5011

Varbanova, M., Yamaguchi, S., Yang, Y., McKelvey, K., Hanada, A., Borochoy, R., Yu, F., Jikumaru, Y., Ross, J., Cortes, D., Ma, C.J., Noel, J.P., Mander, L., Shulaev, V., Kamiya, Y., Rodermeier, S., Weis, D., Pichersky, E., **2007**. Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* 19, 32-45.

Wiemann P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H.-U., Tudzynski, B., **2010** Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Molecular Microbiology* 72, 931-946.

Yamaguchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., **2004**. Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during inhibition of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell* 16, 367-378.

Yamaguchi, S., **2008**. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 225-251.

Zeller, K.A., Summerell, B.A., Leslie, J.F., **2003**. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 95, 943-945.

Zhu, Y., Nomura, T., Xu, Y., Zhang, Y., Peng, Y., Mao, B., Hanada, A., Zhou, H., Wang, R., Li, P., Zhu, X., Mander, L.N., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Hea, Z., **2006**. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidases gibberellins in a novel deactivation reaction in rice. *Plant Cell* 18, 442-456.

CAPÍTULO VII
PUBLICACIONES Y CONGRESOS

VII. PUBLICACIONES Y CONGRESOS

VII.1. PUBLICACIONES

” **Gibberellin biosynthesis and gibberellin oxidase activities in *Fusarium sacchari*, *Fusarium konzum* and *Fusarium subglutinans* strains**” Claudia Troncoso, Ximena González, Christiane Bömke, Bettina Tudzynski, Peter Hedden , Fan Gong and M. Cecilia Rojas. 2010. *Phytochemistry* 71, 1322-1331

“**Segregation of secondary metabolite biosynthesis in hybrids of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum***” Studt, L., Troncoso, C., Gong, F., Hedden, P., Toomajian, C., Leslie, J.F., Humpf, H-U., Rojas, M.C. and Tudzynski, B. 2012. *Fungal Genetics and Biology* 49, 567-577

VII.2. CONGRESOS

“Oxidación de giberelinas en hongos del complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi*. “ X. Gonzalez, C. Troncoso, P. Hedden, B. Tudzynski y M. C. Rojas Congreso Iberoamericano de Química. XXIV Congreso Peruano de Química. El Cusco Perú, Octubre 13-17 de 2008.

“Biosíntesis de fitohormonas diterpénicas en híbridos de *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium proliferatum* “. Y. Corrotea, V. Acuña, C. Troncoso, M.C. Rojas XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Las Termas de Chillán, 22-25 de Septiembre de 2009.

“Distribución de la capacidad de biosintetizar giberelinas en hongos del complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi* “ C. Troncoso, X. González, Y. Corrotea, M.C. Rojas XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Las Termas de Chillán, 22-25 de Septiembre de 2009.

“Distribución de la capacidad de biosintetizar giberelinas en el complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi*”. C. Troncoso, X. Gonzalez, Y. Corrotea, P. Hedden, B. Tudzynski y M.C. Rojas XXIX Congreso latinoamericano de Química. Cartagena de Indias, Colombia. 27 de Septiembre al 1 de Octubre de 2010.