

Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*

José Joaquín Aguilar-Piedras,* Ma. Luisa Xiqui-Vásquez,* Silvia García-García,* Beatriz E. Baca*

Vol. 50, Nos. 1 y 2
Enero - Marzo. 2008
Abril - Junio. 2008
pp. 29 - 37

RESUMEN. *Azospirillum* es una bacteria fijadora de nitrógeno de vida libre, aislada de la rizósfera y del espacio intracelular de la raíz de varias plantas. Muchos reportes han mostrado un mejoramiento del crecimiento de la planta y la producción de granos por la inoculación de *Azospirillum* a la planta. La respuesta observada se ha atribuido a varios mecanismos que pudieran operar simultáneamente entre ellos: la producción por la bacteria del ácido indol-3-acético (IAA). En esta revisión analizaremos la compleja biosíntesis de IAA en *Azospirillum*. Se han propuesto en *Azospirillum* tres vías de síntesis dependientes de triptófano (Trp) anotadas de acuerdo al intermedio de la vía. La ruta del ácido-3-indol pirúvico (IPyA), considerada la más importante, la vía de la triptamina y la ruta del indol-3-acetonitrilo. Una vía independiente del Trp, que emplearía un precursor indólico del Trp; sin embargo ninguna de ellas está completamente dilucidada. Estudios bioquímicos mostraron actividad enzimática de dos aromático aminotransferasas (AATs) en *A. brasiliense* y cuatro en *A. lipoferum*, las cuales podrían estar involucradas en la síntesis del IPyA. En varias cepas se identificó el gene *ipdC* que codifica para la enzima clave de la vía del IPyA, la fenil piruvato descarboxilasa (PPDC). De manera interesante, *ipdC* de *A. brasiliense* Sp245 es sobreexpresado en presencia de IAA, y todos los genes *ipdC* identificados son expresados en asociación con la planta.

La enzima antranilato sintetasa codificada por el gene *trpE(G)* convierte el corismato en ácido antranílico, ésta es la primera reacción de la síntesis del Trp, existen dos copias del gene en el genoma de *A. brasiliense*. Se demostró que ambos participan en la síntesis de IAA y que son regulados diferentemente. Por lo tanto, *A. brasiliense* cuenta con una poza de Trp suficiente para la síntesis de IAA. Otras proteínas afectan la producción de IAA entre ellas: la proteína de estrés ClpX, así como una de membrana externa y una proteína que participa en el transporte de Fe⁺⁺.

Palabras clave: *Azospirillum*, ácido indol-3-acético, vías de síntesis.

Glosario: PGPB, bacteria promotora del crecimiento vegetal; IAA, ácido 3-indol acético; IPyA, ácido indol-3-pirúvico, IAld, indol-3-acetaldehído; ILA, ácido-3-indol láctico; IEth, indol-3-etanol; PAA, ácido fenil acético; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAM, indol-3-acetamida; IAox, indol-3-acetaldioxima; TAM, triptamina; IBA, ácido indol-3-butírico; Trp, triptófano; Ant, antranilato; IPDC, indol piruvato descarboxilasa; PPDC, fenil piruvato descarboxilasa; AAT, aromático aminotransferasa; AS, antranilato sintasa.

ABSTRACT. *Azospirillum* is a free-nitrogen fixing bacterium, isolated from rhizosphere and intracellular spaces of the roots of several plants. Numerous reports have shown the improvement of plant growth and crop yield upon *Azospirillum* inoculation to plants. The observed plant response to *Azospirillum* has been attributed to several mechanisms that could be operating simultaneously, among them the production of indole-3-acetic acid (IAA) by the bacterium. This review considers the complex biosynthetic production of IAA in *Azospirillum*. Three tryptophan-dependent pathways, which are generally named after an intermediate, have been proposed to be occurring in *Azospirillum*. The indole-3-pyruvic acid (IPyA) route which is likely the most important, the tryptamine pathway, and the indole-3-acetonitrile route, and one pathway Trp-independent using an indolic Trp precursor; however none of them are fully elucidated. Biochemical studies showed two aromatic amino-transferases (AATs) enzymatic activity from *A. brasiliense* and four from *A. lipoferum*, which could be involved in IPyA synthesis. The *ipdC* gene coding the key enzyme phenyl-3-pyruvate decarboxylase (PPDC) of IPyA pathway was identified from several strains. Interestingly, *ipdC* from *A. brasiliense* Sp245 strain is up regulated by IAA, and all genes *ipdC* identified are expressed in association with the plant. The antranilate synthase catalyzing the conversion of chorismate to antranilate which. It is the initial reaction in Trp biosynthesis codified by *trpE(G)*, and two copies occur in *A. brasiliense* genome. It was demonstrated that both *trpE(G)* genes participate in IAA synthesis and are differentially regulated. Therefore, *A. brasiliense* has a plenty pool of Trp for IAA synthesis. Other proteins play a role in IAA production such as the ClpX stress protein, as well as an outer membrane protein and a protein involved in transport of Fe⁺⁺.

Key words: *Azospirillum*, indole-3-acetic acid, synthesis pathways.

INTRODUCCIÓN

El género *Azospirillum* son bacterias Gram negativas heterotróficas, fijadoras de nitrógeno de vida libre, pertenecen a la subclase α de las proteobacterias. Se han descrito 10 especies: *A. brasiliense*, *A. lipoferum*,⁴ *A. amazonense*,⁴ *A. halopraeferans*,⁴ *A. irakense*,⁴ *A. largimobil*,⁴ *A. dobereinerae*,⁴ *A. orizae*,⁵⁵ *A. melinis*,³⁶ y *A. canadense*.²⁰ Las cuales se han aislado de la rizósfera o del interior de la planta (endofíticas), de diferentes monocotiledóneas o dicotiledóneas. En regiones templadas y tropicales del mundo. Es considerada una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPB), por el beneficio obtenido posterior a la inoculación de la bacteria, en una amplia variedad de plan-

* Centro de Investigaciones Microbiológicas, Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

tas: maíz, arroz, caña de azúcar sorgo, algunas forrajeras y otras plantas de interés agronómico.^{4, 13}

La inoculación con *Azospirillum* modifica el sistema radicular por un mecanismo o mecanismos aún no completamente establecidos, sin embargo éste se atribuye al menos en parte, a la producción por la bacteria de sustancias que regulan el crecimiento vegetal, conduciendo a un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales, aumentando la superficie disponible para la absorción de nutrientes y el flujo de protones en la membrana de la raíz,

lo que promueve la captación de agua y minerales.^{3,23,33} La inoculación con estas bacterias generalmente implica costos más bajos que el empleo de fertilización química; además de generar un menor impacto ambiental.^{4,32}

Azospirillum produce principalmente ácido indol-3-acético (IAA) y en menor cantidad ácido indol-3-butírico (IBA) citocininas y giberilinas.^{5,20,29,48} Asimismo, la inoculación con *Azospirillum* puede afectar el metabolismo de fitohormonas endógenas. Sin embargo, no se sabe si este fenómeno es debido al IAA producido por la bacteria, o por la hidrólisis de hormonas conjugadas en el tejido de la raíz.¹⁴

FITOHORMONAS

Las fitohormonas son moléculas orgánicas sencillas que regulan la expresión de genes determinados; son sintetizadas en diferentes partes de la planta y pueden ser transportadas a otros sitios, actúan como mensajeros químicos, controlan el crecimiento y desarrollo de la planta, responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética de la planta. Por lo que son capaces de desencadenar una respuesta bioquímica, fisiológica y morfológica. Además de la pro-

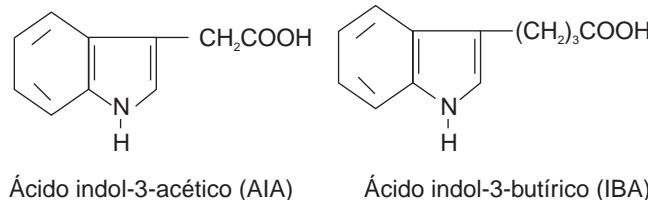


Figura 1. Estructura química de las principales auxinas producidas por *Azospirillum*.

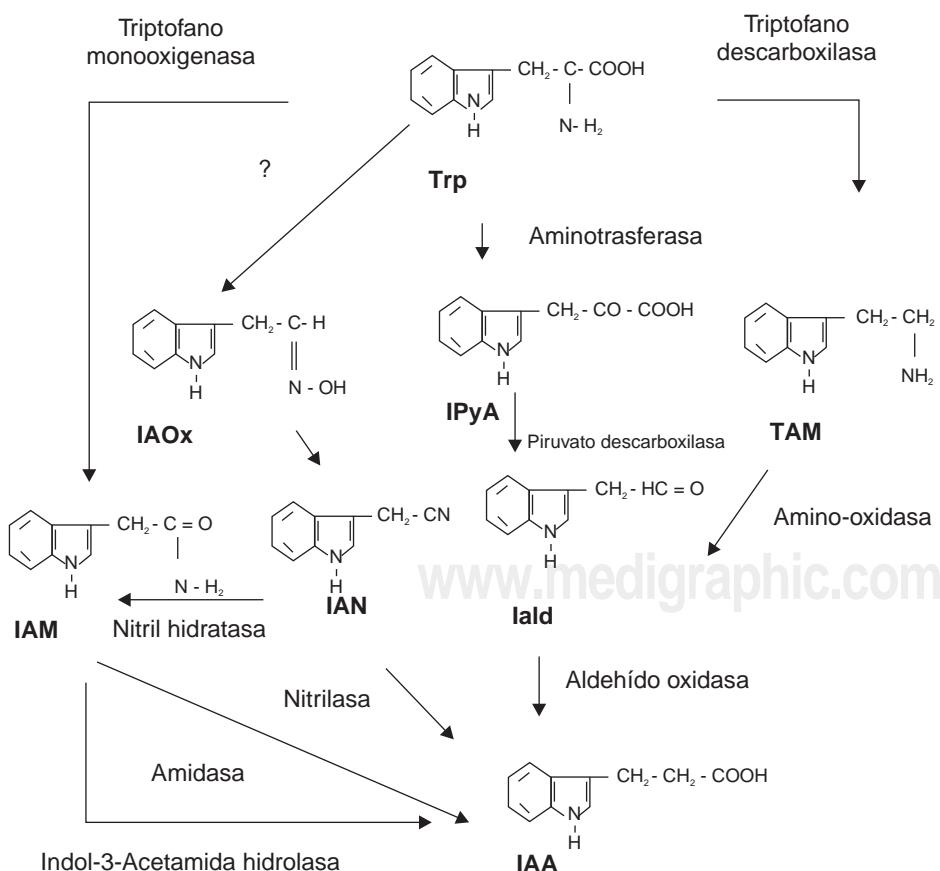


Figura 2. Vías de producción de IAA, dependientes de triptófano.

ducción endógena de la fitohormona por la planta, está la exógena asociada a microorganismos del suelo. En relación a la síntesis de IAA, en bacterias, sólo se tiene un panorama completo en *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae* pv *savastanoi*, en las cuales se conocen las rutas de síntesis de IAA y su participación en la patogénesis de la planta; en los otros casos se cuenta con datos parciales de las vías de síntesis, las enzimas que participan, los genes que las codifican y su regulación.

VÍAS DE SÍNTESIS DEL IAA DESCRITAS EN BACTERIAS

El IAA es un metabolito derivado del Trp. Aunque, éste también puede ser sintetizado por una vía independiente del Trp principalmente en plantas. Por lo tanto se proponen varias vías de síntesis del IAA en bacterias.

Vía del ácido indol-3-pirúvico (IPyA)

Esta vía está presente en plantas superiores y bacterias del suelo.^{6,11,27}

La ruta de síntesis se inicia con la transaminación del Trp, en la que participan las enzimas aromático amino-transferasas (2.6.1.5; 2.6.1.9) para formar el IPyA, éste es transformado en indol-3-acetaldehído (IAld), por la acción de la indol piruvato descarboxilasa (IPDC, 4.1.1.74), el cual a su vez es convertido en IAA por una aldehído deshidrogenasa (1.2.1.3) (Fig. 2).

Vía del indol-3-acetonitrilo (IAN)

Ésta es otra vía dependiente de Trp y se encuentra presente en bacterias y plantas. Generalmente el IAN producido en la planta es transformado en IAA por la enzima nitrilasa (3.5.5.1) (Fig. 2). En bacterias la conversión de IAN en IAA puede llevarse a cabo por dos vías. Mediante la actividad de la nitrilasa que lo convierte en IAA y amonio; o bien por la vía alterna que incluye la actividad de una nitril hidratasa (4.1.1.74) que lo convierte en IAM, posteriormente la enzima amidasa (3.5.1.4) transforma IAM en IAA (Fig. 2). Las enzimas nitril hidratasa y amidasa ocurren en varias cepas de *Agrobacterium*, *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti*.²⁶

Vía de la triptamina (TAM)

En esta ruta el Trp es convertido a triptamina (TAM) por la actividad de la triptófano descarboxilasa (4.1.1.28), posteriormente la TAM es transformada en IAld por la actividad de la triptamina oxidasa (1.4.3.4; 1.4.3.6). El IAld se convierte en IAA como en la vía del IPyA (Fig. 2).

Vía de la indol-3-acetamida (IAM)

La vía de la IAM ha sido estudiada con detalle en *A. tumefaciens* y *P. syringae* pv *savastanoi*. En estos dos patógenos de plantas se estableció la relación de la producción del IAA y la virulencia. El IAA es producido por la actividad secuencial de dos enzimas: Trp 2-monooxigenasa (1.13.12.3) e indol acetamida hidrolasa (3.5.1), que catalizan la conversión de Trp en IAM y ésta en IAA respectivamente.^{15,21,43,47,51} *A. tumefaciens* causa lesiones en plantas dicotiledóneas y la formación de tumores. La virulencia de *A. tumefaciens* se debe a la presencia del plásmido pTi (inductor de tumor). Durante la infección un fragmento de pTi, el T-ADN es transferido e integrado al genoma de la célula de la planta. La expresión de T-ADN en la célula eucariota promueve una alteración en el metabolismo del IAA y citocinina.³¹ Los genes *tms-1* y *tms-2* que codifican para las enzimas IAM hidrolasa y Trp monooxigenasa se localizan en T-ADN.^{22,43,47} Estos dos genes poseen sus homólogos en *P. syringae* pv *savastanoi* llamados *iaaM* y *iaaH*.¹⁰ *P. syringae* pv *savastanoi* es una bacteria patógena, del olivo y de plantas de la familia de las oleáceas. La formación de tumores es una respuesta a la gran concentración de IAA secretado por la bacteria. Se ha establecido que la producción de IAA es la responsable de la patogenicidad de la bacteria, y los genes se localizan en el plásmido (pIAA1); la pérdida del pIAA1 torna avirulenta a la bacteria.⁹ Los genes *iaaM* e *iaaH* están organizados en un operón mientras que los genes de *A. tumefaciens* son monocistrónicos y sólo se expresan en la planta.⁵⁷ Las especies de *P. syringae* subsp. *savastanoi* producen IAA, e IAA-lisina. El gene que codifica para la enzima que conjuga el IAA se denomina *iaaL*, se ubica en el plásmido pIAA1; *iaaL* no es parte del operón *iaa*. De manera sorprendente se observó que una mutación en el gene *iaaL* causa disminución de la virulencia; esto se explica por el hecho de que la conjugación del IAA es un mecanismo de regulación de la actividad de la vía de síntesis del IAA.¹⁸

En varias especies de *P. syringae* y en 57 patógenos de *Pseudomonas* se analizó la producción de IAA y la presencia de los genes *iaaM* e *iaaH*. Sorprendentemente, los genes fueron detectados sólo en pocas especies, este resultado sugiere que la síntesis de IAA se lleva cabo por una vía diferente de IAM; en esas cepas ocurre la vía del IPyA,^{16,19} (Fig. 2).

Vía independiente del trp

Esta vía se propone ser la más importante en plantas. En *Arabidopsis thaliana* y Maíz *orange pericarp* se emplearon mutantes en los genes que codifican para las dos subu-

nidades de la enzima triptófano sintasa (α y β , respectivamente). Las mutantes sintetizaban IAA y acumulaban sus conjugados. Por otra parte, plantas construidas con un RNA antisentido de la enzima indol-3-glicerol sintasa (IGS), no acumulaban los conjugados de IAA.⁵³ El examen de estas mutantes implica que habría una ramificación en la síntesis de IAA, a partir del indol-3-glicerol fosfato, el cual podría ser el precursor de la síntesis.⁵³

PRODUCCIÓN DE IAA EN AZOSPIRILLUM

En cultivo *A. brasiliense* en medio libre de nitrógeno produce IAA (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mientras que la producción alcanza hasta 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un medio adicionado con fuente de nitrógeno combinado y Trp.⁴⁸ Cepas de *A. brasiliense* y *A. lipoferum* aislada del maíz y teocintle producen IAA y otros indoles como el ácido indol-3-láctico (ILA), e indol-3-etanol (IEth).⁷ La producción de IAA depende de la especie, las cepas, las condiciones de cultivo, concentración de Trp, pH, oxigenación y la fase de crecimiento.^{12,34} *A. brasiliense* UAP 154 aislada de maíz, produce IAA y en menor cantidad IBA.²⁹ De estos estudios se desprende que la producción de IAA es óptima bajo los siguientes parámetros: Cultivo adicionado con Trp, oxigenación, pH 5.5, e inicio de la fase estacionaria.^{12,35} Asimismo, la adición de las vitaminas piridoxamina y ácido nicotínico, al medio de cultivo favorece la producción de IAA.⁵⁸ La síntesis de IAA es estimulada por factores de estrés como: la limitación de fuente de carbono y condiciones de microareofilia.³⁵

Evidencia de la existencia de varias vías de síntesis de IAA en *Azospirillum*

Ya que la producción se incrementa considerablemente cuando al medio de cultivo se adiciona el Trp, éste es con-

siderado como el precursor de la síntesis de IAA en *Azospirillum*.^{1,12,38,48} Debido a que no se ha obtenido una mutante desprovista de la producción de IAA,^{2,20,42} se propuso que ocurren en *Azospirillum* varias vías de síntesis de IAA. Prinsen *et al.*,³⁷ basándose en el análisis de la producción de IAA en presencia H³-Trp y H³-IAM, reportaron que al menos tres vías están presentes. En medio adicionado con H³-Trp se identificó H³-IAM, y un 10% de H³-IAA, sin embargo, cuando se adicionó H³-IAM se obtuvo sólo 0.1% de H³-IAA; por lo tanto, la vía principal sería la del IPyA responsable del 90% de la producción de IAA en presencia de Trp; mientras que la vía alternativa sería la del intermediario IAM. La vía independiente de Trp sería predominante en ausencia del aminoácido. No obstante, es controversial la existencia de esta vía ya que Zimmer *et al.*⁵⁹ no identificaron los genes que codifican para dicha vía, ni actividad de 2-triptófano monooxigenasa.

VÍA DEL INTERMEDIARIO IPYA

Aromático aminotransferasas (AATs)

La conversión de Trp en IPyA, es una reacción catalizada por enzimas denominadas aromático aminotransferasas (AATs), detectadas en extractos de *A. brasiliense* y *A. lipoferum*.^{1,38,41} La actividad de las AATs está ampliamente distribuida entre los microorganismos, y documentado que participan en varias etapas de la fisiología microbiana, en algunos casos catalizan la última reacción de la biosíntesis de L-fenilalanina y L-tirosina a través de la transaminación del fenilpiruvato y p-hidroxifenilpiruvato, respectivamente. También participan en la primera etapa de la utilización de aminoácidos como única fuente de nitrógeno.²⁸ Estas enzimas, también llamadas transaminasas, generalmente conducen los grupos α -amino del aminoácido al α -cetoglutarato que se transforma en ácido glutámico y el cetoácido correspondiente.

La Tabla 1 ilustra la superfamilia de las aminotransferasas que dependen de fosfato de piridoxal como cofactor (PLP); debido a la limitada homología entre ellas la división se efectuó en base al alineamiento de aminoácidos empleando un programa sofisticado de análisis. La familia I incluyó el análisis de 47 secuencias obtenidas de varios microorganismos, esta familia se despliega en varias subfamilias. Las subfamilias I α y I β incluyen a: Aromático aminotransferasas e histidil aromático aminotransferasas, respectivamente. La familia IV contiene a las serina aminotransferasas y fosfoserina aminotransferasas; la familia III incluye a D-alanina aminotransferasas y aminotransferasas de cadena ramificada; y la familia II corresponde a las ornitina aminotransferas.²⁴

En *A. brasiliense* Sp7, Sp245, R07 y *A. lipoferum* USA5a se mostró la actividad de dos AATs, AAT1 y AAT2

Tabla 1. Clasificación de la superfamilia de las transaminasas de acuerdo a Jensen & Gu.²²

• Superfamilia de aminotransferasas	<ul style="list-style-type: none"> • Familia IV • Familia III • Familia II • Familia I 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Subfamilia Iα • Subfamilia Iλ • Subfamilia Iβ • Subfamilia IΩ • Subfamilia Iδ • Subfamilia Iγ • Subfamilia Iϕ 	

cuya MMr es de 66 kDa y 44 kDa respectivamente. AAT1 emplea como sustratos a: fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina; mientras que AAT2 sólo a los aminoácidos aromáticos; por lo tanto pertenecen a las subfamilias: I β y I α , respectivamente.^{1,38} La actividad específica total de las AATs aumentó tres veces en presencia de los aminoácidos aromáticos,¹ a diferencia de lo observado en *E. coli* donde la tirosina reprime la expresión del gene *tyrC* que codifica para la AAT. Esta enzima fue purificada a homogeneidad posee una MMr de 33 kDa, en un ensayo de electroforesis en condiciones desnaturizantes, indicando que la proteína nativa es un homodímero; la reacción catalizada por AAT1 exhibe un K_m alto para el Trp, es decir la reacción reversible es favorecida a favor de la síntesis de tirosina y fenilalanina; además es inhibida de manera competitiva por IPyA.⁴⁵ recientemente se ha sugerido su participación en la síntesis del ácido fenil-pirúvico (PPA), el cual exhibe actividades de auxina y antimicrobiana.^{44,52} En *A. lipoferum* se describieron cuatro actividades de aromático aminotransferasas.⁴²

La secuencia de una mutante hipoproductora de IAA de *A. brasiliense* Yu 62 y cuyo producto de traducción reveló homología con un regulador transcripcional de *Sinorhizobium meliloti*; corriente abajo otros dos genes se identificaron *atrB* y *atrC* los productos de traducción mostraron 35% y 39% de identidad, respectivamente con amino transferasas de la familia III.⁵⁴

Fenil piruvato descarboxilasa (PPDC) enzima clave de la síntesis de IAA

La segunda etapa de la vía es catalizada por la enzima PPDC, cuya evidencia se demostró en el estudio realizado en una mutante hipoproductora de IAA.² La complementación de la mutación con una librería genómica de *A. brasiliense* Sp245, condujo al aislamiento de un gene que codifica para una proteína homóloga a la enzima IPDC (*ipdC*) de *E. cloacae*.^{11,27} Posteriormente, el gene se identificó en *A. brasiliense* Sp7 y *A. lipoferum* FS. Mutantes del gene *ipdC*, producen sólo el 10% de IAA.^{8,11,56,60} La expresión del gene se realiza en la etapa inicial de la fase estacionaria, es independiente de la presencia de Trp, y depende de la densidad celular.^{8,49} Vande-Broek *et al.*⁴⁹ reportaron que *ipdC* Sp245 es regulado por IAA de manera positiva; mientras que este efecto no se observó en *ipdC* Sp7.⁸ Se localizaron secuencias homólogas al elemento “Aux-RE” cuya expresión responde al IAA, corriente arriba del gene *ipdC* Sp245.⁴⁷ La fusión transcripcional del gene *ipdC* Sp7, inoculada a raíces de trigo, indicó que ésta se expresa en asociación con la planta hospedera (Fig. 3). En la región promotora de *ipdC* de *A. lipoferum* FS se localizaron secuencias invertidas repetidas (ISR). En un ensayo de re-

tardación en gel se advirtió la unión de dos proteínas a la región reguladora, las cuales podrían estar relacionadas con la expresión del gene.⁵⁶

Regulación de la enzima PPDC

El estudio de la organización genómica de *ipdC* 245, reveló otros dos marcos de lectura abierta, que se anotaron como: *iaaC* y *gltX* (Fig. 4). El producto de traducción de *iaaC* exhibió homología con proteínas de regulación. *iaaC* e *ipdC* se trasciben en forma conjunta, aunque *iaaC* también es expresado a partir de su propio promotor, la expresión del operón *iaaC-ipdC* es máxima a pH 5.5. El análisis fino de la región promotora de *ipdC* indicó que están presentes secuencias que responden al IAA confirmando los hallazgos iniciales,^{49,50} éstas podrían ser sitio de unión de una proteína que actuaría como activador. Además *iaaC* controla también la producción IAA por un mecanismo aún no definido, aunque no la expresión de *ipd*.⁴⁹

De manera interesante, se determinó que la región del promotor de *ipdC* de *A. brasiliense* de Sp7 y Sp245 son diferentes. En la cepa Sp7 ocurre una delección de 150pb. El análisis en vida libre reveló que la regulación de *ipdC* es más estricta en la cepa 245 que en Sp7; los aminoácidos tirosina y fenilalanina aumentan la expresión del gene en ambas cepas; además ésta depende del fondo genético de cada cepa. Al analizar la expresión de *ipdC* en asociación con la planta, ambos son expresados, aunque *ipdC*-Sp245 con menor actividad, confirmando los resultados obtenidos *in vitro*.⁴⁰

Estudios recientes mostraron que la enzima preferentemente utiliza como sustrato al ácido fenil pirúvico y produce PPA, por lo que los autores la renombraron fenil piruvato descarboxilasa (PPDC).^{44,52}

Vías alternas dependientes de Trp en *A. brasiliense* Sp7 y evidencia fisiológica para las vías TAM e IAN

Hartmann *et al.*²⁰ reportaron una mutante ostentando un nivel elevado de producción de IAA y la excreción de un producto tentativamente identificado como TAM. Posteriormente, Carreño López *et al.*⁸ mostraron que la mutante *ipdC-km^R* creciendo en medio adicionado con malato o gluconato disminuía notablemente la producción de IAA, sin embargo en medio adicionado de lactato o piruvato como fuente de carbono la producción resultó muy similar a la de la cepa silvestre. Por otra parte, la mutante *trpAB-ipdC* crecida en medio de cultivo con ILA, producía IAA en menor cantidad sugiriendo la presencia de una vía alterna de IAA, a partir de la producción de Trp obtenido por la reacción reversa de las AATs. Cuando el ensayo se realiza en medio adicionado de gluconato, la producción de IAA

disminuye drásticamente; sugiriendo que la vía alterna de producción de IAA o intermediarios del mismo están sometidos a un mecanismo de represión catabólica.⁸ En este mismo trabajo al adicionar al medio IAN se obtuvo la producción de IAM e IAA; ya que no están presentes en la cepa de Sp7 las actividades de: 2-Trp monooxigenasa, ni IAM hidrolasa, la síntesis de IAM puede provenir de un intermediario de IAN durante su transformación en IAA, por las actividades de nitrilo hidratasa y amidasa, las cuales participarían en otra vía alterna dependiente de Trp para la síntesis de IAA (Fig. 2).²⁶

REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE TRP Y PRODUCCIÓN DE IAA

El escrutinio en las diferentes especies de *Azospirillum* que producen IAA por la vía dependiente de Trp indicó que *Azospirillum irakense* libera diez veces menos IAA y excreta ácido antranílico (precursor del Trp), al medio que *A. brasiliense* Sp7. Por complementación genética se identificó una región de ADN de Sp7 que presentó homología con los genes *trpGDC* que codifican para enzimas de la biosíntesis de Trp.⁵⁹ Al incorporar el gen *trpD* (de Sp7) en *A. irakense* que codifica para la enzima fosforibosil antranilato transferasa, enzima que transforma el antranilato (Ant) en fosforibosil antranilato, éste disminuyó en el medio y al mismo tiempo aumentó la concentración de IAA producida. Coincidiendo con los resultados precedentes una mutante de *A. brasiliense* Sp245 reveló un aumento en la concentración de antranilato y baja producción de IAA.²⁵ Lo que apunta a la interrelación de la síntesis de Trp y IAA. Dos copias del gene *trpE(G)* que codifica la enzima antranilato sintasa (AS) ocurren en *A. brasiliense* Sp7; corriente arriba de *trpE(G)* se localizó un péptido líder rico en Trp, el cual participaría en la regulación transcripcional de la síntesis de Trp, por el mecanismo de atenuación. En el producto de traducción del gene está ausente el motivo de aminoácidos que corresponden al sitio de retroinhibición por el Trp.⁴⁶

La enzima AS cataliza la primera reacción de la síntesis del Trp. Es una proteína constituida por dos subunidades, la subunidad- α (componente I, 4.1.3.27), cataliza la formación de antranilato a partir de corismato, y posee el sitio de regulación por retroinhibición del Trp; esta subunidad es codificada por *trpE* y la subunidad- β (componente II, 2.4.2.18), funciona como una glutamina amino-transferasa que transfiere grupos amino de la glutamina a la subunidad- α ; y es codificada por el gene *trpG*. En algunas bacterias los componentes están fusionados en un solo gene *trpEG*.

En *A. brasiliense* Yu62, como en la cepa Sp7 están presentes dos copias del gene que codifican la enzima AS: *trpE₁(G)* y *trpE₂*. En *trpE₁(G)* se identificó la secuencia terminador-antiterminador, así como la que codifica para el péptido líder; mientras que, en *trpE₂* están ausentes. Se estableció que: Mutantes en ambos genes intervienen en la síntesis de IAA. Sólo el gene *trpE₁(G)* responde a la regulación transcripcional por atenuación, vía Trp. Por otra parte, a pesar de estar ausente el motivo de regulación alostérica característico, la enzima AS TrpE₁ respondió al mecanismo de retroinhibición por Trp; no así TrpE₂.¹⁷ Esto indica que la cepa Yu62 contiene con procesos que le permiten disponer con una poza suficiente de Trp para sintetizar IAA.

PARTICIPACIÓN DE OTROS GENES EN LA SÍNTESIS DE IAA

A partir de *A. brasiliense* 8-I, cepa aislada de la rizósfera de la caña de azúcar, se obtuvo una mutante cuyo análisis de secuencia indicó que se interrumpió el gene de una proteína de estrés calórico codificada por *clpX*. De manera interesante la mutación originó un efecto pleiotrópico, la mutante fija mayor cantidad de N₂, incrementa la producción de exopolisácaridos (EPS), disminuye la producción de β -hidroxibutirato (PHB) y en relación a la cepa silvestre produce sólo un 0.25% de IAA. Los autores proponen que: El aumento de fijación de nitrógeno en respuesta a la

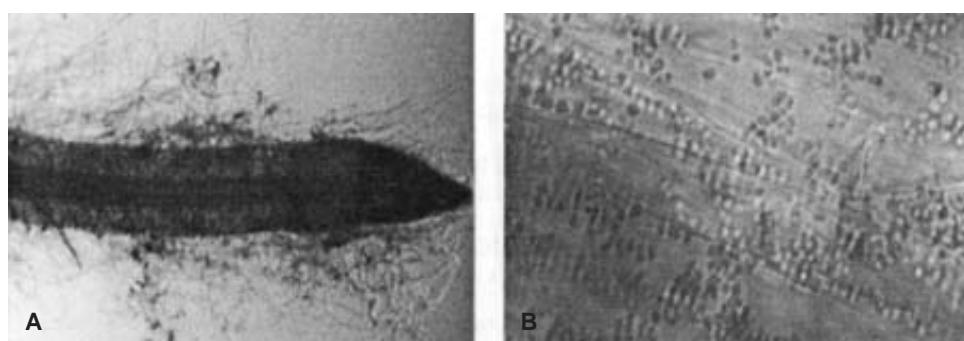


Figura 3. Expresión de ipdC de *A. brasiliense* Sp7 en asociación con la planta. Plántulas de trigo se inocularon con la fusión transcripcional ipdC::lacZ de *A. brasiliense* Sp7. Después de cinco días, se tiñeron con Xgal. Panel A cofia de la raíz 60X. Panel B 1000X.

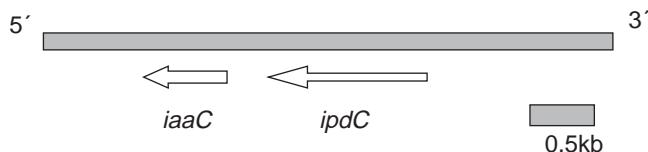


Figura 4. Mapa físico del gene *ipdC* en el cromosoma de *A. brasiliense* Sp 245. La flecha indica la dirección de transcripción de los genes *iaaC* e *ipdC*. (Modificado de: Vande-Broek, et al.⁴⁶)

deficiencia de la proteína de estrés, alteraría el metabolismo de carbono, lo que traería como consecuencia un aumento en la síntesis de EPS, y disminución de la síntesis de IAA, al decrecer la disponibilidad de energía.³⁹

Varias mutantes de *A. brasiliense* Yu62 fueron obtenidas con niveles disminuidos en la producción de IAA. En una de éstas la mutación se localizó en una proteína de unión a Fe³⁺ de un sistema de transporte para el fierro tipo ABC (*ftsA*), coincidiendo con un aumento en el medio de Fe³⁺. Esto sugiere que el Fe³⁺ es necesario para la síntesis de IAA. El producto predicho del gene *omaA* resultó ser una proteína de membrana externa, cuya mutación también afecta la producción de IAA. Sin embargo, la concentración intracelular de éste resultó ser similar a la cepa silvestre, lo que sugeriría que la mutación no afecta la secreción del IAA, *omaA* afectaría la síntesis por un mecanismo diferente al de la secreción. Finalmente, la secuencia obtenida a partir de otra mutante indicó que *aldaA* y el producto de traducción del mismo exhibe homología con aldehído dehidrogenasa, enzima que realiza la tercera reacción de la vía del intermedio IPyA.⁵⁴

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A pesar del avance significativo realizado en el género *Azospirillum* aún no se tiene un panorama completo de la biosíntesis del IAA y su regulación, los datos obtenidos apuntan a que ésta es compleja. En efecto, en *Azospirillum* ocurren varias vías de síntesis para el IAA, se proponen tres rutas dependientes de Trp y una independiente de este precursor. Existe redundancia de genes y varias enzimas pueden participar en la síntesis del intermedio de una vía. Esta redundancia ocurre también en la enzima AS, fundamental en la formación del precursor Trp. De manera interesante se observa diferencia en la regulación tanto a nivel transcripcional de los genes que la codifican; así como en la regulación de la enzima por retroinhibición por el Trp; garantizando una poza de Trp suficiente para sintetizar el IAA.

Aparentemente al menos cuatro transaminasas podrían funcionar para sintetizar los precursores IPyA, y el ácido

fenil pirúvico, este último precursor del PPA; se requiere identificar los genes y obtener las mutantes respectivas para determinar si alguna de ellas posee una participación predominante. Así como analizar su expresión en vida libre y en asociación con la planta.

Los estudios sobre la regulación de la enzima clave de la vía del intermedio IPyA mostraron aspectos relevantes: En dos cepas, en las que la regulación de PPDC se estudió, revelaron diferencias significativas, tanto en vida libre como en asociación con la planta. *ipdC* de *A. brasiliense* Sp7 presentó una regulación flexible en ambas condiciones, lo cual es notable ya que esta cepa es rizosférica; mientras que *ipdC* de *A. brasiliense* Sp245 cepa que se localiza en el interior de la raíz su regulación es más estricta, además de ser regulada de una manera positiva por el IAA. Este control podría garantizar un efecto benéfico adecuado, ya que es conocido que un exceso de IAA produce un efecto de inhibición drástico en el desarrollo de la raíz. Esta enzima además participa en la síntesis de otro compuesto con actividad de auxina y antimicrobiana el PPA.

La secuenciación del genoma de varias especies y cepas de *Azospirillum* están en proceso lo que es muy alentador, ya que nos permitirá contar con una herramienta metodológica muy potente para dilucidar las vías presentes y su regulación, así como poder contar con mutantes desprovistas de síntesis de IAA, si esto resulta posible, para definir su participación en el beneficio observado en la planta, en la interacción con ésta y en la fisiología de la bacteria.

REFERENCIAS

1. Baca, EB., L. Soto-Urzúa, YG. Xochihua & A. Cuervo. 1994. Characterization of aromatic amino acid aminotransferases and production of indolacetic acid in *Azospirillum* strains. Soil Biol. Biochem: 57-63.
2. Barbieri, P., T. Zanelli, E. Galli & G. Zanetti. 1986. Wheat inoculation with *Azospirillum brasiliense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. FEMS Microbiol. Lett.36: 87-90.
3. Bashan, Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasiliense* Cd inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. Can. J. Microbiol. 36:419-425.
4. Bashan, Y., G. Holguin & LE. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Can. J. Microbiol. 50:521-577.
5. Bottini, R., M. Fulchieri, D. Pearce & RP. Pharis. 1989. Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90:45-47.
6. Brandl, M. & SE. Lindow. 1996. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4121-4128.

7. Carcaño-Montiel, MG., R. Ferrera-Cerrato, J. Pérez-Moreno, J D. Molina-Galán, & Y. Bashan. 2006. Actividad nitrogenasa, producción de fitohormonas, sideróforos y antibiosis en cepas de *Azospirillum* y *Klebsiella* aisladas de maíz y teocintle. *Terra Latinoam.* 24:493-502.
8. Carreño-López, R., NB. Campos-Reales, C. Elmerich & BE. Baca. 2000. Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasiliense*. *Mol. Gen. Genet.* 264: 521-530.
9. Comai, L. & T. Kosuge. 1980. Involvement of a plasmid deoxyribonucleic acid in indoleacetic acid synthesis in *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* 143: 950-957.
10. Comai, L. & T. Kosuge. 1982. Cloning and characterization of iaaM, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *J. Bacteriol.* 149: 40-46.
11. Costacurta, A., V. Keijers & J. Vanderleyden. 1994. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasiliense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243: 463-472.
12. Crozier, AP., JM. Arruda, A. Jazmín, M. Monteiro & G. Sandberg. 1988. Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasiliense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2833-2837.
13. Dobbelaere, S. et al. 2001. Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 871-879.
14. Fallik, E., Y. Okon, YE. Epstein, A. Goldman & M. Fisher. 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasiliense* inoculated maize roots. *Soil Biol. Biochem.* 21:147-153.
15. Follin, A., D. Inzé, F. Budar, C. Genetello, M. Van Montagu & J. Schell. 1985. Genetic evidence that the tryptophan 2-monoxygenase gene of *Pseudomonas savastanoi* is functionally equivalent to one of the T-DNA genes involved in plant tumor formation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 201: 178-185.
16. Gardan, LC., ME. David, M. Morel, EL. Glickmann, A. Abu-Ghorrah & Y. Dessaix. 1992. Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1780-1783.
17. Ge, SM., BE. Xie & SF. Chen. 2006. Characterization of two trpE genes encoding anthranilate synthase α -subunit in *Azospirillum brasiliense*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341:494-499.
18. Glass, NL. & T. Kosuge. 1988. Role of indoleacetic acid-lysine synthetase in regulation of indoleacetic acid pool size and virulence in *Pseudomonas syringae* subsp *savastanoi*. *J. Bacteriol.* 170: 2367-2373.
19. Glickmann, EL., S. Gardan, S. Jacquet, M. Hussain, A. Elasri & Y. Dessaix. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 156-162.
20. Hartmann, A., M. Singh & W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29: 916-923.
21. Hutcheson, SW. & T. Kosuge. 1985. Regulation of 3-indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *J. Biol. Chem.* 260: 6281-6287.
22. Inzé, D., A. Follin, M. Van Lijsebettens, C. Simoens, C. Genetello, M. Van Montagu & J. Schell. 1984. Genetic analysis of the individual T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens*, further evidence that two genes are involved in indole-3-acetic acid synthesis. *Mol. Gen. Genet.*, 194 265-274.
23. Itzigsohn, R. & Y. Okon. 1995. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnol. Adv.* 13:415-424.
24. Jensen, R.A. & W. Gu. 1996. Evolutionary recruitment of biochemical specialized subdivisions of family I within the protein superfamily of aminotransferases. *J. Bacteriol.* 178:2161-2171.
25. Katzy, EI., AD. Iosipenko, DA. Egorenko, EA. Zhuravleva, VI. Panasenko & VV. Ignatov. 1990. Involvement of *Azospirillum brasiliense* plasmid DNA in the production of indole acetic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 1-4.
26. Kobayashi, M., T. Suzuki, T. Fujita, M. Masuda & S. Shimizu. 1995. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 714-718.
27. Koga, J. T. Adachi & H. Hidaka. 1991. Molecular cloning of the gene for indolepyruvate decarboxylase from *Enterobacters cloacae*. *Mol. Gen. Genet.* 226:10-16.
28. Lee, C.W. & M. J. Desmazaud. 1995. Utilization of aromatic amino acids as nitrogen sources in *Brevibacterium linens*: an inducible aromatic amino transferase. *Arch. Microbiol.* 140:331-337.
29. Martínez-Morales, LJ., L. Soto-Urzúa, BE. Baca & JA. Sánchez-Ahédo. 2003. Indole-3-butryric acid (IBA) production in culture medium by wild-type *Azospirillum brasiliense*. *FEMS Microbiol.Lett.* 228:170-173.
30. Mehnaz, SB., G. Weselowski & G. Lazarovits. 2007. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from rhizosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:620-624.
31. Morris, RO. 1986. Genes specifying auxin and citokinin biosynthesis in pathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 509-538.
32. Okon Y., R. Itzigsohn, S. Burdman & M. Hampel. 1995. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*/plant association, In Tikhonovich, IA., NA. Provorov, VI. Romanov and WE. Newton (Eds.); Nitrogen fixation: fundamentals and applications pp.635-640. The Netherlands Kluwer Academic Publishers.
33. Okon, Y. & Y. Kalpunik. 1986. Development and function of *Azospirillum* -inoculated roots. *Plant Soil.* 90:3-16.
34. Omay, SH., WA. Schmidt, P. Martin & F. Bangerth. 1993. Indoleacetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasiliense* Cd under *in vitro* conditions. *Can. J. Microbiol.* 39: 187-192.
35. Ona, O., JV. Impe, E. Prinsen & J. Vanderleyden. 2005. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasiliense* Sp245 is environmental controlled. *FEMS Microbiol. Lett.* 246:125-132.
36. Peng, GH., G. Wang, W. Zhang, Y. Hou, E. Liu, T. Wang & Z. Tan. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotroph isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1263-1271.
37. Prinsen, E., A. Costacurta, K. Michiels, J. Vanderleyden & H. Van Onckelen. 1993. *Azospirillum brasiliense* indole-3-acetic acid biosynthesis, evidence for a non tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 609-615.
38. Pedrasa, RO., A. Ramírez Mata, ML. Xiqui. & BE. Baca. 2004. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associate nitrogen-fixing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 233:15-21.
39. Rodríguez, H., A. Mendoza, MA. Cruz, G. Holguin, BG. Glick & Y. Bashan. 2006. Pleiotropic physiological effects in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasiliense* following chromosomal labeling in the clpX gene. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57:217-225.

40. Rothballer, M., M. Schmid, A. Fekete & A. Hartmann. 2005 Comparative *in situ* analysis of ipdC-gfpmut3 promoter fusions of *Azospirillum brasiliense* strains Sp7 and Sp245. Environ. Microbiol. 7:1839-1846.
41. Ruckdäschel, E., B. Lewis-Kittell, DR. Helinski & W. Klingmüller. 1988. Aromatic amino acid aminotransferase of *Azospirillum lipoferum* and their possible involvement in IAA biosynthesis. In *Azospirillum IV, Genetics, Physiology, Ecology*. W. Klingmüller (Ed.), pp 49-53. Springer-Verlag. The Netherlands.
42. Ruckdäschel, E. & W. Klingmüller. 1992. Analysis of IAA biosynthesis in *Azospirillum lipoferum* and Tn5 induced mutants. Symbiosis 13:123-132.
43. Schröder, G., S. Waffenschmid, EW. Weiler & J. Schröder. 1984. The T-region of Ti plasmids codes for an enzyme synthesizing indole-3-acetic acid. Eur. J. Biochem. 138:387-391.
44. Sommers, E. D. Ptacek, P. Gysegom, M. Srinivasan & J. Vanderleyden. 2005. *Azospirillum brasiliense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indol-3-acetic acid biosynthesis. Appl. Environ. Microbiol. 71:1803-1810.
45. Soto-Urzúa, L., YG. Xochihua-Corona, M. Flores-Escarnación & BE. Baca. 1996. Purification and properties of aromatic amino acid aminotransferase from *Azospirillum brasiliense* UAP 14 strain. Can. J. Microbiol. 42: 294-298.
46. De Troch, PF., S. Dosselaere, V. Keijers, P. de Wilde & J. Vanderleyden. 1997. Isolation and characterization of the *Azospirillum brasiliense* trpE(G) gene, encoding anthranilate synthase. Curr. Microbiol. 34:27-32.
47. Thomashow, LS., S. Reeves & MF. Thomashow. 1984. Crown gall oncogenesis, evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 5071-5075.
48. Tien, TM., MH. Gaskins & DH. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). Appl. Environ. Microbiol. 37: 1016-1024.
49. Vande-Broek, A., P. Gysegom, O. Ona, N. Hendrickx, E. Prinsen, J. Van Impe & J. Vanderleyden. 2005. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasiliense* indol-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. MPMI. 14:311-323.
50. Vande-Broek, A., M. Lambrecht, K. Eggemont & J. Vanderleyden. 1999. Auxin upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene. J. Bacteriol. 181:1338-1342.
51. Van Onckelen, et al. 1986. *Agrobacterium* T-DNA gene1 codes for a tryptophan 2-monoxygenase activity in tobacco crown gall cells. FEBS Lett. 198: 357-360.
52. Versées, W., S. Spaenpen, J. Vanderleyden & J. Steyaert. 2007. The crystal structure of phenyl pyruvate decarboxylase from *Azospirillum brasiliense* at 1.5 Å resolution implications for its catalytic and regulatory mechanism. FEBS J. 274:2363-2375.
53. Woodward, A. & B. Bartel. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals Botany. 95:707-735.
54. Xie, B., K. Xu, HX. Zhao & SF. Chen. 2005. Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasiliense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. FEMS Microbiol. Let. 248:57-63.
55. Xie, CH. & A. Yakota. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1435-1438.
56. Yagi, K., T. Chujo, H. Nojiri, T. Omori, M. Nishiyama & H. Yamane. 2001. Evidence for the presence of DNA-binding proteins involved in regulation of the gene expression of indole-3-pyruvic acid decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis in *Azospirillum lipoferum*. Biosc. Biotechnol. Biochem. 65: 1265-1269.
57. Yamada, T., CJ. Palm, B. Brooks & T. Kosuge. 1985. Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 6522-6526.
58. Zakharova, EA., AD. Iosipenko & VV. Ignatov. 2000. Effect of water soluble vitamins on the production of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*. Microbial Res. 155:572-576.
59. Zimmer, W., C. Aparicio & C. Elmerich. 1991. Relationship between tryptophan biosynthesis and indole-3-acetic acid production in *Azospirillum*, identification and sequencing of a trpGDC cluster. Mol. Gen. Genet. 229: 41-51.
60. Zimmer, W., M. Wesche & L. Timmermans. 1998. Identification and isolation of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene from *Azospirillum brasiliense* Sp7, sequencing and functional analysis of the gene locus. Curr. Microbiol. 36, 327-33.

Correspondencia:

Beatriz Eugenia Baca

Centro de investigaciones Microbiológicas,

Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad

Autónoma de Puebla. Edif. 76 3^{er} piso,

Cd. Universitaria, Av. San Claudio y 14 Sur S/N,

Col. San Manuel Puebla, Pue. México.

Teléfono y Fax 222(2444518).

ebaca@siu.buap.mx