



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE
OXIDASAS DE LA BIOSÍNTESIS DE
GIBERELINAS EN RIZOBACTERIAS
SIMBIONTES DE LEGUMINOSAS**

Tesis entregada a la Universidad De Chile en cumplimiento
de los requisitos para optar al Grado de

Magíster en Ciencias Químicas

Mariana Montanares Oyarce

Directora de Tesis
Dra. María Cecilia Rojas Garrido

Santiago, Chile
2015

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

MARIANA MAGDALENA MONTANARES OYARCE

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 30 de Septiembre de 2015.

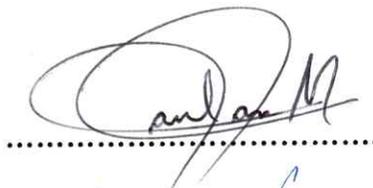
Director de Tesis:

Dra. María Cecilia Rojas


.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

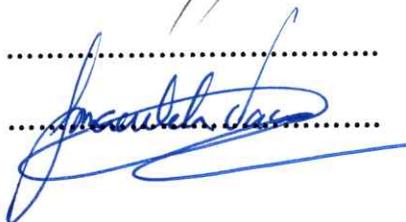
Dr. Paul Jara (Presidente)


.....

Dr. Claudio Saitz

.....

Dra. Inmaculada Vaca


.....

*Dedicado a mi familia por su amor y comprensión.
A mis padres, Manuel y Magdalena, por guiarme hasta este camino.
A mis hermanos, Constanza y Luciano, por caminar junto a mí.*



Mariana Montanares Oyarce, nació en 1987 oriunda de la ciudad de Nacimiento, VIII región. Realiza sus estudios básicos en la Escuela El Saber E-1027 de dicha comuna. En el año 2001 se desplaza a Santiago donde realiza sus estudios de enseñanza media en el Liceo Benjamín Vicuña Mackenna de la comuna de La Florida. En el año 2009 ingresa a la Universidad de Chile, donde en el año 2013 realiza su Unidad de Investigación denominada *Biotransformaciones de fitohormonas diterpénicas por rizobacterias simbióticas y no-simbióticas*, en el laboratorio de Bioorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el cual recibe su grado de Licenciada en Ciencias con mención en Química. En el año 2014 ingresa al programa de Magister en Ciencias Químicas bajo el alero de la Dra. María Cecilia Rojas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a la Dra. María Cecilia Rojas por haberme entregado las herramientas y la ayuda necesaria para completar este trabajo. Por su apoyo, dedicación y formación en cada uno de los días de trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por su ayuda y cooperación. Especialmente a Constanza por sus consejos y a Nathalie por su colaboración.

Un especial agradecimiento para Patricia Corrales quien me ha enseñado mucho y ha compartido muy sabios consejos para con mi persona en todo este proceso.

Agradezco a la comisión evaluadora de este trabajo Dr. Paul Jara, Dra. Inmaculada Vaca y Dr. Claudio Saitz que con sus comentarios, sugerencias y correcciones me permitieron mejorar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Reuben Peters por proveer las mutantes utilizadas, a la Dra. Cecilia Baginsky por su aporte en las cepas de rizobacterias y al Dr. Peter Hedden por colaborar con la realización de GC-MS.

Le doy gracias a mi familia por su paciencia y comprensión, a mis padres quienes me han apoyado enormemente y me han instado siempre a mejorar y crecer.

A mis amigos y compañeros por las horas de estudio y ayuda mutua, por sus comentarios y reflexiones, por su compañía y amistad en este trayecto.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis fue realizada en el laboratorio de Bioorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile y financiada por:

1. Proyecto FONDECYT 1150797 CONICYT
2. Proyecto Facultad de Ciencias (PAIFAC) 2014
3. Proyecto VID- Enlace 2014

RESUMEN

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas diterpénicas que participan en diversas etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas. Además de ser producidas por los sistemas vegetales, son sintetizadas como metabolitos secundarios por algunos hongos y rizobacterias. Particularmente el simbiote de la soya *Bradyrhizobium japonicum* contiene un operón de 8 genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de GAs, los que se expresan en las condiciones de microaerobiosis presentes en los nódulos radiculares de las plantas de soya. Los genes incluyen tres genes de monooxigenasas P450, un gen homólogo a deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, un gen de ferredoxina, dos genes de diterpeno ciclasas y un gen de prenil transferasa. Aunque recientemente se demostró en nuestro grupo de investigación que los bacteroides de *B. japonicum* presentan una alta actividad de oxidasas de GAs, no se conocen las funciones catalíticas asociadas a cada uno de los genes del operón. En esta Tesis se investigaron las funciones catalíticas asociadas a dos de los genes de monooxigenasas del operón de *B. japonicum* así como al gen de deshidrogenasa/reductasa. Mediante la utilización de mutantes bloqueadas en genes individuales se identificaron en bacteroides de las mutantes las reacciones de la biosíntesis de GAs ausentes, que corresponderían a las catalizadas por la enzima bloqueada. Se administró, a una suspensión de bacteroides, precursores de GAs marcados con ^{14}C y los productos generados se aislaron e identificaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Una de las mutantes en genes de monooxigenasas metabolizó efectivamente al ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico y no metabolizó al precursor más oxidado GA₁₂. Los productos

obtenidos a partir del ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico fueron diferentes de los de la cepa silvestre. La segunda mutante no metabolizó al ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico pero convirtió efectivamente a precursores que poseen el esqueleto del *ent*-giberelano para dar los productos más oxidados ¹⁴C-GA₁₅ y/o ¹⁴C-GA₂₄. Finalmente se encontró que la mutante en el gen de la deshidrogenasa metabolizó precursores kaurenoides aunque con baja eficiencia. Los resultados sugieren que tanto la C20 oxidasa de GAs como la *ent*-kaurenoico oxidasa de *B. japonicum* son monooxigenasas P450. La deshidrogenasa del operón catalizaría algunas de las reacciones de oxidación de la secuencia biosintética.

Las actividades de *ent*-kaurenoico oxidasa y C20 oxidasa de GAs se encontraron también en bacteroides de *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici* y *Sinorhizobium meliloti*. Tanto los productos finales como la naturaleza de las enzimas de la biosíntesis de GAs de *B. japonicum* difieren de las que presentan plantas y hongos. Todas las especies de *Rhizobium* estudiadas sintetizan GA₉ como producto final a diferencia de los sistemas vegetales que sintetizan GA₁ y/o GA₄.

SUMMARY

Gibberellins (GAs) are diterpene phytohormones that participate in different stages of plant growth and development. Besides plants, they are produced as secondary metabolites by some fungi and rhizobacteria. Particularly the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* contains an operon of 8 genes that encodes for the enzymes of GA biosynthesis which are expressed under the microaerobic conditions present in root nodules of soybean plants. These genes include three P450 monooxygenase genes, a gene with homology to short chain dehydrogenase/reductase genes, a ferredoxin gene, two diterpene cyclase genes and a prenyl transferase gene. Recently our research group showed that *B. japonicum* bacteroids present a high GA oxidase activity. However, the catalytic functions associated to each gene of the operon are unknown. In this work the catalytic functions of the enzymes encoded by two of the monooxygenase genes were investigated as well as those of the dehydrogenase/reductase gene. Utilizing knock-out mutants in specific single genes the reactions of GA biosynthesis that are absent were identified in bacteroids of each of the mutants. These would correspond to the reactions catalyzed by the blocked enzyme. ^{14}C -labelled GA precursors were added to a bacteroids suspension and the generated products were isolated and identified by gas chromatography-mass spectrometry.

One of the mutants efficiently metabolized *ent*- ^{14}C -kaurenoic acid but it did not metabolize added ^{14}C -GA₁₂, a more oxidized precursor. The products obtained from *ent*- ^{14}C -kaurenoic acid were different to those formed by the wild type *B. japonicum* strain.

The second mutant did not metabolize *ent*-¹⁴C-kaurenoic acid but converted efficiently several GA precursors into the oxidized products ¹⁴C-GA₁₅ and/or ¹⁴C-GA₂₄. Finally, the mutant blocked in the dehydrogenase gene metabolized *ent*-kaurenoid precursors although with a low efficiency. The results suggest that GA C20 oxidase as well as *ent*-kaurenoic acid oxidase are P450 monooxygenases. The dehydrogenase encoded in the GA gene operon would catalyze some of the oxidative reactions of GA biosynthesis.

ent-Kaurenoic acid oxidase as well as C20 oxidase activities were also found in *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici* and *Sinorhizobium meliloti* bacteroids. Final products as well as enzymes of GA biosynthesis in *B. japonicum* differ from those in plants or fungi. All *Rhizobium* species analyzed in this work synthesize GA₉ as final product in contrast to plant systems that synthesize GA₁ and/or GA₄.

ÍNDICE

	Pag.
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vii
ÍNDICE.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
2. MÉTODOS.....	14
2.1. Cultivos bacterianos.....	14
2.2. Mutantes de <i>B. japonicum</i> con genes bloqueados.....	14
2.3. Obtención de nódulos de raíces de leguminosas.....	15
2.4. Obtención de bacteroides y de extractos enzimáticos.....	16
2.5. Sustratos marcados con ¹⁴ C.....	17
2.6. Metabolización de precursores marcados.....	17
2.7. Extracción y purificación de los productos.....	17
2.8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	18
2.9. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	18
2.10. Cuantificación de la radiactividad.....	18
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Reacciones de la biosíntesis de giberelinas en la cepa silvestre USDA110 de <i>B. japonicum</i>	19
3.2. Actividad de oxidasas de giberelinas en las mutantes bloqueadas ΔCYP114 y ΔCYP112 de <i>B. japonicum</i>	23
3.3. Utilización de precursores de GAs por la mutante bloqueada ΔSDR de <i>B. japonicum</i> . Participación de una deshidrogenasa en la secuencia de oxidación del ácido <i>ent</i> -kaurenoico hasta GA ₉	28
3.4. Reacciones de la biosíntesis de GAs en otras especies del género <i>Rhizobium</i> : <i>Rhizobium etli</i> , <i>Rhizobium phaseoli</i> , <i>Rhizobium tropici</i> y <i>Sinorhizobium fredii</i>	32
4. DISCUSIÓN.....	36
5. CONCLUSIONES.....	46
6. REFERENCIAS.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Giberelinas y sus aplicaciones en la agricultura y la horticultura.....	3
Tabla 2. Productos de metabolización de precursores de GAs (^{14}C) por la cepa silvestre USDA110 de <i>B. japonicum</i>	20
Tabla 3. Utilización de ácido <i>ent</i> - ^{14}C -kaurenoico o ^{14}C -GA ₁₂ por la cepa ΔCYP112 de <i>B. japonicum</i>	24
Tabla 4. Actividades enzimáticas de la oxidación del metilo 20 hasta CO ₂ en bacteroides de las cepas USDA110 y ΔCYP112 de <i>B. japonicum</i>	25
Tabla 5. Productos de metabolización de precursores de GAs por la cepa ΔCYP114 de <i>B. japonicum</i>	27
Tabla 6. Productos de metabolización de precursores de GAs por la cepa ΔSDR de <i>B. japonicum</i>	30
Tabla 7. Productos de oxidación del precursor ^{14}C -GA ₁₂ por bacteroides de distintas especies de <i>Rhizobium</i>	34
Tabla 8. Intermediarios y productos finales de la biosíntesis de GAs formados a partir de ácido <i>ent</i> - ^{14}C -kaurenoico por bacteroides de <i>R. phaseoli</i> y <i>S. fredii</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1. Estructura de GAs C20 y C19. A. Esqueleto tetracíclico del <i>ent</i> -giberelano (20 carbonos) y orden de numeración de los carbonos. B. Estructura de las GAs bioactivas de 19 carbonos.....	2
Fig. 2. Reacciones y enzimas de la biosíntesis de GAs en plantas (en verde) y hongos (en rosado). Hasta el GA ₁₂ aldehído las reacciones son comunes y luego difieren para dar los mismos productos finales, GA ₁ y GA ₃ (Hedden <i>et al.</i> , 2002).....	3
Fig. 3. Reacciones de oxidación de C20 en plantas; catalizada por la 20 oxidasa.....	5
Fig. 4. Operón de genes de la biosíntesis de GAs de <i>B. japonicum</i> (Tully <i>et al.</i> , 1998)....	7
Fig. 5. Ciclo catalítico para monooxigenasas P450 (Akhtar y Wright, 1991; Groves y Han, 1995). RH corresponde al sustrato orgánico.....	9
Fig. 6. Mecanismo de oxidación de C20 aldehído para formar la función 19, 10-ylactona.....	9
Fig. 7. Amplificación por PCR del gen <i>CYP112</i> (A) o del gen <i>CYP114</i> (B). En el carril 1 marcadores de peso molecular, GeneRuler 1kb plus Ladder DNA ThermoFisher Scientific rango 3000 pb a 100 pb; carril 2 cepa Δ CYP112 (A) o Δ CYP114 (B); carril 3 cepa silvestre USDA110 de <i>B. japonicum</i>	15
Fig. 8. Plantas de 6 semanas (A) soya (<i>Glicine max.</i>) inoculadas con <i>B. japonicum</i> y (B) Poroto Caupí (<i>Vigna unguiculata</i>) inoculadas con <i>Sinorhizobium fredii</i>	16
Fig. 9. Reacciones de la biosíntesis de giberelinas en <i>B. japonicum</i> , a partir del ácido <i>ent</i> -kaurenoico y sistemas vegetales.....	21
Fig. 10. Perfiles de HPLC de productos metabolización de ¹⁴ C-KA a diferentes tiempos de incubación de bacteroides de la cepa silvestre USDA110 de <i>B. japonicum</i> con el sustrato.....	22
Fig. 11. Perfil de productos del ¹⁴ C-KA formados por (A) cepa silvestre USDA 110 de <i>B. japonicum</i> y (B) la cepa Δ CYP114 de <i>B. japonicum</i>	24
Fig. 12. Reacciones de la biosíntesis de GA ₉ catalizadas por las monooxigenasas CYP114 y CYP112 y/o por la deshidrogenasa SDR.....	31

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

GAs	Giberelinas
GA ₃	Ácido giberélico
GGPP	Geranil difosfato
CPP	<i>ent</i> -copalil difosfato
KA	Ácido <i>ent</i> -kaurenoico
OHKA	Ácido <i>ent</i> -7 β -hidroxi-kaurenoico
KO	<i>ent</i> -kaureno oxidasa
KAO	<i>ent</i> -kaurenoico oxidasa
13ox	13-hidroxilasa
3ox	3 β -hidroxilasa
20ox	Oxidasa del carbono 20
2-OG	2-oxoglutarato
CPS	<i>ent</i> -copalil difosfato sintasa
KS	<i>ent</i> -kaureno sintasa
Fd	Ferredoxina
GGS	Geranil difosfato sintasa
SDR	Alcohol deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
TES	Ácido 2 - [(2-hidroxi-1,1-bis (hidroximetil) etil) amino] etanosulfónico
YEM	Medio nutritivo que contiene manitol y extracto de levadura
PCR	Amplificación de genes por una reacción en cadena de la polimerasa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Δ CYP112	Mutante de <i>B. japonicum</i> bloqueada en el gen <i>CYP112</i>
Δ CYP114	Mutante de <i>B. japonicum</i> bloqueada en el gen <i>CYP114</i>
Δ SDR	Mutante de <i>B. japonicum</i> bloqueada en el gen <i>SDR</i>

1. INTRODUCCIÓN

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas diterpénicas tetracíclicas involucradas en diversos procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores (MacMillan, 1997) como la germinación de semillas, la elongación de tallos, la inducción de la floración y el crecimiento de flores y frutos (Hedden, 1999; Sponsel, 2003). Algunos hongos y bacterias también producen giberelinas como metabolitos secundarios y aunque su función es menos conocida estos metabolitos tienen interés biotecnológico (MacMillan, 2002). Hasta la fecha se han identificado más de 130 GAs de las cuales sólo GA₁, GA₃, GA₄ y GA₇ son activas como fitohormonas (MacMillan, 2002; Bömke y Tudzynski, 2009). Las GAs se denominan mediante la sigla GA seguida de un subíndice que indica su orden de identificación. De acuerdo a su estructura se pueden agrupar en GAs de 20 carbonos (C₂₀, precursores de las GAs de 19 carbonos) y GAs de 19 carbonos (C₁₉, GAs bioactivas) (Fig. 1). Las características estructurales esenciales para la actividad biológica son una función 19, 10-γlactona, un grupo carboxilato en C₇ y una hidroxilación en C₃.

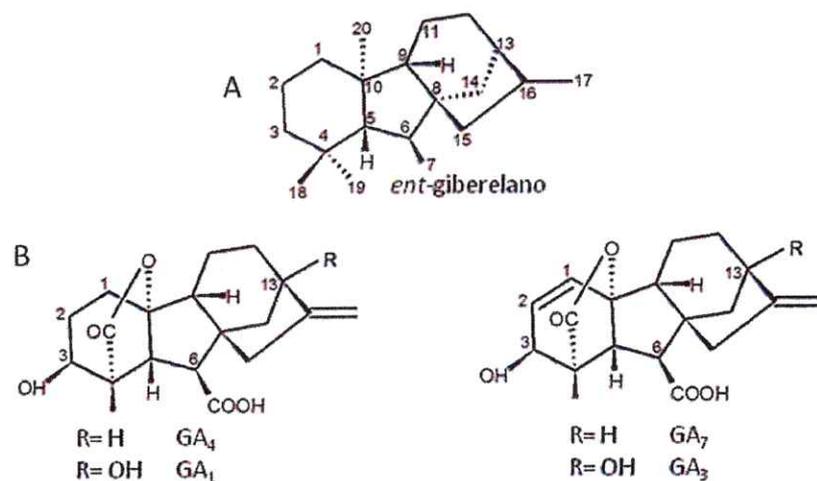


Fig. 1. Estructura de GAs C20 y C19. A. Esqueleto tetracíclico del *ent*-gibberelano (20 carbonos) y orden de numeración de los carbonos. B. Estructura de las GAs bioactivas de 19 carbonos.

Desde que el ácido giberélico (GA₃) fue aislado y caracterizado a partir del medio de cultivo de *Fusarium fujikuroi* (Curtis y Cross, 1954), se demostró su efecto regulador del crecimiento en aplicaciones externas sobre distintas especies vegetales como trigo, tomate y cereales (Groot *et al.*, 1987; Phinney, 1983; Graebe, 1987). Actualmente se utiliza en procesos agrícolas no sólo GA₃ sino que también otras GAs como GA₄, GA₇ y GA₁ las que actúan regulando el crecimiento y desarrollo vegetal. El modo de acción de las GAs involucra diferentes procesos como la promoción de la elongación celular al incrementar la plasticidad de la pared y el aumento del contenido de glucosa y fructosa, provocando el ingreso de agua a la célula lo que produce su expansión (Adams *et al.*, 1975; Ozga *et al.*, 2002). Además, las GAs inducen la disposición transversal de los microtúbulos en los frutos de vid y manzano lo que explica su efecto sobre la forma de los frutos (Wenzel *et al.*, 2000). El ácido giberélico y otras GAs extraídas desde el medio de cultivo del hongo se encuentran disponibles comercialmente y se aplican a diversos

cultivos para promover el crecimiento de tallos, el desarrollo de frutos, la floración y/o la germinación (Tabla 1). En países productores de uva de mesa sin semilla, como nuestro país, el ácido giberélico (GA₃) se aplica a los parronales para inducir el crecimiento de las bayas (Ben-Tal, 1990; Pérez *et al.*, 2000). El GA₃ exógeno suple el efecto de las GAs endógenas sintetizadas por las semillas y hace posible la comercialización de las variedades de uva sin semilla.

Tabla 1. Giberelinas y sus aplicaciones en la agricultura y la horticultura.

Giberelina aplicada	Cultivo	Efecto
GA ₃	Alcachofa	Agrandamiento y alargamiento del escapo floral
	Perejil	Aumento del crecimiento en épocas de frío principalmente
	Cítricos	Retarda la senescencia de los frutos
	Vid	Alargar los péndulos florales para evitar enfermedades fúngicas, obtener bayas de mayor tamaño sin semillas
GA ₄ /GA ₇	Caña de azúcar	Aumentar rendimiento en sacarosa ¹
	Papas	Romper latencia en tubérculos y la dormancia en las semillas
	Semillas de cebada	Aumento de la hidrólisis del almidón en el proceso de malteado
GA ₄ /GA ₇	Manzano	Aumento del tamaño y la calidad de la fruta
	Camelias y azaleas	Inducción de la floración
GA ₇ /GA ₄	Coníferas	Incremento de la producción de semillas induciendo la floración precoz

La biosíntesis de GAs se ha descrito en detalle tanto en plantas superiores como en hongos (Bömke y Tudzynski, 2009; Tudzynski, 2005; Hedden *et al.*, 2002). Se inicia con el precursor de cadena abierta geranyl geranyl difosfato (GGPP) que se forma en la vía isoprenoide. (MacMillan, 1997). La ciclación de GGPP genera el primer intermediario específico de la vía, el hidrocarburo *ent*-kaureno (Fig.2).

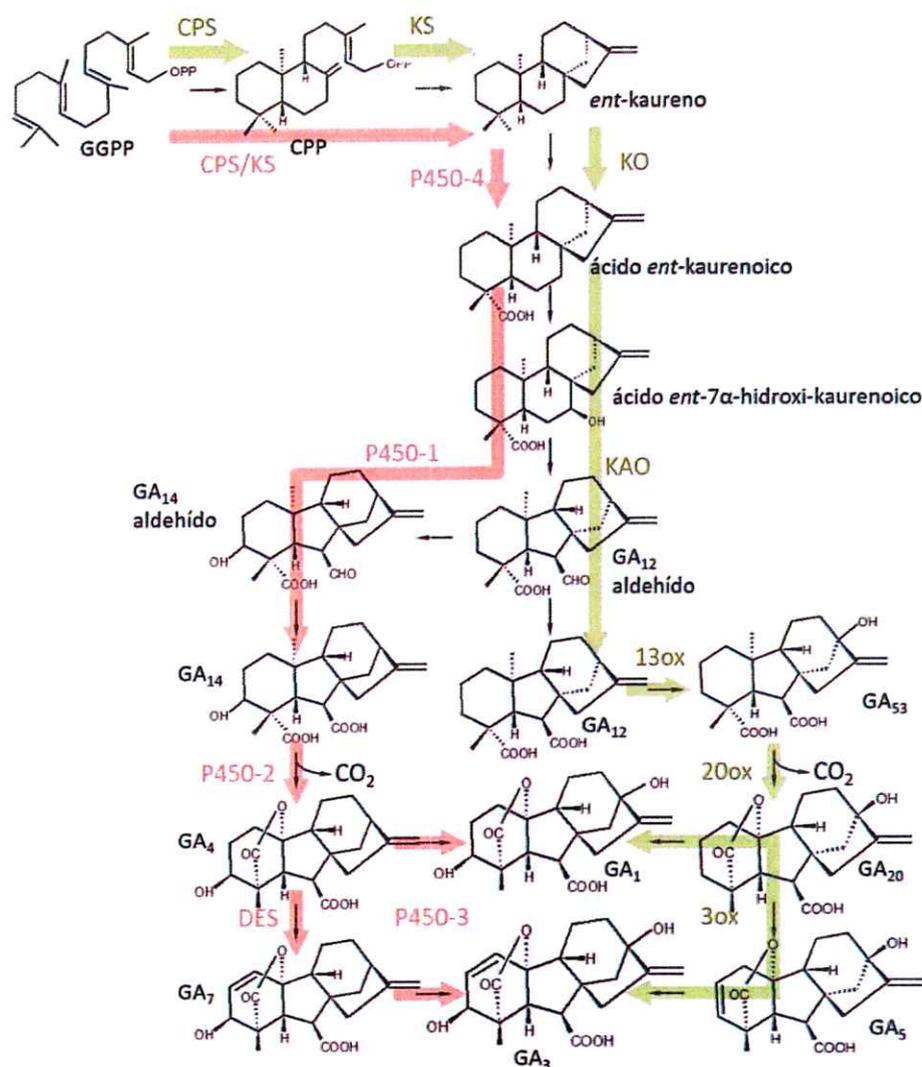


Fig. 2. Reacciones y enzimas de la biosíntesis de GAs en plantas (en verde) y hongos (en rosado). Hasta el GA₁₂ aldehído las reacciones son comunes y luego difieren para dar los mismos productos finales, GA₁ y GA₃ (Hedden *et al.*, 2002).

En plantas superiores, la biosíntesis comprende 15 reacciones y 7 enzimas (Hedden y Kamiya, 1997; Hedden y Proebsting, 1999) (Fig.2): dos ciclasas, *ent*-copalil difosfato sintasa (CPS) y *ent*-kaureno sintasa (KS), dos monooxigenasas asociadas al citocromo P450, *ent*-kaureno oxidasa (KO) y *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO) y tres dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (2-OG), C20 oxidasa (20ox), 3 β -hidroxilasa (3ox) y 13-hidroxilasa (13ox). Las ciclasas CPS y KS generan *ent*-kaureno a partir de GGPP y posteriormente, éste se oxida hasta ácido *ent*-kaurenoico, reacción catalizada por KO. El ácido *ent*-kaurenoico es convertido en GA₁₂ por una secuencia de reacciones de oxidación sobre C7, C6 y C3 vía ácido *ent*-7 α -hidroxi kaurenoico y GA₁₂ aldehído. Las siguientes reacciones son catalizadas por dioxigenasas dependientes de 2-OG: hidroxilación en C13 del GA₁₂ que genera el intermediario GA₅₃ y posterior oxidación del grupo metilo en C20 hasta CO₂ formándose GA₂₀ que contiene la función 19, γ 10 lactona (Fig. 3). La C20 oxidasa también oxida al precursor no hidroxilado GA₁₂ para dar la 19, γ 10 lactona GA₉, aunque esta vía es minoritaria con respecto a la 13-hidroxilada. Finalmente la 3ox introduce un hidroxilo en C3 y una insaturación en 1,2 para dar los productos finales GA₁ y/o GA₃ activos como fitohormonas (Fig. 2).

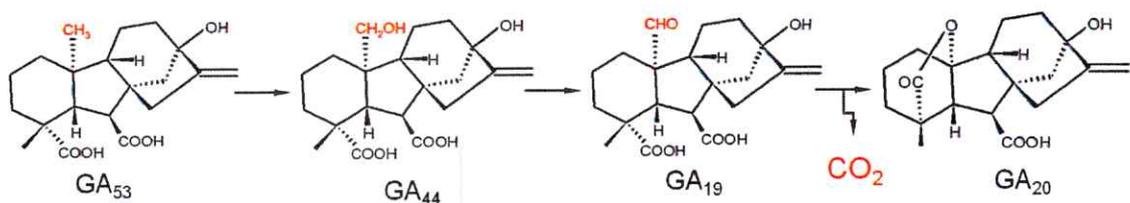


Fig. 3. Reacciones de oxidación de C20 en plantas, catalizada por la 20 oxidasa.

En el hongo *F. fujikuroi*, patógeno del arroz, se ha demostrado que las reacciones de la biosíntesis de GAs son similares a las de plantas superiores, aunque las enzimas difieren ya que la mayoría son monooxigenasas unidas a la membrana del retículo endoplásmico. La única excepción es la desaturasa que es una dioxigenasa soluble dependiente de 2-oxoglutarato (Battacharya *et al.*, 2012). Además, la *ent*-kaureno sintasa (CPS/KS) en este organismo es una enzima bifuncional y la *ent*-kaurenoico oxidasa (KAO) presenta actividad de 3 β -hidroxilasa además de C7 oxidasa (Rojas *et al.*, 2001). En cuanto a las reacciones químicas, la principal diferencia es el nivel al que ocurren las dos reacciones de hidroxilación: la hidroxilación en C3 ocurre en una etapa temprana, a nivel de GA₁₂ aldehído, en tanto que la hidroxilación en C13 ocurre sobre las GAs lactónicas C19 al final de la secuencia (Hedden *et al.*, 2002; Bömke y Tudzynski, 2009).

A diferencia de los sistemas vegetales y fúngicos, la información acerca de la biosíntesis de GAs en bacterias es escasa (Bottini *et al.*, 2004). Se ha reportado en cultivos líquidos de algunas bacterias como *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* (Janzen *et al.*, 1992; Bottini *et al.*, 1989), *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* (Bastián *et al.*, 1998) y *Bacillus sp.* (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001) sin embargo las cantidades encontradas son muy reducidas, del orden de 100 pg/L y además no se ha demostrado en estos sistemas actividad de oxidasas de GAs. Estas bacterias promueven el crecimiento vegetal facilitando la adquisición de nutrientes como el ion amonio generado a partir de la fijación del N₂ atmosférico (Lodwig y Poole, 2003) y además podrían sintetizar fitohormonas entre las que podrían estar las giberelinas (GAs) (Bottini *et al.*, 1989). Por otra parte las bacterias del género *Rhizobium*, simbiotes de leguminosas, también son promotoras del crecimiento vegetal. Estos microorganismos

ingresan a las raíces de las plantas de leguminosas formando nódulos en los que la bacteria se diferencia a un estado denominado bacteroide. Los bacteroides sintetizan nitrogenasa, que permite fijar el nitrógeno atmosférico y además podrían sintetizar fitohormonas como las GAs durante la simbiosis. Con respecto a las reacciones de la secuencia biosintética de GAs en bacterias la única información disponible se refiere a cultivos líquidos de *A. lipoferum* que metabolizan parcialmente las GAs $^2\text{H-GA}_{20}$ y $^2\text{H-GA}_9$ (Bottini *et al.*, 2004). Se encontró que $^2\text{H-GA}_9$ generó el producto $^2\text{H-GA}_3$, mientras que $^2\text{H-GA}_{20}$ se convirtió en $^2\text{H-GA}_1$, sin embargo no se conocen los intermediarios y precursores respectivos ni las enzimas involucradas.

El primer sistema bacteriano para el que se ha caracterizado la biosíntesis de GAs a nivel de los genes y las reacciones químicas es la rizobacteria *Bradyrhizobium japonicum*, simbiote de la soya (*Glycine max.*) (Morrone *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2014; Hershey *et al.*, 2014). El genoma de este microorganismo presenta 8 genes agrupados en un operón que incluye: 3 genes de monooxigenasas P450 (*CYP112*, *CYP114* y *CYP117*), un gen homólogo a genes de ferredoxina (*Fd*), un gen homólogo a una prenil transferasa (geranil geranil difosfato sintasa; *GGS*), dos genes de diterpeno ciclasas (copalil difosfato sintasa y *ent*-kaureno sintasa; *CPS* y *KS*) y un gen homólogo a deshidrogenasas alcohólicas/reductasas de cadena corta (*SDR*) (Fig. 4).

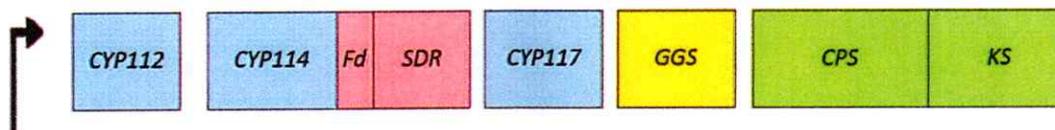


Fig. 4. Operón de genes de la biosíntesis de GAs de *B. japonicum* (Tully *et al.*, 1998).

Los dos genes de diterpeno ciclasas participan en la biosíntesis del *ent*-kaureno a partir de GGPP lo que fue demostrado por expresión heteróloga en *Escherichia coli* (Morrone *et al.*, 2009). Esto demuestra que el operón de *B. japonicum* codifica para las enzimas de la biosíntesis de GAs. Un punto interesante, que marca una diferencia con los sistemas vegetales y fúngicos, es la ausencia de genes de dioxigenasa y la posible participación de una deshidrogenasa en la biosíntesis de GAs por *B. japonicum*.

De acuerdo a la composición del operón las reacciones de oxidación serían catalizadas principalmente por monooxigenasas P450 y recibirían electrones desde el sistema ferredoxina-ferredoxina reductasa, sin embargo las funciones catalíticas de cada una de las monooxigenasas requieren ser demostradas (Fulco, 1991; Omura, 2010). En general las monooxigenasas P450 catalizan un amplio rango de reacciones, tales como hidroxilaciones, oxidaciones de alcoholes y aldehídos, desaturaciones y epoxidaciones (Hedden, 1997). Este tipo de enzimas poseen en el sitio activo un grupo hemo con un Fe^{+3} el que se oxida para formar la especie reactiva oxoferrilo ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) que participa en la oxidación del sustrato (Fig. 5). En la biosíntesis de las GAs de plantas y hongos las reacciones catalizadas por las monooxigenasas P450 corresponden a hidroxilaciones y oxidaciones de alcoholes y aldehídos. Una de las reacciones más relevantes de la biosíntesis de GAs es la oxidación del C20 aldehído para la formación de la función 19, 10- γ lactona esencial para la actividad biológica. Esta reacción requiere dos ciclos de oxidación con la participación de un intermediario formado por reacción del aldehído con un residuo de cisteína del sitio activo (Hedden, 1997) (Fig. 6).

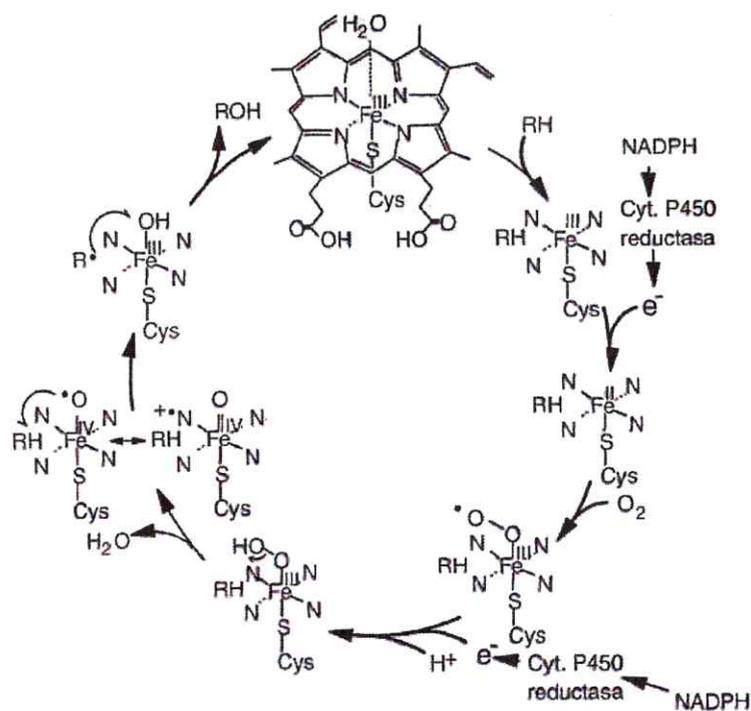


Fig. 5. Ciclo catalítico de las monooxigenasas P450 (Akhtar y Wright, 1991; Groves y Han, 1995). RH corresponde al sustrato orgánico.

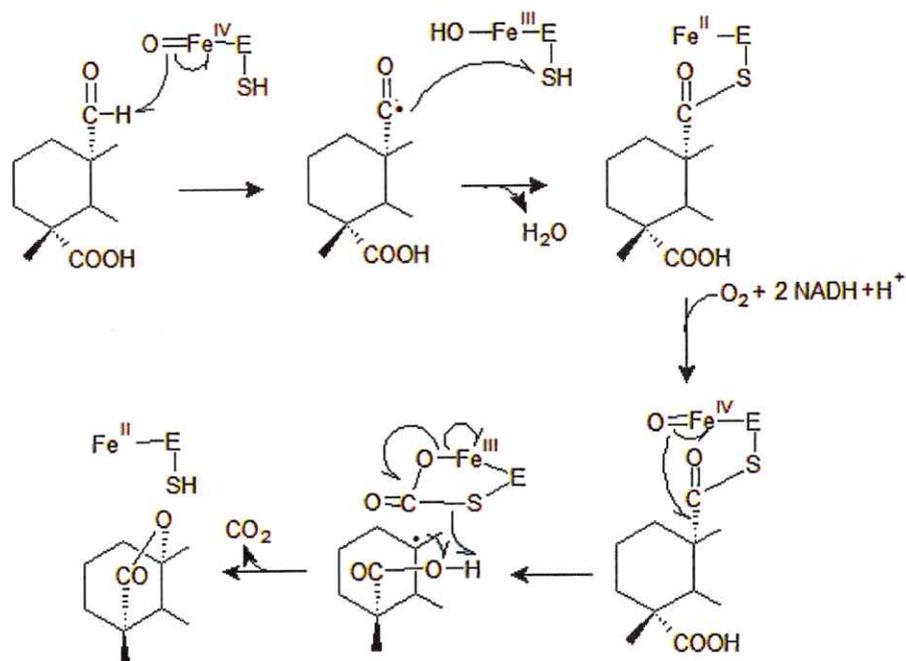


Fig. 6. Mecanismo de oxidación de C20 aldehído para formar la función 19, 10-γlactona.

Recientemente se ha descrito la presencia del operón de genes de la biosíntesis de GAs en varias otras especies de *Rhizobium* como *R. etli*, *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium loti*, y se ha demostrado que en todos los casos las ciclasas que participan en la síntesis del *ent*-kaureno se encuentran activas (Hershey *et al.*, 2014). Existen sin embargo algunas diferencias en la organización estructural del operón para algunas de las especies: en *R. etli* el gen *CYP114* y el gen de Ferredoxina (*Fd*) están fusionados, en tanto que en *S. fredii* el gen *GGS* presenta una delección. Hay un segundo gen *GGS* fuera del operón, cerca del extremo terminal de éste, pero no se ha demostrado si puede reemplazar al primero.

Con respecto a las reacciones y etapas de la biosíntesis de GAs en *B. japonicum*, nuestro grupo de investigación demostró que las oxidasas de la biosíntesis de GAs presentan una alta actividad en bacteroides de *B. japonicum* (Méndez *et al.*, 2014). En esta bacteria está presente sólo la vía no hidroxilada de la biosíntesis de GAs, que forma GA₉ como producto final, un precursor de las GAs bioactivas (Méndez *et al.*, 2014). La eficiente actividad de las oxidasas de GAs en *B. japonicum*, junto con la disponibilidad de los genes respectivos en este microorganismo, hace de *B. japonicum* un sistema muy adecuado para caracterizar las funciones catalíticas de estas enzimas, las estrategias oxidativas y sus similitudes y diferencias con las oxidasas de plantas y hongos.

En esta Tesis se investigaron las funciones catalíticas de las oxidasas de *B. japonicum* codificadas por los genes *CYP112*, *CYP114* y *SDR* del operón. Se determinó, en mutantes bloqueadas en cada uno de estos genes, qué sustratos utilizan las oxidasas por comparación de los productos de metabolización de las mutantes con los de la cepa silvestre. Particularmente interesan las reacciones de oxidación en las que podría

participar una deshidrogenasa como la etapa de oxidación del intermediario C20 alcohol (^{14}C -GA₁₅) hasta C20 aldehído o la oxidación posterior del aldehído. Además se identificó la secuencia de reacciones de la biosíntesis de GAs en otras cuatro especies de *Rhizobium*. Aunque se han descrito genes de GAs en *R. etli*, *R. tropici* y *S. fredii*, no se conocen los intermediarios, productos finales ni las reacciones químicas involucradas. De hecho se ha descrito que *R. phaseoli* produciría las GAs hidroxiladas GA₄ y GA₁ en cultivos aeróbicos (Atzhorn, 1988), a diferencia de *B. japonicum* que sintetiza GA₉ sólo en condiciones de microaerobiosis (Méndez *et al.*, 2014). Las distintas especies de *Rhizobium* podrían utilizar una secuencia biosintética común relacionada más bien con el posible rol de las GAs bacterianas en la simbiosis con las plantas de leguminosas.

HIPÓTESIS

Las monooxigenasas codificadas por los genes *CYP112* y *CYP114* del operón de genes de la biosíntesis de GAs de *B. japonicum* catalizan la oxidación del metilo 20 del precursor GA₁₂ y la oxidación en C7 del ácido *ent*-kaurenoico respectivamente. La deshidrogenasa codificada por el gen *SDR* cataliza la oxidación del intermediario C20 alcohol GA₁₅.

Los bacteroides de distintas especies de *Rhizobium* sintetizan el producto final GA₉ a través de intermediarios no hidroxilados.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las funciones catalíticas de las oxidasas de giberelinas (GAs) de *B. japonicum* codificadas por los genes *CYP112*, *CYP114* y *SDR* que participan en la biosíntesis de GA₉.

Determinar las reacciones, intermediarios y productos finales de la biosíntesis de GAs en bacteroides de distintas especies de *Rhizobium*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar, en mutantes de *B. japonicum* bloqueadas en los genes *CYP112* o *CYP114*, los productos de metabolización de sustratos de la *ent*-kaurenoico oxidasa (ácido ^{14}C -kaurenoico, ácido 7OH- ^{14}C -kaurenoico y ^{14}C -GA₁₂ aldehído) y de la C-20 oxidasa (^{14}C -GA₁₂). Comparar con los productos generados por la cepa silvestre USDA110 de *B. japonicum*.
2. Determinar qué intermediarios de la ruta biosintética se acumulan en las mutantes ΔCYP112 , ΔCYP114 y ΔSDR .
3. Demostrar cuáles de las reacciones de oxidación del metilo 20 hasta CO₂ están presentes en las mutantes ΔCYP112 , ΔCYP114 y ΔSDR . Investigar la metabolización de ^{14}C -GA₁₅ (C-20 alcohol) y de ^{14}C -GA₁₂ (C20 metilo).
4. Investigar la actividad de oxidasas de GAs en la mutante bloqueada en el gen *SDR* de *B. japonicum*.
5. Determinar la actividad de oxidasas de GAs, intermediarios y productos finales en bacteroides de *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. tropici* (simbionte de *Phaseolus vulgaris*) y *S. fredii* (simbionte de *Vigna unguiculata*). Comparar las reacciones con las descritas para *B. japonicum*.

2. MÉTODOS

2.1. Cultivos bacterianos. La cepa silvestre de *B. japonicum* y *S. fredii* fueron proporcionadas por el Dr. Reuben Peters, Iowa State University, Iowa, USA. Las cepas de *R. etli*, *R. phaseoli* y *R. tropici* fueron donadas gentilmente por la Dra. Cecilia Baginsky, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Se utilizaron cultivos líquidos de cada una de las cepas en medio YEM, que contiene extracto de levadura, manitol y sales, para inocular semillas de soya o de poroto en germinación y obtener nódulos radicales con bacteroides de las cepas respectivas de *Rhizobium*.

2.2. Mutantes de *B. japonicum* con genes bloqueados. Las mutantes Δ CYP112, Δ CYP114 y Δ SDR de *B. japonicum* bloqueadas en los genes respectivos, se obtuvieron por un procedimiento de doble recombinación, por el grupo del Dr. Reuben Peters, Iowa State University, Iowa, USA, quien mantiene un vínculo de colaboración con la Dra. María Cecilia Rojas. La mutación se chequeó en los bacteroides de cada una de las mutantes (Δ CYP112, Δ CYP114 y Δ SDR) mediante PCR. Se utilizaron partidores correspondientes a una región 400 pb antes del gen y 400 pb después del gen, por lo que las mutantes presentan una banda amplificada de 800pb a diferencia de la cepa silvestre de *B. japonicum* que presenta una banda de alrededor de 2 kb para *CYP112* y *CYP114* y de 1,6 kb para

SDR. En la Fig. 7 se muestra el resultado de la amplificación por PCR de los genes *CYP112* y *CYP114* en la cepa silvestre y mutante de *B. japonicum*.

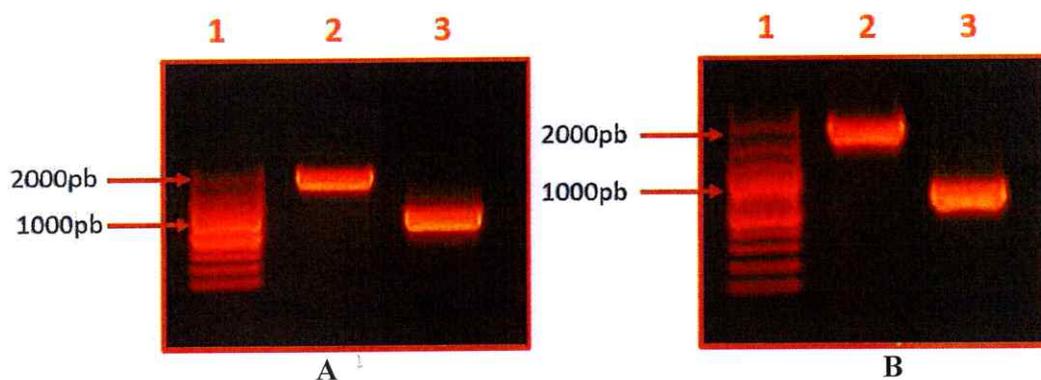


Fig. 7. Amplificación por PCR del gen *CYP112* (A) o del gen *CYP114* (B). En el carril 1 marcadores de peso molecular, GeneRuler 1kb plus Ladder DNA ThermoFisher Scientific rango 3000 pb a 100 pb; carril 2 cepa $\Delta CYP112$ (A) ó $\Delta CYP114$ (B); carril 3 cepa silvestre USDA110 de *B. japonicum*.

2.3. Obtención de nódulos de raíces de leguminosas. Se utilizaron macetas tipo Jarras Leonard, con vermiculita como soporte inerte, para el crecimiento de las plantas. Se depositaron tres semillas de soya por maceta y sobre cada semilla se agregó 2 mL de la solución stock de bacterias. Las condiciones de crecimiento de las plantas fueron a una temperatura controlada y régimen de luz dependiendo el tipo de leguminosa. La realización de riegos deben ser una a la semana, según el requerimiento de la planta, éste debe hacerse con medio nutritivo Leonard definido por Vincent, que no contiene compuestos nitrogenados (Vincent, 1970). Las plantas fueron cosechadas en floración.



A. Soya (*Glicine max.*)



B. Poroto Caupí (*Vigna unguiculata*)

Fig. 8. Plantas de 6 semanas A. Soya (*Glicine max.*) inoculadas con *B. japonicum* y B. Poroto Caupí (*Vigna unguiculata*) inoculadas con *Sinorhizobium fredii*.

2.4. Obtención de bacteroides y de extractos enzimáticos. 1-4g de nódulos se molieron en un mortero con una solución de fosfato de potasio 50 mM pH 7,0, ascorbato de sodio 200 mM y polivinil pirrolidona 60 mg/mL. El homogenizado se filtró por gasa y se centrifugó por 5 min a 500xg y luego por 20 min a 8500xg para sedimentar los bacteroides. El pellet se suspendió en TES 50 mM pH 7,5, KH_2PO_4 1mM, MgCl_2 2,5 mM se lavó tres veces con la misma solución y se utilizó para realizar los experimentos de metabolización.

2.5. Sustratos marcados con ^{14}C . El ácido *ent*- $^{14}\text{C}_4$ -kaurenoico, ácido *ent*-7 β OH- $^{14}\text{C}_4$ -kaurenoico y $^{14}\text{C}_4$ -GA₁₂ aldehído, marcados con ^{14}C en C1, C7, C12 y C18, fueron sintetizados a partir de ácido 2- ^{14}C -mevalónico con un preparado enzimático del endosperma de calabaza (Urrutia *et al.*, 2001). Los sustratos $^{14}\text{C}_1$ -GA₁₂ y $^{14}\text{C}_1$ -GA₁₅, marcados en el C17, fueron sintetizados por el Dr. L. Mander en la Universidad Nacional de Australia, Camberra.

2.6. Metabolización de precursores marcados. Se utilizó una suspensión de bacteroides preparada a partir de 1g de nódulos para los ensayos enzimáticos. Se agregaron precursores marcados (50000-300000 dpm, 0,1-0,6 nmoles) en forma de soluciones metanólicas y se incubaron por 2 días a 28°C con agitación orbital. Para los ensayos analíticos se utilizaron 50000 dpm de cada precursor y para las incubaciones preparativas 300000-500000 dpm.

2.7. Extracción y purificación de los productos. Después de la incubación el medio de reacción se centrifugó a 12000xg por 5 min y el sobrenadante se acidificó hasta pH3,0 con HCl para protonar los grupos carboxilato de las GAs y permitir su extracción desde la fase acuosa a una fase orgánica de acetato de etilo (AcOEt). Las fases AcOEt combinadas se llevaron a sequedad bajo presión reducida y se purificaron mediante extracción en fase sólida en columnas C18 (SepPack, Waters). Los eluidos metanólicos de las columnas se concentraron bajo N₂ y se

analizaron por HPLC. En todas las etapas se cuantificó la radiactividad mediante centelleo líquido.

2.8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un cromatógrafo Waters 600 equipado con una columna C18 5µm de fase reversa de 250 x 3,2mm. Las corridas consistieron en una gradiente lineal de 30 min de 60 a 100% de Metanol en H₂O pH 3,0, seguida por 6 minutos de flujo isocrático de metanol. Se utilizó un flujo de 1mL /min y se colectaron alícuotas de 1 mL para determinar en ellas la radiactividad.

2.9. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se realizó en Rothamsted Research, UK, a través de la colaboración que mantiene la Dra. M. Cecilia Rojas con el Dr. Peter Hedden. Los productos se derivatizaron como ésteres metílicos y trimetil silil éteres y se identificaron mediante los índices de Kovats así como por comparación de sus espectros de masa con los de una librería de espectros de GAs (Gaskin y MacMillan, 1991).

2.10. Cuantificación de la radiactividad. Se utilizó un contador de centelleo Perkin Elmer modelo Tricarb y líquido de centelleo compuesto por 0,125 g de (1,4-bis [2-(feniloxazolil)]-benceno (POPOP), 4 g de 2,5-difeniloxazol (PPO) y 500 mL de detergente (Arcopal) en 1L de tolueno. La eficiencia de conteo para ¹⁴C fue de 98%.

3. RESULTADOS

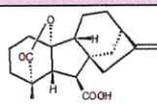
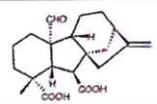
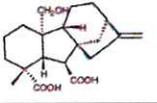
3.1. Reacciones de la biosíntesis de giberelinas en la cepa silvestre USDA110 de *B.japonicum*

La cepa silvestre USDA110 de *B. japonicum* sintetiza la giberelina no hidroxilada 19, γ 10-lactónica GA₉ como producto final de la secuencia biosintética de estas fitohormonas. Este producto se generó a partir de los precursores tempranos ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico o ácido *ent*-¹⁴C-7 β -OHkaurenoico, cuando estos kaurenoides se incubaron con una suspensión de bacteroides de esta cepa (Tabla 2). Además, en las incubaciones se acumuló la giberelina de 20 carbonos con un grupo aldehído en C20, ¹⁴C-GA₂₄. Por otra parte, la incubación de los bacteroides con ¹⁴C-GA₁₂ aldehído o ¹⁴C-GA₁₂, dos precursores posteriores al ácido *ent*-7 β -OHkaurenoico en la secuencia biosintética, se formaron, al igual que en los ensayos anteriores, los productos ¹⁴C-GA₂₄ y ¹⁴C-GA₂₄ y además se detectó el producto ¹⁴C-GA₁₅, giberelina de 20 carbonos con un grupo alcohol en C20 (Tabla 2).

El conjunto de estos resultados permitió postular una secuencia de reacciones para la biosíntesis de GA₉ a partir de ácido *ent*-kaurenoico en *B. japonicum* (Fig. 9, Méndez *et al.*, 2014). La secuencia consiste en 6 reacciones sucesivas de oxidación sobre el esqueleto carbonado del ácido *ent*-kaurenoico: hidroxilación en C7, oxidación en C6 y contracción del anillo B con generación de un grupo aldehído en C7, oxidación del C7 aldehído a C7 carboxilato y finalmente, oxidación del metilo en la posición 20 hasta CO₂ a través de los intermediarios C20 alcohol y C20 aldehído (Fig. 9). Los intermediarios en la formación

de ^{14}C -GA₉ a partir del ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico son el ácido *ent*- ^{14}C -7β-OHkaurenoico, ^{14}C -GA₁₂, ^{14}C -GA₁₅ y ^{14}C -GA₂₄ (Fig. 10).

Tabla 2. Productos de metabolización de precursores de GAs (^{14}C) por la cepa silvestre USDA110 de *B. japonicum*

Sustrato	Producto(s) Estructura(s)
Ácido <i>ent</i> - ^{14}C -kaurenoico (^{14}C -KA)	^{14}C -GA ₉ (C19) 
	^{14}C -GA ₂₄ (C20 aldehído) 
Ácido <i>ent</i> - ^{14}C -7βOHkaurenoico (^{14}C -OHKA)	^{14}C -GA ₉ (C19)
	^{14}C -GA ₂₄ (C20 aldehído)
^{14}C -GA ₁₂ aldehído	^{14}C -GA ₉ (C19)
	^{14}C -GA ₂₄ (C20 aldehído)
	^{14}C -GA ₁₅ (C20 alcohol) 
^{14}C -GA ₁₂	^{14}C -GA ₉ (C19)
	^{14}C -GA ₂₄ (C20 aldehído)
	^{14}C -GA ₁₅ (C20 alcohol)

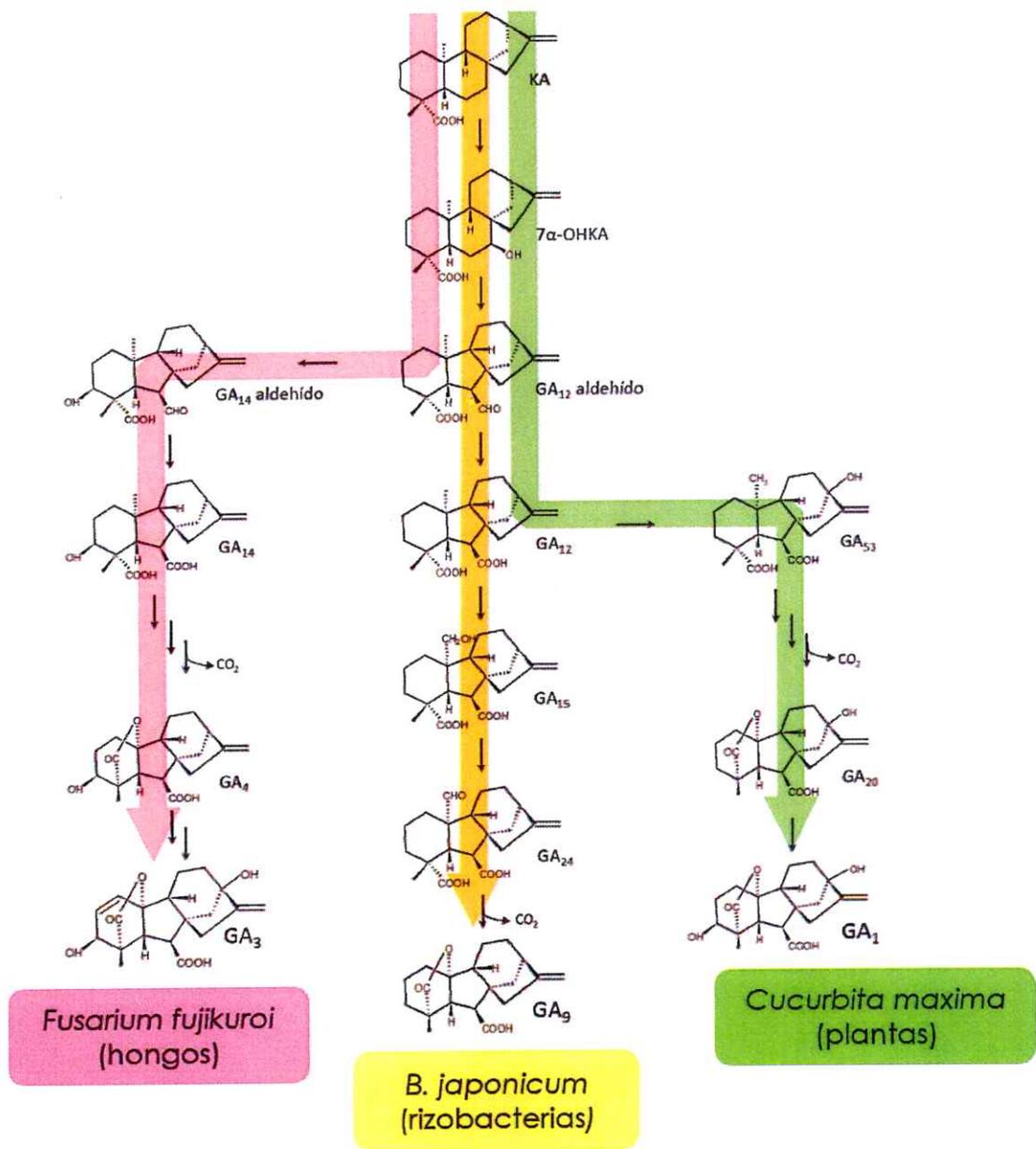


Fig. 9. Reacciones de la biosíntesis de giberelinas en *B. japonicum*, a partir del ácido ent-kaurenoico en comparación con los sistemas fúngicos y vegetales.

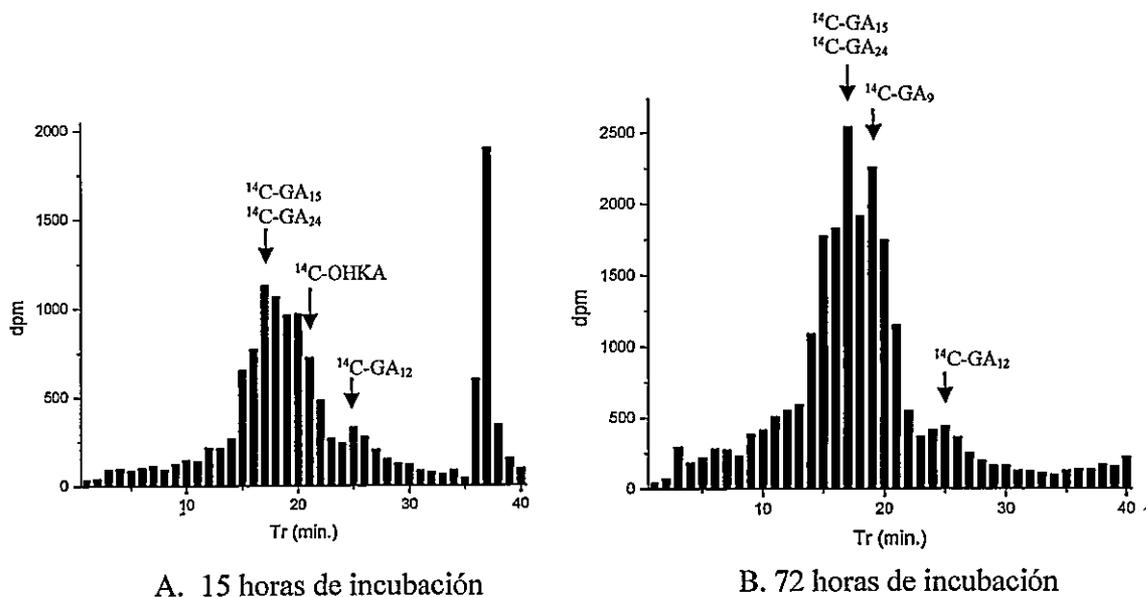


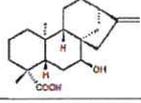
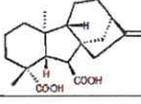
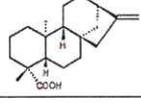
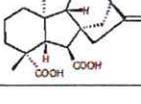
Fig. 10. Perfiles de HPLC de productos metabolización de $^{14}\text{C-KA}$ a diferentes tiempos de incubación de bacteroides de la cepa silvestre USDA 110 de *B. japonicum* con el sustrato.

Las reacciones de oxidación anteriores podrían ser catalizadas por monooxigenasas P450 y/o por una alcohol deshidrogenasa/reductasa puesto que existen en el operón de genes de la biosíntesis de GAs de *B. japonicum* 3 genes de monooxigenasas P450 (*CYP112*, *CYP114*, *CYP117*) y un gen con homología a genes de alcohol deshidrogenasas de cadena corta (*SDR*) (Tully *et al.*, 1998). Este último tipo de oxidasas no participa en la biosíntesis de GAs en sistemas vegetales o fúngicos por lo que resulta de gran interés investigar su contribución a la biosíntesis de GA_9 en *B. japonicum*. En este trabajo se abordó este objetivo mediante la caracterización de la actividad de oxidasas de GAs en mutantes de *B. japonicum*, bloqueadas en genes únicos: ΔCYP114 , ΔCYP112 o ΔSDR . Las reacciones de la secuencia biosintética de GA_9 ausentes en las mutantes indicarán las etapas catalizadas por la enzima codificada por el respectivo gen bloqueado.

3.2. Actividad de oxidasas de giberelinas en las mutantes bloqueadas Δ CYP114 y Δ CYP112 de *B. japonicum*

Con el objeto de demostrar cuáles de las reacciones catalizadas por oxidasas de GAs están ausentes en las mutantes de *B. japonicum*, se inocularon semillas de soya con cultivos líquidos de cada mutante y se crecieron las plantas hasta la fase de floración. Los nódulos radiculares simbióticos generados fueron cosechados y se aislaron de ellos bacteroides para los experimentos de metabolización. Los bacteroides de la cepa Δ CYP112 metabolizaron eficientemente al ácido *ent*- 14 C-kaurenoico. Un 93% de la radiactividad se recuperó en productos más oxidados, los que se aislaron desde el medio de incubación, se analizaron por HPLC y se identificaron mediante GC-MS (Tabla 3, Fig. 11), demostrándose que corresponden al ácido *ent*-7 β -OH 14 C-kaurenoico y 14 C-GA₁₂. El perfil de productos es muy diferente al de la cepa silvestre incubada con ácido *ent*-kaurenoico que genera GA₂₄ y GA₉ como productos (Fig. 11). No se detectaron con la cepa mutante productos posteriores a 14 C-GA₁₂ en la secuencia biosintética, lo que indica que la monooxigenasa CYP112 cataliza la oxidación del metilo 20 del 14 C-GA₁₂ y correspondería a la C20 oxidasa de GAs. Esto fue confirmado incubando los bacteroides con el precursor 14 C-GA₁₂, el cual no fue metabolizado por la cepa Δ CYP112 recuperándose intacto después de una incubación de 3 días (Tabla 3).

Tabla 3. Utilización de ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico o ¹⁴C-GA₁₂ por la cepa ΔCYP112 de *B. japonicum*

Sustrato	Producto(s)	Estructura(s)
Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-kaurenoico	Ácido <i>ent</i> -7βOH- ¹⁴ C-kaurenoico (52%)	
	¹⁴ C-GA ₁₂ (31%)	
	Producto inespecífico no identificado (10%)	
	Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-kaurenoico (7%)	
¹⁴ C-GA ₁₂	¹⁴ C-GA ₁₂ (100%)	

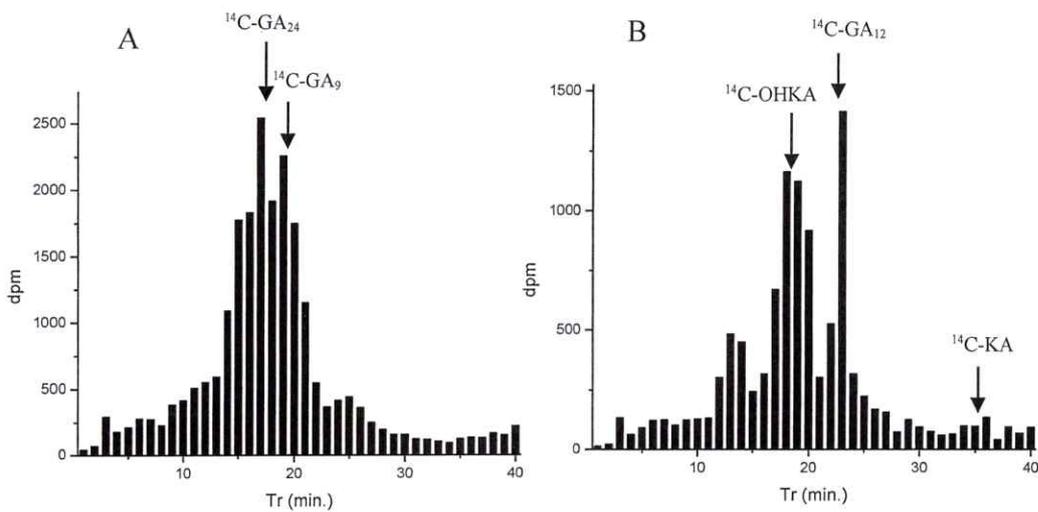
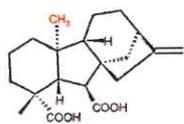
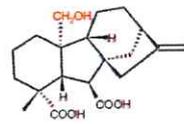


Fig. 11. Perfil de productos del ¹⁴C-KA formados por A. cepa silvestre USDA 110 de *B. japonicum* y B. la cepa ΔCYP114 de *B. japonicum*.

CYP112 podría catalizar algunas o todas las etapas de la oxidación del metilo 20 hasta CO_2 ($-\text{CH}_3 \rightarrow \text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{CHO} \rightarrow \text{CO}_2$) o bien sólo la primera, la oxidación del C20 metilo hasta C20 alcohol. Con el objeto de investigar este punto se incubaron los bacteroides de la cepa ΔCYP112 con el intermediario C20 alcohol, $^{14}\text{C}\text{-GA}_{15}$ encontrándose una conversión parcial a $^{14}\text{C}\text{-GA}_{24}$ y $^{14}\text{C}\text{-GA}_9$ (19% y 5% respectivamente (Tabla 4). La oxidación del C20 alcohol en ausencia de CYP112 sugiere que además de CYP112, la deshidrogenasa SDR catalizaría esta reacción, aunque con una eficiencia menor que en la cepa silvestre que contiene CYP112 y SDR.

Tabla 4. Actividades enzimáticas de la oxidación del metilo 20 hasta CO_2 en bacteroides de las cepas USDA110 y ΔCYP112 de *B. japonicum*

Cepa	Sustrato	Productos (%)	Reacciones presentes	Reacciones ausentes
<i>B. japonicum</i> USDA110	$^{14}\text{C}\text{-GA}_{12}$ 	$^{14}\text{C}\text{-GA}_9$ (18%) $^{14}\text{C}\text{-GA}_{24}$ (68%) $^{14}\text{C}\text{-GA}_{15}$ (14%)	$\text{GA}_{12} \rightarrow \text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_9$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO} \rightarrow \text{CO}_2$	-----
<i>B. japonicum</i> USDA110	$^{14}\text{C}\text{-GA}_{15}$ 	$^{14}\text{C}\text{-GA}_9$ (18%) $^{14}\text{C}\text{-GA}_{24}$ (81%)	$\text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_9$ $-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO} \rightarrow \text{CO}_2$	-----
<i>B. japonicum</i> ΔCYP112	$^{14}\text{C}\text{-GA}_{12}$	$^{14}\text{C}\text{-GA}_{12}$	-----	$\text{GA}_{12} \rightarrow \text{GA}_{15}$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH}$
<i>B. japonicum</i> ΔCYP112	$^{14}\text{C}\text{-GA}_{15}$	$^{14}\text{C}\text{-GA}_9$ (5%) $^{14}\text{C}\text{-GA}_{24}$ (19%) $^{14}\text{C}\text{-GA}_{15}$ (75%)	$\text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_9$ $-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO} \rightarrow \text{CO}_2$ (baja eficiencia)	-----

Con respecto a la cepa Δ CYP114 de *B. japonicum*, los bacteroides de esta cepa convirtieron al precursor $^{14}\text{C-GA}_{12}$ en los 3 productos oxidados en C20 $^{14}\text{C-GA}_{15}$ (C20 alcohol), $^{14}\text{C-GA}_{24}$ (C20 aldehído) y $^{14}\text{C-GA}_9$, producto 19, γ 10-lactónico generado por la eliminación de C20 como CO_2 . Esto evidencia la presencia de la(s) oxidasa(s) que catalizan la oxidación de C20, últimas etapas de la secuencia biosintética en Δ CYP114. En cambio los bacteroides de Δ CYP114 no transformaron al ácido *ent*- ^{14}C -kaurenoico en productos finales o intermediarios de la ruta biosintética de GAs (Tabla 5). Este precursor temprano se recuperó intacto en un 50% después de 3 días de incubación más un 10% ácido 13-OH- ^{14}C -kaurenoico, un producto de oxidación inespecífico, probablemente por oxidasas de otras vías metabólicas, más otros productos inespecíficos que no pudieron ser identificados. El ácido *ent*-7 β -OH ^{14}C -kaurenoico tampoco fue metabolizado a intermediarios de la biosíntesis de GAs por esta mutante, a diferencia del $^{14}\text{C-GA}_{12}$ aldehído que fue convertido completamente en $^{14}\text{C-GA}_{12}$, $^{14}\text{C-GA}_{15}$, $^{14}\text{C-GA}_{24}$ y $^{14}\text{C-GA}_9$ (Tabla 5). Esto indica que CYP114 catalizaría la hidroxilación en C7 del ácido *ent*-kaurenoico y la oxidación del ácido *ent*-7 β -OHkaurenoico en C6 seguida por la contracción del anillo B, mientras que la posterior oxidación de C7 en el GA_{12} aldehído (C7 aldehído) a GA_{12} (C7 carboxilato), sería catalizada por otra oxidasa, probablemente la codificada por el gen *SDR* del operón de la biosíntesis de GAs.

Tabla 5. Productos de metabolización de precursores de GAs por la cepa Δ CYP114 de *B. japonicum*

Sustrato	Productos (%)	Reacciones presentes	Reacciones ausentes
<p>Ácido <i>ent</i>-14C-kaurenoico</p> <p>(14C-KA)</p>	<p>Ácido <i>ent</i>-13OH14C-kaurenoico (10%)</p> <p>14C-KA(50%)</p> <p>Productos inespecíficos no identificados (40%)</p>	<p>Hidroxilación en C13 (inespecífica)</p>	<p>KA \rightarrow 7β-OHKA</p> <p>-CH₃ \rightarrow -CH₂OH</p>
<p>Ácido <i>ent</i>-14C-7βOHkaurenoico</p> <p>(14C-7β-OHKA)</p>	<p>Ácido 7-oxo-14C-kaurenoico (55%)</p> <p>14C-7β-OHKA (17%)</p> <p>Productos inespecíficos no identificados (28%)</p>	<p>Oxidación en C7 (inespecífica)</p>	<p>7β-OHKA \rightarrow GA₁₂ ald</p> <p>-CH₂OH \rightarrow -CHO</p>
<p>14C-GA₁₂ aldehído</p>	<p>14C-GA₉ (29%)</p> <p>14C-GA₂₄ (46%)</p> <p>14C-GA₁₅ (3%)</p> <p>14C-GA₁₂ (22%)</p>	<p>GA₁₂ ald \rightarrow GA₁₂</p> <p>-CHO \rightarrow COOH</p> <p>GA₁₂ \rightarrow GA₁₅ \rightarrow GA₂₄ \rightarrow GA₉</p> <p>-CH₃ \rightarrow -CH₂OH \rightarrow -CHO \rightarrow CO₂</p>	<p>-----</p>
<p>14C-GA₁₂</p>	<p>14C-GA₉ (4 %)</p> <p>14C-GA₂₄ (42 %)</p> <p>14C-GA₁₅ (28 %)</p> <p>14C-GA₁₂(26%)</p>	<p>GA₁₂ \rightarrow GA₁₅ \rightarrow GA₂₄ \rightarrow GA₉</p> <p>-CH₃ \rightarrow -CH₂OH \rightarrow -CHO \rightarrow CO₂</p>	<p>-----</p>

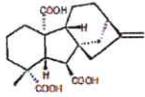
3.3. Utilización de precursores de GAs por la cepa Δ SDR de *B. japonicum*. Participación de una deshidrogenasa en la secuencia de oxidación del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA₉

Los resultados anteriores evidenciaron que las monooxigenasas CYP114 y CYP112 de *B. japonicum* catalizarían al menos las reacciones de oxidación del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA₁₂ aldehído o de GA₁₂ a GA₁₅ respectivamente, puesto que estas reacciones están ausentes en las mutantes que carecen de estos genes. La oxidación del GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ (C7 aldehído a C7 carboxilato) o de GA₁₅ hasta GA₉, presentes en las mutantes, podrían ser catalizadas por la deshidrogenasa codificada por el gen *SDR* del operón de genes de la biosíntesis de GAs, pero podrían también ser mediadas por CYP114 o CYP112 en la cepa silvestre. Con el objeto de investigar la contribución de *SDR* y/o de las monooxigenasas en las distintas etapas de oxidación del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA₉, se utilizó una mutante de la cepa USDA110 de *B. japonicum*, bloqueada en el gen *SDR* (Δ SDR). Se generaron bacteroides en plantas de soya y se incubaron por 3 días con distintos precursores de GAs (Tabla 6). La cepa Δ SDR metabolizó con una baja eficiencia al ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y al ¹⁴C-GA₁₂. El primero fue convertido en ácido 6 β ,7 β -diOH-¹⁴C-kaurenoico, producto lateral de la monooxigenasa CYP114, que se forma a partir del ácido 7 β -OH-¹⁴C-kaurenoico. No se observaron productos posteriores de la vía, lo que indica que CYP114 presenta una baja actividad en la mutante y cataliza sólo la primera reacción de la síntesis de GA₁₂, la hidroxilación sobre C7. Por otra parte el precursor ¹⁴C-GA₁₂ (C20 metilo) fue convertido en el producto C20 aldehído ¹⁴C-GA₂₄ más dos productos de oxidación inespecífica del sustrato: un isómero del ¹⁴C-GA₁₂ y la norcetona de GA₁₂, que ha perdido el C17 (que

contiene la marca) por oxidación hasta CO₂ (Tabla 6). Esto indica que CYP112 catalizaría al menos la oxidación del metilo 20 de ¹⁴C-GA₁₂ hasta aldehído (-CH₃→-CH₂OH→-CHO). La reacción de oxidación del aldehído hasta CO₂, que genera GA₉, no se detectó en ausencia de SDR lo que puede deberse a una baja actividad de CYP112 en estas condiciones o bien a que SDR es la responsable de catalizar esta reacción. Se requerirían ambas enzimas, CYP112 y SDR para catalizar efectivamente la síntesis de GA₉.

Un resultado interesante se obtuvo con el precursor ¹⁴C-GA₁₂ aldehído, el que fue utilizado eficientemente por la cepa ΔSDR y convertido en varios productos más oxidados: el isómero de ¹⁴C-GA₁₂, ¹⁴C-GA₂₅ y ¹⁴C-GA₂₄ (Tabla 6). Este resultado sugiere que CYP114 podría catalizar la oxidación del grupo aldehído en C7 del GA₁₂ aldehído hasta carboxilato, reacción que también es catalizada por SDR, como se demostró con la cepa ΔCYP114 (Tabla 5) aunque no puede descartarse la participación en esta reacción de una deshidrogenasa inespecífica presente en la bacteria. A partir de ¹⁴C-GA₁₂ aldehído el producto final es ¹⁴C-GA₂₄ en la cepa ΔSDR en vez de la 19, γ10-lactona ¹⁴C-GA₉ que se forma en la cepa silvestre, lo que apoya la participación de SDR en última etapa de la biosíntesis del producto 19, γ10 lactónico.

Tabla 6. Productos de metabolización de precursores de GAs por la cepa Δ SDR de *B. japonicum*

Precursor	Productos (%)	Reacciones presentes	Reacciones ausentes
Ácido <i>ent</i> - ^{14}C -kaurenoico (KA)	Ácido <i>ent</i> -6 β ,7 β -diOH ^{14}C -kaurenoico (49%) ^{14}C -KA(30%) Productos inespecíficos no identificados (20%)	$\text{KA} \rightarrow 7\beta\text{-OHKA}$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH}$	-----
Ácido <i>ent</i> - ^{14}C -7 β OHkaurenoico (^{14}C -7 β -OHKA)	^{14}C -GA ₁₂ (17%) ^{14}C -GA ₂₄ (63%)	$7\beta\text{-OHKA} \rightarrow \text{GA}_{12} \text{ ald} \rightarrow \text{GA}_{12}$ $-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$ $\text{GA}_{12} \rightarrow \text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24}$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$	-----
^{14}C -GA ₁₂ aldehído	^{14}C -GA ₂₄ (23%) ^{14}C -GA ₂₅ (20%)  Isómero de ^{14}C -GA ₁₂ (5%)	$\text{GA}_{12} \text{ ald} \rightarrow \text{GA}_{12}$ $-\text{CHO} \rightarrow \text{COOH}$ $\text{GA}_{12} \rightarrow \text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_{25}$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO} \rightarrow -\text{COOH}$	$\text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_9$ $-\text{CHO} \rightarrow -\text{CO}_2$
^{14}C -GA ₁₂	^{14}C -GA ₂₄ (35 %) Isómero de ^{14}C -GA ₁₂ (21%) norcetona de GA ₁₂ (5%) Productos inespecíficos no identificados (38%)	$\text{GA}_{12} \rightarrow \text{GA}_{15} \rightarrow \text{GA}_{24}$ $-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow -\text{CHO}$	$\text{GA}_{24} \rightarrow \text{GA}_9$ $-\text{CHO} \rightarrow -\text{CO}_2$

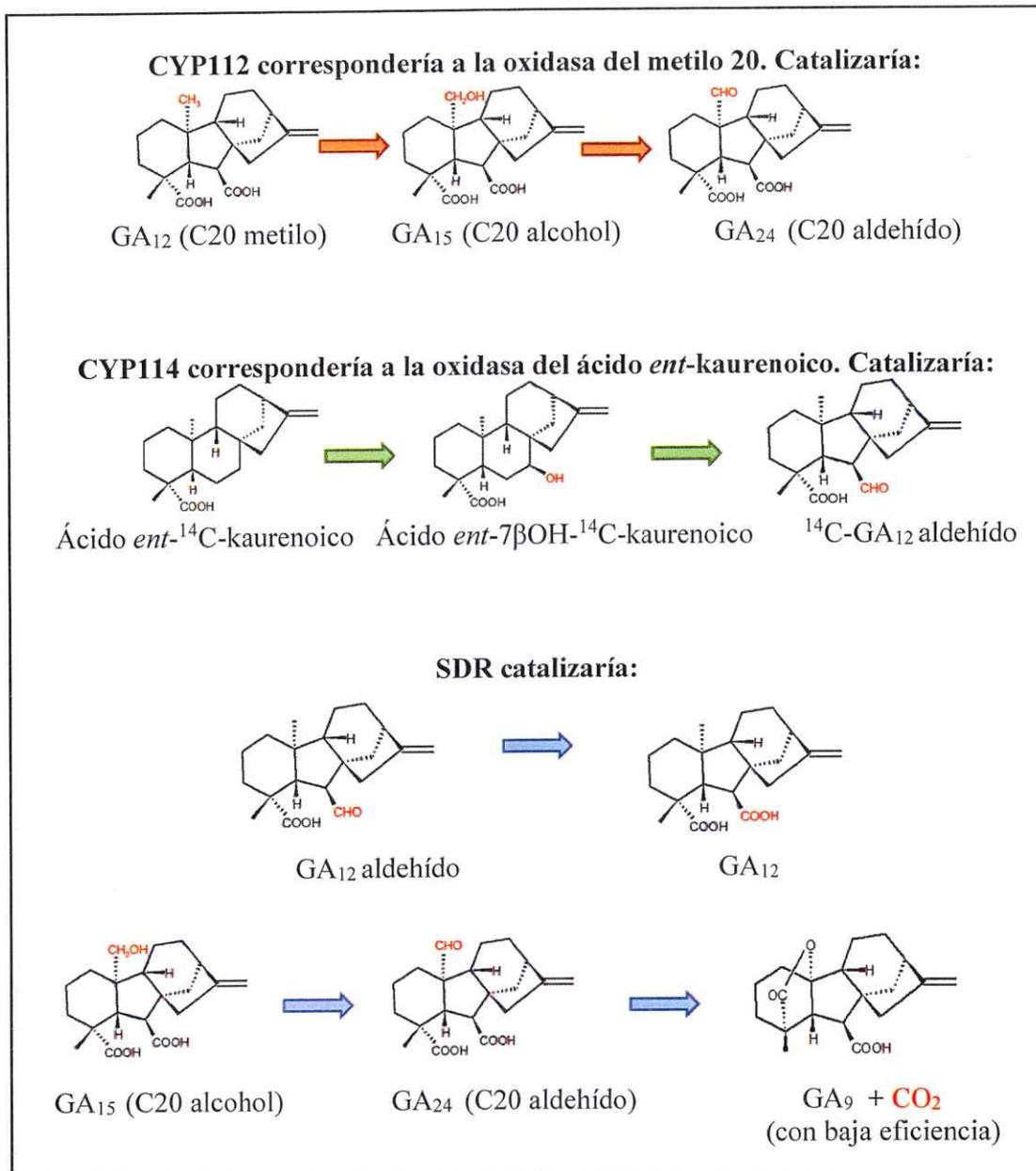


Fig. 12. Reacciones de la biosíntesis de GA₉ catalizadas por las monooxigenasas CYP114 y CYP112 y/o por la deshidrogenasa SDR.

3.4. Reacciones de la biosíntesis de GAs en otras especies del género *Rhizobium*: *Rhizobium etli*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium tropici* y *Sinorhizobium fredii*

Además de identificar las oxidasas que participan en la biosíntesis de GAs en *B. japonicum*, se investigó la actividad de dos de estas enzimas en otras 4 especies de *Rhizobium*, para averiguar si esta capacidad biosintética se encuentra distribuida en otras especies o bien es una particularidad de *B. japonicum*. Administrando a bacteroides de cada especie ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico y/o el precursor ¹⁴C-GA₁₂ se obtuvieron productos de metabolización que fueron aislados e identificados mediante GC-MS (Tablas 7, 8). El sustrato ¹⁴C-GA₁₂ fue transformado a varios productos de la ruta biosintética de GAs por los bacteroides de las 4 especies ensayadas: *R. phaseoli*, *R. etli*, *R. tropici* y *S. fredii*. En todos los casos se detectó el C20 alcohol (¹⁴C-GA₁₅), C20 aldehído (¹⁴C-GA₂₄) y el producto 19, γ10-lactónico ¹⁴C-GA₉ aunque en distinta proporción. Los bacteroides de *R. phaseoli* y *R. etli* presentaron una alta actividad de C20 oxidasa (se obtuvo prácticamente conversión completa del sustrato) en cambio quedó un 24% de sustrato remanente en la incubación con los bacteroides de *R. tropici* y un 83% de sustrato residual con bacteroides de *S. fredii* (Tabla 7) después de 3 días de incubación. En todos los ensayos anteriores con ¹⁴C-GA₁₂ sólo se obtuvieron productos no hidroxilados en C3 o C13, como se había demostrado previamente para *B. japonicum*, sin embargo podrían ocurrir reacciones de hidroxilación en C3 o C13 en etapas anteriores a GA₁₂ en la secuencia biosintética, que no se detectaran con este precursor. Esto se investigó para *R. phaseoli* y *S. fredii* administrando ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico e identificando los productos formados (Tabla 8). Los bacteroides de *R. phaseoli* convirtieron un 84% del sustrato en varios intermediarios

de la ruta biosintética: ácido *ent*-7 β OH-¹⁴C-kaurenoico, ¹⁴C-GA₁₂, ¹⁴C-GA₁₅ y ¹⁴C-GA₂₄ (Tabla 8). Los bacteroides de *S. fredii* convirtieron sólo un 25% del ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico generando dos productos tempranos: ácido *ent*-7 β OH-¹⁴C-kaurenoico y ¹⁴C-GA₁₂ (Tabla 8). Las cepas de ambas especies generaron sólo productos no hidroxilados en C3 o C13, evidenciando diferencias con respecto a hongos o plantas, cuyos productos finales e intermediarios son GAs hidroxiladas en C3 y/o en C13 (Hedden *et al.*, 2002; Sponsel y Hedden, 2004; Bömke y Tudzynski, 2009).

Tabla 7. Productos de oxidación del precursor $^{14}\text{C-GA}_{12}$ por bacteroides de distintas especies de *Rhizobium*

Especie/cepa bacteriana	Planta hospedera	Productos	%
<i>Rhizobium phaseoli</i> 1b	<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto común)	$^{14}\text{C-GA}_9$	4
		$^{14}\text{C-GA}_{24}$	32
		$^{14}\text{C-GA}_{15}$	61
		$^{14}\text{C-GA}_{12}$	3
<i>Rhizobium etli</i> 1026	<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto común)	$^{14}\text{C-GA}_9$	10
		$^{14}\text{C-GA}_{24}$	50
		$^{14}\text{C-GA}_{15}$	38
		$^{14}\text{C-GA}_{12}$	2
<i>Rhizobium tropici</i> Ñiquen 19.3	<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto común)	$^{14}\text{C-GA}_9$	14
		$^{14}\text{C-GA}_{24}$	24
		$^{14}\text{C-GA}_{15}$	38
		$^{14}\text{C-GA}_{12}$	24
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	<i>Vigna unguiculata</i> (caupi)	$^{14}\text{C-GA}_{24}$	2
		$^{14}\text{C-GA}_{15}$	15
		$^{14}\text{C-GA}_{12}$	83

Tabla 8. Intermediarios y productos finales de la biosíntesis de GAs formados a partir de ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico por bacteroides de *R. phaseoli* y *S. fredii*

Especie/cepa bacteriana	Planta hospedera	Productos	%
<i>Rhizobium phaseoli</i> 1b	<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto común)	Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-kaurenoico	16
		Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-7βOH-kaurenoico	30
		¹⁴ C-GA ₁₂	17
		¹⁴ C-GA ₂₄	6
		¹⁴ C-GA ₁₅	31
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	<i>Vigna unguiculata</i> (caupí)	Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-kaurenoico	74
		Ácido <i>ent</i> - ¹⁴ C-7βOH-kaurenoico	10
		¹⁴ C-GA ₁₂	15

4. DISCUSIÓN

El conjunto de resultados obtenidos conmutantes de la rizobacteria *B. japonicum* evidenció la participación de tres oxidasas en la conversión del ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico en el producto final ¹⁴C-GA₉: las monooxigenasas CYP114 y CYP112 más una deshidrogenasa codificada por el gen *SDR*. El patrón de metabolización de precursores de GAs por las cepas Δ CYP114 (reacciones ausentes) y Δ SDR (reacciones presentes que podrían atribuirse a CYP114), indica que CYP114 correspondería a la *ent*-kaurenoico oxidasa que cataliza 3 reacciones sucesivas de oxidación en el carbono 7, para dar la giberelina no hidroxilada GA₁₂ como producto final (hidroxilación en C7, oxidación en C6 con contracción del anillo B y generación de un grupo aldehído en C7, y finalmente oxidación del aldehído a carboxilato). Se forman como intermediarios el ácido *ent*-7 β -OH-kaurenoico y el GA₁₂ aldehído, precursores que son utilizados por la monooxigenasa CYP114 en la cepa Δ SDR, cuando se agregan en forma exógena. Por otra parte, la monooxigenasa CYP112 correspondería a la oxidasa del C20, como lo evidencia la no utilización de GA₁₂ en la cepa Δ CYP112 y la utilización de este sustrato en la cepa Δ SDR. CYP112 catalizaría la oxidación secuencial del metilo 20 del sustrato GA₁₂ por lo menos hasta aldehído (GA₂₄), a través del intermediario C20 alcohol GA₁₅. La cepa Δ SDR, que contiene CYP112 y carece de SDR, forma sólo GA₂₄ como producto final a diferencia de la cepa silvestre o la cepa Δ CYP114 que contienen tanto SDR como CYP112 y forman GA₉ lo que sugiere que la deshidrogenasa codificada por el gen *SDR* catalizaría la última etapa de oxidación del metilo 20, de aldehído a CO₂ aunque no puede descartarse que la

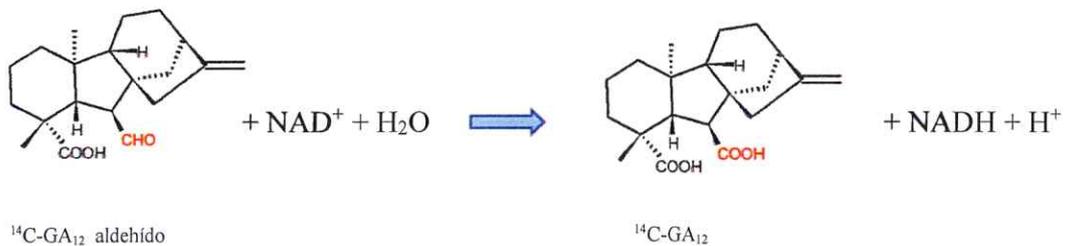
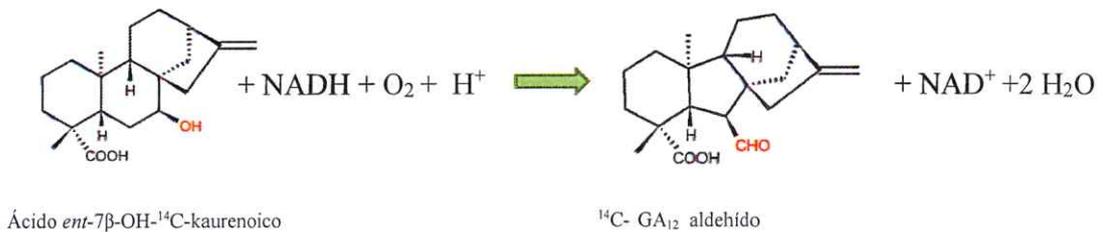
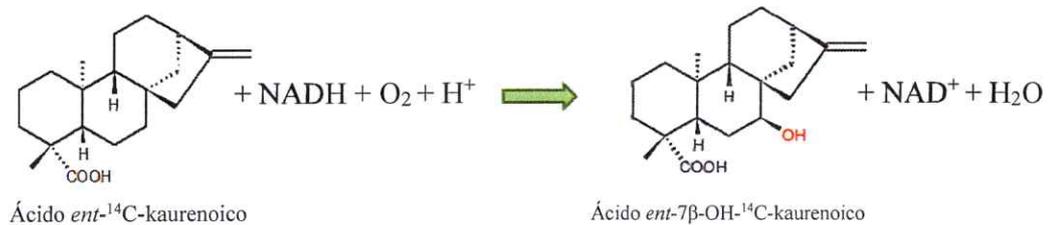
ausencia de esta reacción en Δ SDR se deba a una baja actividad de las monooxigenasas en la mutante. SDR participaría también en varias otras etapas de oxidación, anteriores en la secuencia biosintética: la oxidación de GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ (reacción catalizada eficientemente por SDR) y una contribución menor en la conversión de GA₁₅ (C20 alcohol) a GA₂₄ (C20 aldehído). De manera que en *B. japonicum* la organización molecular de la biosíntesis de GA₉ a partir del ácido *ent*-kaurenoico incluiría dos monooxigenasas que catalizan las 6 reacciones de oxidación más una deshidrogenasa que participaría adicionalmente en algunas etapas, principalmente en la reacción de oxidación del GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂.

Una observación interesante se refiere a que algunas de las mutantes que carecen de genes individuales presentan una menor actividad de las oxidasas de GAs restantes que la cepa silvestre. Por ejemplo, en la cepa Δ CYP114 que carece de *ent*-kaurenoico oxidasa, el sustrato de la C20 oxidasa ¹⁴C-GA₁₂ es transformado sólo en un 74% después de 3 días de incubación mientras que en la cepa silvestre se obtiene conversión completa. En la cepa Δ SDR el ácido *ent*-¹⁴C-kaurenoico es transformado sólo a ácido *ent*-7 β -OH-¹⁴C-kaurenoico, evidenciado como el producto lateral ácido *ent*-6 β ,7 β -diOH-¹⁴C-kaurenoico, mientras que los precursores ¹⁴C-GA₁₂ aldehído y ¹⁴C-GA₁₂ generan el C20 aldehído ¹⁴C-GA₂₄ como producto final y no ¹⁴C-GA₉ junto con varias reacciones no específicas como la formación de un isómero de ¹⁴C-GA₁₂ o la norcetona de ¹⁴C-GA₁₂ que compiten con las reacciones de oxidación del metilo 20. Estos resultados sugieren que las monooxigenasas CYP114 y CYP112 podrían requerir de la interacción con SDR para su máxima actividad, lo que ocurriría en la cepa silvestre, además de interactuar con

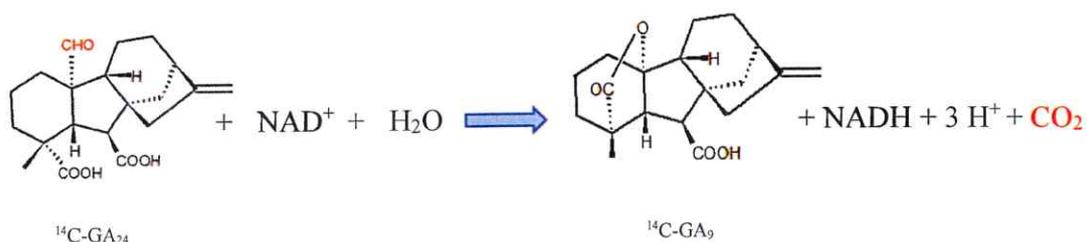
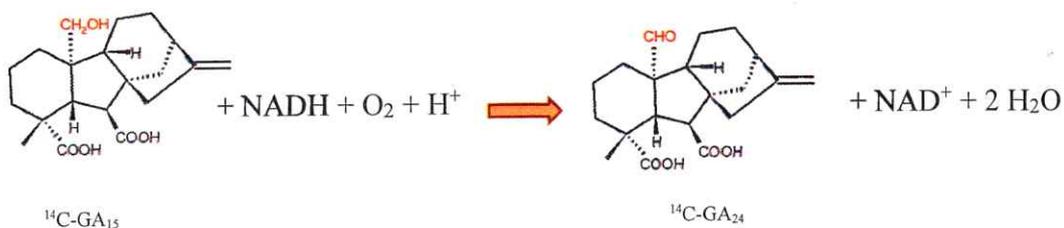
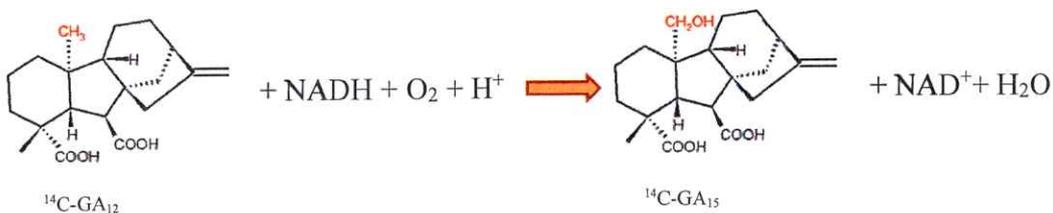
el sistema ferredoxina-ferredoxina reductasa que aporta electrones para la reacción de oxidación con O_2 .

Las reacciones catalizadas por monooxigenasas P450 en sistemas bacterianos requieren O_2 y NADH (Fulco *et al.*, 1991), en tanto que las reacciones principales catalizadas por la aldehído deshidrogenasa SDR requieren NAD^+ y H_2O (Ki Ho y Weiner, 2005). SDR sería más bien una aldehído deshidrogenasa que utiliza GA_{12} aldehído o GA_{24} en la biosíntesis de GA_9 .

Para la oxidación de C7 las reacciones serían las siguientes:



Para la oxidación del metilo 20 de $^{14}\text{C-GA}_{12}$ las reacciones podrían ser:



La participación de una deshidrogenasa en la biosíntesis de GA_9 a partir de ácido *ent*-kaurenico, además de dos monooxigenasas P450, en los bacteroides de *B. japonicum* evidencia una organización molecular para la biosíntesis de GAs diferente a la que presentan los sistemas vegetales o fúngicos. En plantas, como *Arabidopsis thaliana*, calabaza (*Cucurbita máxima*), maíz o cebada una monooxigenasa P450 asociada a membranas cataliza las tres etapas de oxidación del ácido *ent*- ^{14}C -kaurenico hasta GA_{12} (Helliwell *et al.*, 2001; Sponsel y Hedden, 2004). En arveja, dos genes codifican para *ent*-kaurenico oxidasas y se expresan en todos los tejidos aéreos (Davidson *et al.*, 2003). El ácido *ent*- 7β -OH-kaurenico y GA_{12} aldehído son

intermediarios en esta reacción. Todas las reacciones ocurren sobre el mismo centro carbonado (C7) lo que explica la multifuncionalidad de esta oxidasa. Adicionalmente se ha encontrado en *C. máxima* una C7 oxidasa que es una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato que oxida al GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ (Lange, 1997). Ésta puede ser una enzima específica o no específica presente en la planta que puede catalizar la última etapa de la síntesis de GA₁₂ y no las anteriores. Más bien podría ser una actividad inespecífica puesto que se han encontrado varias aldehído oxidasas en maíz y *Arabidopsis thaliana* que oxidan un amplio rango de aldehídos (Seo *et al.*, 1998). De manera que dos enzimas participarían en la oxidación de GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ en *C. máxima*. Las etapas posteriores, incluyendo la oxidación de C20, son catalizadas por dioxigenasas solubles dependientes de 2-oxoglutarato en plantas, que catalizan las 3 etapas de oxidación del metilo 20 hasta CO₂. Por otra parte, tanto en el hongo *F. fujikuroi* como en el hongo *Sphaceloma manihoticola* la *ent*-kaurenoico oxidasa y la C20 oxidasa son monooxigenasas P450 dependientes de NADPH y asociadas al retículo endoplásmico (Rojas *et al.*, 2001; Tudzynski *et al.*, 2002; Bomke *et al.*, 2008). Ambas son enzimas multifuncionales. A diferencia de la *ent*-kaurenoico oxidasa de plantas, la *ent*-kaurenoico oxidasa fúngica presenta actividad de 3β-hidroxisasa además de C7 oxidasa (Rojas *et al.*, 2001) generando GA₁₄ (C7 carboxilato, C3 hidroxilado) como producto final.

Otra diferencia entre el sistema bacteriano y los sistemas vegetales o fúngicos es la naturaleza de los productos finales de la ruta biosintética. Las plantas producen GAs C19 hidroxiladas en C3 y/o en C13: GA₄, GA₁, GA₃ que son activas como fitohormonas (Sponsel y Hedden, 2004). Los sistemas fúngicos también producen este tipo de productos, GA₃ para *F. fujikuroi*, GA₄ para *S. manihoticola* (Bömke y Tudzynski, 2009;

Tudzynski, 2005). Se encontró que tanto *B. japonicum* como *R. phaseoli*, *R. etli*, *R. tropici* y *S. fredii* sintetizan GA₉ como producto final, y no presentan actividad de C3 ni C13 hidroxilasas de GAs. La naturaleza de los genes, las enzimas y las reacciones químicas de la biosíntesis de GAs en las distintas especies de *Rhizobium* estudiadas descartan la posibilidad de una transferencia horizontal de genes desde las plantas hospederas a cada uno de estos simbioses. Más bien las bacterias habrían adquirido en forma independiente esta capacidad biosintética, la que diferiría de la de plantas y hongos. Para *B. japonicum* encontramos que la oxidación de GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ puede ser catalizada por SDR y además por CYP114. La primera utiliza NAD⁺ como cofactor y la segunda NADH a través de la ferredoxina/ferredoxina reductasa. La deshidrogenasa codificada por el gen SDR podría utilizar el NAD⁺ generado por CYP114 en la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico para oxidar el GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂ y utilizaría el NAD⁺ generado por CYP112 en la oxidación del GA₁₂ para catalizar la oxidación del intermediario final C20 aldehído (GA₂₄) hasta CO₂ y GA₉.

Las actividades enzimáticas de la biosíntesis de GAs, particularmente las actividades de oxidasas, se encontraron en varias otras especies de *Rhizobium* además de *B. japonicum* aunque en distinta magnitud. Particularmente *R. phaseoli* y *R. etli* presentaron una alta actividad de C20 oxidasa y de *ent*-kaurenoico oxidasa en tanto que *S. fredii* estas enzimas presentaron una menor actividad. Estas bajas actividades podrían deberse a un menor nivel de las enzimas por expresión reducida de los genes, a diferentes condiciones de inducción de los genes con respecto a *B. japonicum* o bien a diferencias en la eficiencia catalítica de las enzimas específicas. El hecho de que estén reducidas todas las actividades ensayadas sugiere más bien diferencias en algún factor regulatorio común.

En todos los casos sólo se formaron productos no hidroxilados en C3, C13 como en *B. japonicum* lo que sugiere que en general estos simbiontes de leguminosas sintetizarían GA₉, un precursor de las GAs bioactivas, el que podría ser entregado a la planta para ser convertido en GA₁, GA₄ y/o GA₃, mediante reacciones de hidroxilación y/o desaturación.

Las oxidadas de GAs de plantas y hongos son en general enzimas multifuncionales que oxidan sucesivamente un determinado centro carbonado del sustrato. Por ejemplo, la oxidación del metilo en C19 del *ent*-kaureno en tres etapas hasta carboxilato, la oxidación del metileno en C7 del ácido *ent*-kaurenoico hasta carboxilato o la oxidación del metilo en C20 hasta CO₂. Aunque pueden ser monooxigenasas o dioxigenasas, tienen en común la utilización de O₂ como agente oxidante y la participación de un átomo de Fe en sus centros activos, Fe hemínico (monooxigenasas) o Fe no hemínico (dioxigenasas) (Hedden, 1997). El Fe, en el estado de oxidación +2, tiene la función de activar al O₂ para la reacción de oxidación por lo que estas enzimas requieren electrones para reducir al Fe³⁺ los que provienen ya sea del NAD(P)H (para las monooxigenasas) o bien del 2-oxoglutarato (para las dioxigenasas).

Las dos monooxigenasas de GAs de *B. japonicum* caracterizadas funcionalmente en esta tesis, son también enzimas multifuncionales. CYP114 catalizaría 3 etapas de oxidación sobre el C7 del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA₁₂ mientras que CYP112 cataliza por lo menos dos reacciones de oxidación sobre el metilo 20 de GA₁₂. En ambos casos el mecanismo de oxidación incluiría un centro de Fe hemínico, que recibiría electrones desde el NADH a través del sistema ferredoxina-ferredoxina reductasa bacteriano. El operón de genes de la biosíntesis de GA₉ de *B. japonicum* contiene un gen homólogo a genes de

ferredoxina (Tully *et al.*, 1998), en tanto que la ferredoxina reductasa estaría codificada por un gen ubicado fuera del operón. De hecho existen en el genoma de *B. japonicum* por lo menos 3 genes de ferredoxina (Hauser *et al.*, 2007), que podrían codificar para las proteínas transportadoras de electrones asociadas a CYP114 y/o CYP112.

Además de las monooxigenasas, participa en la biosíntesis de GA₉ en *B. japonicum* otro tipo de oxidasa que no está presente en los sistemas vegetales o fúngicos, codificada por el gen *SDR* del operón. Este gen fue descrito por Tully (1998) como un gen homólogo a genes de alcohol deshidrogenasas/reductasas de cadena corta. Las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta se caracterizan por tener 250 residuos de aminoácido y dos dominios principales, uno que une el NAD(P)H y otro que une el sustrato oxidable (Kavanagh *et al.*, 2008). En el sitio catalítico hay 3 residuos conservados que participan en la catálisis: una tirosina, (en forma de tiosinato, que actúa como la base que abstrae un protón del sustrato), una lisina, ubicada vecina a la tirosina, que junto al NAD⁺ reduce el pKa de la tirosina y una serina que estabiliza y polariza el carbonilo del sustrato (Kavanagh *et al.*, 2008). Este tipo de alcohol deshidrogenasas son diferentes de las alcohol deshidrogenasas de cadena media, dependientes de Zn²⁺ o de las aldo-ceto reductasas. De acuerdo a los resultados obtenidos para el metabolismo de precursores de GAs en las mutantes bloqueadas de *B. japonicum*, *SDR* catalizaría la oxidación de GA₁₂ aldehído y GA₂₄, aunque también oxidaría al intermediario C20 alcohol GA₁₅, por lo que *SDR* funcionaría más bien como una aldehído deshidrogenasa que como una alcohol deshidrogenasa. Las aldehído deshidrogenasas presentan un mecanismo de oxidación muy diferente al de monooxigenasas o dioxigenasas: la oxidación ocurre por transferencia de electrones, en forma de hidruro, hasta el NAD⁺ junto con la adición de agua al carbono

oxidado. Por lo tanto, en las reacciones catalizadas por aldehído deshidrogenasas, el oxígeno incorporado al sustrato proviene del H₂O y no del O₂. Generalmente un residuo de cisteína del sitio activo actúa como nucleófilo formando un intermediario tioéster con una parte del sustrato (Marchitti S.A. *et al.*, 2008). Si SDR es una aldehído deshidrogenasa, la conversión del C₂₀ alcohol GA₁₅ en GA₂₄ (C₂₀ aldehído) podría corresponder a una reacción inespecífica catalizada por una alcohol deshidrogenasa de otras vías metabólicas presente en *B. japonicum*.

La identificación de las reacciones de la biosíntesis de GAs que están ausentes en la mutantes de *B. japonicum* indican indirectamente cuáles son las reacciones catalizadas en cada caso, sin embargo la demostración inequívoca de la funcionalidad de las monooxigenasas CYP112, CYP114 o de la deshidrogenasa SDR requeriría de experimentos adicionales como la expresión heteróloga y la caracterización funcional en una bacteria que no contenga genes de la biosíntesis de GAs, como *E. coli*. Particularmente interesante resultaría la expresión heteróloga de *SDR*, que permitiría confirmar las reacciones catalizadas por esta oxidasa y definir si corresponde a una aldehído deshidrogenasa o a una alcohol deshidrogenasa.

Hasta la fecha todas las especies bacterianas en las que se han reportado genes de la biosíntesis de GAs (Tully *et al.*, 1998; Morrone *et al.*, 2009; Hershey *et al.*, 2014) y que presentan una actividad significativa de las enzimas de esta vía metabólica, pertenecen a las rizobiáceas. Se han descrito GAs en cultivos de otras bacterias como *A. brasilense* y *A. lipoferum* (Janzen *et al.*, 1992; Bottini *et al.*, 1989), *A. diazotrophicus*, *H. seropedicae* (Bastián *et al.*, 1998) y *Bacillus sp.* (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001) pero no se ha demostrado en estos sistemas actividad de oxidasas de GAs. La caracterización funcional

de mutantes de *B. japonicum* que carecen de genes individuales de la biosíntesis de GA₉ representa una contribución importante a la comprensión detallada de este proceso biosintético en sistemas bacterianos tanto a nivel de las reacciones químicas, los genes y las enzimas que participan.

5. CONCLUSIONES

- En las 6 reacciones de la biosíntesis de GA₉ a partir de ácido *ent*-kaurenoico por la rizobacteria *B. japonicum*, participan dos monooxigenasas asociadas al citocromo P450 y una deshidrogenasa.
- La monooxigenasa CYP114 cataliza 3 reacciones sucesivas de oxidación, en los carbonos 6 y 7 del ácido *ent*-kaurenoico, para dar la giberelina no hidroxilada GA₁₂ a través del ácido *ent*-7β-OH-kaurenoico y el GA₁₂ aldehído como intermediarios.
- La monooxigenasa CYP112 catalizaría la oxidación secuencial del metilo 20 del sustrato GA₁₂ hasta C20 aldehído (GA₂₄), a través del intermediario C20 alcohol, GA₁₅.
- La deshidrogenasa codificada por el gen *SDR* cataliza eficientemente la oxidación en C7 del GA₁₂ aldehído hasta GA₁₂.
- Además, *SDR* catalizaría la última etapa de oxidación del metilo 20, de C20 aldehído (GA₂₄) hasta CO₂. Podría también contribuir a la conversión de GA₁₅ en GA₂₄.
- Las monooxigenasas de la biosíntesis de GA₉ podrían requerir de la interacción con *SDR* para su funcionalidad completa.
- Al igual que *B. japonicum*, los bacteroides de simbioses de *Phaseolus vulgaris* *R. phaseoli*, *R. etli* y *R. tropici* y del simbiote de *Vigna unguicula*, *S. fredii* presentan actividad de oxidasas de GAs. Estas enzimas oxidan en C7, C6 y C20 el esqueleto carbonado de los precursores.

- Tanto a partir de ácido *ent*-kaurenoico como del precursor GA₁₂ se formaron productos no hidroxilados en C3 ni C13, con GA₉ como producto final. Ninguna de las especies estudiadas presentó actividad de C3 o C13 hidroxilasa.
- La capacidad de sintetizar GA₉ de que presentan distintas especies de *Rhizobium*, formaría parte de la simbiosis entre estas bacterias y las plantas de leguminosas.

6. REFERENCIAS

- Adams, P.A.,** Montague, M.J., Tefner, M., Rayle, D.L., Ikuma, H., Kaufman, P.B. (1975). Effect of gibberellic acid on the plasticity and elasticity of *Avena* stem segments. *Plant Physiol.* 56:757-760.
- Akhtar, M.** and Wright, J.N. (1991). A unified mechanistic view of oxidative reactions catalyzed by P-450 and related Fe-containing enzymes. *Nat. Prod. Rep.* 8: 527-551.
- Atzhorn, R.,** Crozier, A., Wheeler, C., Sandberg, G. (1988). Production of gibberellins and indole 3-acetic acid by *Rhizobium phaseoli* in relation to nodulation of *Phaseolus vulgaris* roots. *Planta* 175:532-538.
- Bastián, F.,** Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.* 24:7-11.
- Bhattacharya, A.,** Kourmpetli, S., Ward, D.A., Thomas, S.G., Gong, F., Powers, S.J., Carrera, E., Taylor, B., Nuñez de Cáceres Gonzalez, F., Tudzynski, B., Phillips, A.L., Davey, M.R., Hedden, P. (2012). Characterization of the fungal gibberellins desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. *Plant Physiol.* 160: 837-845.
- Ben-Tal Y.** (1990). Effects of gibberellin treatments on ripening and berry drop from thompson seedless grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 41:142-146.
- 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. Environ. Microbiol.* 74:5325-5339.
- Bömke, C.** and Tudzynski, B. (2009). Diversity, regulation and evolution of the gibberellins biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochem.* 70:1876-1983.
- Bottini, R.,** Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P. (1989). Identification of gibberellins A₁, A₃, and isoA₃ in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* 90:45-47.

Bottini, R., Cassán, F., Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65:497-503.

Curtis, P.J. and Cross, B.E., (1954). Gibberellic acid. A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. *Chem. Ind.* 1066.

Davidson, S.E., Elliott, R.C., Helliwell, C.A., Poole, A.T., Reid, J.B. (2003). The pea gene *NA* encodes *ent*-kaurenoic acid oxidase. *Plant Physiol.* 131:335-344.

Fulco, A.J. (1991). P450_{BM-3} and other inducible bacterial cytochromes: Biochemistry and regulation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 31:177-203.

Gaskin, P. and 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.

Graebe, J.E. (1987). Gibberellin biosynthesis and control. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:419-465.

Groot, S.P., Bruinsman, J., Karssen, C.M. (1987). The role of endogenous gibberellins in seed and fruit development of tomato: studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol. Plant.* 71:184-190.

Groves, J. T. and Han Y. Z., (1995). Models and mechanisms of cytochrome P-450 action. *In* cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry (P. R. Ortiz de Montellano, ed.) pp3-48. Plenum Press, New York, NY. ISBN 0-306-45141-7.

Gutiérrez-Mañero, F., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* 111:206-211.

Hauser, F., Pessi, G., Friberg, M., Weber, C., Rusca, N., Lindemann, A., Fischer, H. M., and Hennecke, H. (2007). Dissection of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA⁺ σ 54 regulons, and identification of a ferredoxin gene (*fdxN*) for symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Genet. Genomics* 278:255-271.

Hedden, P. (1997). The oxidases of gibberellin biosynthesis: Their function and mechanism. *Physiol. Plant.* 101:709-719.

- Hedden, P.** (1999). Recent advances in gibberellin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 50:553-563.
- Hedden, P.** and Kamiya, Y. (1997). Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:431-460.
- Hedden, P.** and Proebsting, W.M. (1999). Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* 119:365-370.
- 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.,** Chandler, P.M., Poole, A., Olive, M.R., Dennis, E.S., and Peacock, W.J. (2001a). The CYP88A cytochrome P450, *ent*-kaurenoic acid oxidase, catalyzes three steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:2065-2070.
- Hershey, D.M.,** Lu, X., Zi, J. and Peters, R.J. (2014). Functional conservation of the capacity for *ent*-kaurene biosynthesis and an associated operon in certain rhizobia. *Journal of Bacteriology.* 196:100-106.
- Ho, Kwok Ki;** Weiner, Henry (2005). Isolation and characterization of an aldehyde dehydrogenase encoded by the *aldB* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:1067-73.
- Janzen, R.,** Rood, S., Dormar, J. and McGill, W. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. *Soil Biol. Biochem.* 24:1061-1064.
- Kavanagh, K. L.,** Jörnvall, H., Persson, B. & Oppermann, U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3895-3906.
- Lange, T.,** (1997). Cloning gibberellin dioxygenase genes from pumpkin endosperm by heterologous expression of enzyme activities in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:6553-6558.
- Lodwig, E.,** Poole, P. (2003). Metabolism of Rhizobium bacteroids. *Critical Rev. in Plant Sciences.* 22:37-78.
- 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.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., Vasiliou, V.** (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4:697-720.
- Méndez, C., Baginsky, C., Hedden, P., Gong, F., Carú, M. and Rojas, M.C.** (2014). Gibberellin oxidase activities in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Phytochemistry*. 98:101-109.
- Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Gunjune, K., Anterola, A., Bender, K., Peters, R.** (2009). Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate *ent*-copalyl diphosphate and *ent*-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Letters*. 583:475-480.
- Omura, T.** (2010). Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J. Biochem.* 147:297-306.
- Ozga, J.A., Van Huizen, R., Reinecke, D.M.,** (2002). Hormone and Seed-Specific Regulation of Pea Fruit Growth. *Plant Physiol.* 128:1379-1389.
- Pérez, F.J., Viani C., Retamales J.** (2000). Bioactive gibberellins in seeded and seedless grapes: Identification and changes in content during berry development. *Am. J. Enol. Viticulture*. 51:315-318.
- Phinney, B.O.** (1983). The history of gibberellins. In: *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*. Praeger Publishers USA (Ed. Crozier A.). 1:19:52.
- 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.
- Seo, M., Akaba, Sh., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., Koshiba, T.** (1998). Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 116:687-693.
- Sponsel, V.M.,** (2003). Gibberellins. In: *Encyclopedia of hormones*, Norman A.W. (eds) vol 2. Academic Press. pp 29-40.

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

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

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

Tully, R.E., Van Berkum, P., Lovins, K.W., Keister, D.L. (1998). Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1398:243-255.

Urrutia, O., Hedden, P., and Rojas M. C. (2001). Monooxygenases involved in GA₁₂ and GA₁₄ synthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Phytochemistry*. 56:5005-5511.

Vincent, J. M., (1970). A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria (IBP Handbuch No. 15 des International Biology Program, London). XI u. 164 S., 10 Abb., 17 Tab., 7 Taf. Oxford-Edinburgh 1970: Blackwell Scientific Publ., 45 s.

Wenzel, C.L., Williamson, R.E., and Wasteneys, G.O. (2000). Gibberellin induced changes in growth anisotropy precede gibberellin-dependent changes in cortical microtubule orientation in developing epidermal cells of barley leaves. Kinematic and cytological studies on a gibberellin-responsive dwarf mutant, M489. *Plant Physiol.* 124:813-822.