

BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS, BIKAVERINA Y CAROTENOIDES EN *Gibberella Fujikuroi*

*Javier Avalos, Rafael Fernández-Martín, M. Mar Prado, Walter
Giordano* Carlos E. Domenech* y Enrique Cerdá-Olmedo*

Departamento de Genética, Universidad de Sevilla.

*Departamento de Biología Molecular, Universidad Nacional de Río
Cuarto, Argentina.

EL HONGO *Gibberella fujikuroi*

Gibberella fujikuroi es el nombre asignado a las estirpes de *Fusarium* moniliforme capaces de llevar a cabo el ciclo sexual. El género *Fusarium* acoge numerosas especies de hongos imperfectos (incapaces de cruzar) que se caracterizan por poseer esporas fusiformes. La ambigüedad de la definición explica la complejidad taxonómica del género, del que se han descrito más de mil especies, en su mayoría patógenas de plantas (Booth, 1971).

El ascomiceto *Gibberella fujikuroi* (abreviado como *Gibberella* de aquí en adelante) incluye estirpes pertenecientes a varios grupos de cruzamiento (Kuhlman, 1983; Leslie, 1991; Klittich and Leslie, 1992). La comparación de cariotipos electroforéticos (Xu *et al.*, 1995a) y otros marcadores moleculares (Voigt *et al.*, 1995; Amoah *et al.*, 1996) demuestran que cada grupo de cruzamiento es realmente una especie independiente que deberá recibir un nombre específico en el futuro. Las estirpes de los distintos grupos de cruzamiento se diferencian también en otros aspectos, como la cantidad y tipos de esporas asexuales que producen (macroconidios y microconidios) o las plantas que parasitan.

Ciertas estirpes de *Gibberella* producen giberelinas, hormonas vegetales inductoras del crecimiento. Las propiedades de las giberelinas explican su interés aplicado en la agricultura e industria cervecera (Crozier 1983; Hedden 1987; Brückner *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1991). Las elevadas concentraciones de giberelinas producidas por *Gibberella* y su fácil cultivo le han convertido en la fuente para la obtención de estas hormonas a escala industrial.

Las estirpes productoras de giberelinas pertenecen al grupo de cruzamiento C y son patógenas del arroz. Estas estirpes tienen otros rasgos en común: poseen un ciclo sexual de difícil reproducción en el laboratorio, no esporulan en cultivo sumergido y sus micelios aéreos producen cantidades moderadas de microconidios en respuesta a la luz y la escasez de nutrientes. Por el contrario, las estirpes de *Gibberella* pertenecientes a otros grupos de cruzamiento suelen ser más fértiles y producen abundantes cantidades de macroconidios y microconidios en cualquier condición de cultivo. La ausencia de macroconidios en las estirpes productoras de giberelinas representan una ventaja, ya que los microconidios son uninucleados y, por tanto, más útiles como herramienta de clonación y mutagénesis.

BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS

Las giberelinas son terpenoides, compuestos que derivan del difosfato de isopentenilo. Esta molécula se puede sintetizar por dos rutas biosintéticas diferentes. La primera usa como intermediarios el hidroximetilglutaril-CoA y el mevalonato (Fig. 1); la segunda, descubierta más recientemente, usa como intermediario el fosfato de gliceraldehído y el piruvato (Rohmer *et al.*, 1993). Los experimentos de alimentación con mevalonato radioactivo indican que las giberelinas se sintetizan en *Gibberella* y en las plantas por la vía del mevalonato (Birch *et al.*, 1958; Coolbaugh, 1983; Domenech *et al.*, 1996).

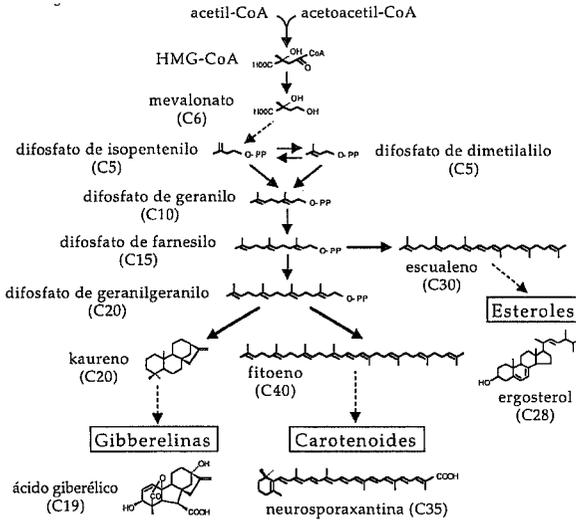


Fig. 1. Biosíntesis de terpenoides en *Gibberella*. Las flechas discontinuas representan más de una reacción.

Un paso crítico en la síntesis de giberelinas es la ciclación del difosfato de geranylgeranilo para dar kaureno, el primer diterpeno tetracíclico en la ruta (Fig. 1); el resto de la ruta se detalla en la Fig. 2. El kaureno se oxida sucesivamente a kaurenol, kaurenal, ácido kaurenoico y ácido 7 α -hidroxikaurenoico. De esta parte de la ruta derivan otros metabolitos secundarios de *Gibberella*, como son el fujenal (Cross *et al.*, 1963), el gibelactol (Barrero *et al.*, 1992) o las kaurenolidas (Beale *et al.*, 1982). La contracción del anillo del ácido 7 α -hidroxikaurenoico da lugar al aldehído de GA₁₂, primer compuesto con la estructura típica de las giberelinas, con dos anillos pentagonales y dos hexagonales (esqueleto ent-giberelano). A partir de ahí, la ruta en *Gibberella* se escinde en dos vías paralelas que se diferencian en la presencia o ausencia de una hidroxilación en el carbono 3 del aldehído de GA₁₂. La ruta hidroxilada es predominante en la estirpe silvestre de *Gibberella* (Fig. 3).

Durante muchos años, *Gibberella* fue el único organismo conocido productor de giberelinas. Este hecho, unido a su simplicidad de

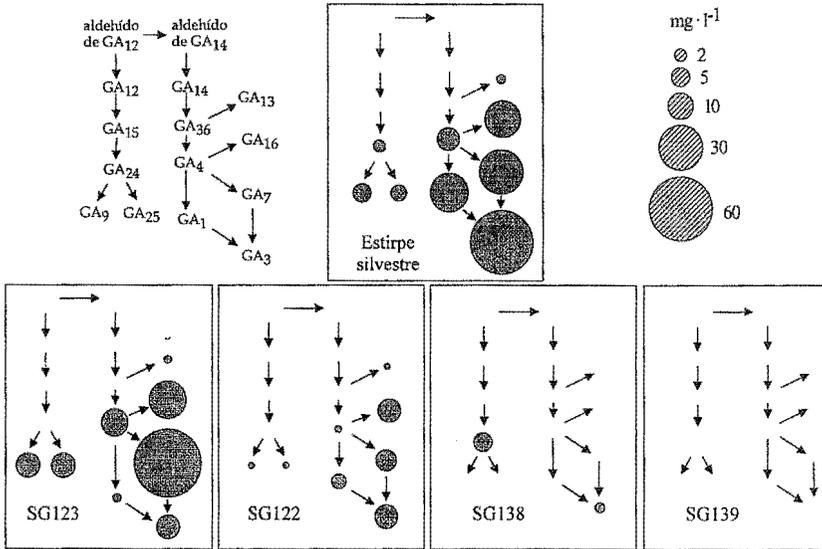


Fig. 3. Giberelinas acumuladas por la estirpe silvestre IMI58289 de *Gibberella* y cuatro mutantes SG derivados de ella. Los círculos representan la giberelina situada en la misma posición en la ruta mostrada en la parte superior izquierda. La superficie de los círculos representan la concentración de cada giberelina de acuerdo con la escala mostrada en la parte superior derecha. (Datos de Fernández-Martín *et al.*, 1995)

El aislamiento de mutantes de la síntesis de giberelinas es difícil en *Gibberella*, donde las alteraciones en la producción no dan lugar a cambios visibles en su fenotipo. El aislamiento de estos mutantes requiere el escrutinio individual de miles de supervivientes a tratamientos mutagénicos. El mutante B1-41A fue aislado tras caracterizar por bioensayo 50.000 supervivientes a radiación ultravioleta. La simplificación de los métodos de escrutinio y el empleo de agentes mutagénicos más potentes ha permitido ampliar considerablemente el número de mutantes disponibles (Candau *et al.*, 1991; Fernández-Martín *et al.*, 1995). El fenotipo de algunos de estos mutantes se describe en la Fig. 3. Algunos mutantes no producen giberelinas (SG139) o producen muchas menos que el silvestre (SG122 y SG138). Otros mutantes, como

SG123, están afectados en la reacción final de hidroxilación, y acumulan mayor cantidad de los precursores GA₄ y GA₇ en detrimento de sus productos, GA₁ y GA₃.

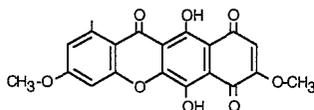


Fig. 4. Bikaverina.

BIOSÍNTESIS DE BIKAVERINA

La bikaverina (Fig. 4) es un pigmento de *Gibberella rojizo* a pH ácido, que se identificó originalmente por su actividad antibiótica frente a ciertos protozoos (Balan *et al.*, 1970). Al igual que las giberelinas, la bikaverina se sintetiza a partir de acetyl-CoA, pero en este caso a través de la ruta de los poliquétidos. Este término agrupa a una compleja familia de compuestos químicos que, como los terpenoides, tienen en común los primeros pasos de la ruta biosintética. Los poliquétidos tienen enorme importancia aplicada, ya que incluyen moléculas de interés químico y farmacéutico, como pigmentos, toxinas, antibióticos o compuestos con actividad antitumoral (Katz y Donadio, 1993). Un ejemplo relevante son las aflatoxinas, moléculas cancerígenas producidas por ciertas especies de *Aspergillus*, y cuya presencia como contaminante en alimentos representa un problema importante para la salud.

La síntesis de poliquétidos se inicia por un proceso casi idéntico al de la síntesis de los ácidos grasos (Hopwood y Sherman, 1990). Los complejos enzimáticos responsables de ambas rutas biosintéticas son muy similares y se asume que poseen un origen evolutivo común. La síntesis comienza con la adición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono por condensaciones descarboxilativas de moléculas de acetato a partir de malonil-CoA. Tales reacciones son llevadas a cabo por la sintetasa de los poliquétidos, complejo proteico formado por varias actividades

enzimáticas. El complejo puede estar formado por un solo polipéptido de gran tamaño (sintetasa de tipo I) o por varios polipéptidos independientes (sintetasa de tipo II). Las sintetetasas de poliquétidos de muchos hongos y bacterias pertenecen al primer grupo. Un ejemplo es la enzima que inicia la síntesis de aflatoxina B1 en *Aspergillus parasiticus* (Chang *et al.*, 1995). El tamaño de la proteína, unos 2000 aminoácidos, implica que el gen responsable (*pksA*) posee una longitud inusual en este tipo de organismos.

Además de bikaverina, *Gibberella* produce otros poliquétidos, como las fusarinas (Barrero *et al.*, 1991). Entre ellas destaca la fusarina C, compuesto con actividad mutagénica aislado originalmente a partir de varias estirpes de *Fusarium* (Mirocha *et al.*, 1989). La presencia de *Fusarium* como contaminante en cereales ha dado relevancia a la investigación sobre la toxicidad de este compuesto.

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GIBERELINAS Y BIKAVERINA

Gibberella excreta al medio giberelinas y bikaverina cuando entra en fase estacionaria como resultado del agotamiento de la fuente de nitrógeno asimilable (Borrow *et al.*, 1964). La síntesis no tiene lugar si la fase estacionaria se alcanza por agotamiento de otros nutrientes esenciales, como la fuente de carbono o de fósforo (Candau *et al.*, 1992). En consecuencia, la puesta en marcha de estos procesos biosintéticos no guarda relación con la entrada en fase estacionaria per se (y la correspondiente detención del crecimiento) sino con la desaparición del nitrógeno, que ejerce de represor de ambas rutas biosintéticas.

En ausencia de nitrógeno, la biosíntesis de giberelinas se mantiene activa durante al menos tres semanas, mientras que la producción de bikaverina se detiene a los pocos días. La adición de un compuesto nitrogenado a un cultivo en plena producción de giberelinas da lugar a la detención inmediata de esta síntesis (Candau *et al.*, 1992). El efecto es independiente de la reanudación del crecimiento, porque la adición de amonio reprime también la síntesis de giberelinas en un mutante

auxótrofo para asparragina, en el que no se restablece el crecimiento (Sánchez-Fernández, 1993).

Todas las fuentes de nitrógeno ensayadas, nitrato, amonio y diversos aminoácidos, reprimen la síntesis de giberelinas (Sánchez-Fernández, 1993). En presencia de L-metionina-DL-sulfoximina, un inhibidor de la síntesis de glutamina, el amonio carece de efecto represor (Muñoz y Agosín, 1993), indicando que el regulador es la glutamina o un compuesto derivado de este aminoácido. La adición de nitrato a mutantes carentes de reductasa de nitrato produce una inhibición parcial de la síntesis de giberelinas (Sánchez-Fernández *et al.*, 1997), sugiriendo que la regulación por nitrógeno está modulada por al menos dos señales independientes.

La regulación de la síntesis de giberelinas recuerda la regulación de las actividades enzimáticas implicadas en la asimilación de fuentes de nitrógeno diferentes del amonio y la glutamina (Muñoz y Agosín, 1993). La activación de estas rutas está mediada por una proteína activadora, denominada AreA en *Aspergillus nidulans* y Nit-2 en *Neurospora crassa* (Marzluf, 1993). Se sospecha que la proteína homóloga de *Gibberella* puede jugar un papel clave en la regulación de la síntesis de giberelinas en este organismo.

La represión por nitrógeno de la síntesis de giberelinas y bikaverina sugiere estrategias experimentales que permitan la clonación de los genes responsables de sus rutas metabólicas. En *Gibberella* se han amplificado por PCR con cebadores arbitrarios fragmentos aleatorios de ADN (RAPDs) a partir de muestras de ARNm o ADNc obtenidos en condiciones reprimidas e inducidas para la síntesis de giberelinas (Appleyard *et al.*, 1995). No se ha confirmado la identidad de estas secuencias.

La transferencia de micelio reprimido por nitrógeno a una solución de glucosa da lugar a la inducción inmediata de las producciones de giberelinas y bikaverina. Hemos usado estas condiciones experimentales para determinar la cinética de inducción de una actividad enzimática de la síntesis de giberelinas, la sintetasa de kaureno, y obtener ARNm y ADNc de micelio reprimido e inducido. La comparación de ambas muestras de ADNc ha permitido identificar varios genes regulados por nitrógeno. Uno

de ellos es responsable de una proteína cuya secuencia es similar a las de las sintetasas de poliquétidos de diversas especies. Se investiga actualmente la relación de este gen con la síntesis de bikaverina y otros metabolitos secundarios.

GENES DE LA SÍNTESIS DE GIBERELINAS

El primer gen de la síntesis de giberelinas se clonó en la planta *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 1992). El gen, denominado *gal*, es responsable de la sintetasa de kaureno y se obtuvo mediante la técnica de “sustracción genómica” utilizando un mutante con una deleción del gen. En los años siguientes se han multiplicado los trabajos que describen la clonación y caracterización de otros genes de la síntesis de giberelinas en plantas. En *Cucurbita maxima*, el gen de la oxidasa del carbono 20 se aisló rastreando en *E. coli* con anticuerpos contra la enzima una genoteca de expresión de ADN complementario de endospermo (Lange et al., 1994). Posteriormente se han clonado otros genes de oxidasas del carbono 20 mediante estrategias basadas en el conocimiento de su secuencia. Así, se han amplificado por PCR secuencias internas de otros genes utilizando cebadores basados en la secuencia de *Cucurbita* (Phillips et al., 1995; Wu et al., 1996; García-Martínez et al., 1997) y se han rastreado genotecas con sondas heterólogas (Xu et al., 1995b). Otros genes se han clonado posteriormente mediante inserción de transposones o del ADN-T de *Agrobacterium*, sacando ventaja de la fácil detección del fenotipo mutante en plantas (Chiang et al., 1995; Bensen et al., 1995; Winkler y Helentjaris, 1995).

Recientemente se ha clonado el primer gen responsable de una enzima específica de la síntesis de giberelinas en un hongo. Se ha obtenido amplificando por PCR un fragmento de ADN del ascomiceto *Phaeosphaeria* con cebadores deducidos de las secuencias conservadas de varias sintetasas de difosfato de copalilo de plantas, primera enzima responsable de la conversión difosfato de geranilgeranilo en kaureno (Kawaide et al., 1997). La proteína determinada por el gen tiene similitud tanto con la sintetasa de difosfato de copalilo como con la siguiente

enzima que completa la reacción, la sintetasa de kaureno. La expresión del gen de *Phaeosphaeria* en *E. coli* ha permitido concluir que se trata de una proteína bifuncional, capaz de llevar a cabo ambas reacciones enzimáticas. Tudzynski y colaboradores están empleando la secuencia del gen de *Phaeosphaeria* para clonar el correspondiente gen en *Gibberella*, así como otros genes de la misma ruta biosintética. La clonación y secuenciación de nuevos genes aportará información sobre el origen de la ruta en hongos y posibilitará un conocimiento molecular que permita mejorar la producción industrial de giberelinas.

BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos de naturaleza terpenoide que comparten con las giberelinas los primeros pasos de la ruta biosintética (Fig. 1). Los carotenoides se encuentran en todos los seres vivos, desde las bacterias a los animales, aunque los últimos no son capaces de sintetizarlos y los toman de la dieta. Su papel en la fotosíntesis los hace esenciales en los organismos fotosintéticos y explica que las enzimas para la biosíntesis de carotenoides en plantas sean dianas de herbicidas.

Gibberella acumula un carotenoide de 35 átomos de carbono denominado neurosporaxantina (ácido 4'-apo-b-caroten-4'-oico; Aasen y Jensen, 1965). El primer caroteno de su ruta biosintética es el fitoeno, que se produce por condensación de dos moléculas de difosfato de geranylgeranilo (Fig. 1). Este caroteno incoloro sufre cinco deshidrogenaciones y una ciclación para convertirse en toruleno (Fig. 5). La caracterización de mutantes de la carotenogénesis de *Gibberella* sugiere que las cinco deshidrogenaciones son llevadas a cabo por una misma enzima, la deshidrogenasa del fitoeno (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). El toruleno es finalmente convertido en neurosporaxantina mediante una reacción de pérdida de cinco átomos de carbono y la adición de un grupo carboxilo terminal.

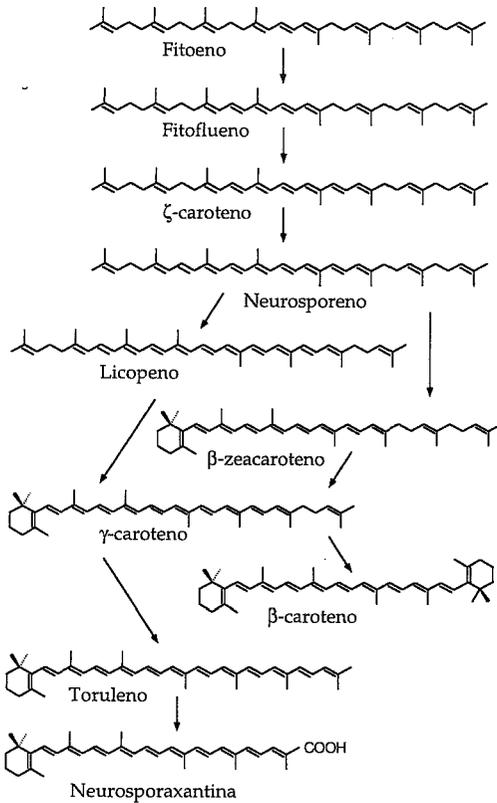


Fig. 5. Biosíntesis de neurosporaxantina.

RELACIÓN ENTRE LAS BIOSÍNTESIS DE GIBERELINAS Y CAROTENOIDES

Los carotenoides y las giberelinas juegan un papel esencial en las plantas, pero no en *Gibberella*, donde los mutantes carentes de estos compuestos crecen igual que la estirpe silvestre. *Gibberella* ofrece la oportunidad, por tanto, de investigar ambas rutas biosintéticas en una situación biológica diferente.

La síntesis de neurosporaxantina es fotoinducible en *Gibberella* (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987; Avalos y Schrott, 1990). La fácil detección de los cambios en la pigmentación ha facilitado el aislamiento de una completa colección de mutantes de este hongo afectados en la biosíntesis de carotenoides (Avalos y Cerdá-Olmedo, 1987). Se han aislado dos tipos de mutantes: albinos en la luz y pigmentados en la oscuridad. Los primeros incluyen tanto mutantes carentes de carotenoides como mutantes que acumulan fitoeno. Los segundos son de dos tipos: aquellos que sintetizan cantidades de carotenoides en la oscuridad similares a las acumuladas por la estirpe silvestre en la luz, y mutantes superproductores de neurosporaxantina, fuertemente pigmentados en cualquier condición de cultivo.

Las síntesis de giberelinas y carotenoides poseen regulaciones independientes. Sin embargo, ambas rutas se nutren de precursores comunes, de forma que los cambios en el flujo de una ruta pueden afectar al de la otra. Los mutantes superproductores de neurosporaxantina, no producen más giberelinas que la estirpe silvestre, pero muestran una reducción en la producción próxima al 50% (Candau *et al.*, 1991). Esa sería, aproximadamente, la reducción esperada si las moléculas de difosfato de geranilgeranilo utilizadas para hacer neurosporaxantina se hubieran desviado de la ruta biosintética de las giberelinas.

La síntesis de carotenoides en la estirpe silvestre es muy minoritaria respecto a la síntesis de giberelinas, por lo que no sorprende que los mutantes albinos no sufran cambios significativos en su capacidad de sintetizar giberelinas (Candau *et al.*, 1991). La única excepción es un mutante albino, denominado SG127, que muestra una fuerte reducción en la síntesis de giberelinas (Candau *et al.*, 1991, Fernández-Martín *et al.*, 1995). Este mutante podría estar afectado en una sintetasa de difosfato de geranilgeranilo común para ambas rutas. No se ha demostrado, sin embargo, que solo haya una enzima con esta actividad en *Gibberella*, y no se descarta que el mutante SG127 posea dos mutaciones independientes.

La utilización de precursores comunes no significa que las rutas biosintéticas tengan lugar en el mismo compartimento celular. Experimentos de alimentación con sustratos marcados radiactivamente

dan lugar a distintas radioactividades específicas en ergosterol, caroteno y ácido giberélico con cada sustrato, indicando que las síntesis de esteroides, carotenoides y giberelinas tienen lugar en compartimentos celulares diferentes (Domenech *et al.*, 1996).

TRANSFORMACIÓN DE *Gibberella*

La identificación y caracterización de los genes involucrados en el metabolismo secundario de *Gibberella* requiere disponer de sistemas eficientes de introducción de ADN exógeno y de mutagénesis dirigida. La transformación de *Gibberella* se llevó a cabo por primera vez introduciendo el gen de la nitrato reductasa de *Aspergillus niger* en mutantes de *Gibberella* carentes de esta actividad enzimática (Sánchez-Fernández *et al.*, 1991). Posteriormente se han utilizado otros marcadores, como son el gen de la transcarbamilasa de la ornitina de *Aspergillus nidulans*, o un gen bacteriano de resistencia a higromicina (Leslie y Dickman, 1991; Brückner *et al.*, 1992; Fernández-Martín, 1998).

La transformación de *Gibberella* es integrativa y los transformantes obtenidos muestran un elevado grado de estabilidad (Brückner *et al.*, 1992). Las frecuencias de transformación obtenidas son bajas (menos de 10 transformantes por microgramo de ADN), por lo que no es práctico su empleo para clonación de genes por complementación. Una variante del método de transformación por resistencia a higromicina permite que la mayoría de los transformantes hayan integrado el vector por recombinación homóloga (Fernández-Martín, 1998). El método permite realizar experimentos de disrupción génica por integración dentro de un gen o mutagénesis dirigida por integración y excisión del vector.

GENES DE LA SÍNTESIS DE CAROTENOIDES DE *Gibberella*

El gen de la síntesis de carotenoides del que se posee más información es el que determina la deshidrogenasa del fitoeno. Este gen ha sido secuenciado en numerosos organismos, tanto bacterias como

hongos y plantas, observándose una alta similitud en las secuencias de aminoácidos que determinan. Hemos sacado provecho del parecido de estas secuencias para clonar el gen de la deshidrogenasa del fitoeno de *Gibberella* (gen *carB*, Fernández-Martín *et al.*, 1998). Para ello, se diseñaron cebadores a partir de sus regiones más conservadas y se utilizaron para amplificar por PCR el fragmento equivalente de *Gibberella*. Este fragmento se usó como sonda para rastrear una genoteca parcial enriquecida en el gen. La función del gen clonado se ha confirmado tanto por complementación, transformando un mutante carente de deshidrogenasa del fitoeno, como por mutagénesis dirigida, introduciendo en dos pasos un cambio de fase en la lectura.

Estrechamente ligado al gen *carB* de *Gibberella* se encuentra un gen de una proteína altamente similar a la sintetasa del fitoeno de *Neurospora crassa* (Schmidhauser *et al.*, 1994), enzima anterior a la deshidrogenasa en la ruta biosintética. En la misma región de ADN se ha identificado un tercer gen responsable de una proteína con similitud con las rodopsinas bacterianas, fotoproteínas que unen un carotenoide como grupo prostético (Kuan y Saier, 1994). Están en marcha experimentos para determinar la relación de este gen con la síntesis de carotenoides en *Gibberella*. La proximidad de estos genes sugiere la existencia en este hongo de un “cluster” de genes de la síntesis de carotenoides.

AGRADECIMIENTOS

R.F.M. y M.M.P. recibieron ayuda económica de la Fundación Caja de Madrid y de la Junta de Andalucía, respectivamente. La colaboración con W.G. y C.E.D. fue financiada por la Agencia Española de Cooperación Internacional.

REFERENCIAS

Aasen AJ, Jensen SL (1965) Fungal carotenoids II. The structure of the carotenoid acid neurosporaxanthin. *Acta Chem. Scand.* 19: 1843-1853.

- Amoah BK, MacDonald MV, Rezanoor N, Nicholson P (1996) The use of the random amplified polymorphic DNA technique to identify mating groups in the *Fusarium* section *Liseola*. *Plant Pathol.*, 45, 115-125.
- Appleyard VCL, Unkles SE, Legg M, Kinghorn JR (1995) Secondary metabolite production in filamentous fungi displayed. *Mol. Gen. Genet.* 247: 338-342.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1986) Chemical modification of carotenogenesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 25: 1837-1841.
- Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1987) Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr. Genet.* 11: 505-511.
- Avalos J, Schrott EL (1990) Photoinduction of carotenoid biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 295-298.
- Balan J, Fуска J, Kuhr I, Kuhrová V (1970) Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. *Fol. Microbiol.* 15: 479-484.
- Barrero AF, Oltra JE, Cabrera E, Herrador MM, Rojas FJ, Reyes JF, Godoy F (1992) Gibelactol, a diterpenoid from *Gibberella fujikuroi*. *Nat. Prod. Lett.* 1: 155-160.
- Barrero AF, Oltra JE, Herrador MM, Cabrera E, Sánchez JF, Quílez JF, Rojas FJ, Reyes JF (1993) Gibepyrone: a-pyrone from *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron* 49: 141-150.
- Barrero AF, Sánchez JF, Oltra JE, Tamayo N, Cerdá-Olmedo E, Candau R, Avalos J (1991) Fusarin C and 8Z-Fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 30: 2259-2263.
- Beale MH, Bearder JR, Down GH, Hutchison M, MacMillan J, Phinney BO (1982) The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 21: 1279-1287.
- Bearder JR, MacMillan J, Wels CM, Chaffey MB, Phinney BO (1974) Position of the metabolic block for gibberellin biosynthesis in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry* 13: 911-917.

- Bensen RJ, Johal GS, Crane VC, Tossberg JT, Schnable PS, Meeley RB, Briggs SP (1995) Cloning and characterization of the maize An1 gene. *Plant Cell* 7: 75-84.
- Birch AJ, Rickards RW, Smith H (1958) The biosynthesis of gibberellic acid. *Proc. Chem. Soc. London.* 192-193.
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Borrow A, Brown S, Jefferys EG, Kessell RHJ, Lloyd EC, Lloyd PB, Rothwell A, Rothwell B, Swait JC (1964) The kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* 10: 407-444.
- Brückner B, Blechschmidt D, Sembdner G, Schneider G (1989) Fungal gibberellin production. En: Vandamme EJ (ed.) *Biotecnology of vitamins, pigments and growth factors*. Elsevier Applied Science.
- Brückner B, Unkles SE, Weltring K, Kinghorn JR (1992) Transformation of *Gibberella fujikuroi*: effect of the *Aspergillus nidulans* AMA1 sequence on frequency and integration. *Curr. Genet.* 22: 313-316.
- Candau R, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1991) Gibberellins and carotenoids in the wild-type and mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3378-3382.
- Candau R, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1992) Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Plant Physiol.* 100: 1184-1188.
- Chang PK, Cary JW, Yu J, Bhatnagar D, Cleveland TE (1995) The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene *pkSA*, a homolog of *Aspergillus nidulans* *wA*, is required for aflatoxin B1 biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 248: 270-277.
- Chiang HH, Hwang I, Goodman HM (1995) Isolation of the *Arabidopsis* *Ga4* locus. *Plant Cell* 7: 195-201.
- Coolbaugh RC (1983) The biochemistry and physiology of gibberellins. En: *The biochemistry and physiology of gibberellins*, 1. Crozier A (ed.) Praeger. 53-58.

- Cross BE, Galt RHB, Hanson JR, Curtis PJ, Grove JF, Morrison A (1963) New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. Part II. The isolation of fourteen new metabolites. J. Chem. Soc. 2937-2943.
- Cross BE, Markwell RE, Stewart JC (1971) New metabolites of *Gibberella fujikuroi*. XVI. Cyclonerodiol. Tetrahedron 27: 1663-1667.
- Crozier A, ed. (1983) The biochemistry and physiology of gibberellins. Vol. I y II. Praeger, New York.
- Domenech CE, 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.
- Fernández-Martín R (1998) Síntesis de giberelinas y transformación integrativa en *Gibberella fujikuroi*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Fernández-Martín R, Reyes F, Domenech CE, Cabrera E, Bramley PM, Barrero AF, Avalos J, Enrique Cerdá-Olmedo E (1995) Gibberellin biosynthesis in gib mutants of *Gibberella fujikuroi*. J. Biol. Chem. 270: 14970-14974.
- Garcia-Martinez JL, Lopez-Diaz I, Sanchez-Beltran MJ, Phillips AL, Ward DA, Gaskin P, Hedden P (1997) Isolation and transcript analysis of gibberellin 20-oxidase genes in pea and bean in relation to fruit development. Plant. Mol. Biol. 33: 1073-1084.
- Hedden P (1987) Gibberellins. En: Rivier L, Crozier A (ed.) Principles and practice of plant hormone analysis. Academic Press, London.
- Hopwood DA, Sherman DH (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. Annu. Rev. Genet. 24: 37-66.
- Katz L, Donadio S (1993) Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. Annu. Rev. Microbiol. 47: 875-912.
- Kawaide H, Imai R, Sassa T, Kamiya Y (1997) Ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487. cDNA isolation, characterization,

- and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 272: 21706-21712.
- Klittich CJR, Leslie JF (1992), Identification of a second mating population within *the Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia* 84: 541-547. Kuan G, Saier MH (1994) Phylogenetic relationships among bacteriorhodopsins. *Res. Microbiol.* 145: 273-285.
- Kuhlman EG (1983) Varieties of *Gibberella fujikuroi* with anamorphs in *Fusarium* section *Liseola*. *Mycologia* 74: 759-768.
- Lange T, Hedden P, Graebe JE (1994) Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 8552-8556.
- Leslie JF (1991) Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). *Phytopathology* 81: 1058-1060.
- Leslie JF, Dickman MB (1991) Fate of DNA encoding hygromycin resistance after meiosis in transformed strains of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1423-1429.
- Marzluf GA (1993) Regulation of sulfur and nitrogen metabolism in filamentous fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 31-55.
- Mirocha CJ, Abbas HK, Kommedahl T, Jarvis BB (1989) Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 254-255.
- Muñoz GA, Agosín E (1993) Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4317-4322.
- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P (1995) Isolation and expression of 3 gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 108: 1049-1057.

- Rhomer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295: 517-524.
- Sánchez-Fernández R (1993) Transformación y biosíntesis de giberelinas en *Gibberella fujikuroi*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
- Sánchez-Fernández R, Avalos J, Cerdá-Olmedo E (1997) Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS lett.* 413: 35-39.
- Sánchez-Fernández R, Unkles SE, Campbell EI, Macro JA, Cerdá-Olmedo E, Kinghorn JR (1991) Transformation of the filamentous fungus *Gibberella fujikuroi* using the *Aspergillus niger* niaD gene encoding nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* 225: 231-233.
- Schmidhauser TJ, Lauter FR, Schumacher M, Zhou W, Russo VEA, Yanofsky C (1994) Characterization of al-2, the phytoene synthase gene of *Neurospora crassa*. Cloning, sequence analysis, and photoregulation. *J. Biol. Chem.* 269: 12060-12066.
- Sun TP, Goodman HM, Ausubel FM (1992) Cloning the Arabidopsis GA1 locus by genomic subtraction. *Plant Cell* 4: 119-128.
- Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J, eds. (1991) *Gibberellins*. Springer Verlag, New York.
- Voigt K, Schleier S, Brückner B (1995) Genetic variability in *Gibberella fujikuroi* and some related species of the genus *Fusarium* based on random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Curr. Genet.* 27: 528-535.
- Winkler RG, Helentjaris T (1995) The maize dwarf3 gene encodes a cytochrome P450-mediated early step in gibberellin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1307-1317.
- Wu K, Li L, Gage DA, Zeevaart JA (1996) Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol.* 110: 547-554.

- Xu J-R, Yan K, Dickman MB, Leslie JF (1995) Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (Fusarium section Liseola). *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 8;74-84.
- Xu Y-L, Li L, Wu K, Peeters AJM, Gage DA, Zeevart JAD (1995) The GA5 locus of *Arabidopsis thaliana* encodes a multifunctional gibberellin 20-oxidase: molecular cloning and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6640-6644.