



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO**

**ISABELA PIMENTEL DE ALMEIDA**

**BIOSSÍNTESE DE GIBERELINAS EM *Gluconacetobacter diazotrophicus***

**CAMPINA GRANDE  
2018**

**ISABELA PIMENTEL DE ALMEIDA**

**BIOSSÍNTESE DE GIBERELINAS EM *Gluconacetobacter diazotrophicus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba – *campus* I como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: 20202008 Genética Molecular e de Microrganismos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses

**CAMPINA GRANDE  
2018**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A447b Almeida, Isabela Pimentel de.  
Biossíntese de Giberelinas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* [manuscrito] / Isabela Pimentel de Almeida. - 2018.  
26 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.  
"Orientação : Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses, Departamento de Biologia - CCBS."  
1. Ácido giberélico. 2. Fitohormônio. 3. Fotossíntese. 4. Bioinformática. I. Título

21. ed. CDD 572

ISABELA PIMENTEL DE ALMEIDA

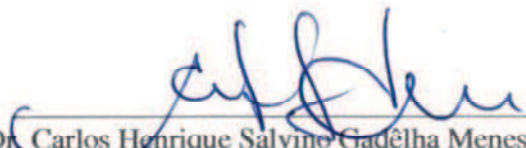
BIOSSÍNTESE DE GIBERELINAS EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*

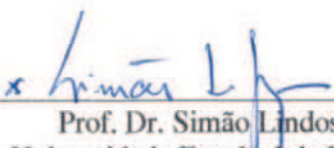
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba – *campus* I como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Área de concentração: 20202008 Genética Molecular e de Microrganismos.

Aprovada em: 14/11/2018

BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadêlha Meneses (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof. Dr. Simão Lindoso de Souza  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

  
Prof. Dra. Maria José Lima da Silva  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Às minúcias da vida.

## AGRADECIMENTOS

Em um primeiro momento, gostaria de agradecer a mim mesma, que nunca permiti por mais que alguns minutos ser uma barreira entre o meu agora e os meus sonhos - e também por ter aprendido a me amar ao longo desses últimos quatro anos, sorrindo com meus pequenos erros e pulando quando há de se pular de alegria.

Agradeço à Bryan Khelven, que esteve pacientemente me observando ficar louca e segurando minhas mãos nos ups, downs, nas subidas e nas descidas. Por ser minha luz quando eu me esqueço de brilhar, por ser meu porto seguro e o alguém com quem posso sempre contar. Por ser o meu amor.

Ao papai e à mamãe, José Joelson e Sirlene Gomes, por me ensinarem tantos preciosos valores, mesmo quando não era essa a intenção, por me deixarem brincar com livros de matemática e me darem lápis de colorir, de maneira que cresci observando ao mínimo a beleza e fluidez da vida. Ao Raul, que será sempre meu pequenino menino e que, apesar de nunca atender ao telefone, sempre está lá. E à Maria do Livramento, por me oferecer um segundo lar e amor.

Minha mãe sempre me disse que desde pequena eu queria ser bióloga. Não lembro ou não sei definir *pequena* – na sexta-série, meu professor de ciências, Eduardo, me fez apaixonar por esse sonho. Além dele, gostaria de agradecer a todos os professores que estiveram comigo ao longo desta jornada: aos que de mau agrado trabalhavam, por me mostrarem como não agir, e aos que tinham uma paixão por suas profissões, pelos conhecimentos aprendidos e inspirações. Em especial, à Karina Soares, Simão Lindoso, Beatriz Ceballos e Simone Lopes, que primeiro me mostraram as minúcias da vida.

Ao meu orientador, professor Carlos Meneses, por me apoiar, me ensinar e me guiar, confiando em mim como parte de seu grupo – eu não poderia ser mais feliz sendo parte de nenhuma outra equipe nessa Universidade.

Agradeço também àqueles com os quais tive as primeiras experiências de pesquisa, os professores André Peçanha e Simone Lopes e ao pesquisador da Embrapa Algodão, Augusto Guerreiro. Bem como ao CNPq pelo fomento, à Universidade Estadual da Paraíba, por me aceitar e me ensinar e à banca examinadora deste trabalho, professores Maria José Lima e Simão Lindoso, por suas contribuições.

Por mudar a minha vida naquela tarde e me dar de presente a realização de um sonho, Guy Barry. Além do bônus fantástico e de conhecer e aprender com a Mainá Bitar – valeu

atravessar o mundo para conhecer minha carioca favorita e quebrar minha cabeça em cinco milhões de pedacinhos para poder me apaixonar pela Bioinformática.

A maioria das pessoas sente que com o passar dos parágrafos o agradecimento vai ficando menos importante, mas vejo diferente – para mim cada um de vocês é uma batida do meu coração, sístole e diástole.

Desde o início, Nadja Melo, Maylla Correia e Vitória Almeida, nas loucuras e bugs, nas correrias e desesperos. Desde antes, do IFPB, agradeço à Eduardo Benedito, Jójce Kaynara e Carol Vieira. E de antes ainda, Jéssica Maria, Sabrina Lorranny e Ana Layse, pela amizade sincera de criança. Às companheiras de laboratório, Izamara Gesiele, Vitória Almeida, Mayla Dantas, Grace Borchert e Charlotte Woods pela troca de ideias - só posso esperar que, além do sucesso científico (fazer boas perguntas), vocês todas continuem nesse parágrafo lindo de amigos. Também agradeço à Ginell Ranpura, Christa Rohof, Jiahui Wang e Carla Lopez, por todo carinho e todas as nossas diversões juntas. Até mesmo Rafael Cavalcante e Itagiba Neto, pelas boas discussões que me fizeram desestressar.

Agradeço a São Paulo, por ser meu portão de entrada nesse mundo lindo, ao pseudo Paraná (verdadeira Minas Gerais) e à Pernambuco, por trazerem minhas metades de carga genética, à Paraíba, por me acolher quando eu não queria ser acolhida e me presentear com tantas boas pessoas, com tanto conhecimento e com tantos gatos e à Queensland, por ser tão pacificamente linda e me mostrar que minha vida pode sim ser andar dançando pelas ruas às 10 horas da noite, acompanhada apenas de canções.

À Zag, Tutu, Amora, Fofinha, Dois, Três, Quatro e Branquinho, pela maciez e amor, mesmo sem falarmos o mesmo idioma.

Por fim, agradeço ao Universo, por ter colapsado de maneira a permitir que todos nós tenhamos vivido, colidido nossas existências ao nos conhecer, aos que fazem ciência – fazer acontecer ciência e estudar a organização no meio de todo esse lindo e grandioso caos.

Vocês são todos batidas do meu coração me fazendo ir para a lua.

Com um sincero, profundo e grandioso sentimento,

Obrigada!

Isabela Almeida

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
1 INTRODUÇÃO.....	7
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.1 Caracterização Experimental.....	9
2.2 Condições de Cultura e Crescimento .....	9
2.3 Extração e Quantificação de Giberelinas.....	9
2.4 Análises Bioinformáticas.....	10
2.5 Análises Estatísticas .....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	11
4 CONCLUSÃO.....	20
ABSTRACT .....	21
REFERÊNCIAS .....	21
ANEXO A – BIOSÍNTESE DE DITERPENÓIDES.....	26

BIOSSÍNTESE DE GIBERELINAS EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Isabela Pimentel de Almeida\*

**RESUMO**

Bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) exercem efeitos positivos no desenvolvimento de várias espécies de plantas por conta de sua produção de metabólitos bioativos. O ácido giberélico, um fitohormônio com diversas variações, tem relação direta com esses efeitos e já foi anteriormente detectado em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, embora a via metabólica para sua produção até então era desconhecida. Essa bactéria é uma PGPB capaz de colonizar e promover o crescimento de espécies vegetais como o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.), com importância socioeconômica e ambiental no semiárido brasileiro. Nesse trabalho, objetivamos detectar perfis ativos e inativos de giberelinas em *G. diazotrophicus* PA15 e caracterizar genes para sua biossíntese nessa espécie bacteriana. Culturas filtradas de *G. diazotrophicus* PA15 revelaram os perfis de GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> fisiologicamente ativos e GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> e GA<sub>20</sub> foram caracterizadas em sua forma inativada. Através de ferramentas de Bioinformática as sequências putativas de enzimas descritas no genoma e, com indicação de literatura, sequências de outros organismos foram alinhadas para a descrição completa da via biossintética das variações deste hormônio na espécie em estudo. Esses resultados podem ter uma importância na produção mundial de arroz através de uma possível inoculação de sementes.

**Palavras-Chave:** Ácido giberélico. Acetobacteraceae. Fitohormônio.

**1 INTRODUÇÃO**

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria fixadora de nitrogênio com a habilidade fisiológica de solubilizar fosfato e zinco, controlar fitopatógenos e produzir fitohormônios, fatores que a estabelecem como uma importante bactéria promotora do crescimento vegetal (*Plant growth promoting bacteria* – PGPB) (SEVILLA et al., 2001; SARAVANAN et al., 2007). Originalmente isolada da cana de açúcar, (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988), essa bactéria também coloniza os tecidos internos de outras plantas, como batata-doce (PAULA, REIS e DÖBEREINER, 1991), café (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), abacaxi (TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2000), cenoura, rabanete, beterraba (MADHAIYAN et al., 2004) e arroz (MUTHUKUMARASAMY et al., 2007; MENESES et al., 2017), assim como outras poáceas (SARAVANAN et al., 2007) em associações benéficas.

Uma das alternativas viáveis para a implementação de novas tecnologias na cadeia de produção de vegetais que possuem inegável potencial econômico, social e ambiental como o arroz vermelho (*Oryza sativa* L.) para que seja possível a expansão do seu cultivo no semiárido brasileiro seria o uso de PGPB, que exercem efeitos positivos na germinação de sementes, comprimento das raízes, crescimento dos colmos, aumento do número de folhas, da

---

\* Aluno de Graduação em Ciências Biológicas na Universidade Estadual da Paraíba – *campus* I.  
Email: isabelaalmeida42@outlook.com

área foliar e da floração, bem como da produtividade das culturas tanto em casa de vegetação quanto no campo (ETESAMI, ALIKHANI e HOSSEINI, 2015).

Esses efeitos podem ser induzidos através da produção de metabólitos bioativos das PGPB, entre os quais se destacam as giberelinas (*Gibberellic Acids* – GAs) (GLICK, 2012). Esses são hormônios vegetais diterpênicos tetracíclicos que regulam muitos aspectos do crescimento e da reprodução vegetal (CASTILLO et al., 2015; HEDDEN e KAMIYA, 1997). Primeiro identificados e isolados no fungo *Fusarium fujikuroi* (anamorfo de *Gibberella fujikuroi*), giberelinas também podem ser encontradas em outras espécies fúngicas, assim como em plantas e bactérias (BÖMKE e TUDZYNSKI, 2009; NETT, CONTRERAS e PETERS, 2017) e são atualmente conhecidas mais de 136 variações deste hormônio (SPONSEL e HEDDEN, 2004; HEDDEN e THOMAS, 2012) das quais apenas um pequeno número é biologicamente ativo (GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub>) (CASTILLO et al., 2015; HEDDEN e THOMAS, 2012).

Embora a produção de giberelinas por bactérias seja conhecida, sua via metabólica até o momento só foi descrita para Rhizobiales (*Bradyrhizobium japonicum*), com os metabólitos GA<sub>9</sub> (NETT et al., 2016) e GA<sub>20</sub> (TUDZYNSKI, STUDDT e ROJAS, 2016), e para Gammaproteobacterias (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*), com o metabolito GA<sub>4</sub> (NAGEL et al., 2017). Para Rhodospirillales, embora tantas bactérias tenham tido seus genomas sequenciados e apresentem genes para a produção deste hormônio, há apenas uma rota hipotética para a produção de GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub> descrita para a família Rhodospirillaceae em *Azospirillum* sp. (BOTTINI, CASSÁN e PICCOLI, 2004, JANZEN et al., 1992).

Especificamente para *G. diazotrophicus*, da família Acetobacteraceae, a produção de GAs já foi demonstrada (BASTIÁN et al., 1998) e seu genoma contém genes que codificam moléculas precursoras para a formação de geranyl-geranyl difosfato (GGPP) via a rota do não-mevalonato (BERTALAN et al., 2009). Essa via metabólica, também conhecida como DOXP (1-deoxy-D-xilulose-5-fosfato) e alternativamente como MEP (2C-metil-D-eritritol-4-fosfato), ocorre em cloroplastos de plantas, algas, cianobactérias, eubactérias e parasistas apicomplexos e os produtos da rota, isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (HUNTER, 2007) são requisitados para a síntese de ácidos giberélicos através da enzima geranyl-geranyl difosfato sintase (GGPS). Apesar das evidências de que *G. diazotrophicus* as produza (GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub>) (BASTIÁN et al., 1998), essa é a primeira vez que uma referência é feita a uma descrição detalhada da via metabólica para biossíntese de giberelinas por uma bactéria Acetobacteraceae, assim como da existência de outras variações dessa classe de hormônios em *G. diazotrophicus* PA15.

Aqui, através da combinação de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS-SIM), cromatografia líquida de alta performance (HPCL) e ferramentas de Bioinformática, objetivamos detectar giberelinas em *G. diazotrophicus* estirpe brasileira PA15 e caracterizar genes para sua biossíntese nessa espécie bacteriana, atribuindo função a outros genes não caracterizados nesta via metabólica de giberelinas e elucidando seus papéis na biossíntese dos fitohormônios detectados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Caracterização Experimental**

A estirpe selvagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15 (GDI) foi obtida através do Termo de Transferência de Material (TTM) entre a EMBRAPA Agrobiologia (Seropédica/RJ, 23891-000) e a Universidade Estadual da Paraíba (Campina Grande/PB, 58429-500).

As análises moleculares foram desenvolvidas no Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LGBM) do Departamento de Biologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, *campus* I – Campina Grande e no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal da Paraíba, *campus* II – Areia.

Análises *in silico* foram realizadas com o genoma completo de GDI (BERTALAN et al., 2009) depositado no GenBank no número de acesso AM889285.1.

### **2.2 Condições de Cultura e Crescimento**

A estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em análise foi cultivada à 30 °C em uma incubadora com agitação à 150 rpm em meio LGI modificado (composição em g.l<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,2; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,02; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,002; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,018), pH 5,5, contendo 1 mM de ácido glutâmico e suplementado com sacarose 20 g.l<sup>-1</sup> como fonte de carbono, por ser a melhor fonte de nutrientes para o crescimento da espécie em análise (ROUWS, 2008). Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos Sigma-Aldrich, para garantir a pureza e descrição detalhada dos compostos químicos, de maneira a gerar uma maior confiabilidade nos resultados de cromatografia.

### **2.3 Extração e Quantificação de Giberelinas**

Para detectar e caracterizar os ácidos giberélicos secretadas por *G. diazotrophicus*, a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000 x g durante 10 min a 4 °C, e o sobrenadante foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,45 µm. Os hormônios giberélicos de



*G. diazotrophicus* foram extraídos de sobrenadante filtrado de cultura após 3 dias de incubação de acordo com o protocolo descrito por Lee e colaboradores (1998).

O sobrenadante filtrado foi submetido a C18-HPLC de fase reversa. Os ácidos giberélicos foram separados em uma coluna de Bondapak C18 de 3.9 mm × 300 mm (Waters Corporation, USA) e eluídos a 1,5 mL/min com o seguinte gradiente: 0 a 5 min, metanol isocrático 28% (MeOH) em 1% ácido acético aquoso; 5 a 35 min, gradiente linear de 28% a 86% MeOH; 35 a 36 min, 86% a 100% de MeOH; 36 a 40 min, 100% MeOH isocrático. Até 48 frações de 1,5 mL de cada foram coletadas. As frações foram então preparadas para injeção em um cromatógrafo a gás/espectrômetro de massa (GC/MS) com modo seletivo de monitoramento de íons (SIM) (Sistema CG de modelo 6890N e detector seletivo de massa modelo 5973; Agilent Technologies/USA). Para cada tipo de ácido giberélico, 1 µl de amostra foi injetado em uma coluna capilar DB-1 com uma dimensão de 30 mm × 0.25 mm i.d. e com espessura de filme de 0,25 µm (J&W Scientific Co., USA). A temperatura de forno do cromatógrafo a gás foi programada para 60 °C por 1 min, para depois subir 15 °C/min até 200 °C seguida por 5 °C/min até 285 °C. O gás portador hélio foi mantido a uma pressão de 30 kPa. O cromatógrafo a gás foi diretamente interligado a um detector seletivo de massa com uma interface e temperatura de fonte de 280 °C, uma tensão ionizante de 70 eV e um tempo de permanência de 100 msec. O modo de varredura completo (primeiro teste) e os três íons principais dos padrões internos suplementados [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] de ácidos giberélicos e os ácidos giberélicos bacterianos foram monitorados simultaneamente. O tempo de retenção foi determinado usando padrões de hidrocarbonetos para calcular o valor de KRI (*Kovats Retention Index*) (KOVATS, 1958), e a quantificação de giberelinas foi baseada em razões de área de pico de ácido giberélico não deuterados (extraídos) para ácidos giberélicos deuterados.

## 2.4 Análises Bioinformáticas

Usou-se como base da Biossíntese de Giberelinas as vias metabólicas de Terpenóides para *G. diazotrophicus* PA15 e de Diterpenóides disponível no banco de dados KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017) para análise e identificação de genes envolvidos, comparação de vias entre diferentes organismos e elucidação da via metabólica de giberelinas para a estirpe em estudo.

A identificação de sequências nucleotídicas e proteicas estritamente relacionadas de interesse para a via foi realizada através das ferramentas do banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLASTn e BLASTp (ALTSCHUL et al., 1990; ALTSCHUL et al., 1997; ALTSCHUL et al., 2005). Os



parâmetros algorítmicos utilizados foram os padronizados pelo programa *protein-protein BLAST* para BLASTp e *megablast* para BLASTn, para identificação de sequências altamente similares. Sequências com maiores pontuações (*Max Score*), cobertura (*Query Cover*) e identidade e com menor valor de E-value foram selecionadas.

Para estas sequências, seus domínios conservados foram analisados através do Pfam (FINN et al., 2016) e da base de dados de domínios conservados do NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004).

## 2.5 Análises Estatísticas

Todos os programas para análises *in silico* possuem seu próprio algoritmo estatístico para garantir a significância dos resultados demonstrados.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sobrenadante filtrado de *G. diazotrophicus* estirpe PA15 foi submetido à HPLC e análise por GC/MS-SIM para a quantificação de GAs. As análises GC/MS-SIM detectaram sinais iônicos de GAs que apresentaram correlação com os padrões ultrapuros utilizados de GAs [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] (Tabela 01). Foi possível identificar sinais relativos a presença de GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub>, GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> e GA<sub>20</sub>.

**Tabela 01.** Análise GC/MS-SIM das frações de HPLC do sobrenadante filtrado de *G. diazotrophicus* PA15 cultivada em meio LGI modificado por 72 horas. Identificado como derivados do éster metílico trimetilsilílico através da comparação com espectros de referência e dados de KRI (índices de retenção de Kovats); GAs foram identificadas com três íons e quantificadas pelo primeiro íon através da comparação com os padrões rotulados.

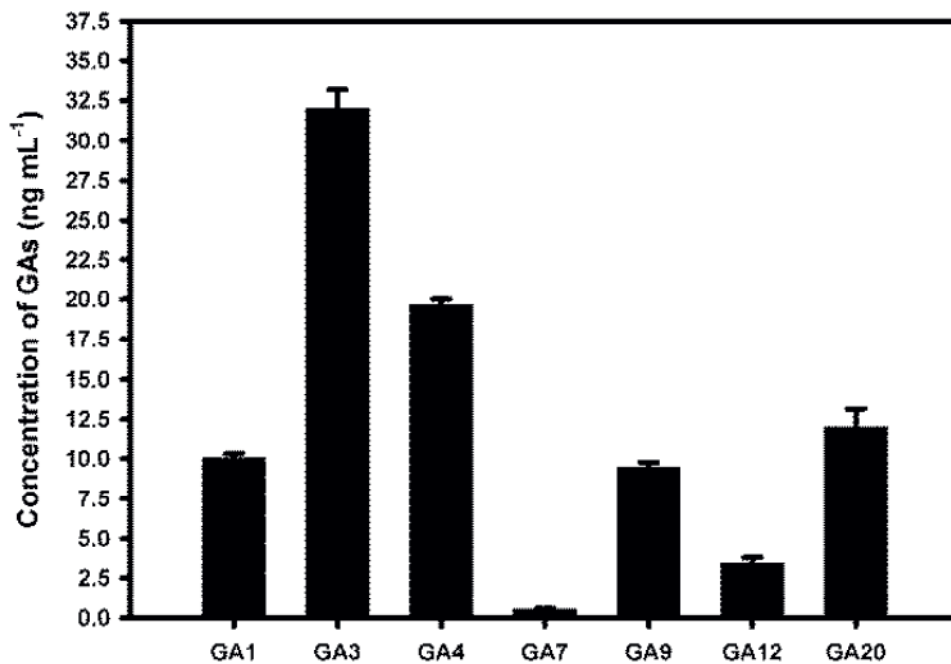
Notas: RT, tempo de retenção (min).

Fração de HPCL	RT	Amostra/Padrão	GAs	KRI	m/z (% intensidade relativa de picos de base)		
10~13	24.51	Amostra	GA <sub>1</sub>	2650	506 (100)	491 (7)	448 (19)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>1</sub>	2650	508 (100)	493 (9)	450 (21)
11~15	24.51	Amostra	GA <sub>3</sub>	2741	504 (100)	487 (8)	443 (8)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>3</sub>	2741	506 (100)	491 (10)	445 (7)
29~31	24.51	Amostra	GA <sub>4</sub>	2515	284 (100)	224 (66)	287 (63)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>4</sub>	2515	286 (100)	227 (71)	291 (68)
35~38	24.51	Amostra	GA <sub>7</sub>	2498	522 (100)	285 (20)	505 (8)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>7</sub>	2498	524 (100)	289 (22)	507 (6)
38~39	24.51	Amostra	GA <sub>9</sub>	2315	297 (100)	268 (70)	232 (50)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>9</sub>	2315	300 (100)	272 (74)	229 (50)
40~44	24.51	Amostra	GA <sub>12</sub>	2310	417 (100)	400 (90)	370 (68)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>12</sub>	2310	420 (100)	405 (92)	375 (70)
21~26	24.51	Amostra	GA <sub>20</sub>	2501	419 (100)	371 (47)	402 (8)
		Padrão	[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]GA <sub>20</sub>	2501	420 (100)	377 (50)	405 (10)

Fonte: Isabela Pimentel de Almeida

Estas GAs foram identificadas e quantificadas pela comparação de suas massas espectrais e seus índices retenção Kovats (KOVATS, 1958). As GAs bioativas GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> foram as GAs mais abundantes e estavam presentes em concentrações de 10.1 ng, 32 ng, 19.87 ng e 0.5 ng mL<sup>-1</sup> no sobrenadante, respectivamente (Figura 01). Além disso, as GAs fisiologicamente inativas GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> e GA<sub>20</sub> também foram detectadas no sobrenadante em respectivas concentrações de 9.2 ng, 3.14 ng e 12 ng mL<sup>-1</sup> (Figura 01).

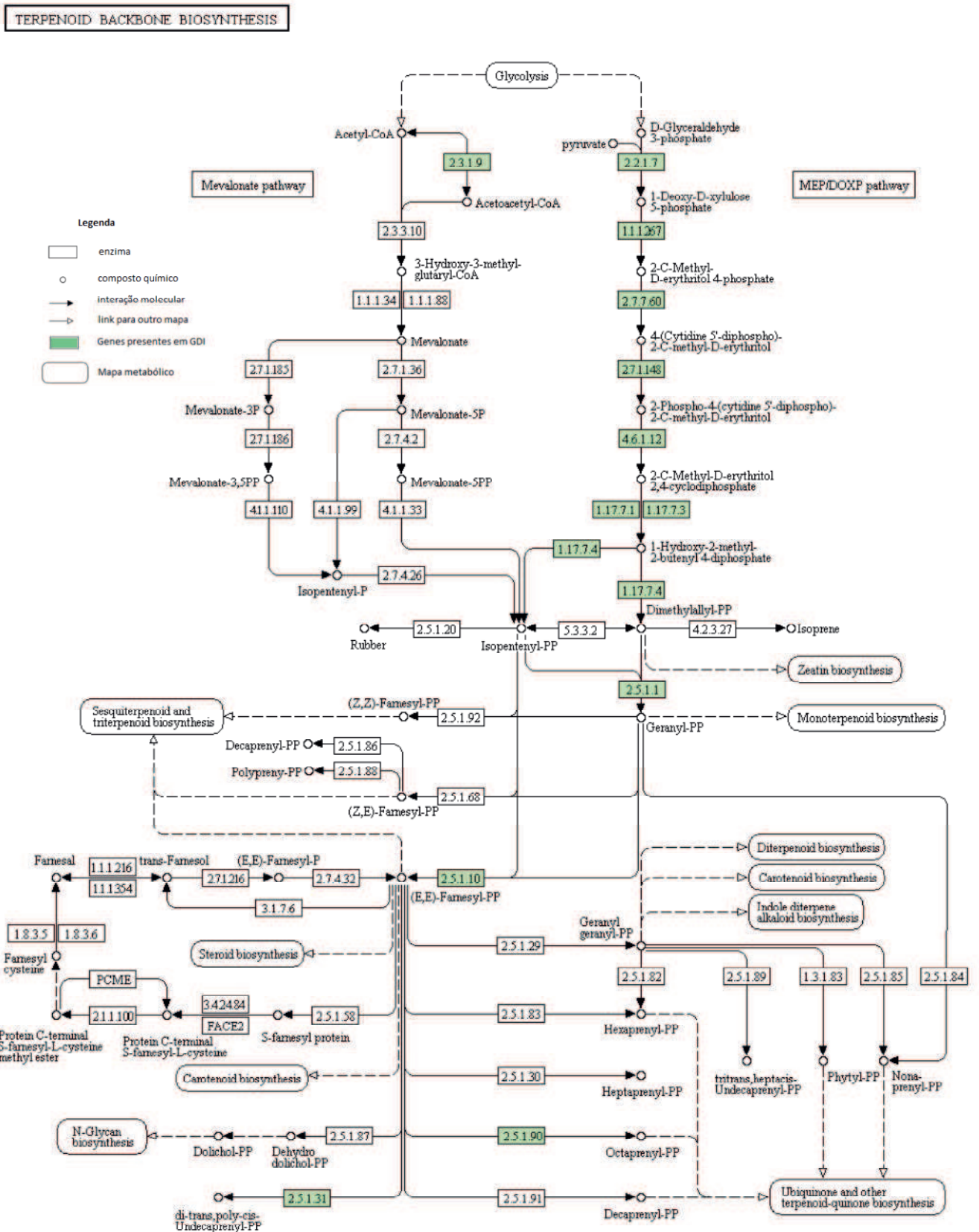
**Figura 01.** Detecção de GAs no sobrenadante filtrado de *G. diazotrophicus* estirpe PA15. Os valores médios foram calculados a partir dos resultados de triplicatas; As barras mostram o erro padrão.



Fonte: Isabela Pimentel de Almeida

Estudo anterior detalhado sobre metabólitos bioativos nessa mesma espécie bacteriana identificaram a presença de giberelinas GA<sub>1</sub> e GA<sub>3</sub> (BASTIÁN et al., 1998), que podem estar relacionadas com a promoção de aumentos da taxa de germinação de sementes nas plantas as quais se associa. Arelado a isso, o genoma de *G. diazotrophicus* PA15 contém genes para a biossíntese de precursores diterpenóides do tipo geranyl-geranyl difosfato (GGPP) através da via do não-mevalonato, por reações enzimáticas de condensação destes precursores por ispA geranyltransferase/GGPS (GDI1861) (BERTALAN et al., 2009) (Figura 02).

**Figura 02.** Biossíntese de Terpenóides com destaque para a síntese de GGPP em *G. diazotrophicus* PA15.

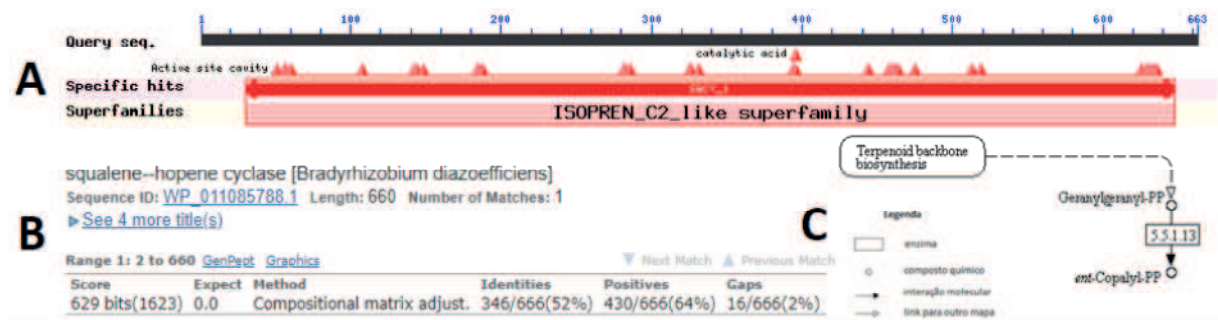


00900 6/26/18  
(c) Kanehisa Laboratories

Fonte: KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

A primeira etapa da síntese de giberelinas relacionado à formação específica de diterpenóides é a ciclização de geranyl-geranyl difosfato à ent-copalil difosfato (Figura 03C). Essa reação é catalisada por uma sintase dipernóide bifuncional (CPS/KS – *ent-copalyl diphosphate synthase* / *ent-kaurene synthase*) em fungos (TUDZYNSKI, KAWAIDE e KAMIYA, 1998), com gene homólogo de CPS detectado em *Bradyrhizobium japonicum* (MORRONE et al., 2008), mas não encontrado no genoma da espécie em análise. No entanto, foi demonstrado que a enzima esqualeno hopeno ciclase (SHC – *squalene-hopene cyclase*) recombinante realiza ciclizações de geranyl-geranyl difosfato (HOSHINO et al., 2004) e uma sequência putativa para SHC (GDI1620) pode exercer a mesma função em *G. diazotrophicus*. Além de possuir domínios conservados com os terminais N e C de SHC de acordo com o Pfam, quando alinhada à *Bradyrhizobium* spp, a SHC encontrada em *G. diazotrophicus* possui domínios conservados, pontua bem, possui ótima cobertura, além de um E-value, que conforme se aproxima do valor zero determina a maior similaridade das duas sequências comparadas, de 0.0 (Figura 03), o que fortalece sua prévia descrição do momento de publicação do genoma (BERTALAN et al., 2009).

**Figura 03.** Alinhamento BLASTp de GDI1620 com *Bradyrhizobium* spp – a) presença de domínios conservados com a superfamília de isoprenos; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento para SHC e c) excerto da via metabólica do Anexo A.



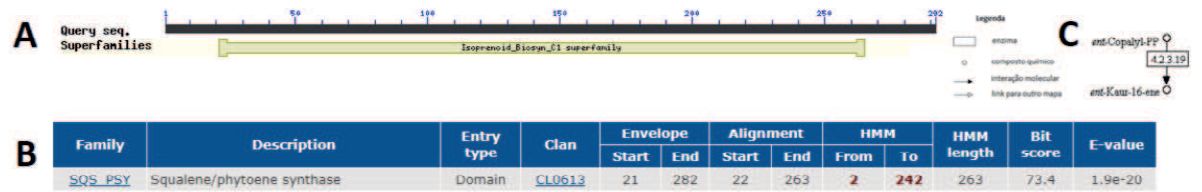
Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004) BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

A ciclização de GGPP por CPS/SHC forma *ent-copalil* difosfato. Essa molécula deverá transformada em *ent-caureno* por uma *ent-caureno* sintase (KS – *ent-kaurene synthase*). No genoma de *G. diazotrophicus* PA15, o gene GDI2167 pertence a superfamília de trans-isoprenil difosfato sintases (IPPS) (NCBI – *Conserved Domain*) e está anotada como uma proteína conservada hipotética (BERTALAN et al., 2009). Em *F. fujikuroi* essa reação é catalisada por uma KS com bifuncionalidade que tem domínios conservados com a família de esqualeno hopeno ciclases, e o gene GDI2167 apresenta os mesmos domínios, demonstrando



que essa enzima pode exercer a função de KS em *G. diazotrophicus* (Figura 04) (TUDZYNSKI, KAWAIDE e KAMIYA, 1998).

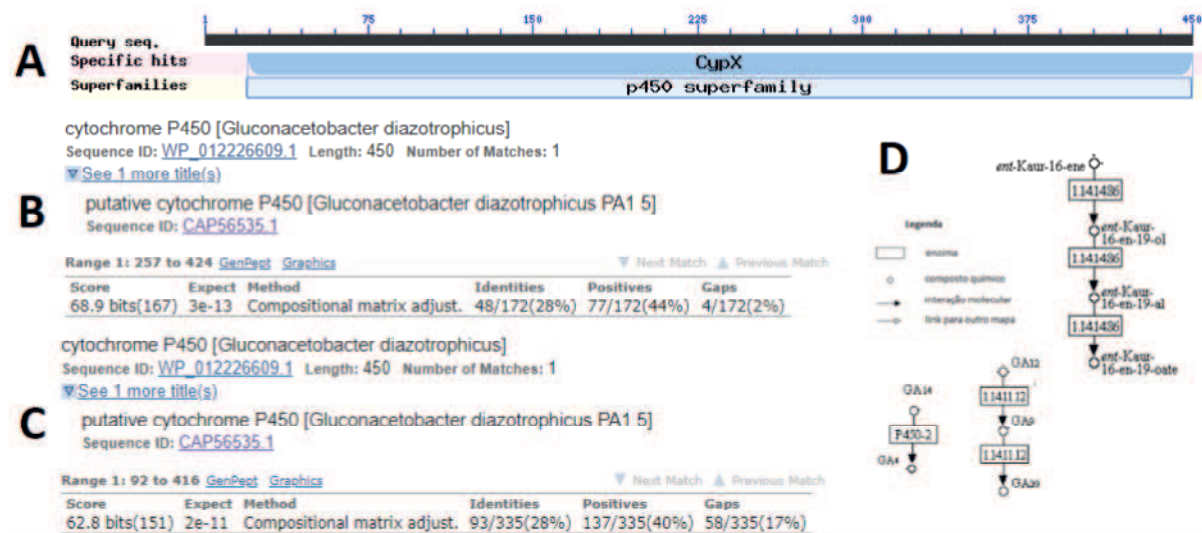
**Figura 04.** Domínios conservados de GDI2167 de *G. diazotrophicus* PA15 para SHC/KS – a) NCBI b) Pfam e c) excerto da via metabólica do Anexo A.



Fonte: Pfam (FINN et al., 2016), NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

Etapas de oxidação do *ent*-caureno, necessárias para produzir os ácidos giberélicos detectados por cromatografia podem ser catalisadas por dois citocromos P450 (GDI2592 – Figura 05 e GD12364), sugeridos na descrição do genoma (BERTALAN et al., 2009) com a participação de uma ferredoxina (Fd<sub>GA</sub>) em bactérias do gênero *Rhizobiaceae* e de uma enzima redutase des-hidrogenase de cadeia curta (SDR<sub>GA</sub>) (MACMILLAN, 2002; MÉNDEZ et al., 2014).

**Figura 05.** GDI2592 de *G. diazotrophicus* PA15 – a) presença de domínios conservados com a superfamília de citocromos P450; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento em *A. thaliana* para KO; c) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento *Bradyrhizobium* spp para GA<sub>20</sub> oxidase e d) excerto da via metabólica do Anexo A.

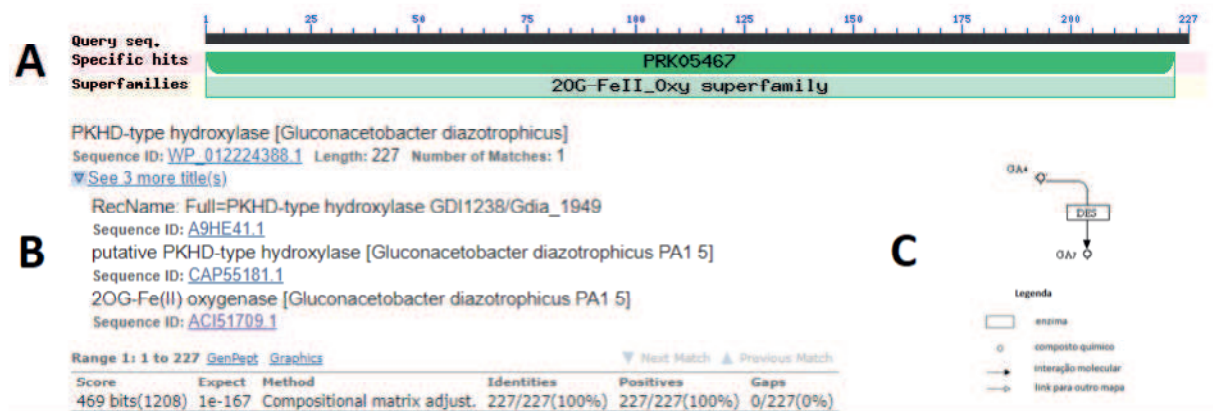


Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

De acordo com os alinhamentos de sequência proteica realizados, a GDI2592 tanto apresenta função de *ent*-caureno oxidase (KO – *ent*-kaurene oxidase) quanto de GA<sub>20</sub> oxidase (Figura 05). A função de oxidar é desempenhada nas etapas de ciclização de *ent*-caureno necessárias para a formação do ácido *ent*-caurenóico (*ent*-caurenoato), fundamental para a biossíntese dos hormônios giberélicos, equivalente à CYP701A3 (*GA requiring 3*) de *Arabidopsis thaliana* (DAVIDSON, REID e HELLIWELL, 2006) e à CYP117 BJ-4 de *B. japonicum* (NETT et al., 2016). Enquanto GA<sub>20</sub> oxidase, essa proteína realiza a síntese de GA<sub>4</sub>, GA<sub>9</sub> e GA<sub>20</sub> funcionando como uma P450-2 20 oxidase (CYP68B) de *F. fujikuroi* (TUDZYNSKI et al., 2002) e como uma CYP112 BJ-1 em *B. japonicum* (NETT et al., 2016).

A conversão de GA<sub>4</sub> em GA<sub>7</sub> é realizada por uma enzima GA<sub>4</sub> desaturase (DES) que adiciona uma ligação dupla 1,2 na molécula formada. Giberelina A<sub>7</sub> é intermediária para a produção de GA<sub>3</sub> por CYP69A em fungos (TUDZYNSKI et al., 2003), embora no genoma de *G. diazotrophicus* uma enzima homóloga não tenha sido identificada. A GA<sub>4</sub> desaturase possui domínios para 2-oxoglutarato dioxigenase dependente em fungos (TUDZYNSKI, STUDDT e ROJAS, 2016; BHATTACHARYA et al., 2012) e no genoma de *G. diazotrophicus* PA15 a proteína GDI1238 apresenta os mesmos domínios, embora sua anotação não seja condizente com sua função – o genoma da mesma espécie bacteriana sequenciado sob número de acesso CP001189.1 possui descrição para essa mesma enzima que reflete suas funções (GIONGO et al., 2010) (Figura 06).

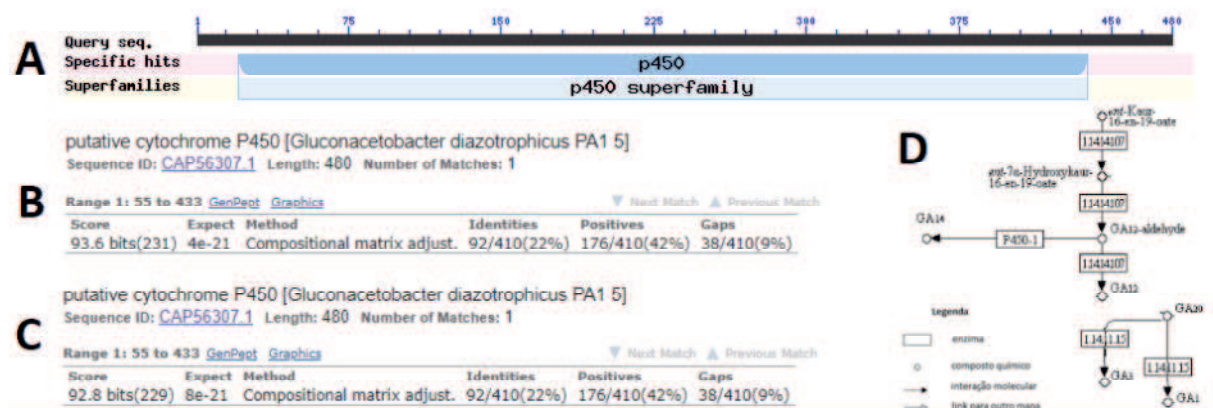
**Figura 06.** Alinhamento BLASTp da GDI1238 de *G. diazotrophicus* PA15 – a) presença de domínios conservados com a superfamília de 2-oxoglutarato FeII oxigenase dependente; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento com genoma CP001189.1 para GA<sub>4</sub> desaturase e c) excerto da via metabólica do Anexo A.



Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

O gene GDI2364 apresenta função na biossíntese de giberelinas de oxidar a molécula de ácido *ent*-caurenóico ao ácido *ent*-Hidroxic Laurenóico, ao aldeído de Giberelina A<sub>12</sub> e a GA<sub>12</sub>, como uma ácido *ent*-caurenóico oxidase (KAO - *ent-kaurenoic acid oxidase*), confirmada tanto por seus domínios conservados da superfamília de citocromos P450 demonstrados pela análise da sequência no Pfam quanto por alinhamento de sequências (Figura 07). Essa mesma etapa é catalisada por CYP114 BJ-3 em *B. japonicum* (NETT et al., 2016), pelas enzimas CYP701A e CYP88A em *A. thaliana* (DAVIDSON, REID e HELLIWELL, 2006) e por P450-1 (CYP68A – GA<sub>14</sub> synthase) em *F. fujikuroi* (ROJAS et al., 2001). Em *F. fujikuroi*, P450-1 também sintetiza GA<sub>14</sub> e sua forma em aldeído, funcionando como uma GA<sub>14</sub> sintase (ROJAS et al., 2001). Além disso, GDI2364 desempenha de forma semelhante às plantas, a função GA<sub>3</sub> oxidase para catalisar a reação de formação específica de Giberelina A<sub>1</sub> e de Giberelina A<sub>3</sub> (JANZEN et al., 1992) – em fungos, esses metabólitos são produzidos pelo citocromo CYP69A que desempenha a função de uma 13-hidroxilase, sendo correspondente a P450-3 (*C13 oxidase*) de *F. fujikuroi* (DAVIDSON, REID e HELLIWELL, 2006).

**Figura 07.** Alinhamento BLASTp da GDI2364 de *G. diazotrophicus* PA15 – a) presença de domínios conservados com a superfamília de citocromos P450; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento em *A. thaliana* para KAO; c) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento em *A. thaliana* para GA<sub>3</sub> oxidase e d) excerto da via metabólica do Anexo A.

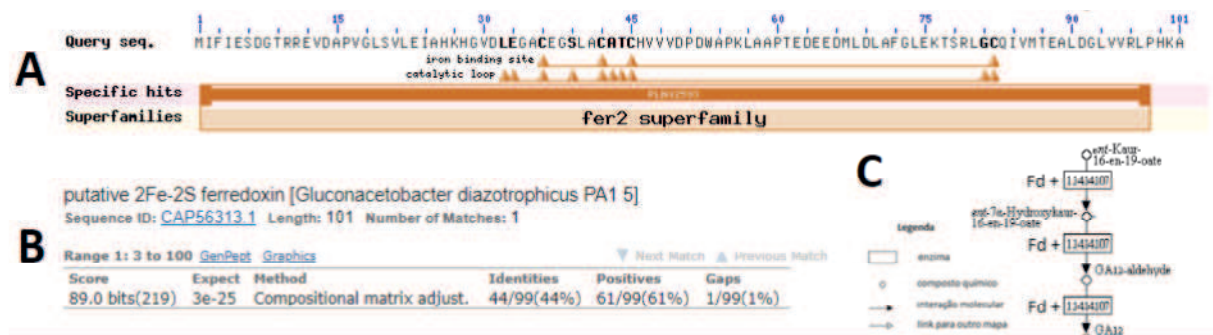


Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

A ferredoxina presente no genoma de *B. japonicum* alinhou com GDI2370 de *G. diazotrophicus* PA15, que apresenta domínios conservados demonstrados tanto pela ferramenta de análise do NCBI quanto pelo Pfam com a superfamília de ferredoxinas (Figura

08). Essa enzima é importante em algumas etapas de ciclização do ácido ent-caurenóico e para formação da GA<sub>12</sub> aldeído, que é a molécula precursora das diversas variações de GAs e da própria forma ativa de GA<sub>12</sub>, conforme descrito por trabalhos anteriores para outras espécies bacterianas e fungicas (MACMILLAN, 2002). Suas reações promovem a ação da enzima KAO previamente descrita.

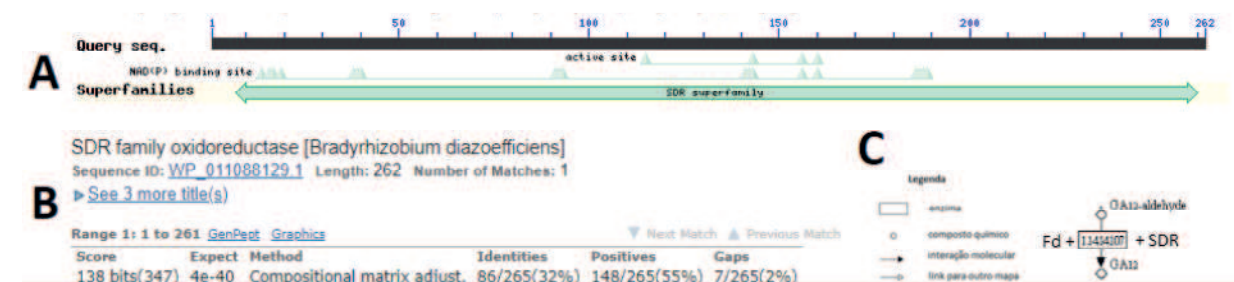
**Figura 08.** Alinhamento BLASTp de ferredoxina de *Bradyrhizobium* spp com *G. diazotrophicus* PA15 – a) presença de domínios conservados com a superfamília de ferredoxinas; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento e c) excerto da via metabólica do Anexo A.



Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).

De forma semelhante, a redutase des-hidrogenase de cadeia curta putativa presente no genoma de *G. diazotrophicus* PA15 (GDI3734) alinhou com a *Bradyrhizobium* spp e demonstra domínios conservados com a família de *Enoyl-(Acyl carrier protein) reductase* de acordo com o Pfam e com a família des-hidrogenase de cadeia curta (SDR) de acordo com a ferramenta de análise de domínios conversados do NCBI (Figura 09). Em outras espécies, a enzima SDR<sub>GA</sub> auxilia o citocromo P450 previamente descrito na formação de Giberelina A<sub>12</sub>, que é precursora de GA<sub>9</sub> e GA<sub>20</sub> (MACMILLAN, 2002; MÉNDEZ et al., 2014).

**Figura 09.** Alinhamento BLASTp de SDR<sub>GA</sub> de *G. diazotrophicus* PA15 com *Bradyrhizobium* spp – a) presença de domínios conservados com a família de SDR; b) alinhamento com valores de pontuação, E-value, Identidade e espaços gerados no alinhamento com *Bradyrhizobium* spp para SDR<sub>GA</sub> e c) excerto da via metab. do Anexo A.



Fonte: NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2017; MARCHLER-BAUER et al., 2015; MARCHLER-BAUER et al., 2011; MARCHLER-BAUER e BRYANT, 2004), BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997 ALTSCHUL et al., 2005) e adaptado de KEGG (KANEHISA e GOTO, 2000; KANEHISA et al., 2017).



A análise de sequências e de seus domínios conservados culminou na caracterização dos genes descritos (Tabela 02) como parte da via biossintética de giberelinas em *G. diazotrophicus* PA15, demonstrando que essa espécie bacteriana de fato possui em seu genoma proteínas que possibilitam a síntese deste hormônio, tanto os previamente descritos (BASTIÁN et al., 1998; MACMILLAN, 2002) quanto os detectados neste estudo.

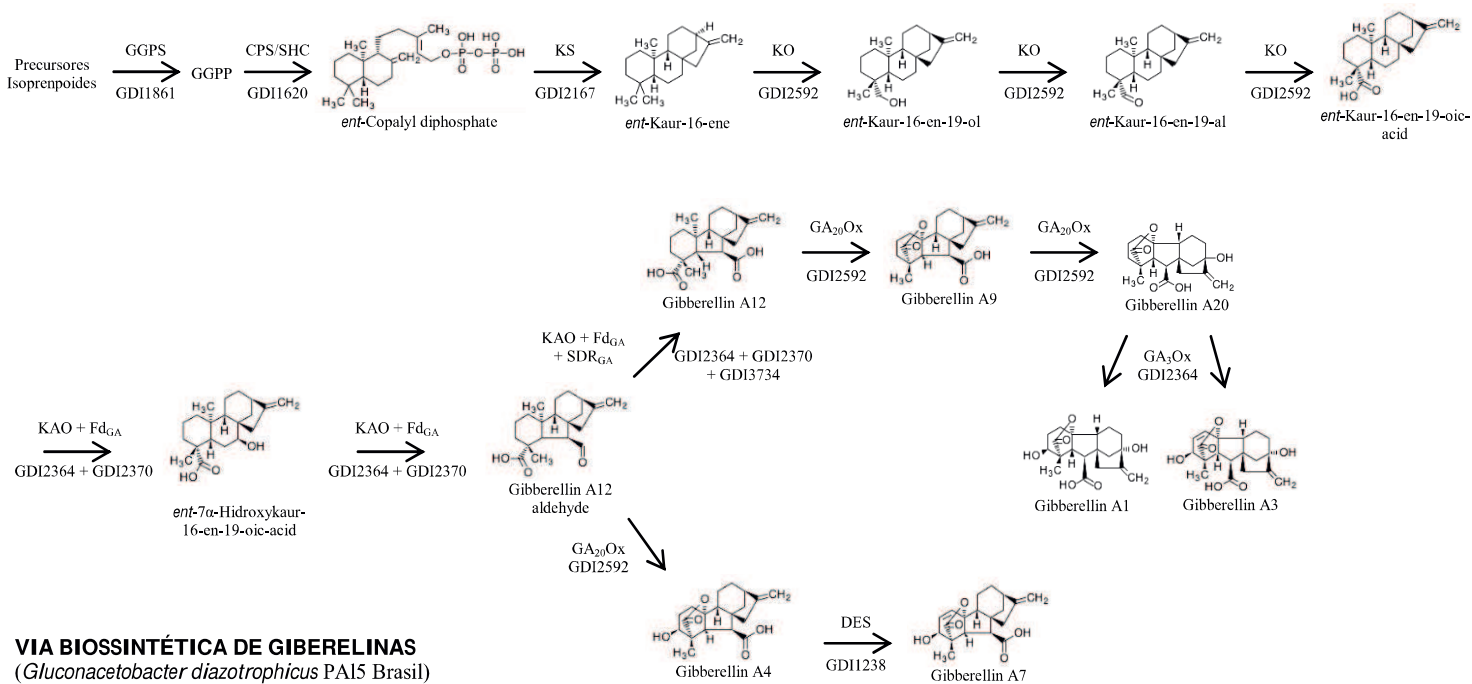
Tabela 02. Lista de genes caracterizados em *G. diazotrophicus*. Descrições dos genes pelo NCBI/GenBank, identificadores dos genes (ID), seu *locus tag*, e identificadores do UniProtKB.

Enzima em <i>G. diazotrophicus</i>	Descrição do Gene (BERTALAN et al., 2009)	Produto	ID	locus tags	ID - UniProtKB
GGPS	Geranylgeranyl transferase	geranylgeranyl diphosphate synthase	5789455	GDI1861	A9HIR3 (A9HIR3_GLU DA)
CPS/SHC	putative squalene-hopene cyclase	<i>ent</i> -copalyl diphosphate synthase/squalene-hopene cyclase	5789866	GDI1620	A9HGY2 (A9HGY2_GLU DA)
KS	conserved hypothetical protein	<i>ent</i> -kaurene synthase	5792526	GDI2167	A9HL13 (A9HL13_GLU DA)
KO	putative cytochrome P450	<i>ent</i> -kaurene oxidase	5790217	GDI2592	A9HP25 (A9HP25_GLU DA)
GA <sub>3</sub> oxidase	putative cytochrome P450	GA <sub>3</sub> oxidase	5790217	GDI2364	A9HP25 (A9HP25_GLU DA)
KAO	putative cytochrome P450	<i>ent</i> -kaurenoic acid oxidase	5789014	GDI2364	A9HMH0 (A9HMH0_GLU DA)
GA <sub>20</sub> oxidase	putative cytochrome P450	P450-2 GA <sub>20</sub> oxidase	5789014	GDI2592	A9HMH0 (A9HMH0_GLU DA)
Fd <sub>GA</sub>	NADH-quinone oxidoreductase chain I	gibberellin ferredoxin	5791857	GDI2370	A9HRS9 (A9HRS9_GLU DA)
SDR <sub>GA</sub>	putative short-chain dehydrogenases/reductases family	short-chain alcohol dehydrogenase/reductase	5791158	GDI3734	A9H7S3 (A9H7S3_GLU DA)
DES	putative PKHD-type hydroxylase	GA4 Desaturase	5791990	GDI1238	A9HE41 (Y1238_GLU DA)

Fonte: Isabela Pimentel de Almeida

Usando as estruturas moleculares presentes no KEGG com relação às enzimas analisadas e às moléculas produzidas em cada etapa, descrevemos a via biossintética de giberelinas para *G. diazotrophicus* PA15 (Figura 10).

**Figura 10.** Via de Biossíntese para Giberelinas em *G. diazotrophicus* PA15.



Fonte: Isabela Pimentel de Almeida.

## 4 CONCLUSÃO

Este trabalho culminou na elucidação de variações fisiologicamente ativas e inativas de ácido giberélico na estirpe brasileira de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15. Foram detectados os perfis fisiologicamente ativos de GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> e GA<sub>7</sub> e além disso foram caracterizados em sua forma inativa as giberelinas GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> e GA<sub>20</sub>.

Concluimos com a descrição completa da via metabólica de giberelinas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15, ao demonstrar que essa espécie bacteriana possui em seu genoma enzimas responsáveis pela síntese deste importante fitohormônio.

Vale ressaltar que a forma GA<sub>12</sub> aldeído, precursora intermediária das demais variações do ácido giberélico, pode ser produzida pelas enzimas detectadas neste estudo, reafirmando que a espécie bacteriana usada neste trabalho produz giberelinas e que é uma importante bactéria promotora do crescimento vegetal.

Uma interessante perspectiva seria um experimento para detectar a produção deste hormônio pela bactéria quando associada a uma planta de importância econômica, social e ambiental para o contexto regional. Isso por conta de que o perfil das giberelinas detectadas

varia com as fases fisiológicas da bactéria, bem como com suas condições de cultura e, se na presença de moléculas e sinais de origem vegetal, com os mesmos.

## GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS IN *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Isabela Pimentel de Almeida

### ABSTRACT

Plant growth promoting bacteria (PGPB) exert positive effects on the development of several plant species due to their production of bioactive metabolites. The Gibberellic acid, a phytohormone with many variations, are directly related to these effects and have been previously detected in *Gluconacetobacter diazotrophicus*, although the metabolic pathway for its production until now was unknown. This bacterium is a PGPB capable of colonizing and promoting growth of plant species such as red rice (*Oryza sativa* L.), with socioeconomic and environmental importance in the Brazilian semiarid. In this research, we aimed to detect active and inactive gibberellin in *G. diazotrophicus* PA15 and to characterize genes for their biosynthesis in this bacterial species. Filtered culture analyzes of *G. diazotrophicus* PA15 revealed physiologically active GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> and GA<sub>7</sub> profiles and GA<sub>9</sub>, GA<sub>12</sub> and GA<sub>20</sub> were characterized in their inactivated form. Through Bioinformatics tools the putative enzyme sequences described in the genome and, with indication of the literature, sequences from other organisms were aligned for the complete description of the biosynthetic pathway of the variations of this hormone in the species under analysis. These results may have importance in the world production of rice through a possible seed inoculation.

**Keywords:** Gibberellic acid. Acetobacteraceae. Phytohormone.

### REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS Journal**, v. 272, p. 5101-5109, 2005.
- BERTALAN, M. et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 450-467, 2009.
- BÖMKE, C. e TUDZYNSKI, B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1876–1893, 2009.

BOTTINI, R.; CASSÁN, F. e PICCOLI, P. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n 5, p. 497-503, 2004.

BASTIÁN, F. et al., Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

BHATTACHARYA, A. et al. Characterization of the Fungal Gibberellin Desaturase as a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase and Its Utilization for Enhancing Plant Growth. **Plant Physiology**, v. 160, n. 2, p. 837–845, 2012.

CASTILLO, P. et al. Phytohormones and Other Plant Growth Regulators Produced by PGPR: The Genus *Azospirillum* In: Cassán, F.D.; OKON, Y. e CREUS, C. M. (eds.). **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**. Springer International Publishing, v. 7, p. 115-138, 2015.

CAVALCANTE, V.A. e DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

DAVIDSON, S.E.; REID, J.B.; HELLIWELL, C.A. Cytochromes P450 in gibberellin biosynthesis. **Phytochemistry Review**, v. 5, p. 405-419, 2006.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A. e HOSSEINI, H.M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **MethodsX**, v. 2, p. 72–78, 2015.

FINN, R.D. et. al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. **Nucleic Acids Research**, v. 44, p. 279-285, 2016.

GIONGO, A. et al. Two genome sequences of the same bacterial strain, *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA15, suggest a new standard in genome sequence submission. **Stand Genomic Sci.**, v. 15, n. 2, p. 309-317, 2010.

GLICK, B.R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p.1–15, 2012.

HEDDEN, P. e KAMIYA, Y. GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS: Enzymes, Genes and Their Regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1, p. 431–460, 1997.

HEDDEN, P. e THOMAS, S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation. **Biochem. Journal**, v. 2012, p. 11-25, 2012.

HOSHINO T. et al. Enzymatic cyclization reactions of geraniol, farnesol and geranylgeraniol, and those of truncated squalene analogs having C20 and C25 by recombinant squalene cyclase. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 2650-2657, 2004.

HUNTER, W.N. The Non-mevalonate Pathway of Isoprenoid Precursor Biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 30, p. 21573–21577, 2007.

- JANZEN, R. et al. Azospirillum brasilense produces gibberellins in pure culture and chemically-medium and in co-culture on straw. **Soil Biol Biochemistry**, v. 24, p. 1061–1064, 1992.
- JIMENEZ-SALGADO, T. et al. Coffea arabica L., a New Host Plant for Acetobacter diazotrophicus, and Isolation of Other Nitrogen-Fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.
- KANEHISA, M. e GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 27-30, 2000.
- KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. 353-361, 2017.
- KOVATS, E. Gaz-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, p. 1915–1932, 1958.
- LEE, I.J., FOSTER, K.R. e MORGAN, P.W. Photoperiod control of gibberellin levels and flowering in Sorghum. **Plant Physiol.**, v. 116, p. 1003-1101, 1998.
- MACMILLAN, J. Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 20, p. 387-442, 2002.
- MADHAIYAN, M. et al. Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological Research**, v. 159, n. 3, p. 233–243, 2004.
- MARCHLER-BAUER, A. e BRYANT, S.H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p 327-331, 2004.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, p. 225-229, 2011.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, p 222-226, 2015.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures, **Nucleic Acids Res.**, v. 45, p. 200-203, 2017.
- MÉNDEZ, C. et al. Gibberellin oxidase activities in Bradyrhizobium japonicum bacteroids. **Phytochemistry**, v. 98, p. 101–109, 2014.
- MENESES, C. et al. Gluconacetobacter diazotrophicus exopolysaccharide protects bacterial cells against oxidative stress in vitro and during rice plant colonization. **Plant and Soil**, v. 416, n. 1-2, p. 133–147, 2017.
- MORRONE, D. et al. Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separateent-copalyl diphosphate anident-kaurene synthases in Bradyrhizobium japonicum. **FEBS Letters**, v. 583, n. 2, p. 475–480, 2008.

- MUTHUKUMARASAMY, R. et al. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 981-991, 2007.
- NAGEL, R. et al. An operon for production of bioactive gibberellin A4 phytohormone with wide distribution in the bacterial rice leaf streak pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. **New Phytologist**, v. 214, n. 3, p. 1260–1266, 2017.
- NETT, R.S.; CONTRERAS, T.; e PETERS, R.J. Characterization of CYP115 As a Gibberellin 3-Oxidase Indicates That Certain Rhizobia Can Produce Bioactive Gibberellin A4. **ACS Chemical Biology**, v. 12, n. 4, p. 912–917, 2017.
- NETT, R.S. et al. Elucidation of gibberellin biosynthesis in bacteria reveals convergent evolution. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 69–74, 2016.
- PAULA, M.A.; REIS, V.M. e DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v. 11, n. 2, p. 111–115, 1991.
- ROJAS, M.C. et al. The P450-1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 10, p. 5838–584, 2001.
- ROUWS, L. F. M. et al. Validation of a Tn5 transposon mutagenesis system for *Gluconacetobacter diazotrophicus* through characterization of a flagellar mutant. **Archives of Microbiology**, v. 189, p. 397-405, 2008.
- SARAVANAN, V.S. et al. Ecological Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 130–140, 2007.
- SEVILLA, M. et al. Comparison of Benefit to Sugarcane Plant Growth and 15N2 Incorporation Following Inoculation of Sterile Plants with *Acetobacter diazotrophicus* Wild-Type and Nif<sup>-</sup> Mutant Strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358–366, 2001.
- SPONSEL, V.M. e HEDDEN, P. Gibberellin biosynthesis and inactivation. In: DAVIS, P.J. (eds.). **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!** Kluwer Academic Publishers, v. B2, p. 63-94, 2004.
- TAPIA-HERNÁNDEZ, A. et al. Natural Endophytic Occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in Pineapple Plants. **Microbial Ecology**, v. 39, n. 1, p. 49–55, 2000.
- TUDZYNSKI, B. et al. Characterization of the Final Two Genes of the Gibberellin Biosynthesis Gene Cluster of *Gibberella fujikuroi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28635–28643, 2003.
- TUDZYNSKI, B. et al. The Gibberellin 20-Oxidase of *Gibberella fujikuroi* Is a Multifunctional Monooxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21246–21253, 2002.

TUDZYNSKI, B.; KAWAIDE, H. e KAMIYA, Y. Gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*: cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. **Curr. Genet.**, v. 34, p. 234–240, 1998.

TUDZYNSKI, B.; STUDDT, L. e ROJAS, M.C. Gibberellins in Fungi, Bacteria and Lower Plants: Biosynthesis, Function and Evolution. In: HEDDEN, P. e THOMAS, S.G. **Annual Plant Reviews: The Gibberellins**. Wiley-Blackwell, v. 49, c. 5, p. 121-152, 2016.



## ANEXO A – BIOSÍNTESE DE DITERPENÓIDES

