

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**Biosíntesis de giberelinas lactónicas por el  
hongo *Sphaceloma rhois*.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO

**PAULA ANDREA FUENTES AZÓCAR**

Santiago, 2007

PROFESOR  
PATROCINANTE  
**Dra. María Antonieta Valenzuela**  
Departamento de Bioquímica  
Facultad de Cs Qcas y Farmacéuticas

DIRECTOR DE MEMORIA  
**Dra. María Cecilia Rojas G.**  
Departamento de Química  
Facultad de Ciencias

# INDICE

|  |      |
|--|------|
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | IV   |
| <b>LISTA DE TABLAS</b>   | V    |
| <b>RESUMEN</b>   | VI   |
| <b>ABSTRACT</b>  | VIII |
| <b>ABREVIATURAS</b>  | X    |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>   | 1    |
| <b>HIPOTESIS</b>   | 11   |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b>  | 11   |
| <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>   | 12   |
| <b>2. MATERIALES Y METODOS</b>   |      |
| 2.1. Reactivos.  | 13   |
| 2.2. Síntesis de precursores de GAs marcados con <sup>14</sup> C.  | 13   |
| 2.3. Cepas fúngicas y condiciones de cultivo.  | 14   |
| 2.4. Preparación de microsomas.  | 15   |
| 2.5. Ensayos enzimáticos.  | 16   |
| 2.6. Experimentos de metabolización de precursores de giberelinas.   | 17   |
| 2.7. Cinética de metabolización de ácido <i>ent</i> -7 $\alpha$ -hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico, ácido <i>ent</i> -[ <sup>14</sup> C]kauradienoico y [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> . | 17   |

|   |    |
|---|----|
| 2.8. Extracción de [ <sup>14</sup> C]GAs desde el filtrado del cultivo. | 19 |
| 2.9. Purificación de las giberelinas por extracción en fase sólida.     | 19 |
| 2.10. Condiciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).   | 19 |
| 2.11. Cromatografía en capa fina (TLC).                                 | 22 |
| 2.12. Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido.         | 22 |
| 2.13. Identificación de los productos de metabolización por GC/MS.      | 23 |

### 3. RESULTADOS

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Reacciones de la biosíntesis de GA <sub>4</sub> por <i>S. rhois</i> .  |    |
| Metabolización de precursores marcados con <sup>14</sup> C por cultivos líquidos.   | 24 |
| 3.2. Efecto de compuestos nitrogenados sobre la velocidad de utilización del ácido <i>ent-7α</i> -hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico por cultivos de <i>S. rhois</i> . | 29 |
| 3.3. Biosíntesis de kaurenolidos y ácidos fujenoicos por <i>S. rhois</i> .  | 32 |
| 3.4. Oxidación de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por cultivos de <i>S. rhois</i> . Intermediarios y productos.  | 37 |
| 3.5. Participación de monooxigenasas P450 en la biosíntesis de giberelinas por <i>S. rhois</i> .  | 39 |

### 4. DISCUSIÓN 42

### 5. CONCLUSIONES 56

### 6. REFERENCIAS 58

### 7. ANEXO: ESPECTROS DE MASA A-I

## LISTA DE FIGURAS.

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Efecto del ácido giberélico sobre el crecimiento de bayas de uva.  | 2  |
| <b>Figura 2.</b> Estructura de las giberelinas biológicamente activas.  | 2  |
| <b>Figura 3.</b> Mapa físico del cluster de genes de la biosíntesis de giberelinas en <i>F. fujikuroi</i> .   | 3  |
| <b>Figura 4.</b> Vía de síntesis de giberelinas en el hongo <i>F. fujikuroi</i> .   | 6  |
| <b>Figura 5.</b> Vía de síntesis de GAs en <i>Phaeosphaeria sp.</i> L487.   | 9  |
| <b>Figura 6.</b> Perfiles de HPLC para los productos de metabolización de ácido <i>ent-7<math>\alpha</math></i> -hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico por <i>S. rhois</i> en medios de cultivo con y sin compuestos nitrogenados.  | 30 |
| <b>Figura 7.</b> Cinética de aparición de producto a partir de ácido <i>ent-7<math>\alpha</math></i> -hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico por cultivos de <i>S. rhois</i> en medios sin N, con NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,92 g/L , con NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 4,8 g/L y con glutamina 3,64 g/L. | 31 |
| <b>Figura 8.</b> Curvas de progreso de la biosíntesis de kaurenolidos a partir de ácido <i>ent</i> -[ <sup>14</sup> C]kauradienoico.  | 36 |
| <b>Figura 9.</b> Perfil cromatográfico en HPLC para los productos de metabolización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por cultivos de <i>S. rhois</i> .   | 37 |
| <b>Figura 10.</b> Curva de progreso de la metabolización de [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> por cultivos de <i>S. rhois</i> .  | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Ruta biosintética de GA <sub>4</sub> propuesta para <i>Sphaceloma rhois</i> .   | 43 |
| <b>Figura 12.</b> Secuencia propuesta para la oxidación de GA <sub>12</sub> en <i>S. rhois</i> .  | 50 |

## LISTA DE TABLAS.

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Metabolización de precursores de GAs marcados con $^{14}\text{C}$ por cultivos líquidos de <i>S. rhois</i> .   | 26 |
| <b>Tabla 2.</b> Reacciones detectadas en los experimentos de metabolización.   | 28 |
| <b>Tabla 3.</b> Efecto de compuestos nitrogenados sobre la velocidad de oxidación del ácido <i>ent</i> -7 $\alpha$ -hidroxi[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenico por cultivos de <i>S. rhois</i> .                            | 31 |
| <b>Tabla 4.</b> Utilización de precursores de kaurenolidos y ácidos fujenoicos por cultivos de <i>S. rhois</i> .   | 33 |
| <b>Tabla 5.</b> Reacciones detectadas en los experimentos de metabolización de ácido <i>ent</i> -[ $^{14}\text{C}$ ]kauradienoico y ácido <i>ent</i> -6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenico. | 34 |
| <b>Tabla 6.</b> Reacciones detectadas en microsomas del micelio de <i>S. rhois</i> y/o de <i>S. manihoticola</i> .   | 41 |
| <b>Tabla 7.</b> Evidencias de participación de MOs P450 en la biosíntesis de GAs por <i>S. rhois</i> .   | 48 |
| <b>Tabla 8.</b> Reacciones y enzimas de la biosíntesis de GAs en <i>F. fujikuroi</i> y <i>S. rhois</i> .   | 54 |

## RESUMEN

El hongo filamentoso *Sphaceloma rhois* sintetiza giberelinas, principalmente la giberelina A<sub>4</sub>, metabolitos secundarios diterpénicos activos como fitohormonas. En esta memoria de título se caracterizó la biosíntesis de giberelinas por este hongo a nivel de las reacciones químicas, de las enzimas que las catalizan y de su regulación. Mediante la administración de precursores marcados con <sup>14</sup>C a cultivos líquidos de *S. rhois*, se determinó la secuencia de reacciones de oxidación de la biosíntesis de GA<sub>4</sub> a partir del ácido *ent*-kaurenoico. Los precursores previos al GA<sub>12</sub> aldehído fueron metabolizados completamente por cultivos líquidos del hongo y se transformaron en los productos 3β-hidroxiados [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> (giberelina de 20 carbonos) y [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub> (giberelina 19, γ<sup>10</sup> lactónica de 19 carbonos). Además, al realizar incubaciones a tiempos cortos, se detectaron los intermediarios ácido *ent*-7α-hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico y el [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído. No se detectaron productos no hidroxiados. La giberelina [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> agregada a los cultivos fue convertida en [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub>, el producto final de la secuencia. Todo esto permite concluir que el ácido *ent*-7α-hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico, el GA<sub>12</sub> aldehído y el GA<sub>14</sub> son intermediarios en la síntesis de GA<sub>4</sub>. Todos los intermediarios posteriores al GA<sub>12</sub> aldehído son 3β-hidroxiados debido a que la reacción de hidroxiación en C3 ocurre sobre este precursor. No se forman productos no hidroxiados a partir de GA<sub>12</sub> aldehído, por lo tanto, en este sistema está presente exclusivamente la vía 3β-hidroxiada. La reacción de oxidación del C20 hasta CO<sub>2</sub> que forma el producto final GA<sub>4</sub>, fue investigada en detalle a partir de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>, encontrándose que los cultivos del

hongo metabolizan este sustrato para dar el producto lactónico [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> (derivado de la oxidación a CO<sub>2</sub>) junto con el producto C20 carboxilato [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub>. Además, se forma el intermediario C20 aldehído, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub>, que sería el precursor del producto lactónico y del producto C20 carboxilato. El nitrato de amonio o la glutamina, presentes en el medio de cultivo, reducen 3 veces la velocidad de oxidación del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico, lo que sugiere que la biosíntesis de GAs podría ser regulada por compuestos nitrogenados en este microorganismo.

En fracciones microsomales obtenidas del micelio se determinó el requerimiento de cofactores de las reacciones de oxidación del ácido *ent*-[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico hasta [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub>, las que dependen en forma absoluta de NADPH, FAD y O<sub>2</sub>. Esto, junto con la demostración en los cultivos de las reacciones de síntesis de [ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolidos y ácidos [ $^{14}\text{C}$ ]fujenoicos a partir de ácido *ent*-[ $^{14}\text{C}$ ]kauradienoico y de ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, indica que la síntesis de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub> es catalizada por una o más monooxigenasas P450.

La secuencia biosintética de GA<sub>4</sub> encontrada en *S. rhois* es similar a la descrita en *Fusarium fujikuroi* que produce principalmente GA<sub>3</sub> y concentraciones menores GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>. Las rutas de biosíntesis son similares en cuanto a la reacción de 3 $\beta$ -hidroxilación (que ocurre en una etapa temprana), en los intermediarios de la secuencia y en la naturaleza de las oxidasas. Por otra parte, esta secuencia difiere de la del otro hongo productor de giberelinas, *Phaeosphaeria* sp., que produce GA<sub>4</sub> y GA<sub>1</sub> a través de intermediarios no hidroxilados.

## ABSTRACT

### **“Lactonic gibberellin biosynthesis by the fungus *Sphaceloma rhois*”.**

The filamentous fungus *Sphaceloma rhois* synthesizes gibberellins, mainly GA<sub>4</sub>, diterpenoid secondary metabolites active as phytohormones. In this work, gibberellin biosynthesis by this fungus was characterized at the chemical, enzymatic and regulatory levels. The oxidative reaction sequence of GA<sub>4</sub> biosynthesis from *ent*-kaurenoic acid was determined by adding <sup>14</sup>C-labeled precursors to liquid cultures of *S. rhois*. These were completely metabolized and transformed into the 3β-hydroxylated products [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> (C20 gibberellin) and [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub> (C19 lactonic gibberellin). Furthermore, in short term incubations *ent*-7α-hydroxy[<sup>14</sup>C]kaurenoic acid and [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehyde were detected as intermediates. Non-hydroxylated products were not detected in any incubation. [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> added to the cultures was converted into [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub>, the final product of the sequence. This indicates that *ent*-7α-hydroxykaurenoic acid, GA<sub>12</sub> aldehyde and GA<sub>14</sub> are intermediates in GA<sub>4</sub> synthesis. All intermediates after GA<sub>12</sub> aldehyde are 3β-hydroxylated due to 3β-hydroxylation reaction over this precursor. Non-hydroxylated products are not formed from GA<sub>12</sub> aldehyde, thus, the 3β-hydroxylated pathway is present exclusively in this fungal system. C20 oxidation to CO<sub>2</sub> which gives the lactonic C19 product, was investigated in detail from [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>. *S. rhois* cultures metabolized this substrate to the lactonic product [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> (derived from oxidation to CO<sub>2</sub>) together with the C20 carboxylic acid product [<sup>14</sup>C]GA<sub>25</sub>. In addition the C20 aldehyde intermediate, [<sup>14</sup>C]GA<sub>24</sub>,

accumulated, which would be precursor of both the lactonic and C20-carboxylic acid products. Ammonium nitrate or glutamine present in the cultures reduced by a factor of 3 the oxidation rate of *ent*-7 $\alpha$ -hydroxykaurenoic acid, suggesting that GA biosynthesis in *S. rhois* would be regulated by nitrogen compounds.

The cofactor requirement of oxidation reactions involved in [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> synthesis from *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenoic acid was determined in mycelial microsomal fractions. An absolute requirement of NADPH, FAD and O<sub>2</sub> was found for these steps, which together with the demonstration of [<sup>14</sup>C]kaurenolide and [<sup>14</sup>C]fujenoic acid synthesis from *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoic acid or *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihydroxy[<sup>14</sup>C]kaurenoic acid, indicate that GA<sub>14</sub> synthesis is catalyzed by a P450 monooxygenase in *S. rhois*.

The biosynthetic pathway to GA<sub>4</sub> in *S. rhois* is similar to that described in *Fusarium fujikuroi*, a GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> and GA<sub>7</sub> producing fungus. Both microorganisms utilize similar intermediates and the same kind of oxidases. In contrast, this sequence differ from that found in *Phaeosphaeria sp.* which produces GA<sub>4</sub> and GA<sub>1</sub> through non-hydroxylated intermediates.

## ABREVIATURAS

**AMO1618:** Cloruro de 2-isopropil-4-dimetilamino-5-metilfenil-1-piperidina-carboxilato

**BSA:** Seroalbúmina de bovino

**CPR:** NADPH-citocromo P450 reductasa

**DTT:** Ditioneitol

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético

**FAD:** Flavina Adenina Dinucleótido (forma oxidada)

**GAs:** Giberelinas

**GC/MS:** Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**MeOH:** Metanol

**MO:** Monooxigenasa

**MSTFA:** N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

**NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida)

**PDA:** Agar papa dextrosa

**R<sub>r</sub>:** Factor de retención

**SG139:** Mutante de delección de *Fusarium fujikuroi* que no contiene genes de GAs

**SG139-P450-1:** Mutante SG139 complementada con el gen P450-1 de *F. fujikuroi*

**TLC:** Cromatografía en capa fina

**T<sub>R</sub>:** Tiempo de retención

## 1. INTRODUCCIÓN.

Las giberelinas (GAs) son fitohormonas diterpénicas tetracíclicas ampliamente distribuidas en las plantas superiores, donde regulan diversos procesos relacionados con el crecimiento y desarrollo, como el crecimiento de tallos y frutos, la floración y la germinación de las semillas (**Graebe y cols., 1987**). Su descubrimiento provino de la observación del crecimiento exagerado que presentaban las plántulas de arroz infectadas por el hongo productor de ácido giberélico, *Fusarium fujikuroi*, compuesto que se aisló desde el medio de cultivo y fue identificado espectroscópicamente (**Cross y cols., 1959**).

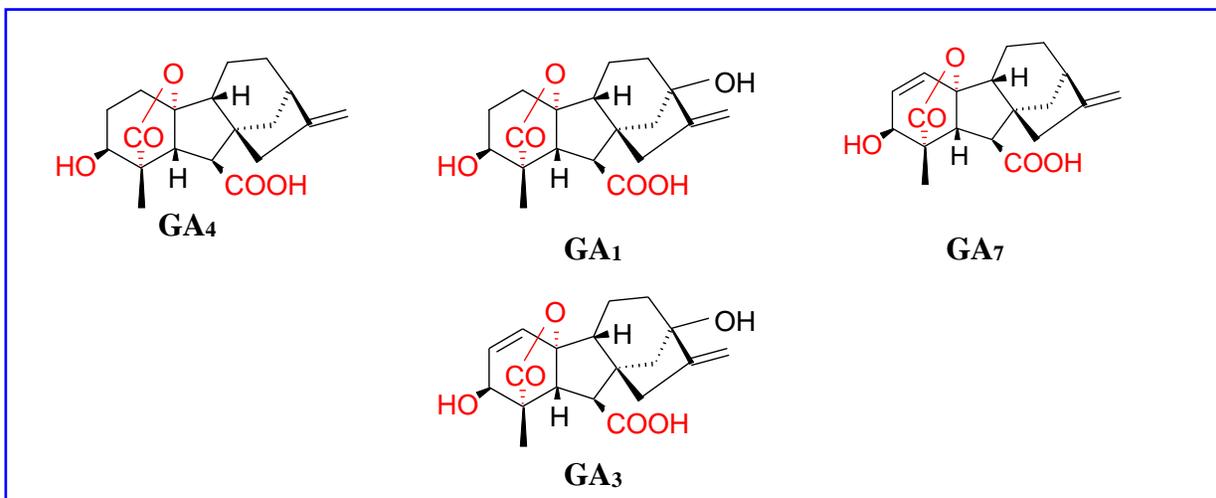
En *F. fujikuroi* las GAs son metabolitos secundarios y no se conoce su función a diferencia de los sistemas vegetales. Debido a que se encuentran en muy pequeñas cantidades en las plantas, pudieron ser identificadas sólo después del desarrollo de la espectrometría de masas.

Debido al efecto regulador del crecimiento que tienen algunas GAs sobre las plantas, éstas se utilizan para diversas aplicaciones agronómicas. Por ejemplo el GA<sub>3</sub> es utilizado para acelerar el proceso de malteado en la industria cervecera, para aumentar el tamaño de la baya en variedades de uva sin semilla (Fig.1) o para aumentar la calidad de los frutos cítricos (**Rademacher, 1994**). Así también la mezcla de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> es utilizada para mejorar la calidad de frutos de manzana (**Rademacher, 1994**).



**Figura 1.** Efecto del ácido giberélico sobre el crecimiento de bayas de uva. Izquierda: uvas no tratadas. Derecha: tratadas con GA<sub>3</sub>. (Raven y Eichhorn, 1992).

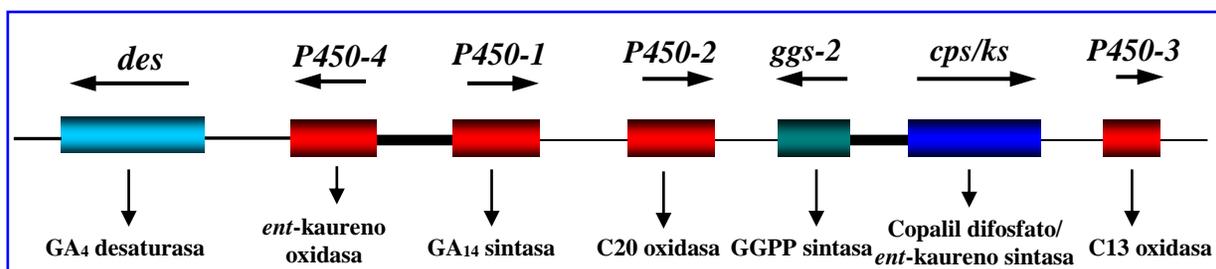
Estructuralmente, las GAs son ácidos carboxílicos tetracíclicos de naturaleza diterpénica. A la fecha se han descrito más de 130 GAs, pero de éstas sólo cuatro son biológicamente activas (GA<sub>4</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>3</sub>). Todas ellas poseen 19 carbonos y contienen la función 19,γ10 lactona, además de la función carboxilo en la posición 7 y la función alcohol en la posición 3 (Fig. 2). El resto corresponde a GAs de 20 carbonos y son precursores de las GAs lactónicas o bien sus productos de degradación.



**Figura 2.** Estructura de las giberelinas biológicamente activas.

El hongo *Fusarium fujikuroi* pertenece al complejo de especies *Gibberella fujikuroi* del género *Fusarium*, que contiene nueve especies biológicas denominadas poblaciones de apareamiento (MPs, A-I) (Malonek et al., 2005). Es el más eficiente productor de GAs en la naturaleza, principalmente de ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), el que se acumula en cantidades del orden de g/L en el medio de cultivo en condiciones óptimas de producción (Brückner y Blechshmidt, 1991a). Además genera cantidades más bajas de GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub> (Macmillan, 1997).

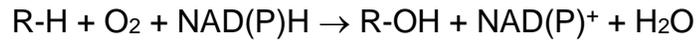
La vía metabólica que lleva a la formación de GA<sub>3</sub> a partir de ácido mevalónico en *F. fujikuroi* ha sido descrita completamente, así como también las enzimas que catalizan cada una de las etapas de esta vía y los genes que codifican para dichas enzimas (Hedden y cols., 2002; Tudzynski, 2005). En la secuencia de reacciones específica de la síntesis de GAs, a partir de farnesildifosfato (FPP) participan siete enzimas, las que están codificadas por siete genes agrupados en un cluster ubicado en el cromosoma IV del hongo (Tudzynski y Hölter, 1998; Hedden y cols., 2002) (Fig. 3).



**Figura 3.** Mapa físico del cluster de genes de la biosíntesis de giberelinas en *F. fujikuroi*. Las respectivas enzimas codificadas se indican debajo de cada gen.

Cuatro de los genes del cluster codifican para monooxigenasas relacionadas con el citocromo P450, la mayoría multifuncionales. Estas enzimas

generalmente se encuentran asociadas al retículo endoplásmico, y utilizan oxígeno molecular como agente oxidante y requieren electrones para la oxidación:

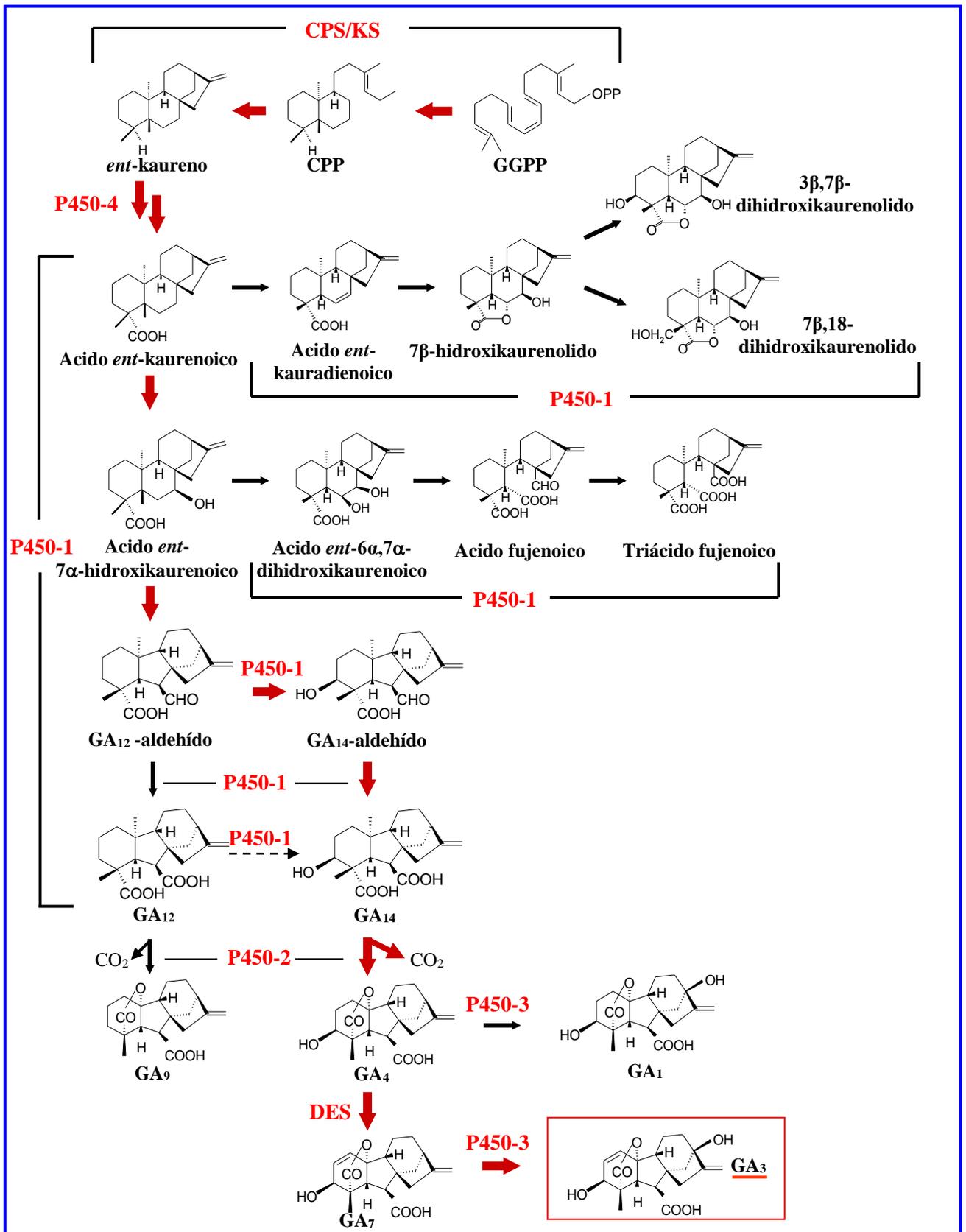


Los electrones provenientes del NADH o NADPH no son recibidos directamente por las monooxigenasas P450, sino que son transportados a través de una proteína asociada a ellas (**Donaldson y Luster, 1991**). En *F. fujikuroi* la principal proteína transportadora de electrones asociada a las monooxigenasas de GAs es la citocromo P450 reductasa (CPR). Las mutantes carentes de CPR producen sólo un 1-3% de GAs (**Malonek y cols., 2004**). Las GAs residuales son sintetizadas por un segundo sistema transportador de electrones asociado a las monooxigenasas P450, el sistema citocromo b5: citocromo b5 reductasa (**Troncoso y cols., 2007**).

La síntesis de GAs en *F. fujikuroi* (Fig. 4) comienza con la ciclación del primer intermediario específico de la vía, el geranilgeranil difosfato (GGPP), la que ocurre en dos etapas y es catalizada por la enzima bifuncional *ent*-copalildifosfato sintasa/*ent*-kaureno sintasa (CPS/KS), para formar el *ent*-kaureno a través del intermediario copalil difosfato (CPP) (**Tudzynski y cols., 1998**). A continuación el *ent*-kaureno es oxidado en el metilo C19, en tres etapas hasta ácido *ent*-kaurenoico por la monooxigenasa P450-4 (*ent*-kaureno oxidasa) (**Tudzynski y cols., 2001**). Luego la monooxigenasa P450-1 (GA<sub>14</sub> sintetasa) cataliza cuatro reacciones sucesivas de oxidación sobre el ácido *ent*-kaurenoico: hidroxilación en

la posición 7, la contracción del anillo B, para dar GA<sub>12</sub> aldehído, la hidroxilación en la posición 3 $\beta$  del GA<sub>12</sub> aldehído y la oxidación del grupo aldehído en C7 hasta carboxilato, para dar GA<sub>14</sub> **(Rojas y cols., 2001)**. El grupo metilo ubicado en la posición 20 es posteriormente oxidado por la monooxigenasa P450-2 (C20-oxidasa) hasta CO<sub>2</sub>, lo que permite la formación de la función 19, $\gamma$ 10 lactona en el GA<sub>4</sub> **(Tudzynski y cols., 2002)**. Finalmente el GA<sub>4</sub> sufre una desaturación en la posición 1,2, oxidación catalizada por una desaturasa, seguida por la hidroxilación en la posición 13 mediada por la monooxigenasa P450-3 (C13-hidroxilasa) lo que lleva a la formación del producto final GA<sub>3</sub>, a través de GA<sub>7</sub> **(Tudzynski y cols., 2003)**.

Además de la ruta principal que lleva a la formación de GA<sub>3</sub>, existen dos vías laterales que dan lugar a la formación de los kaurenolidos y ácidos fujenoicos (Fig. 4) los que son sintetizados como productos laterales de la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico respectivamente, por la MO P450-1. Estos productos resultan de alternativas de estabilización de los intermediarios radicalarios generados a partir de estos sustratos durante la catálisis **(Rojas y cols., 2004)**.

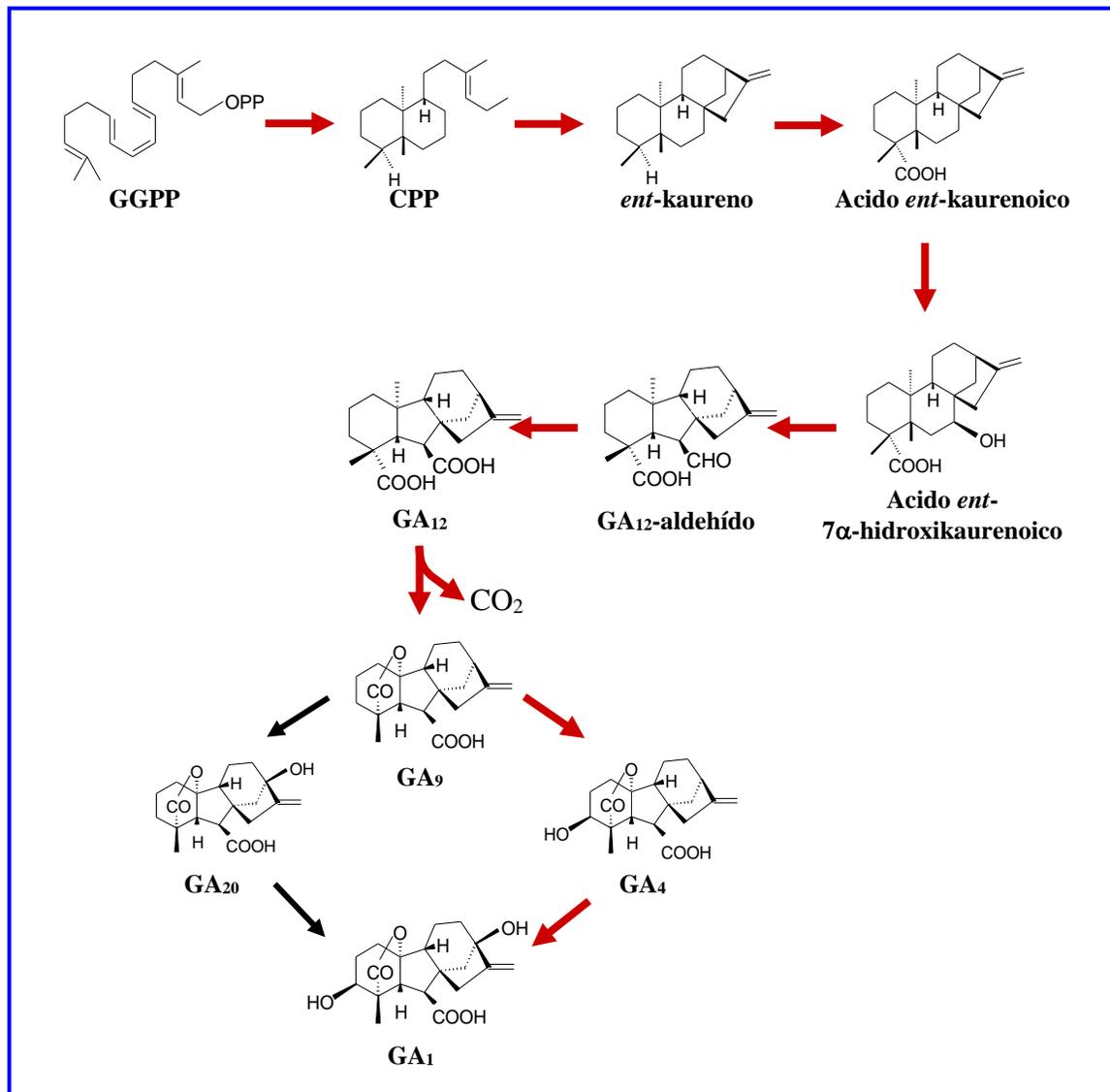


**Figura 4.** Vía de síntesis de giberelinas en el hongo *F. fujikuroi*. En rojo se muestra la ruta principal que lleva a la formación del producto final, GA<sub>3</sub>. → → Más de una etapa.

Si bien la ruta biosintética de las GAs en plantas es bastante similar a la vía presente en *F. fujikuroi* y se forman los mismos productos finales, existen marcadas diferencias entre ambos sistemas (**Hedden y Kamiya, 1997; MacMillan, 1997**). La principal diferencia radica en la naturaleza de las enzimas involucradas. En plantas, la ciclación del GGPP para formar *ent*-kaureno, es catalizada por dos enzimas, la *ent*-copalildifosfato sintasa (CPS) y la *ent*-kaureno sintasa (KS). En *Arabidopsis thaliana* incluso los genes respectivos *cps* y *ks* están localizados en diferentes cromosomas (**Sun y Kamiya, 1994; Yagamuchi y cols., 1998**). En *F. fujikuroi*, en cambio una enzima bifuncional, que posee ambas actividades, cataliza esta conversión, CPS/KS (**Tudzynski y cols., 1998**). Además, las oxidaciones que ocurren sobre el GA<sub>12</sub> aldehído y los intermediarios posteriores son catalizadas por monooxigenasas P450 en el hongo y por dioxigenasas solubles dependientes de 2-oxoglutarato en las plantas (**Hedden y Kamiya, 1997; MacMillan, 1997**). Una importante diferencia es el nivel de la secuencia biosintética al cual ocurren las hidroxilaciones, ya que en plantas la 13-hidroxilación ocurre en forma temprana, a nivel del GA<sub>12</sub>, mientras que la 3 $\beta$ -hidroxilación tiene lugar sólo al término de la vía, al contrario de lo que ocurre en el hongo en que la 3 $\beta$ -hidroxilación es a nivel de GA<sub>12</sub> aldehído y la 13-hidroxilación es la última etapa de la secuencia (**Hedden y Kamiya, 1997; MacMillan, 1997**). Estas diferencias indican un origen evolutivo diferente para la biosíntesis de GAs en ambos sistemas (**Hedden y cols, 2002**).

Además de las plantas superiores y de *F. fujikuroi*, algunas bacterias y otros dos géneros de hongos producen GAs: *Sphaceloma sp.* y *Phaeosphaeria sp.*

**(Rademacher, 1994)**. Si bien *F. fujikuroi* es el sistema más estudiado, existen algunos reportes sobre la síntesis de estas fitohormonas en *Phaeosphaeria sp* L487, especie que no muestra fitopatogenicidad y que produce la giberelina A<sub>1</sub> como producto final **(Kawaide, 2006)**. La ruta biosintética que lleva a la formación de GA<sub>1</sub> es más parecida a la existente en plantas que a la de *F. fujikuroi*, ya que en este hongo la hidroxilación en C3 $\beta$  ocurre al final de la secuencia sobre los intermediarios lactónicos GA<sub>9</sub> o GA<sub>20</sub> (Fig. 5) y no se forman GAs 3 $\beta$ -hidroxiladas de 20 carbonos **(Kawaide y cols., 1995)**. La hidroxilación en C13 también ocurre a este nivel, sobre GA<sub>9</sub> o GA<sub>4</sub>. En este hongo sin embargo, las enzimas que participan en la síntesis de GA<sub>1</sub> presentan las mismas características que para *F. fujikuroi*, ya que la síntesis de *ent*-kaureno es catalizada por una ciclasa bifuncional **(Kawaide y cols., 1997; Kawaide y cols., 2000)** y sólo participan monooxigenasas P450 en las etapas oxidativas, aunque la funcionalidad de estas enzimas no ha sido estudiada **(Kawaide, 2006)**. Por lo tanto, este hongo productor de GAs presenta una organización molecular intermedia entre las plantas superiores y *F. fujikuroi*, en cuanto a la síntesis de estos diterpenos.



**Figura 5.** Vía de síntesis de GAs en *Phaeosphaeria sp.* L487.

Un tercer género de hongos productor de GAs, es *Sphaceloma sp.*, que produce exclusivamente GA<sub>4</sub> como producto principal, dentro del cual se ha descrito que *S. manihoticola* y *S. rhois* son las especies que producen mayores niveles de esta fitohormona, generando ~26 y 14 mg por litro de cultivo, respectivamente (Rademacher, 1992a). El primer indicio que se tuvo de la producción de GAs por este hongo provino de la observación de la enfermedad de

superelongación de la yuca o mandioca (*Manihot esculenta*), una planta cuya raíz acumula almidón y se utiliza como alimento en los países tropicales. La infección con *S. manihotica* es la responsable de la excesiva elongación de los tallos. Así, Rademacher y Graebe detectaron en 1979 la producción de GA<sub>4</sub> en cultivos líquidos de *S. manihotica* **(Rademacher y Graebe, 1979)**.

*S. rhois* ha sido escasamente descrito hasta ahora, pero se sabe que es un hongo filamentoso perteneciente al grupo de los deuteromicetes y que infectaría a *Rhus sucedánea* L, árbol de 5-6 m de altura, nativo de Japón, utilizado para producir cera **(Bitancourt y Jenkins, 1940)**. En cuanto a la producción de GAs por este hongo, Rademacher describió que GA<sub>4</sub> es el producto principal (76,5%) al igual que en *S. manihotica*, y además se producen las giberelinas GA<sub>13</sub> (GA de 20C, 3β-hidroxiada, 16,9%), GA<sub>9</sub> (C19, no 3β-hidroxiada, 3,6%), GA<sub>14</sub> (C20, 3β-hidroxiada, 2,2%) y GA<sub>24</sub> (C19, no 3β-hidroxiada, 0,7%) en bajos niveles **(Rademacher, 1992a)**.

La presencia del intermediario 3β-hidroxiado GA<sub>14</sub> en el medio de cultivo de *S. rhois* sugiere que la secuencia metabólica podría ser similar a la de *F. fujikuroi*, con una etapa de 3β-hidroxiación temprana, sin embargo, no se han descrito estudios de metabolización de precursores de GAs ni estudios genéticos en *S. rhois*, que puedan dar cuenta de la ruta biosintética que da lugar a la formación de GA<sub>4</sub>.

En esta memoria se investigó en detalle la metabolización de distintos precursores de GAs, tanto derivados del *ent*-kaureno como conteniendo el

esqueleto carbonado del *ent*-giberelano, por cultivos líquidos y fracciones microsomales de *S. rhois*.

El objetivo de este trabajo es la dilucidación de la secuencia biosintética de la giberelina A<sub>4</sub> en *S. rhois*, para demostrar si las reacciones químicas respectivas se asemejan a las descritas para la síntesis de GA<sub>3</sub> por *F. fujikuroi* o a la secuencia biosintética de GA<sub>1</sub> por *Phaeosphaeria sp.*

## HIPÓTESIS

En la biosíntesis de giberelinas lactónicas por el hongo *Sphaceloma rhois* participan intermediarios 3 $\beta$ -hidroxilados, en una secuencia biosintética similar a la descrita para *Fusarium fujikuroi*.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar, en la secuencia de biosíntesis de GA<sub>4</sub> en *Sphaceloma rhois*, las etapas e intermediarios que participan.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Establecer las condiciones de cultivo del hongo, particularmente las condiciones en que se sintetizan giberelinas.
- 2) Determinar la participación de ácido *ent*-kaurenoico, GA<sub>12</sub> aldehído y GA<sub>14</sub> como intermediarios.
- 3) Investigar la reacción de oxidación del metilo en la posición 20 de las giberelinas GA<sub>12</sub> (giberelina no hidroxilada, con metilo en la posición 20) y GA<sub>14</sub> (giberelina 3 $\beta$ -hidroxilada, con metilo en la posición 20).
- 4) Investigar a qué nivel de la secuencia metabólica ocurre la reacción de 3 $\beta$ -hidroxilación.
- 5) Investigar la participación de monooxigenasas asociadas al citocromo P450 en la biosíntesis de GA<sub>4</sub>.
- 6) Demostrar si las reacciones de desaturación y de 13-hidroxilación están ausentes en *S. rhois*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 Reactivos.

Todos los reactivos que se utilizaron son de grado pro análisis, exceptuando el metanol que es grado HPLC.

### 2.2 Síntesis de precursores de GAs marcados con $^{14}\text{C}$ .

Los precursores ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ kaurenoico (radiactividad específica de 7,51 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ), ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi $^{14}\text{C}$ kaurenoico (radiactividad específica de 7,91 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ), ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ kauradienoico (radiactividad específica 7,12 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ), ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi $^{14}\text{C}$ kaurenoico (radiactividad específica de 4,64 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ),  $^{14}\text{C}$ GA<sub>12</sub> aldehído (radiactividad específica de 6,81 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) y  $^{14}\text{C}$ GA<sub>12</sub> (radiactividad específica de 4,4 TBq $\cdot\text{mol}^{-1}$ ) fueron sintetizados a partir de ácido R-[2- $^{14}\text{C}$ ]mevalónico con un preparado enzimático de endosperma de calabaza, que contiene altos niveles de las enzimas de la biosíntesis de giberelinas, en presencia de ATP, MgCl<sub>2</sub> y NADPH (**Graebe y cols., 1974**). El precursor  $^{14}\text{C}$ GA<sub>14</sub> se preparó incubando ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi $^{14}\text{C}$ kaurenoico con un cultivo de la transformante SG139 P450-1 de *Fusarium fujikuroi* (**Rojas y cols., 2001**). Los precursores  $^{14}\text{C}$ GA<sub>9</sub> y  $^{14}\text{C}$ GA<sub>4</sub> fueron sintetizados químicamente en la Universidad de Camberra, Australia por el profesor L. Mander.

### 2.3 Cepas fúngicas y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa 1521 de *S. rhois* que fue donada por la Dra. Bettina Tudzynski (Universidad de Munster, Alemania). La transformante SG139-P450-1 de *Fusarium fujikuroi* fue preparada por la Dra. B. Tudzynski mediante complementación de la mutante de delección SG139 que no contiene genes de GAs, con el gen P450-1 (Rojas y cols, 2001).

La cepa 1521 de *S. rhois* fue mantenida en agar papa dextrosa (PDA) al que se le agregó un liofilizado de papas (12,5 g/L) a 25°C. Los medios líquidos se obtuvieron inoculando trozos de agar conteniendo el micelio en 100 mL de medio ICI 40 % (Geissman y cols., 1966) previa disgregación en un mortero. Este medio contiene 1,92 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 80 g/L de glucosa, 5 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/L de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1% de solución de elementos traza (100 mL contiene: 0,01 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,015 g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,161 g de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,01 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ). El cultivo se mantuvo por 6 días con agitación orbital (28°C, 300 rpm) para permitir el crecimiento del micelio y se traspasó luego a un medio ICI 0%, igual al anterior, sin  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (condiciones que inducen la síntesis de giberelinas). Para los experimentos de metabolización de ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico en presencia de distintos compuestos nitrogenados, el precultivo se traspasó a un medio ICI 40% fresco, a un medio ICI 100% (con 4,8 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) o bien a un medio igual que contiene 3,64 g/L de glutamina en vez de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . El traspaso se realizó separando el micelio por filtración y luego lavándolo con el medio requerido, el que previamente contenía un

inhibidor de la síntesis de GAs endógenas, AMO 1618 (Cloruro de 2-isopropil-4-dimetilamino-5-metilfenil-1-piperidina-carboxilato, 200  $\mu$ M) (**Rademacher, 1992b**). Éste inhibidor bloquea la formación de *ent*-kaureno, a partir de geranilgeranil difosfato, al inhibir a la *ent*-kaureno sintasa, una de las primeras etapas de la síntesis de GAs y evita así la competencia entre las giberelinas endógenas y las giberelinas marcadas en los experimentos de metabolización. Finalmente se traspasó una alícuota de la suspensión de micelio lavado (aproximadamente 100 mg, peso seco) a un matraz erlenmeyer de 25 mL, completando hasta 10 mL con el mismo medio fresco. A este cultivo se agregaron distintos precursores radiactivos.

#### **2.4. Preparación de microsomas.**

El micelio crecido bajo condiciones inductoras de la síntesis de GAs, tres días en medio ICI 0%, se cosechó por filtración al vacío (1 matraz con 100 mL de cultivo que da alrededor de 1 g de peso fresco de micelio). Después de lavar el micelio alternativamente con H<sub>2</sub>O nanopura y tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 5 mM) el micelio fue filtrado al vacío y resuspendido en la solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 5 mM; DTT 4 mM; sacarosa 0,25 M y BSA 10 mg/mL). Se utilizaron 10 mL de solución de extracción por 1 g de micelio (peso fresco). La suspensión fue congelada a -20°C hasta el momento de romper las células para preparar el extracto enzimático.

Para preparar el extracto se utilizó una prensa "X-press" (AB BIOX, Suecia) enfriada a -30°C, la cual consiste en 2 cilindros axiales idénticos con cámaras separadas por un disco que posee un agujero circular de 1 mm de diámetro.

La suspensión de micelio congelada a  $-30^{\circ}\text{C}$  se pone en una de estas cámaras donde es sometida a una presión de 28.000 psi, lo que permite el flujo de la muestra a través del orificio debido al cambio de estado sólido a líquido del agua por efecto de la presión. La ruptura de las células se produce por la descompresión (**Edebo, 1983**). El homogeneizado resultante fue descongelado y centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los microsomas se obtuvieron por centrifugación del sobrenadante de 10.000xg a 100.000xg por 1 hora. El pellet de 100.000xg (P100, microsomas) fue suspendido en 0,5 mL de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,5; DTT 4 mM; sacarosa 0,2M; NaCl 1 M y de BSA 10 mg/mL. La suspensión microsomal fue distribuida en alícuotas de 50  $\mu\text{L}$ , congelada en nitrógeno líquido y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **2.5. Ensayos enzimáticos.**

Las actividades de la  $3\beta$ -hidroxilasa y 7-oxidasa de giberelinas fueron determinadas en 100  $\mu\text{L}$  de un medio de reacción que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 5-10  $\mu\text{L}$  de suspensión microsomal; 30.000 dpm de [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>12</sub> aldehído; NADPH 1 mM y NaCl 0,1 M. Alternativamente se utilizó la combinación NADPH 1 mM con FAD 5  $\mu\text{M}$  o bien NADH 1 mM más FAD 50  $\mu\text{M}$ .

El medio de reacción se incubó con agitación a  $30^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Para detener la reacción se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de ácido acético, 1,6 mL de H<sub>2</sub>O acidificada a pH 3,0 con ácido acético y 0,4 mL de metanol. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en fase sólida en columnas C18 de 100 mg (cartuchos Bakerbond C18 J.T. Baker) y se analizó por HPLC.

## 2.6. Experimentos de metabolización de precursores de giberelinas.

A una suspensión del micelio en medio ICI 0% (10 mL, pH 4.0, conteniendo AMO 1618 200  $\mu$ M) se agregó uno de los precursores marcados con  $^{14}\text{C}$  (ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ ]kauradienoico, ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> aldehído, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub>, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub>, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> o [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>4</sub>) en forma de una solución metanólica (10-150  $\mu$ L; 30.000-400.000 dpm). El cultivo se incubó por 3 días a 28°C con agitación orbital a 300 rpm. Para investigar la metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub>, se ajustó el pH del medio de cultivo hasta 3.0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. El ingreso de esta GA al micelio depende del pH y se favorece a pH 3.0 (**Bearder y cols., 1975**).

En todos los casos, los productos de metabolización se aislaron desde el filtrado después de separar el micelio por filtración, como se indica en la sección 2.8.

## 2.7. Cinética de metabolización de ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico, ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ ]kauradienoico y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub>.

La cinética de metabolización de ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico se midió en cultivos sin una fuente nitrogenada (ICI 0%, AMO 1618 200  $\mu$ M) en los cuales se había inducido la expresión de los genes de la síntesis de giberelinas incubando 24 horas en este medio antes de agregar los precursores. El mismo procedimiento se utilizó en cultivos que contienen 1,92 g/L de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (ICI 40%), 4,8 g/L de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (ICI 100%) o 3,64 g/L de glutamina (Gln). Se tomó una alícuota

de 2mL de cultivo (aproximadamente 100 mg de micelio, peso seco) y se completó a 10 mL con medio fresco. A esta suspensión se le agregó el precursor marcado en forma de una solución metanólica. El cultivo se incubó a 25°C con agitación y, a tiempos variables desde 5 minutos hasta 20 minutos, se sacaron alícuotas de 2 mL (aproximadamente 20 mg de micelio, peso seco) las que fueron filtradas para detener la reacción y extraer los productos marcados y el sustrato residual. El filtrado se acidificó y se extrajo con acetato de etilo. Luego se evaporó el solvente a sequedad, la muestra se limpió por extracción en fase sólida en columnas C18 (cartuchos Bakerbond C18 J.T. Baker) y fue analizada por HPLC.

La cinética de metabolización de ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico y [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> se midió en cultivos ICI 0% con AMO 1618 200 μM, los cuales se mantuvieron 24 horas a 28°C con agitación orbital (300 rpm) para inducir las enzimas de la síntesis de giberelinas. Se tomó una alícuota de 2mL de cultivo (aproximadamente 100 mg de micelio, peso seco) y se completó a 10 mL con medio fresco. A esta suspensión se le agregó el precursor marcado en forma de una solución metanólica. El cultivo se incubó a 28°C con agitación y, a tiempos variables desde 5 minutos hasta 3 días, se tomaron alícuotas de 2 mL las que fueron procesadas como se describe anteriormente para la cinética de ácido *ent*-7α-hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico.

## **2.8. Extracción de [<sup>14</sup>C]GAs desde el filtrado del cultivo.**

El filtrado del cultivo junto con las soluciones de lavado del micelio con H<sub>2</sub>O a pH 7,0 fueron acidificados hasta pH 3,0 con HCl 2N (volumen total ~10 mL en los experimentos de metabolización). Las giberelinas se extrajeron por partición

con acetato de etilo (1x 10 ml; 2x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas fueron evaporadas a presión reducida en un Rotavapor R10 (Büchi) a 38°C. Las [<sup>14</sup>C]GAs fueron disueltas en 2 mL de metanol al 20% y aplicadas a una columna de extracción en fase sólida C18 (cartuchos Bakerbond C18 J.T. Baker, 100 mg).

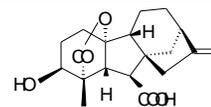
### **2.9. Purificación de las giberelinas por extracción en fase sólida.**

Se utilizaron columnas C18 de 100 mg (cartuchos Bakerbond C18 J.T. Baker) previamente activadas con 2 mL de metanol. Las columnas se equilibraron con 2 mL de agua acidificada a pH 3,0 antes de aplicar la muestra. Después de aplicar la muestra se lavó la columna con 2 mL de agua acidificada a pH 3,0 y finalmente las GAs se eluyeron con 2 mL de metanol. El solvente fue evaporado a presión reducida en un equipo SpeedVac plus SC110A (Termo Savant) o mediante flujo superficial de nitrógeno.

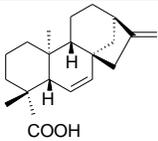
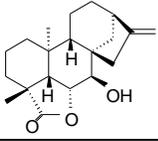
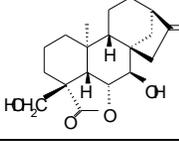
### **2.10. Condiciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).**

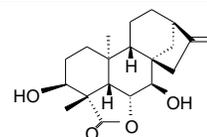
Los productos de metabolización de los precursores de giberelinas marcados con <sup>14</sup>C se analizaron en un instrumento Waters 600 usando una columna de fase reversa C18 Simmetry (5µm; 250x4 mm; Waters). Las giberelinas marcadas se separaron usando una gradiente lineal de 60 a 100% de MeOH/H<sub>2</sub>O pH 3,0 de 30 min. En estas condiciones los tiempos de retención de los correspondientes estándares son:

| Compuesto   | Tiempo de Retención (minutos) | Estructura |
|---|-------------------------------|------------|
| Ácido <i>ent</i> -[ <sup>14</sup> C]kaurenoico                    | 35                            |            |
| Ácido <i>ent</i> -7 $\alpha$ -hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico | 21                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> aldehído                       | 26                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub>                                | 23                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>14</sub>                                | 14                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>25</sub>                                | 15                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>24</sub>                                | 17                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>9</sub>                                 | 19                            |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>40</sub>                                | 8                             |            |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>4</sub>                                 | 15                            |            |



En el caso de los [ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolidos, éstos fueron separados en la misma columna usando una gradiente 75-100% MeOH de 15 minutos seguida por 15 minutos de flujo isocrático de MeOH 100%. En estas condiciones los tiempos de retención de los correspondientes estándares son:

| Compuesto  | Tiempo de Retención (minutos) | Estructura  |
|--|-------------------------------|---|
| Ácido ent-<br>[ $^{14}\text{C}$ ]kauradienoico                     | 21                            |   |
| 7 $\beta$ -hidroxi-<br>[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolido              | 10                            |    |
| 7 $\beta$ ,18-dihidroxi-<br>[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolido         | 7                             |  |
| 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroxi-<br>[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolido | 8                             |  |



El flujo fue de 1 mL/min en todos los casos. Se colectaron fracciones de 1 mL y se midió la radioactividad en ellas por centelleo líquido. Los productos se identificaron por co-cromatografía con estándares de giberelinas marcadas con  $^{14}\text{C}$  o bien fueron derivatizados para identificarlos por GC/MS.

### **2.11. Cromatografía en capa fina (TLC).**

Los ácidos [ $^{14}\text{C}$ ]fujenoicos fueron separados del ácido *ent-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi*[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico por TLC, ya que se retienen en la columna C18 de HPLC bajo las condiciones utilizadas.

La mezcla de ácidos [ $^{14}\text{C}$ ]fujenoicos y ácido *ent-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi*[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico se extrajo y purificó como se describe en 2.8 y se aplicó a una placa de sílicagel (cromatofolios AL TLC Sílicagel 60, Merck; de 7x2 cm). La cromatografía se desarrolló con una solución de hexano: acetato de etilo 30:70 que contenía 3 gotas de ácido fórmico por cada 5 mL. En estas condiciones el Rf del ácido *ent-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi*[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico es de 0,6, en tanto que el Rf de los ácidos fujenoicos (diácido fujenoico y triácido fujenoico) es de 0,1. Después de secar la placa, la sílica se raspó cada 1 cm directamente a frascos de centelleo para medir la radiactividad. Para acumular productos para análisis, se raspó la sílica a un tubo de ensayo y se eluyó con metanol.

### **2.12. Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido.**

Se utilizó el contador Packard Tri-Carb modelo 1600 TR. El líquido de centelleo contiene 0,125 g de 1,4-bis-[2-(5-feniloxazolil)]-benceno y 4 g de 2,5-difeniloxazol en 1 L de tolueno grado técnico. Esta mezcla se diluyó con 500 mL del detergente Arcopal después de su disolución para completar la solución de centelleo.

La eficiencia de conteo para  $^{14}\text{C}$  fue de 96%, cuantificada por medio de un estándar de  $^{14}\text{C}$ -tolueno (Amersham).

### **2.13. Identificación de los productos de metabolización por GC/MS.**

Algunos productos separados por HPLC fueron metilados con diazometano y sililados con N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) para obtener los derivados volátiles (**Urrutia et al., 2001**). Éstos fueron analizados en base a los espectros de masa por comparación con el espectro de GAs estándar, en Rothamsted Research, Harpenden, U.K.

Los espectros de los distintos productos se adjuntan en el anexo 1.

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1. Reacciones de la biosíntesis de GA<sub>4</sub> por *S. rhois*. Metabolización de precursores marcados con <sup>14</sup>C por cultivos líquidos.

Con el objeto de identificar las reacciones que participan en la biosíntesis de GAs a partir del ácido *ent*-kaurenico en *S. rhois*, se investigó la transformación de distintos intermediarios descritos para la biosíntesis del ácido giberélico en *F. fujikuroi*, marcados con <sup>14</sup>C, por cultivos líquidos de este hongo (Tabla 1). Después de incubar estos precursores con cultivos crecidos en un medio que no contenía compuestos nitrogenados, se aislaron e identificaron los productos formados a distintos tiempos de incubación, para detectar los productos finales y los intermediarios en cada caso. Se realizaron incubaciones de 2-3 días para identificar los productos correspondientes a las etapas finales de la secuencia biosintética, en tanto que en incubaciones cortas (20-60 min) se pudieron detectar intermediarios tempranos que no se acumulan en las condiciones anteriores.

Los resultados descritos en la Tabla 1 muestran que los derivados *ent*-kaurenoides, ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenico y ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi-[<sup>14</sup>C]kaurenico (Fig. 4) fueron transformados después de 2-3 días de incubación en dos productos marcados con <sup>14</sup>C: la giberelina de 20 carbonos, 3 $\beta$ -hidroxilada, [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> (25-10%) y el producto final de la vía metabólica, la giberelina de 19 carbonos, 3 $\beta$ -hidroxilada, [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub> (53-70%). Los mismos productos se obtuvieron a partir de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído en incubaciones de 3 días, lo que sugiere que tanto el ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi-[<sup>14</sup>C]kaurenico como el [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído y el [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> serían intermediarios en la secuencia de oxidación del ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenico hasta

[<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub>. La detección de ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico (10%) después de 20 min de incubación con ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenoico así como la formación de una baja concentración de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído a partir de ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico en incubaciones cortas confirmó que estos derivados son en realidad intermediarios en la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico (Tabla 1). Las reacciones detectadas a partir de cada precursor se resumen en la Tabla 2.

En ninguna de las incubaciones anteriores se formaron productos no hidroxilados, lo que indica que la vía 3 $\beta$ -hidroxilada es la principal ruta de biosíntesis de GA<sub>4</sub> en *S. rhois*. Los intermediarios son canalizados hacia esta vía, a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído a través de la reacción de 3 $\beta$ -hidroxilación de este sustrato. El producto respectivo, [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> aldehído (Fig. 4), no fue detectado en ninguna de las incubaciones posiblemente debido a su alta velocidad de oxidación, sin embargo este intermediario debería necesariamente formarse para explicar la síntesis de [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> a partir de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído. La síntesis de [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> también podría explicarse a través de la 3 $\beta$ -hidroxilación de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>, sin embargo esta posibilidad fue descartada ya que no se encontraron productos 3 $\beta$ -hidroxilados a partir de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> en incubaciones de 60 min o 2 días (Tabla 1).

**Tabla 1.** Metabolización de precursores de GAs marcados con  $^{14}\text{C}$  por cultivos líquidos de *S. rhois*.

| Precursor  | Tiempo de incubación | Productos <sup>a</sup>  | Tr (min) <sup>b</sup> |
|--|----------------------|---|-----------------------|
| Ácido <i>ent</i> -[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico                    | 20 min <sup>c</sup>  | Ác. <i>ent</i> -7 $\alpha$ -hidroxi[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico (10%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> (6%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub> (10%)<br>7 $\beta$ ,18-dihidroxi<br>[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenolido (14%) | 21<br>14<br>15<br>13  |
|  | 2 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> (25%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub> (53%)   | 14<br>15              |
| Ácido <i>ent</i> -7 $\alpha$ -hidroxi[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico | 20 min               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> aldehído (18%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> (10%)   | 25<br>14              |
|  | 3 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> (10%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub> (70%)   | 14<br>15              |
| [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub> aldehído                       | 3 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub> (15%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub> (65%)   | 14<br>15              |
| [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>12</sub>                                | 60 min               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>40</sub> (10%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>25</sub> (28%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>24</sub> (29%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>9</sub> (17%)   | 8<br>15<br>17<br>20   |
|  | 2 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>40</sub> (28%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>25</sub> (32%)<br>[ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>24</sub> (25%)   | 8<br>15<br>17         |
| [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>14</sub>                                | 3 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub> (80%)  | 15                    |
| [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>9</sub>                                 | 3 días               | [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>40</sub> (35%)   | 8                     |
| [ $^{14}\text{C}$ ]GA <sub>4</sub>                                 | 3 días               | ----- <sup>d</sup>  |                       |

<sup>a</sup> Identificados por su co-cromatografía con estándares y por su patrón de fragmentación en GC-MS.

<sup>b</sup> Tiempo de retención en HPLC, utilizando una gradiente de 60-100% MeOH.

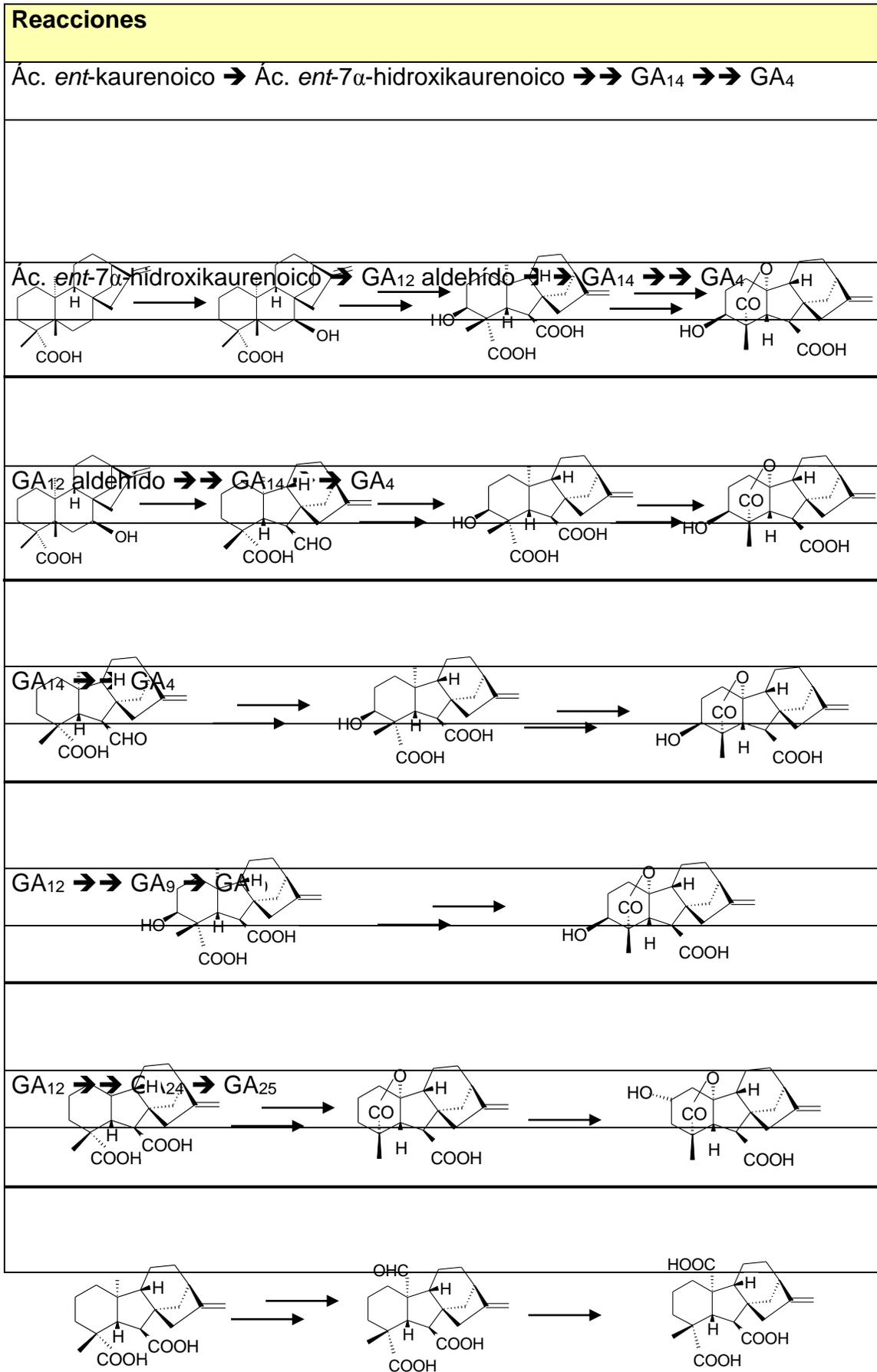
<sup>c</sup> Incubación realizada a 25°C con el fin de hacerla más lenta y así identificar intermediarios.

<sup>d</sup> No se detectaron productos y se recuperó el sustrato inicial no transformado.

La reacción de oxidación del C20 fue investigada con la giberelina no hidroxilada [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> (C20 metilo). Después de 2 días de incubación, este sustrato generó los productos C20 aldehído ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub>), C20 carboxilato ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub>) y el producto de 19 carbonos hidroxilado en la posición 2, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>40</sub>, que evidencia la oxidación de C20 hasta CO<sub>2</sub> seguida por oxidación en la posición 2. En incubaciones de 60 min se encontró adicionalmente la giberelina de 19 carbonos no hidroxilada [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> lo que sugiere que ésta generaría el producto [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>40</sub>. Esto fue confirmado utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> como precursor, el que fue transformado por los cultivos de *S. rhois* en [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>40</sub>. No se obtuvieron productos 3 $\beta$ -hidroxilados a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> lo que confirma que en este hongo la hidroxilación en 3 $\beta$  ocurre en una etapa temprana de la secuencia, a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído. Las enzimas de *S. rhois*, por lo tanto, catalizan la oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> en el carbono 20 y en el carbono 2 (Tabla 2).

Finalmente se encontró que la giberelina [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>4</sub> no es metabolizada por los cultivos, confirmando que corresponde al producto final de la vía metabólica y que las reacciones posteriores, presentes en *F. fujikuroi* (desaturación e hidroxilación en C13) están ausentes en *S. rhois*. Las reacciones demostradas a partir de los distintos sustratos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Reacciones detectadas en los experimentos de metabolización.



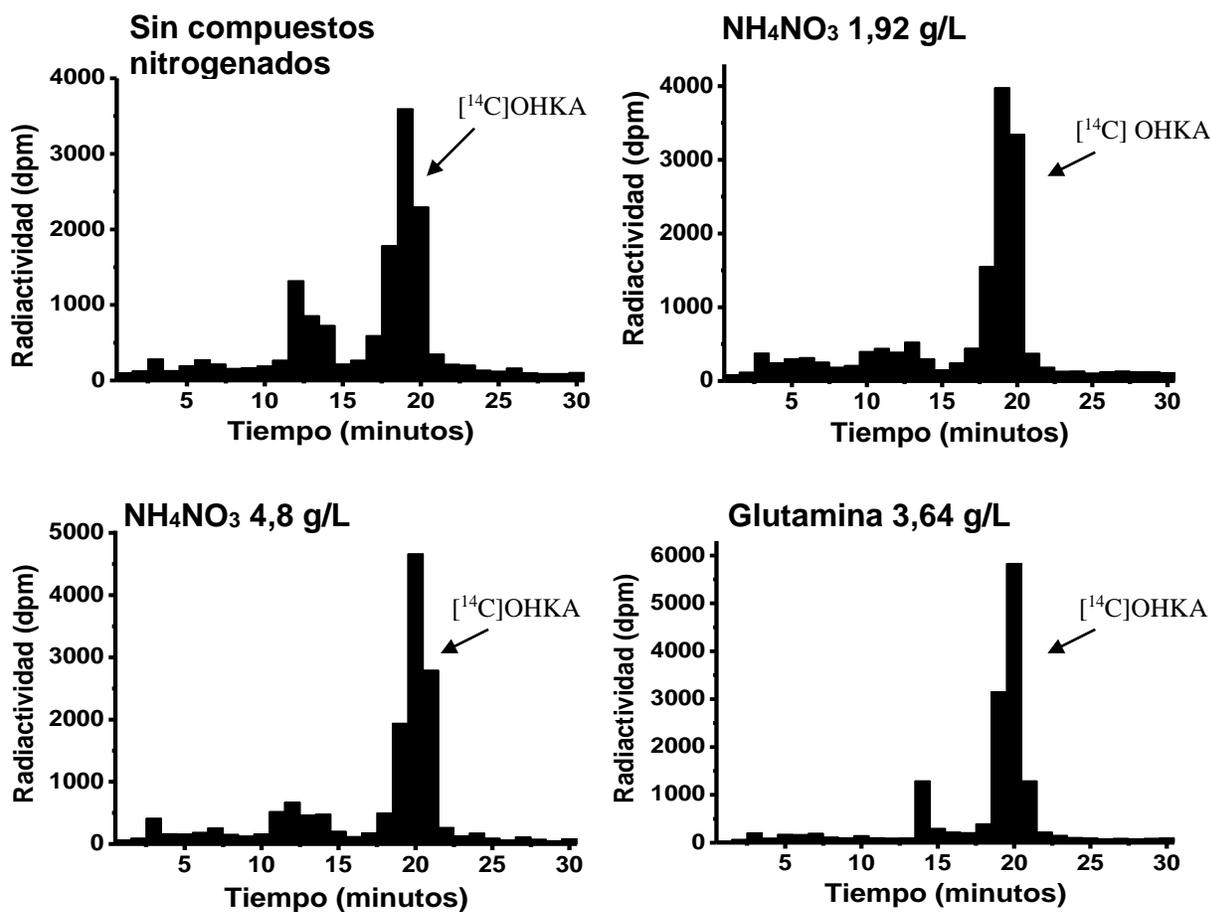
### 3.2. Efecto de compuestos nitrogenados sobre la velocidad de utilización del ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico por cultivos de *S. rhois*.

La presencia de compuestos nitrogenados, como NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o glutamina, en el medio de cultivo, genera una fuerte disminución en la velocidad de síntesis de metabolitos secundarios en *F. fujikuroi*, como GAs y bicaverinas debido a una represión de los respectivos genes (**Brückner y Blechschmidt, 1991b; Candau y cols., 1992**). Tomando este antecedente se procedió a investigar el efecto de compuestos nitrogenados sobre la biosíntesis de GAs en *S. rhois*.

Para esto se midió la velocidad de metabolización del ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico ([<sup>14</sup>C]OHKA) en distintos medios que contienen como fuente de nitrógeno NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,92 g/L (40%ICI), NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 4,8 g/L (100%ICI), glutamina 3,64 g/L o bien ningún compuesto nitrogenado (0%ICI). Se eligió el ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico en este experimento debido a que participa en una de las etapas tempranas, limitantes de la vía de síntesis de GAs (**Rojas y cols., 2001**), de modo que su velocidad de oxidación reflejaría la velocidad de síntesis de GAs. Las incubaciones se realizaron en presencia de AMO 1618 como inhibidor de la síntesis de GAs endógenas (**Rademacher, 1992b**). Para comparar las velocidades obtenidas en los distintos medios, se utilizó una cantidad constante de micelio en las incubaciones (100 mg de micelio, peso seco, por 10 mL de medio de cultivo).

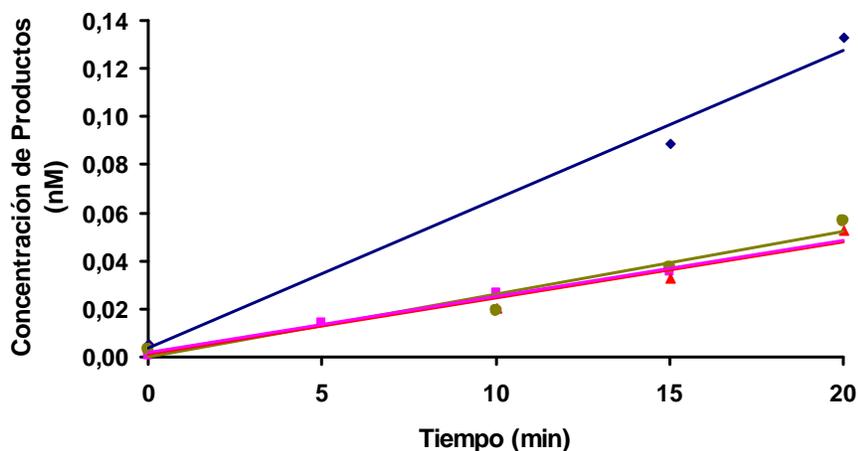
En la Fig. 6 se muestran los perfiles cromatográficos en HPLC de los productos obtenidos en 15 minutos de incubación en los distintos medios de cultivo. En ausencia de compuestos nitrogenados se puede apreciar que el sustrato fue parcialmente metabolizado, quedando aproximadamente un 50% de

éste sin transformar. Por otra parte, la metabolización del sustrato utilizado en los cultivos que contienen  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  o glutamina, ocurrió con una menor eficiencia, encontrándose entre un 60 y 67% de sustrato remanente.



**Figura 6.** Perfiles de HPLC para los productos de metabolización de ácido *ent-7 $\alpha$* -hidroxi $[^{14}\text{C}]$ kaurenoico ( $[^{14}\text{C}]\text{OHKA}$ ) por *S. rhois* en medios de cultivo con y sin compuestos nitrogenados. Tiempo de incubación 15 min. Los productos con  $T_R$  14 y 15 min corresponden a productos de la biosíntesis de GAs.

La concentración de productos obtenida a distintos tiempos de incubación entre 5 y 20 min se graficó en función del tiempo para obtener la velocidad de utilización del sustrato en las distintas condiciones, que corresponden a las pendientes de las curvas (Fig. 7). Los valores de velocidad obtenidos se muestran en la Tabla 3.



**Figura 7.** Cinética de aparición de producto a partir de ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico por cultivos de *S. rhois* en medios sin N (◆), con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,92 g/L (■), con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 4,8 g/L (▲) y con glutamina 3,64 g/L (●). Los valores fueron normalizados por mg de micelio (peso seco).

**Tabla 3.** Efecto de compuestos nitrogenados sobre la velocidad de oxidación del ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico por cultivos de *S. rhois*.

| Compuesto Nitrogenado <sup>a</sup>                | Velocidad (nM/min) <sup>b</sup> |
|---|---------------------------------|
| Ninguno   | 0,0062                          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,92 g/L (40%ICI) | 0,0023                          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 4,8 g/L (100%ICI) | 0,0023                          |
| Glutamina 3,64 g/L                                | 0,0026                          |

<sup>a</sup> Presente en el medio de cultivo que contiene 80 g/L de glucosa, 5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, trazas de iones metálicos.

<sup>b</sup> Velocidad inicial de la oxidación de ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxi*[<sup>14</sup>C]kaurenoico.

Los resultados anteriores indican que la presencia de compuestos nitrogenados en el medio de cultivo estaría ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la oxidación del ácido *ent-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico* en cultivos líquidos de *S. rhois*. La velocidad se redujo parcialmente, disminuyendo 3 veces con respecto al medio sin nitrógeno.

### 3.3. Biosíntesis de kaurenolidos y ácidos fujenoicos por *S. rhois*.

Los kaurenolidos y ácidos fujenoicos son productos laterales de la biosíntesis de GAs tanto en plantas como en *F. fujikuroi* (Hedden y Graebe, 1981; Hedden y cols., 1973; Beale y cols., 1982), generados a partir de la oxidación del ácido *ent*-kaurenico y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenico, respectivamente. En *F. fujikuroi* las oxidaciones involucradas en la formación tanto de kaurenolidos como de ácidos fujenoicos, son catalizadas por la monooxigenasa P450 multifuncional (GA<sub>14</sub> sintasa), que cataliza la oxidación del ácido *ent*-kaurenico y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenico hasta GA<sub>14</sub> (Rojas y cols., 2001; Rojas y cols., 2004). Durante el ciclo catalítico de esta enzima se generan intermediarios radicalarios derivados del ácido *ent*-kaurenico y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenico, los que se estabilizan formando kaurenolidos y ácidos fujenoicos respectivamente.

Con el objeto de investigar si participa una monooxigenasa P450 en la oxidación del ácido *ent*-kaurenico y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenico por *S. rhois*, se administró a los cultivos ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico y ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenico, precursores de kaurenolidos y ácidos fujenoicos respectivamente, los que se generan en *F. fujikuroi* a partir del ácido *ent*-kaurenico y el ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenico por acción del centro de Fe hemínico de la GA<sub>14</sub> sintasa.

Después de 2 días de incubación a 28°C, el ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico fue transformando completamente a tres productos con T<sub>R</sub> de 10 min, 7 min y 8 min en HPLC, respectivamente, que fueron identificados como 7 $\beta$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido, 7 $\beta$ ,18-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido y 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -

dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido (Tabla 4). El producto con T<sub>R</sub> 10 min (7β-hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido) fue transformado completamente a 7β,18-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido y 3β,7β-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido, lo que indica que es un intermediario.

**Tabla 4.** Utilización de precursores de kaurenolidos y ácidos fujenoicos por cultivos de *S. rhois*.

| Precursor   | Productos*                                    | %     | Tr (min) | Rf   |
|---|---|-------|----------|------|
| Ácido <i>ent</i> [ <sup>14</sup> C]kauradienoico              | 7β-hidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido      | 10    | 10       |      |
|   | 7β,18-dihidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido | 62    | 7        |      |
|   | 3β,7β-dihidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido | 23    | 8        |      |
| 7β-hidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido**                    | 7β,18-dihidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido | 70    | 7        |      |
|   | 3β,7β-dihidroxi [ <sup>14</sup> C]kaurenolido | 22    | 8        |      |
| Ácido <i>ent</i> -6α,7α-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico | Diácido [ <sup>14</sup> C]fujenoico           | 90*** |          | 0,14 |
|   | Triácido [ <sup>14</sup> C]fujenoico          |       |          | 0,14 |

\* Incubación de 2 días.

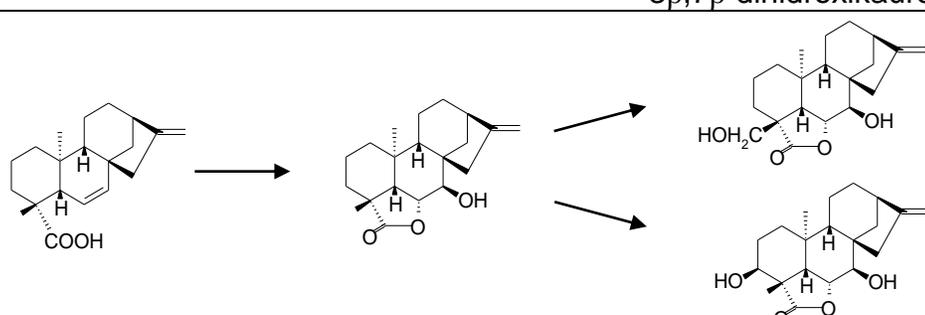
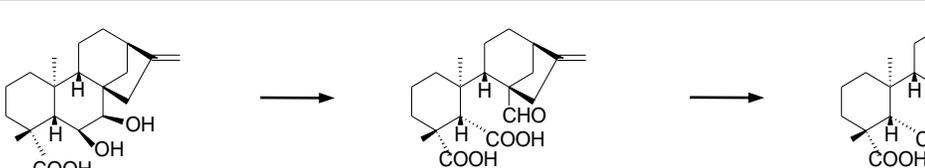
\*\* Producto con Tr de 10 min en HPLC (gradiente de 15 min 75-100% MeOH, 15 min 100% MeOH).

\*\*\* % de conversión en diácido fujenoico + triácido fujenoico. Ambos productos presentan el mismo Rf en cromatografía en capa fina (TLC).

El ácido *ent*-6α,7α-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico se transformó en un 90% en ácidos [<sup>14</sup>C]fujenoicos, en una incubación de tres días con el cultivo de *S. rhois*. Los productos, en este caso, se separaron por cromatografía en capa fina (TLC), ya que los ácidos fujenoicos se retienen y no se logran eluir, en la columna C18 de

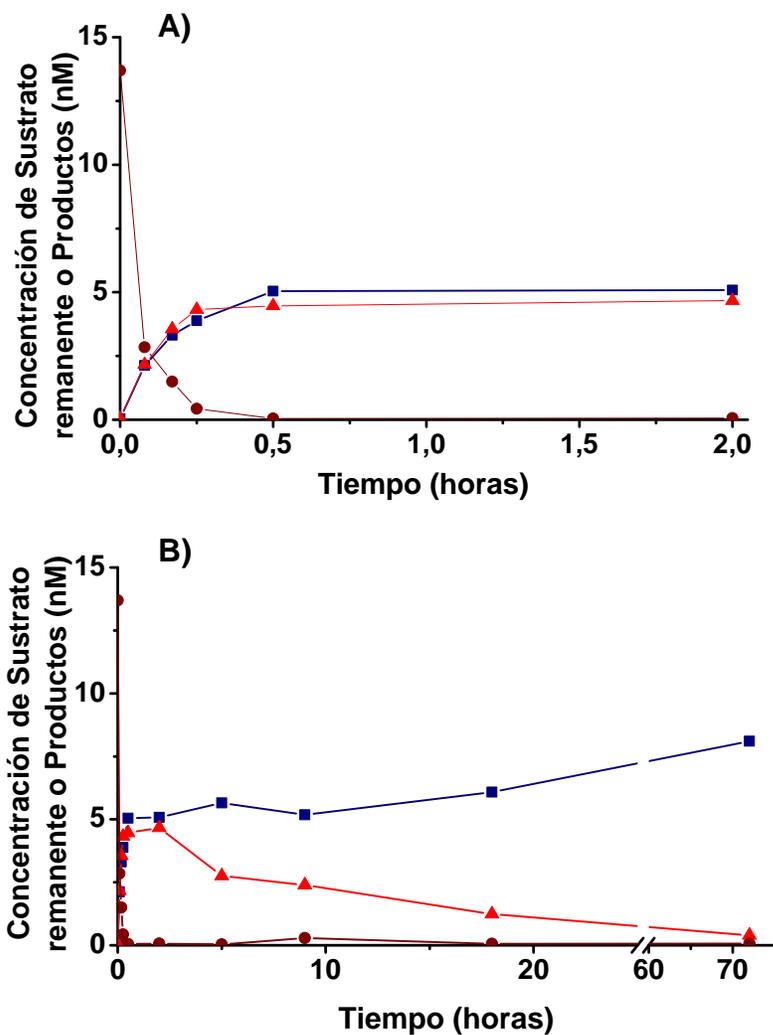
HPLC. Los ácidos fujenoicos resultan de la apertura oxidativa del anillo B del ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-kaurenoico y pueden contener una función carboxilato y una aldehído en C6 y C7 (diácido fujenoico) o bien dos funciones carboxilato (triácido fujenoico) (Tabla 5). Las reacciones de la síntesis de kaurenolidos y ácidos fujenoicos demostradas a partir de ambos sustratos se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Reacciones detectadas en los experimentos de metabolización de ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico y ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico.

| Reacciones  |  |
|---|--|
| <p>Ác. <i>ent</i>-kauradienoico <math>\rightarrow</math> 7<math>\beta</math>-hidroxi-kaurenolido</p>  | <p><math>\rightarrow</math> 7<math>\beta</math>,18-dihidroxi-kaurenolido</p> <p><math>\rightarrow</math> 3<math>\beta</math>,7<math>\beta</math>-dihidroxi-kaurenolido</p> |
|    |  |
| <p>Ac. <i>ent</i>-6<math>\alpha</math>,7<math>\alpha</math>-dihidroxi-kaurenoico <math>\rightarrow</math> Diácido fujenoico <math>\rightarrow</math> Triácido fujenoico</p> |  |
|   |  |

Con el objeto de investigar el progreso de la reacción de oxidación del ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico y de confirmar la participación del 7 $\beta$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido como intermediario, se realizaron incubaciones con este precursor a diferentes tiempos, entre 5 min y 18 horas y se cuantificaron los

productos (Fig. 8). Se encontró que a tiempos cortos de incubación el sustrato desaparece y aparecen paralelamente dos tipos de productos: kaurenolidos monohidroxilados y dihidroxilados (Fig. 8a). A tiempos más largos de incubación (Fig. 8b), el 7 $\beta$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido comienza a desaparecer y los productos dihidroxilados aumentan su concentración (7 $\beta$ ,18-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido y 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido). Si bien la desaparición del 7 $\beta$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido coincide con el aumento de la concentración de los productos dihidroxilados, éste no es exclusivamente transformado en dichos productos, sino que también da lugar a la formación de un producto de oxidación que no tiene relación con la síntesis estudiada.

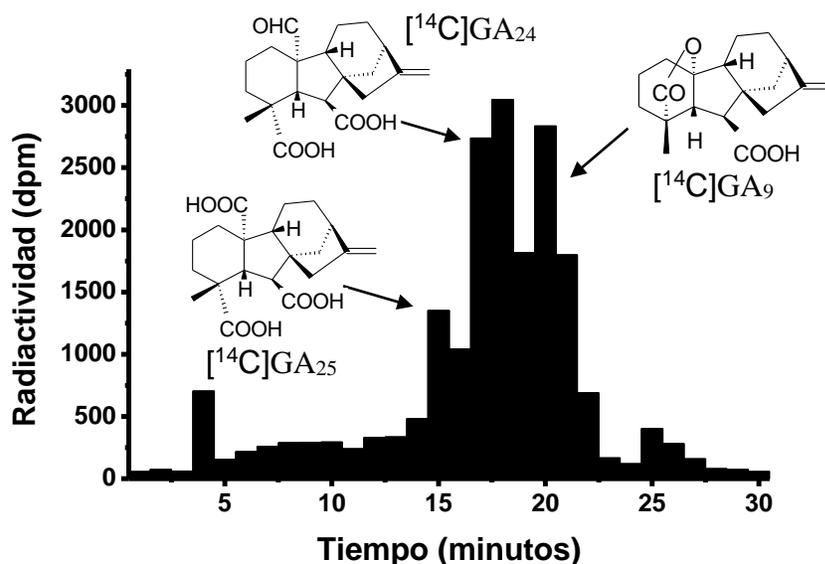


**Figura 8.** Curvas de progreso de la biosíntesis de kaurenolidos a partir de ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kauradienoico. 7β,18-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido/3β,7β-dihidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido (■); 7β-hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenolido (▲); ácido *ent*[<sup>14</sup>C]kauradienoico (◆). A) Incubaciones desde 5 min hasta 2 hrs; B) Incubaciones desde 5 min hasta 72 hrs.

Estos resultados son consistentes con la participación de monooxigenasas P450 en la oxidación del ácido *ent*-kaurenico y del ácido *ent*-7α-hidroxi-kaurenico por cultivos de *S. rhois*.

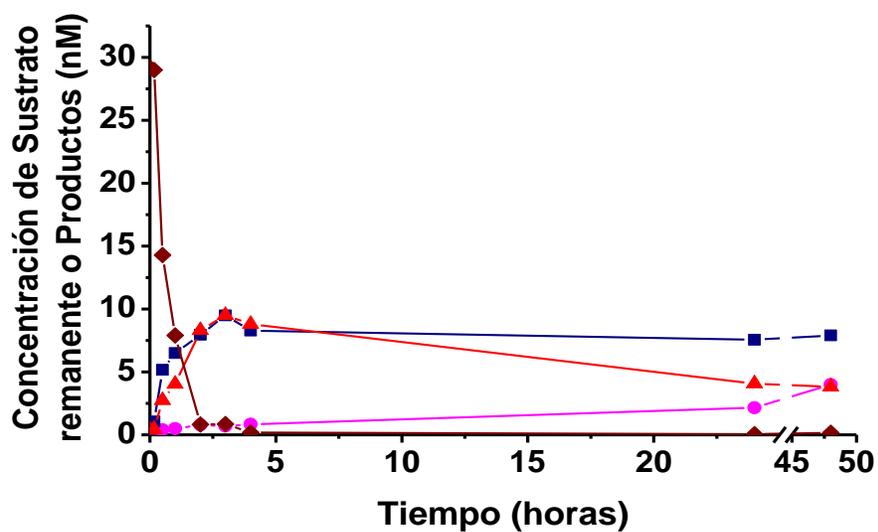
### 3.4. Oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por cultivos de *S. rhois*. Intermediarios y productos.

La oxidación del C20 de las GAs hasta CO<sub>2</sub> para formar la función 19,γ10 lactona es una etapa fundamental en la síntesis de GAs, ya que esta función les confiere la actividad biológica. Esta etapa de oxidación se estudió en detalle en *S. rhois* utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> como sustrato (GA no 3β-hidroxilada, con un grupo metilo en C20) más bien que con [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>14</sub>, ya que los productos respectivos son más fáciles de cuantificar por HPLC, debido su mejor separación. Los cultivos líquidos de *S. rhois* se incubaron con [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> a diferentes tiempos entre 10 min y 48 horas y se cuantificaron los productos formados. El [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> administrado fue completamente metabolizado a las 2 horas de incubación dando origen a 3 productos más polares (Fig. 9). Los T<sub>R</sub> 15, 17 y 20 minutos corresponden a [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub> (GA con un grupo carboxilato en C20), [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub> (GA con un grupo aldehído en C20) y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> (GA de 19 carbonos, 19γ,10 lactónica).



**Figura 9.** Perfil cromatográfico en HPLC para los productos de metabolización de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> por cultivos de *S. rhois*. Tiempo de incubación 2 horas. El T<sub>R</sub> de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> es de 24 min.

Los tres productos se forman paralelamente a la desaparición del sustrato y aumentan su concentración entre los 5 min y 5 hrs (Fig. 10). A tiempos más largos aparece otro producto con  $T_R$  8 min correspondiente a  $[^{14}C]GA_{40}$  junto con el decaimiento del producto  $[^{14}C]GA_9$ .



**Figura 10.** Curva de progreso de la metabolización de  $[^{14}C]GA_{12}$  por cultivos de *S. rhois*. (■)  $[^{14}C]GA_{24}$  +  $[^{14}C]GA_{25}$ ; (▲)  $[^{14}C]GA_9$ ; (◆)  $[^{14}C]GA_{40}$ .

### 3.5. Participación de monooxigenasas P450 en la biosíntesis de giberelinas por *S. rhois*.

Con el objeto de confirmar la participación de monooxigenasas P450 en la biosíntesis de GAs por hongos del género *Sphaceloma* se determinaron las actividades enzimáticas presentes en una fracción de membranas (pellet de 100.000xg) obtenida desde el micelio de *S. rhois* o de *S. manihotícola*. Se utilizaron dos especies de *Sphaceloma* en este experimento ya que se pudieron demostrar distintas reacciones de la biosíntesis de GAs en cada una de ellas. En *F. fujikuroi* las monooxigenasas de GAs se encuentran asociadas al retículo endoplásmico y se recuperan en el pellet de 100.000xg (**Rojas y cols., 2004; Urrutia y cols., 2001**). En presencia de NADPH como dador de electrones y FAD como cofactor, la suspensión microsomal de *S. manihotícola* catalizó la oxidación del ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenoico para dar ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico y [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> como productos (Tabla 6). El ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico fue metabolizado por los microsomas hasta el producto 3 $\beta$ -hidroxilado [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub>. La síntesis de GA<sub>14</sub> corresponde a 4 etapas de oxidación desde el ácido *ent*-kaurenoico. En presencia de los mismos cofactores (NADPH y FAD) el [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído se convirtió también en [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> en presencia de la fracción microsomal de *S. rhois* o de *S. manihotícola* junto a una pequeña formación de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> que se forma por oxidación del aldehído en C7. Esto indica que la o las enzimas que catalizan la oxidación en C7, la contracción del anillo B y la 3 $\beta$ -hidroxilación presentan las propiedades esperadas para monooxigenasas P450. En todas las incubaciones, [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> o [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> fueron los productos finales y no se

observaron las oxidaciones posteriores en C20. Esto se confirmó utilizando  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  como sustrato, el que se recuperó intacto después de las incubaciones. El  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  aldehído no fue oxidado por la fracción microsomal en presencia de NADH y FAD, sugiriendo que el sistema transportador de electrones asociado a la monooxigenasa que oxida este sustrato es específico para NADPH. El FAD es un activador de la oxidación de  $[^{14}\text{C}]\text{GA}_{12}$  aldehído (Tabla 6) lo que indica la participación de una flavoproteína en esta reacción.

En conjunto, los resultados anteriores indican que la o las enzimas que catalizan la oxidación en C7, la contracción del anillo B y la  $3\beta$ -hidroxilación presentan las propiedades esperadas para monooxigenasas P450.

**Tabla 6.** Reacciones detectadas en microsomas del micelio de *S. rhois* y/o de *S. manihotica*.

| Sustrato   | Fracción microsomal                     | Cofactores <sup>a</sup> | Productos <sup>b</sup>  | % conversión sustrato |
|--|---|-------------------------|---|-----------------------|
| Ácido <i>ent</i> - <sup>[14C]</sup> kaurenoico               | <i>S. manihotica</i>                    | NADPH/FAD               | ác. <i>ent</i> -7 $\alpha$ -OH <sup>[14C]</sup> kaurenoico<br><sup>[14C<sub>4</sub>]</sup> GA <sub>14</sub> | 7<br>25               |
| Ácido <i>ent</i> -7 $\alpha$ -OH <sup>[14C]</sup> kaurenoico | <i>S. manihotica</i>                    | NADPH/FAD               | <sup>[14C]</sup> GA <sub>14</sub>   | 34                    |
| <sup>[14C]</sup> GA <sub>12</sub> -aldehído                  | <i>S. rhois</i>                         | NADPH/FAD               | <sup>[14C]</sup> GA <sub>14</sub>   | 38                    |
|  | <i>S. manihotica</i>                    |                         | <sup>[14C]</sup> GA <sub>12</sub>   | 8                     |
| <sup>[14C]</sup> GA <sub>12</sub> aldehído                   | <i>S. rhois</i><br><i>S. manihotica</i> | NADH/FAD                | ----- <sup>c</sup>  | 0                     |
| <sup>[14C]</sup> GA <sub>12</sub> aldehído                   | <i>S. rhois</i>                         | NADPH                   | ----- <sup>c</sup>  |                       |
| <sup>[14C]</sup> GA <sub>12</sub>                            | <i>S. rhois</i><br><i>S. manihotica</i> | NADPH/FAD               | ----- <sup>c</sup>  | 0                     |

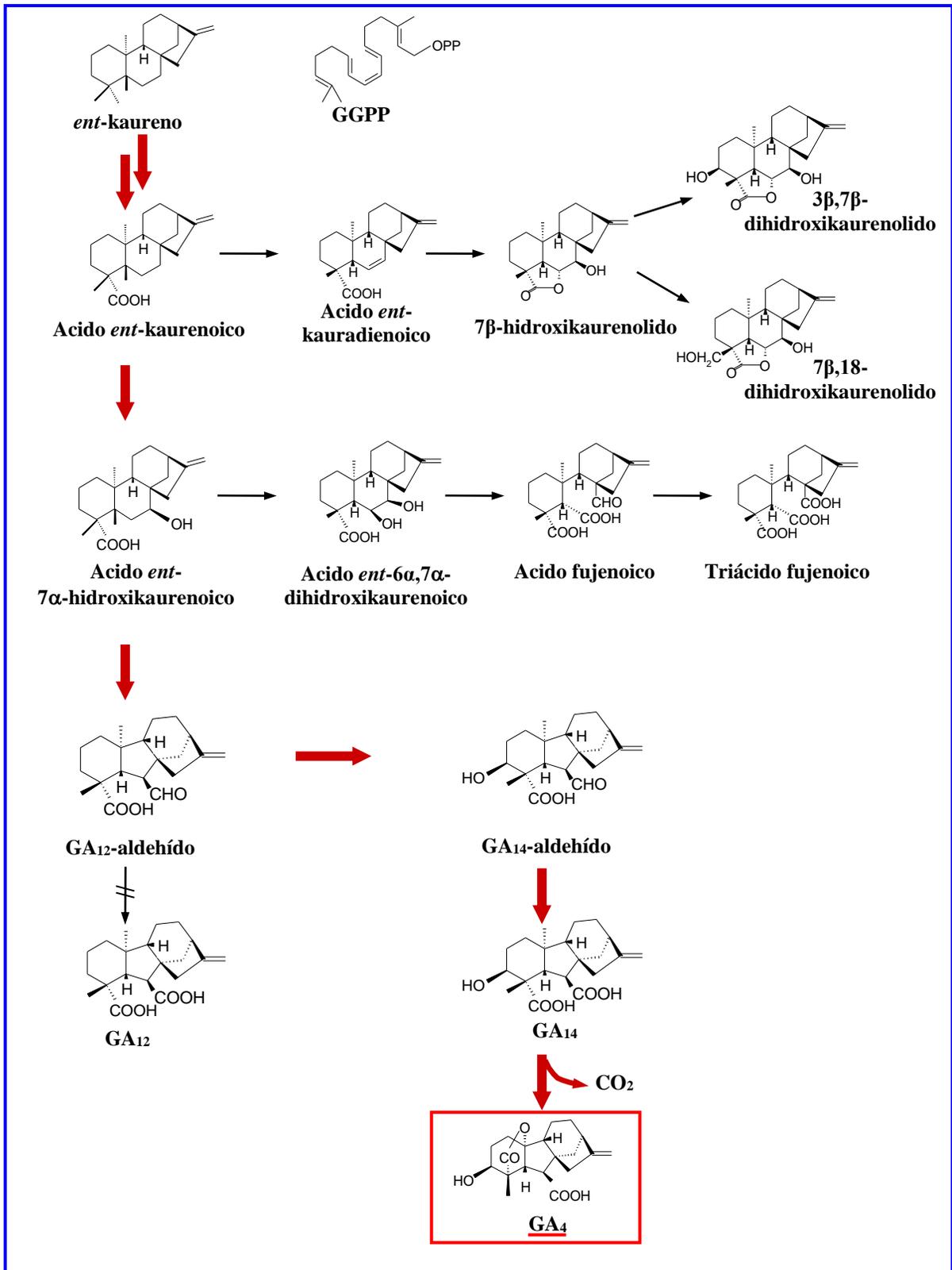
<sup>a</sup> NADPH 10mM, NADH 1 mM, FAD 5  $\mu$ M

<sup>b</sup> Identificados por los tiempos de retención en HPLC, por comparación con los correspondientes estándares

<sup>c</sup> Después de la incubación se recuperó el sustrato intacto

#### 4. DISCUSIÓN.

*S. rhois* pertenece a uno de los 3 géneros de hongos productores de GAs: *Sphaceloma*, *Fusarium* y *Phaeosphaeria*. A diferencia de *F. fujikuroi* que produce ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) como producto final, *S. rhois* sintetiza la giberelina A<sub>4</sub>, que presenta distintos efectos sobre el crecimiento vegetal que el ácido giberélico. Las GAs secretadas al medio de cultivo de *S. rhois*, descritas por W. Rademacher en 1992, sugerían que en la secuencia biosintética de GA<sub>4</sub> participarían intermediarios 3β-hidroxilados ya que se acumula la giberelina A<sub>14</sub> y no se detectan niveles significativos de intermediarios no hidroxilados (**Rademacher, 1992a**). En este trabajo demostramos directamente, mediante la administración de precursores de GAs marcados con <sup>14</sup>C, las distintas reacciones de la secuencia biosintética de GA<sub>4</sub> a partir del ácido *ent*-kaurenoico incluyendo intermediarios, productos finales y productos laterales de la vía (Fig. 11).



**Figura 11.** Ruta biosintética de GA<sub>4</sub> propuesta para *Sphaceloma rhois*.

\* Aunque no se detectó, la 3β-hidroxilación de GA<sub>12</sub> aldehído demostrada, hace obligatoria su participación en la síntesis de GA<sub>4</sub>. **→** Más de una etapa.

El ácido *ent*-kaurenoico se hidroxila primero en C7, seguido por la contracción del anillo B para dar GA<sub>12</sub> aldehído (Fig. 11). Esta reacción se iniciaría con la oxidación del C6. El GA<sub>12</sub> aldehído se hidroxilaría en 3β para dar GA<sub>14</sub>, a través de GA<sub>14</sub> aldehído, el que se oxidaría en C20 para dar el producto final GA<sub>4</sub> (Fig. 11). Dos enzimas, posiblemente MOs P450, catalizarían este conjunto de reacciones: una *ent*-kaurenoico oxidasa responsable de la oxidación de ácido *ent*-kaurenoico hasta GA<sub>14</sub> y una oxidasa del C20 que convertiría al metilo 20 en CO<sub>2</sub>. El GA<sub>12</sub> aldehído se oxidaría exclusivamente en C3 y no en C7 por lo que la vía no hidroxilada que se inicia con el producto de oxidación en C7, GA<sub>12</sub>, no tiene una participación significativa en *S. rhois* (Fig. 11).

Todas las transformaciones anteriores corresponden a reacciones de oxidación, catalizadas por oxidasas que actúan sobre distintas posiciones del esqueleto carbonado del ácido *ent*-kaurenoico (C7 y C6), del GA<sub>12</sub> aldehído (C3 y/o C7) o bien del GA<sub>14</sub> (C20). Mediante la identificación de los productos de metabolización obtenidos a distintos tiempos de incubación se demostró que el ácido *ent*-7α-hidroxi-kaurenoico, el GA<sub>12</sub> aldehído y el GA<sub>14</sub> son intermediarios en la biosíntesis del GA<sub>4</sub> y se confirmó que esta GA no sufre transformaciones posteriores y corresponde efectivamente al producto final de la vía metabólica, en tanto que el producto lactónico no hidroxilado (GA<sub>9</sub>) no se sintetiza (Fig. 11). Al igual que en *F. fujikuroi* y a diferencia de *Phaeosphaeria sp.*, en *S. rhois* la reacción de 3β-hidroxilación ocurre en una etapa temprana de la secuencia, a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído, el que fue convertido eficientemente, por los cultivos de *S. rhois*, en los productos 3β-hidroxilados GA<sub>14</sub> y GA<sub>4</sub>. No se detectó la 3β-

hidroxilación de los intermediarios más oxidados, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub>, por los cultivos de *S. rhois* (Fig. 11), sin embargo, ambas reacciones no pueden ser completamente descartadas, ya que las reacciones de oxidación en C20 del GA<sub>12</sub> y de oxidación en C2 del GA<sub>9</sub> detectadas, podrían ocurrir con una gran eficiencia, la que no permitiría detectar la reacción de hidroxilación en C3 de estos precursores. En *Phaeosphaeria sp.*, en cambio, la reacción de 3 $\beta$ -hidroxilación ocurre en una etapa final de la secuencia, sobre el producto lactónico de 19 carbonos, GA<sub>9</sub>, por lo que todos los intermediarios de 20 carbonos son no hidroxilados (**Kawaide y cols., 1995**).

Las cuatro reacciones de oxidación sucesivas que dan cuenta de la síntesis de GA<sub>14</sub> a partir del ácido *ent*-kaurenoico, son catalizadas en *F. fujikuroi* por una monooxigenasa multifuncional, la GA<sub>14</sub> sintasa o MO P450-1 (**Rojas y cols., 2001**). Esta enzima hidroxila en el carbono C3 al GA<sub>12</sub> aldehído para dar GA<sub>14</sub> o alternativamente oxida en C7 a este sustrato para dar el producto GA<sub>12</sub> (**Urrutia y cols., 2001; Rojas y cols., 2001**). Ambas reacciones compiten siendo GA<sub>14</sub> el producto principal (**Urrutia y cols., 2001**). En *S. rhois* no se ha demostrado si una o más enzimas participan en la síntesis de GA<sub>14</sub> a partir del ácido *ent*-kaurenoico, sin embargo, a diferencia de *F. fujikuroi*, se encontró que el GA<sub>12</sub> aldehído se transforma completamente a productos 3 $\beta$ -hidroxilados y no forma GA<sub>12</sub> o productos posteriores, lo que indica que la reacción de oxidación en C7 sobre este sustrato no compite con la 3 $\beta$ -hidroxilación, por lo que la formación de productos no hidroxilados no sería relevante en *S. rhois* (Fig. 11). A diferencia de los intermediarios anteriores (ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico, GA<sub>12</sub> aldehído y GA<sub>14</sub>)

que se acumularon en las incubaciones, el GA<sub>14</sub> aldehído (Fig. 11) no fue detectado en los experimentos de metabolización. Su participación en la biosíntesis de GA<sub>4</sub> fue deducida de la conversión de GA<sub>12</sub> aldehído en GA<sub>14</sub>. El GA<sub>14</sub> aldehído tampoco se acumula en *F. fujikuroi* y su participación en la biosíntesis de GAs fue demostrada en este hongo mediante experimentos de dilución isotópica y a través de la conversión de [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> aldehído sintetizado químicamente (**Hedden y cols., 1974**).

Con respecto a la naturaleza de las enzimas de la biosíntesis de GAs en *S. rhois*, encontramos evidencia de que en este sistema fúngico las reacciones de oxidación de la biosíntesis de GA<sub>4</sub> son catalizadas por monooxigenasas P450. En la secuencia biosintética de GAs participan ciclasas y oxidasas y se ha demostrado, en *F. fujikuroi* y *Phaeosphaeria sp.*, que las oxidasas de GAs corresponden exclusivamente a monooxigenasas asociadas al citocromo P450 (**Tudzynski y Hölder, 1998; Kawaide, 2006**), a diferencia de los sistemas vegetales que utilizan dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato además de monooxigenasas (**Hedden y Kamiya, 1997**). En *Sphaceloma sp.* se encontró que las fracciones microsomales obtenidas desde el micelio catalizan la oxidación de varios intermediarios, en presencia de NADPH y FAD: ácido *ent*-[<sup>14</sup>C]kaurenoico, ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico o [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> aldehído, para dar la giberelina 3 $\beta$  hidroxilada [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> como producto final (Tabla 6, 7). Estas reacciones incluyen la hidroxilación en C7, la contracción del anillo B iniciada por oxidación en C6, la hidroxilación en C3 y la oxidación del grupo C7 aldehído hasta carboxilato. El

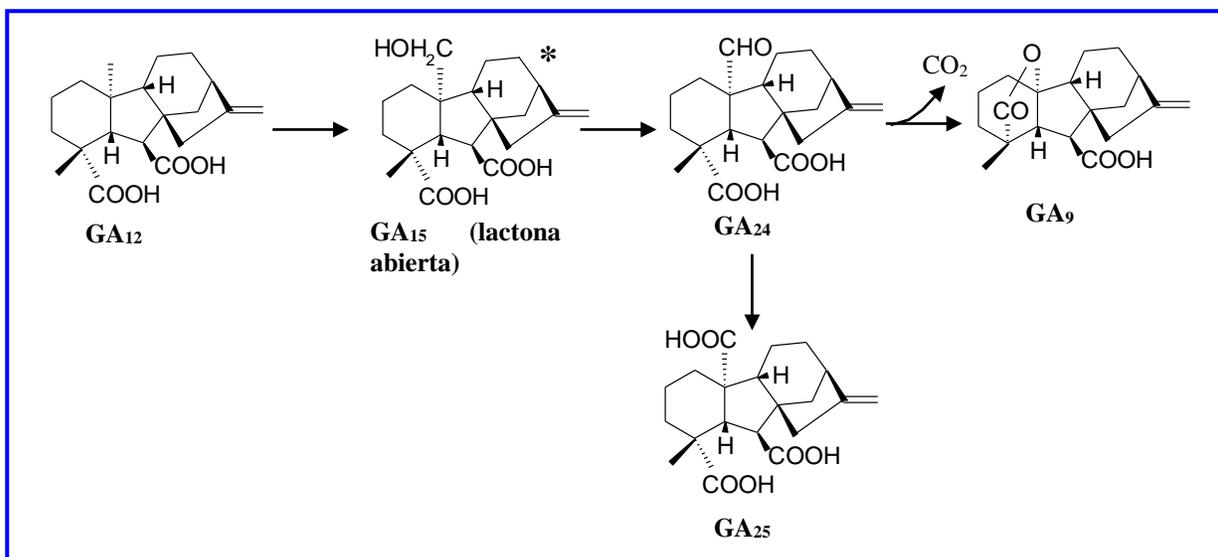
requerimiento absoluto de NADPH como fuente de electrones y de O<sub>2</sub> es consistente con la participación de monooxigenasas P450 en estas reacciones **(Donaldson y Luster, 1991)**. El requerimiento de FAD indica que participa una flavoproteína en estas reacciones de oxidación, como la citocromo P450 reductasa que transporta electrones desde el NADPH hasta las monooxigenasas P450 **(Malonek y cols., 2004)**. Ninguno de los sustratos anteriores fue transformado por los microsomas en presencia de NADH, demostrando que el sistema transportador de electrones asociado a las monooxigenasas de GAs en *S. rhois* es específico para NADPH y podría corresponder a la citocromo P450 reductasa **(Donaldson y Luster, 1991)**. Aun cuando nuestros resultados no demuestran si una o más monooxigenasas catalizan la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA<sub>14</sub>, el hecho de que estén presentes en los microsomas todas las actividades enzimáticas correspondientes a la GA<sub>14</sub> sintasa de *F. fujikuroi*, en tanto que las actividades posteriores están ausentes, sugiere que en *S. rhois* también una sola monooxigenasa multifuncional cataliza estas reacciones. Este punto deberá ser confirmado cuando se disponga de los genes de la biosíntesis de GAs de este hongo y se analicen las funciones catalíticas de los respectivos productos de expresión.

**Tabla 7.** Evidencias de participación de MOs P450 en la biosíntesis de GAs por *S. rhois*.

| Reacción   | Sistema enzimático     | Evidencia   |
|--|------------------------|---|
| Ácido <i>ent</i> -[ <sup>14</sup> C]kaurenoico → [ <sup>14</sup> C]GA <sub>14</sub> + [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub>   | Microsomas del micelio | Reacción asociada a membranas<br>requiere NADPH<br>requiere O <sub>2</sub><br>Activada por FAD  |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> -aldehído → [ <sup>14</sup> C]GA <sub>14</sub> + [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub>   | Microsomas del micelio | Reacción asociada a membranas<br>requiere NADPH<br>requiere O <sub>2</sub><br>Activada por FAD  |
| ác.[ <sup>14</sup> C]kaurenoico → 7β,18-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenolido + 3β,7β-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenolido  | Cultivos líquidos      | Reacción lateral de oxidación del ácido <i>ent</i> -kaurenoico por un centro de Fe hemínico   |
| ác.[ <sup>14</sup> C]kauradienoico → 7β-hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenolido → 7β,18-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenolido + 3β,7β-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenolido | Cultivos líquidos      | Reacción lateral de oxidación del ácido <i>ent</i> -kaurenoico por un centro de Fe hemínico   |
| ác. <i>ent</i> -6α,7α-dihidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico → diácido [ <sup>14</sup> C]fujenoico + triácido [ <sup>14</sup> C]fujenoico                                   | Cultivos líquidos      | Reacción lateral de oxidación del ácido <i>ent</i> -7α-hidroxi[ <sup>14</sup> C]kaurenoico por un centro de Fe hemínico                   |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> → [ <sup>14</sup> C]GA <sub>25</sub>  | Cultivos líquidos      | Reacción de oxidación del metilo en C <sub>20</sub> hasta COOH. Consistente con la participación de un centro de Fe hemínico.             |
| [ <sup>14</sup> C]GA <sub>12</sub> → [ <sup>14</sup> C]GA <sub>9</sub>   | Cultivos líquidos      | Reacción de oxidación del metilo en C <sub>20</sub> hasta CO <sub>2</sub> . Consistente con la participación de un centro de Fe hemínico. |

Las reacciones siguientes en la ruta biosintética de GA<sub>4</sub>, de oxidación del metilo en C20 de los precursores [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> y [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>, pudieron demostrarse en los cultivos de *S. rhois* pero no pudieron demostrarse con las fracciones microsomales (Tabla 7). Una posible explicación es que la C20 oxidasa de *S. rhois* no sea una monooxigenasa P450 y que se encuentre asociada a fracción soluble en vez que a la fracción de membranas, sin embargo, esto es poco probable porque en los otros dos sistemas fúngicos en que se ha descrito la biosíntesis de GAs (*F. fujikuroi* y *Phaeosphaeria*) la oxidación del C20 es catalizada por monooxigenasas P450 (Tudzynski y cols., 2002; Troncoso y cols., 2007; Kawaide y cols., 2006). Para *F. fujikuroi*, que es el sistema mejor caracterizado, la C20 oxidasa de GAs (MO P450-2) no se ha logrado ensayar *in vitro*, ya que esta actividad se pierde completamente al romper el micelio (Tudzynski y cols., 2002; Troncoso y cols., 2007). La reacción de oxidación del C20 de las GAs de *S. rhois* fue investigada mediante la incubación de los cultivos con [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> (GA 3β-hidroxiada, con un grupo metilo en C20) el que fue completamente transformado al producto de 19 carbonos, [<sup>14</sup>C]GA<sub>4</sub> (lactónico). Además se investigó en detalle la oxidación del precursor no hidroxilado, [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub>, el que permite detectar con facilidad productos e intermediarios. El [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> fue metabolizado completamente a los productos finales [<sup>14</sup>C]GA<sub>25</sub> (C20 carboxilato) y [<sup>14</sup>C]GA<sub>40</sub> ([<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> hidroxilado en C2) ambos productos en la misma proporción. La formación de [<sup>14</sup>C]GA<sub>40</sub> da cuenta de la reacción de oxidación del C20 metilo de [<sup>14</sup>C]GA<sub>12</sub> hasta CO<sub>2</sub> para formar [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub>, el que posteriormente sufre una hidroxilación para dar [<sup>14</sup>C]GA<sub>40</sub>. Esta última reacción posiblemente es catalizada por una oxidasa inespecífica presente en el micelio y no correspondería a la biosíntesis de GAs. El

progreso de la reacción de oxidación de [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>12</sub> indicó que ambos productos ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>25</sub>) se formarían a partir del intermediario C20 aldehído ([ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>24</sub>) el que se acumuló en el medio de reacción en niveles similares a los productos finales (Fig. 12). Además, la cinética demostró que el producto [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>40</sub> proviene de la lactona [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>9</sub>. Aunque no se detectaron productos con el C20 al estado de alcohol, [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>15</sub>, éste debería participar en esta secuencia de oxidación, como ha sido demostrado en *F. fujikuroi* (Troncoso y cols., 2007). La reacción principal en la oxidación del C20 en la biosíntesis de GAs en *S. rhois*, sería la oxidación del grupo metilo hasta CO<sub>2</sub>, para formar los productos lactónicos (GA<sub>4</sub> y GA<sub>9</sub>), además de la oxidación parcial hasta carboxilato (Fig. 12). La secuencia de oxidación del metilo 20 encontrada en *S. rhois* es consistente con la participación de una oxidasa con un centro de Fe hemínico, como se ha descrito para *F. fujikuroi* y *Phaeosphaeria* sp.



**Figura 12.** Secuencia propuesta para la oxidación de GA<sub>12</sub> en *S. rhois*.

\* Aunque no se detectó este intermediario, la formación de GA<sub>24</sub> demostrada, hace obligatoria su participación en la síntesis de GA<sub>25</sub> y GA<sub>9</sub>.

Otra evidencia de la participación de monooxigenasas P450 en la biosíntesis de GAs en *S. rhois* es la existencia de las vías de síntesis de kaurenolidos y de ácidos fujenoicos en este hongo (Tabla 7). Se ha demostrado en *F. fujikuroi*, que estos productos corresponden a reacciones laterales de la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico (precursor de kaurenolidos a través del ácido *ent*-kauradienoico) y del ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico (precursor de ácidos fujenoicos a través del ácido *ent*-6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxikaurenoico) por la GA<sub>14</sub> sintasa, una monooxigenasa P450 (Rojas y cols., 2004). En la síntesis de GA<sub>14</sub> se forman intermediarios radicalarios por acción del centro de Fe hemínico de la monooxigenasa, que une O<sub>2</sub> y forma, al recibir electrones del NADPH, la especie activada oxoferrilo (Hedden, 1997). Los radicales presentan vías de estabilización alternativas a las reacciones de síntesis de GA<sub>14</sub>, que llevan a la formación de kaurenolidos y ácidos fujenoicos (Fig. 4). Por lo tanto, la presencia de estas reacciones evidencia la participación de una monooxigenasa P450 en la oxidación del ácido *ent*-kaurenoico. La secuencia de síntesis de kaurenolidos en *S. rhois* incluye al ácido *ent*-kauradienoico y al 7 $\beta$ -hidroxikaurenolido como intermediarios (Fig. 8, 11). Las reacciones finales, de hidroxilación en C3 o C18 del 7 $\beta$ -hidroxikaurenolido, tendrían velocidades similares, siendo ambas reacciones relativamente rápidas, por lo que los productos finales se formarían al mismo tiempo que se está formando el intermediario.

Otro aspecto de la biosíntesis de GAs que se investigó en *S. rhois*, es la regulación por compuestos nitrogenados. Tanto el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> como la glutamina

disminuyen la velocidad de síntesis de [ $^{14}\text{C}$ ]GAs a partir del ácido *ent-7 $\alpha$* -hidroxil[ $^{14}\text{C}$ ]kaurenoico. En presencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1,92 g/L o 4,8 g/L) o glutamina (3,64 g/L) la velocidad es 3 veces menor con respecto al medio sin nitrógeno, sin embargo, en *S. rhois* la biosíntesis de GAs no se suprime en forma tan drástica en presencia de compuestos nitrogenados, como en *F. fujikuroi* (**Brückner y Blechschmidt, 1991b**). Se ha demostrado que el principal regulador de la expresión de los genes de la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi* es el regulador general AREA (**Tudzynski y cols., 1999**). Este factor de transcripción controla la represión/desrepresión de genes relacionados con la utilización de fuentes secundarias de nitrógeno. Actúa uniéndose a los motivos GATA de la región promotora de los genes de la biosíntesis de GAs, activando su transcripción en condiciones limitantes de fuentes primarias de nitrógeno como amonio o glutamina (**Mihlan y cols., 2003**). En *S. rhois* el mecanismo de inhibición de la biosíntesis de GAs por nitrógeno, que aun no se conoce, parece ser menos eficiente que en *Fusarium*.

La secuencia de reacciones de la biosíntesis de  $\text{GA}_4$  demostrada en *S. rhois* se asemeja a la secuencia biosintética de  $\text{GA}_4$  y  $\text{GA}_3$  descrita en *F. fujikuroi* (Tabla 8) y difiere de la secuencia descrita en *Phaeosphaeria sp.* para la biosíntesis de  $\text{GA}_4$  y  $\text{GA}_1$ . En *F. fujikuroi* la vía  $3\beta$ -hidroxilada temprana es la principal, con una pequeña contribución de la vía no hidroxilada, lo que está determinado por la competencia entre las reacciones de hidroxilación en C3 y de oxidación en C7 del  $\text{GA}_{12}$  aldehído, que favorece la primera (**Rojas y cols., 2001**).

En *F. fujikuroi* el GA<sub>4</sub> se forma a través de intermediarios hidroxilados en C3. Las oxidasas de GAs de *S. rhois* por otra parte, catalizan también la 3β-hidroxilación del GA<sub>12</sub> aldehído pero con una eficiencia mucho mayor con respecto a la oxidación en C7 que las enzimas de *F. fujikuroi*, por lo que todos los intermediarios son canalizados hacia la vía 3β-hidroxilada y prácticamente no se generan, en *S. rhois*, intermediarios ni productos finales no hidroxilados (Fig. 11). La síntesis de GA<sub>4</sub> también ocurre a través de intermediarios hidroxilados en C3 en *S. rhois*. En *Phaeosphaeria* sp. en cambio, la secuencia biosintética de GA<sub>4</sub> es diferente, participan sólo intermediarios no hidroxilados y el GA<sub>12</sub> aldehído se oxida a GA<sub>12</sub> y a GA<sub>9</sub>, a través de las reacciones de oxidación en C7 y en C20 respectivamente. La hidroxilación posterior del GA<sub>9</sub> en la posición C3 genera el producto GA<sub>4</sub>. A diferencia de *Sphaceloma* y de *Fusarium*, la 3β-hidroxilación ocurre en una etapa tardía en *Phaeosphaeria* (**Kawaide y cols., 1995**). A diferencia de *F. fujikuroi*, *S. rhois* carece de las actividades de desaturasa y de C13 hidroxilasa de GAs, que corresponden a las dos últimas reacciones en la síntesis de GA<sub>3</sub> (Tabla 8). Esto podría deberse a la ausencia de los respectivos genes o a mutaciones que produzcan proteínas inactivas. En plantas, en que la biosíntesis de GAs tiene un origen evolutivo diferente a la de los sistemas fúngicos, se encuentran las vías no hidroxilada y/o 13-hidroxilada para la biosíntesis de GAs lactónicas. La hidroxilación en 13 ocurre en una etapa temprana a nivel de GA<sub>12</sub>, en tanto que la hidroxilación en C3 ocurre invariablemente en una etapa tardía de la secuencia a nivel de las giberelinas 19,γ10 lactónicas: GA<sub>9</sub> para dar GA<sub>4</sub> o sobre GA<sub>20</sub> para dar GA<sub>1</sub> (**Hedden y Kamiya, 1997**).

|  | <i>F. fujikuroi</i>  | <i>S. rhois</i>   |
|--|--|---|
| Intermediario hidroxilado en C3  | GA <sub>12</sub> aldehído > GA <sub>12</sub>   | GA <sub>12</sub> aldehído   |
| Cuociente productos vías 3β-hidroxilada: no hidroxilada (GA <sub>3</sub> + GA <sub>4</sub> + GA <sub>7</sub> : GA <sub>9</sub> ) | 3:1  | 10:1 o mayor  |
| Regulación   | Represión por compuestos nitrogenados  | Represión parcial por NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> o Glutamina.  |
| Oxidasa  | <i>ent</i> -kaureno oxidasa<br>GA <sub>14</sub> sintasa<br><br>C20 oxidasa<br>1,2-desaturasa<br>13-hidroxilasa | <i>ent</i> -kaureno oxidasa<br>ác. <i>ent</i> -kaurenoico oxidasa (GA <sub>14</sub> sintasa)<br>C20 oxidasa<br>-----<br>----- |
| Naturaleza de las oxidasa  | Monooxigenasas asociadas al citocromo P450 (P450-1, P450-2, P450-3, P450-4), excepto la 1,2- desaturasa        | La GA <sub>14</sub> sintasa y la C20 oxidasa presentan características de monooxigenasas P450                                 |
| Naturaleza de las ciclasas   | <i>ent</i> -kaureno sintasa soluble bifuncional  | <i>ent</i> -kaureno sintasa sería soluble (demostrado en <i>S. manihotica</i> )   |

**Tabla 8.** Reacciones y enzimas de la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi* y *S. rhois*.

Por otra parte, en ambos sistemas fúngicos la biosíntesis de GAs está regulada por compuestos nitrogenados, los que disminuyen su velocidad de síntesis, aunque este efecto es menor en *S. rhois* que en *F. fujikuroi*.

Las monooxigenasas P450 tienen un rol central tanto en la síntesis de GA<sub>4</sub> en *S. rhois* como en la síntesis de GA<sub>3</sub> en *F. fujikuroi*. Por lo tanto se espera que la biosíntesis de GA<sub>4</sub> en *S. rhois* sea un proceso básicamente asociado a membranas aunque las reacciones de ciclación iniciales (síntesis del *ent*-kaureno a partir de geranylgeranyl difosfato) son catalizadas por una ciclasa soluble (demostrado en *S. manihotica*).

Las variantes que presentan los sistemas fúngicos y las plantas con respecto a la secuencia de reacciones de la biosíntesis de GAs están definidas por el orden de las reacciones de hidroxilación requeridas para sintetizar los productos finales GA<sub>4</sub> (3-hidroxilado), GA<sub>1</sub> (3, 13-hidroxilado) y/o GA<sub>3</sub> (3, 13-hidroxilado), lo cual a su vez está determinado por la especificidad de sustrato de las respectivas hidroxilasas. En el caso de *S. rhois*, la vía 3β-hidroxilada temprana que se demostró para la síntesis de GA<sub>4</sub> estaría determinada por la especificidad de la GA<sub>14</sub> sintasa que cataliza la hidroxilación en C3 del precursor de 20 carbonos (GA<sub>12</sub> aldehído) y no utiliza sustratos de 19 carbonos.

## CONCLUSIONES.

- ❖ Los cultivos de *S. rhois* metabolizan eficientemente diversos precursores de giberelinas como el ácido *ent*-kaurenoico, ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico, GA<sub>12</sub> aldehído, GA<sub>12</sub> y GA<sub>14</sub>, generando GA<sub>4</sub> y otras giberelinas más polares oxidadas en distintas posiciones.
- ❖ En la biosíntesis de GA<sub>4</sub> en *S. rhois* participan los intermediarios: ácido *ent*-kaurenoico, ácido *ent*-7 $\alpha$ -hidroxikaurenoico, GA<sub>12</sub> aldehído, GA<sub>14</sub> aldehído y GA<sub>14</sub>.
- ❖ La reacción de hidroxilación en 3 $\beta$  ocurre sobre el GA<sub>12</sub> aldehído y no sobre intermediarios posteriores en la secuencia biosintética.
- ❖ La vía no hidroxilada de síntesis de GAs no se detectó en los experimentos de metabolización con precursores marcados.
- ❖ Las reacciones de oxidación del ácido *ent*-kaurenoico hasta GA<sub>14</sub> presentan características asociadas a reacciones catalizadas por monooxigenasas P450.
- ❖ Las reacciones de oxidación de C20 también son consistentes con la participación de monooxigenasas P450.

- ❖ La biosíntesis de GA<sub>4</sub> por *S. rhois* se parece a la biosíntesis de esta giberelina por *F. fujikuroi* en cuanto a las reacciones químicas, los intermediarios y la naturaleza de las enzimas.
  
- ❖ La biosíntesis de GA<sub>4</sub> por *S. rhois* difiere de la descrita para esta GA en *Phaeosphaeria* sp. que produce GA<sub>4</sub> a través de intermediarios no hidroxilados.

## REFERENCIAS

- Beale M**, Bearder J, Down G, Hutchison M, MacMillan J y Phinney BO. (1982) "The biosynthesis of kaurenolide diterpenoids by *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **21**:1279-1287.
- Bearder, J.R.**, MacMillan, J. y Phinney, B.O. (1975) Fungal products. Part XIV. "Metabolic pathways from *ent*-kaurenoic acid to the fungal gibberellins in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 721-726
- Bitancourt AA.** y Jenkins AE. (1940) *Archos Inst. Biol., S Paulo* **11**:48.
- Brückner B.** y Blechshmidt D. (1991) "The gibberellin fermentation". *Crit. Rev. Biotech.* **11**:163-192.
- Brückner B.** y Blechshmidt D. (1991b) "Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:646-650.
- Candau R**, Avalos J. y Cerdá-Olmedo E. (1992) "Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Plant Physiol.* **100**: 1184-1188.
- Cross B**, Grove J, MacMillan J, Moffatt J, Mulholland T, Seaton J y Sheppard N (1959) "A revised structure for gibberellic acid". *Proc. Chem. Soc.* 302-303.
- Donaldson RP.** y Luster DG. (1991) "Multiple forms of cytochromes P-450". *Plant Physiol.* **96**:669-674.
- Edebo, L.** (1983) "Disintegration of cells by extrusion under pressure". *Enzyme-Technology*, Edited by RM Lafferty. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 93-114.
- Geissman TA**, Verbiscar AJ, Phinney BO. y Cragg G. (1966) "Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)-kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **5**:933-947.
- Graebe JE.** (1987) "Gibberellin biosynthesis and control". *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **38**:419-65.
- Graebe JE**, Hedden P, Gaskin P. y MacMillan J. (1974) "Biosynthesis of the gibberellins A12, A15, A24, A36 and A37 by a cell-free system from *Cucurbita maxima*". *Phytochem.* **13**:1433-1440.
- Hedden P.** (1997) "The oxidases of gibberellin biosynthesis: their function and mechanism". *Phys. Plant.* **101**:709-719.

**Hedden P**, MacMillan J. y Grinsted M. (1973) "Fungal Products. Part VIII. New kaurenolides from *Gibberella fujikuroi*". J. Chem. Soc. Perkin Trans 1 2773-2778.

**Hedden P**, MacMillan J. y Phinney BO. (1974) "Fungal products. Part XII. Gibberellin A<sub>14</sub> aldehyde, an intermediate in gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*". J. Chem Soc. Perkin Trans I, 587-592.

**Hedden P** y Graebe JE. (1981) "Kaurenolide biosynthesis in a cell-free system from *Cucurbita maxima* seeds". Phytochem. **20**:1011-1015.

**Hedden P.** y Kamiya Y. (1997) "Gibberellin biosynthesis: enzymes, genes and their regulation". Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **48**:431-460.

**Hedden P**, Phillips AL, Rojas MC, Carrera E. y Tudzynski B. (2002) "Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution?". J. Plant Growth Regul. **20**:319-331.

**Kawaide H.** (2006) "Biochemical and molecular analyses of gibberellin biosynthesis in fungi". Biosci. Biotechnol. Biochem. **70**:583-590.

**Kawaide H**, Sassa T. y Kamiya Y. (1995) "Plant-like biosynthesis of gibberellin A<sub>1</sub> in the fungus *Phaeosphaeria sp.* L487". Phytochem. **39**:305-310.

**Kawaide H**, Imai R, Sassa T. y 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.

**Kawaide H**, Sassa T. y Kamiya Y. (2000) "Functional analyses of the two interacting cyclase domains in *ent*-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria sp.* L487 and a comparison with cyclases from higher plants". J. Biol. Chem. **275**: 2276-2280.

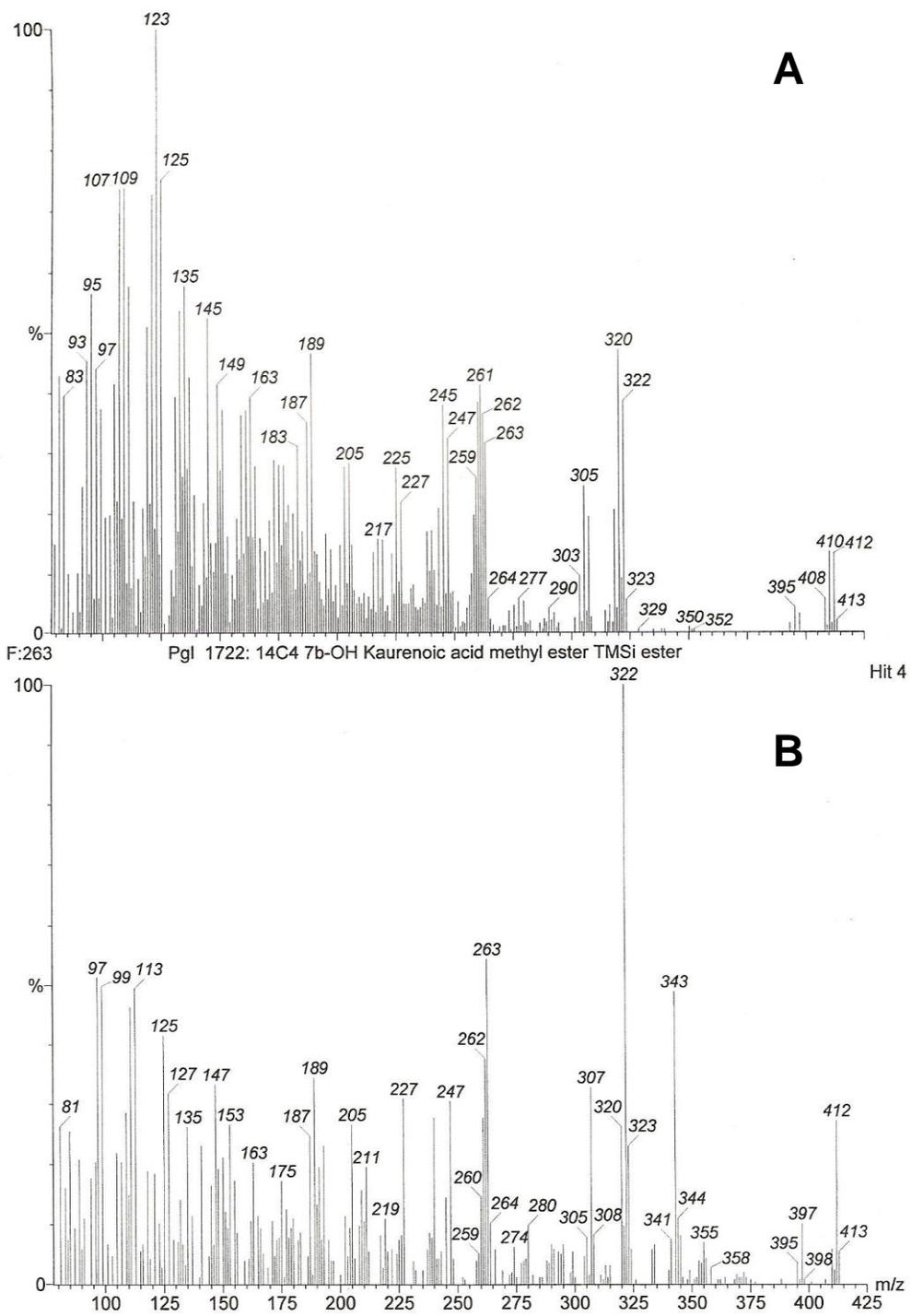
**MacMillan J.** (1997) "Biosynthesis of the gibberellin plant hormones". Nat. Prod. Res. **14**:221-243.

**Malonek S**, Rojas MC, Hedden P, Gaskin P, Hopkins P y Tudzynski B. (2004) "The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis". J. Biol. Chem. **279**:25075-25084.

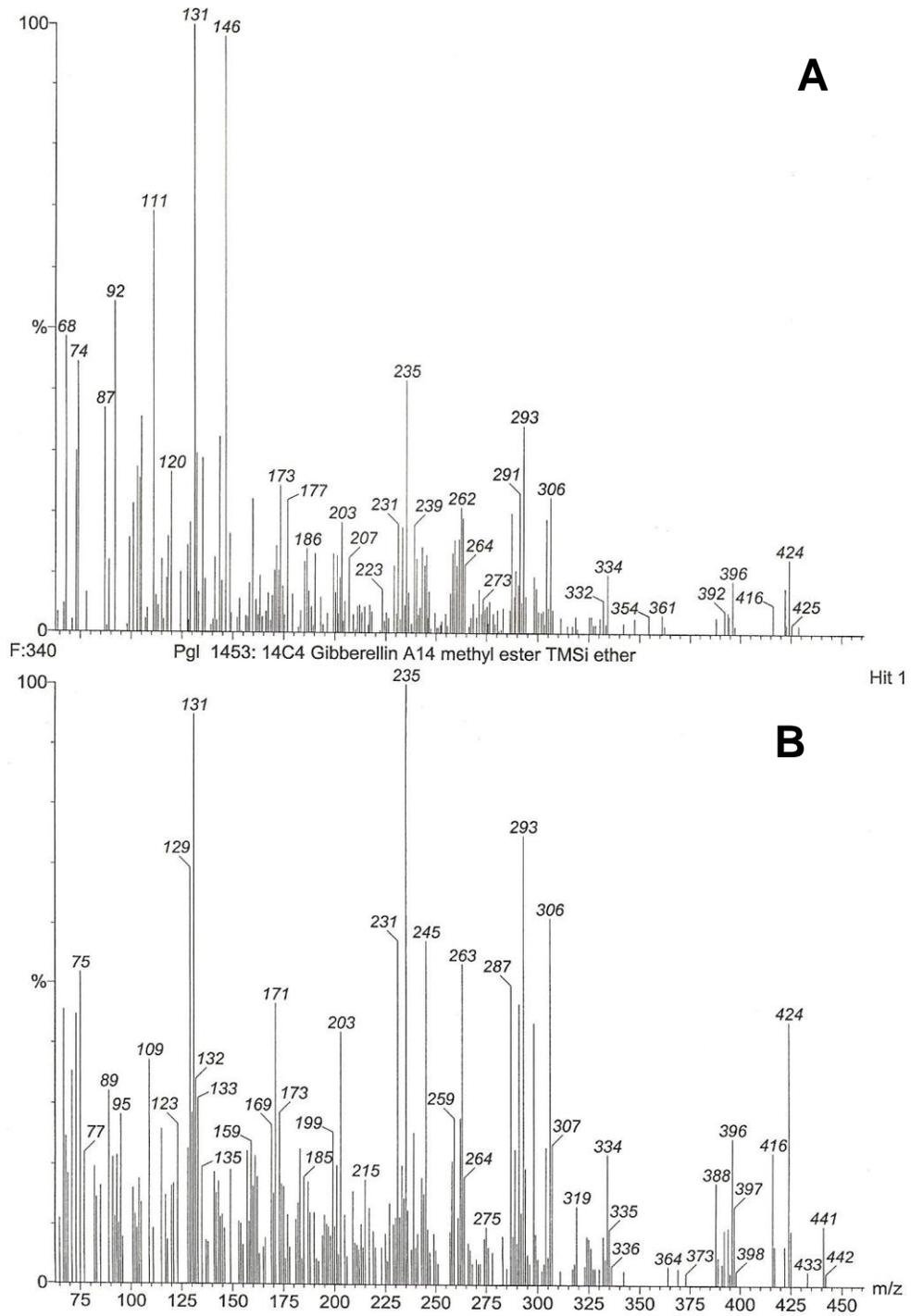
- Mihlan M**, Homann V, Liu T-W. y Tudzynski B. (2003) "AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR". Mol. Microbiol. **47**:975-991.
- Rademacher W.** (1992a) "Ocurrence of gibberellins in different species of the fungal genera *Sphaceloma* and *Elsinoe*". Phytochem. **31**:4155-4157.
- Rademacher W.** (1992b) "Inhibition of gibberellin production in the fungi *Gibberella fujikuroi* and *Sphaceloma manihoticola* by plant growth retardants". Plant Physiol. **100**:625-629.
- Rademacher W.** (1994) "Gibberellin formation in microorganisms". Plant. Growth Regul. **15**:303-314.
- Rademacher W.** y Graebe JE. (1979) "Gibberellin A<sub>4</sub> produced by *Sphaceloma manihoticola*, the cause of the superelongation disease of cassava (*Manihot esculenta*)". Biochem. Biophys. Res. Com. **91**:35-40.
- Raven, P.H.** y Eichhorn, S.E. (1992) "El efecto del ácido giberélico sobre el crecimiento de las uvas Thompson Seedles, un cultivar de *Vitis vinifera*". Biología de las Plantas, Vol II, Ed. Reverté, Barcelona.
- Rojas MC**, Hedden P, Gaskin P. y Tudzynski B. (2001) "The P450-1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis". Proc. Natl. Acad. Sci., (USA) **98**:5828-5843.
- Rojas MC**, Urrutia O, Cruz C, Gaskin P, Tudzynski B. y Hedden P. (2004) "Kaurenolides and fujenoic acids are side products of the P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*". Phytochem. **65**:821-830.
- Sun TP.** y Kamiya Y. (1994) "The Arabidopsis *GA1* locus encodes the cyclase *ent*-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis". Plant Cell **6**:1509-1518.
- Troncoso C**, Carcamo J. Hedden P Tudzynski B. y Rojas MC. (2007) "Influence of electron transport proteins on the reactions catalyzed by *Fusarium fujikuroi* gibberellin monooxygenases". Phytochem. (Aceptado)
- Tudzynski B.** (2005) "Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology". Appl. Microbiol. Biotechnol. **66**:597-611.
- Tudzynski B.** y Hölter K. (1998) "The gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster". Fungal Genet. Biol. **25**:157-170.

- Tudzynski B**, Kawaide H. y Kamiya Y. (1998) "Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene". *Curr. Genet.* **34**:234-240.
- Tudzynski B**, Homann V, Feng B. y Marzluf GA. (1999) "Isolation, characterization and disruption of the *area* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*". *Mol. Gen. Genet.* **261**:106-114.
- Tudzynski B**, Hedden P, Carrera E. y Gaskin P. (2001) "The *P450-4* gene of *Gibberella fujikuroi* encodes *ent*-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthetic pathway". *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3514-3522.
- Tudzynski B**, Rojas MC, Gaskin P. y Hedden P. (2002) "The *Gibberella fujikuroi* gibberellin 20-oxidase is a multifunctional monooxygenase". *J. Biol. Chem.* **277**:21246-21253.
- Tudzynski B**, Mihlan M, Rojas MC, Linnemanstöns P. y Hedden P. (2003) "Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: *des* and *P450-3* encode GA<sub>4</sub> desaturase and the 13-hydroxylase, respectively". *J. Biol. Chem.* **278**:28635-28643.
- Urrutia O**, Hedden P. y Rojas MC. (2001) "Monooxygenases involved in GA<sub>12</sub> and GA<sub>14</sub> synthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochem.* **56**:505-511.
- Yagamuchi S**, Smith MW, Brown RGS, Kamiya Y. y Sun TP. (1998) "Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3 $\beta$ -hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds." *Plant Cell* **10**:2115-2126.

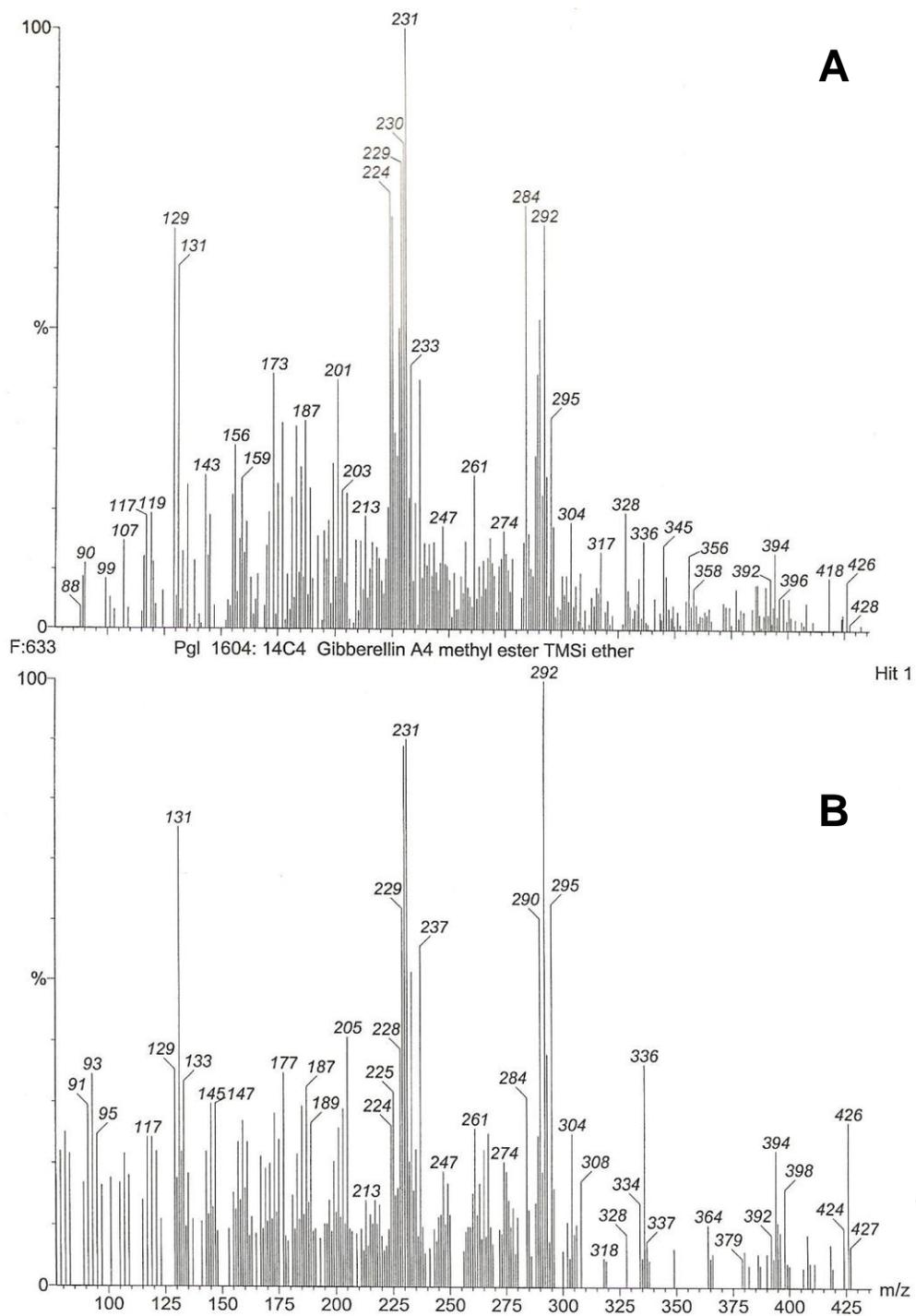
## **ANEXO DE ESPECTROS DE MASA**



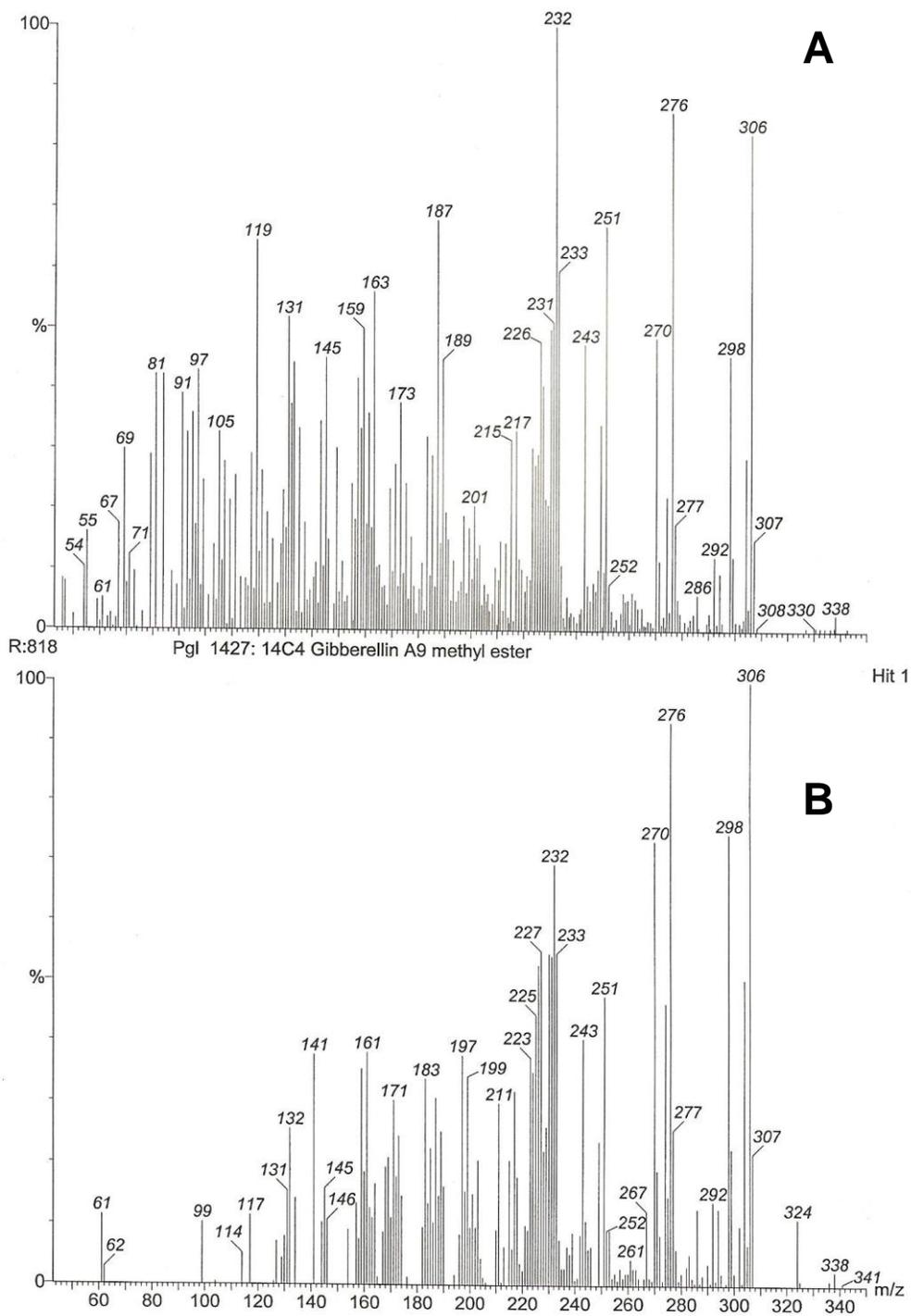
Espectro de masas del producto con tiempo de retención 21 min de la Tabla 1 (A) y del ácido 7 $\alpha$ -hidroxi[<sup>14</sup>C]kaurenoico estándar (B).



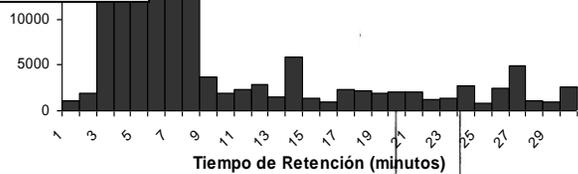
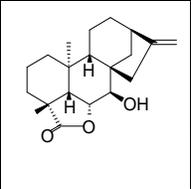
Espectro de masas del producto con tiempo de retención 14 min de la Tabla 1 (A) y de la giberelina [<sup>14</sup>C]GA<sub>14</sub> estándar (B).



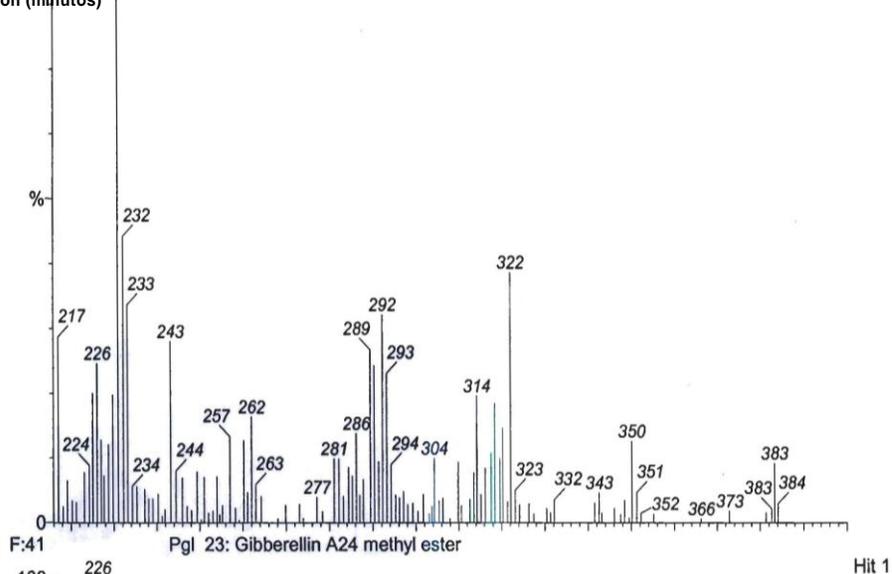
Espectro de masas del producto con tiempo de retención 15 min de la Tabla 1 (A) y de la gibberelina [ $^{14}\text{C}$ ]GA<sub>4</sub> estándar (B).



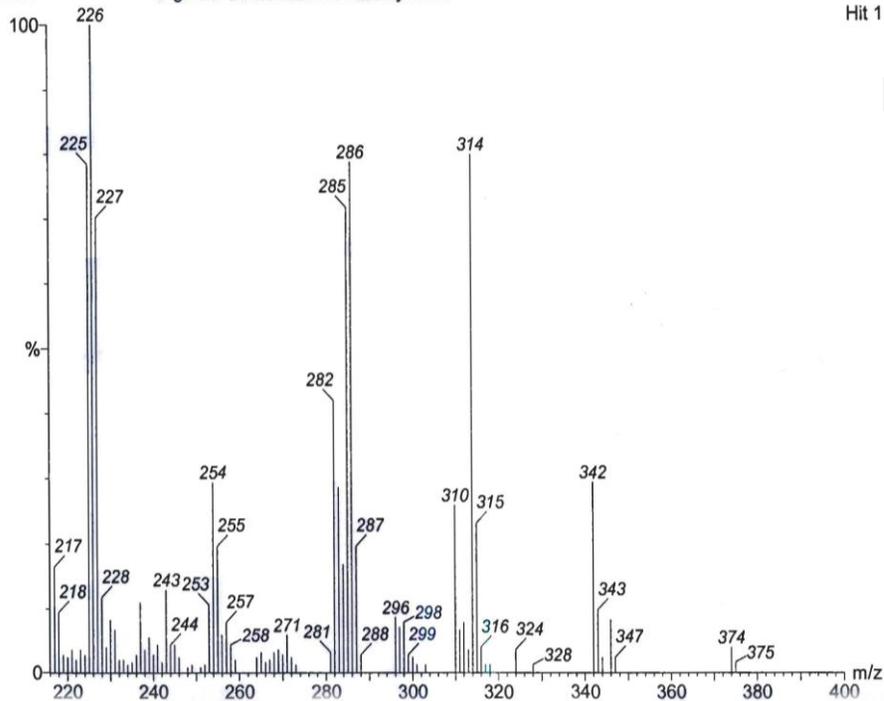
Espectro de masas del producto con tiempo de retención 20 min de la Tabla 1 (A) y de la giberelina [<sup>14</sup>C]GA<sub>9</sub> estándar (B).



**A**



**B**



Espectro de masas del producto con tiempo de retención 17 min de la Tabla 1 (A) y de la giberelina [<sup>14</sup>C]GA<sub>24</sub> estándar (B).