

ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA A ESTRESSE POR  
SACAROSE EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 E  
IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GENE ESSENCIAL À TOLERÂNCIA  
A ESTRESSES ABIÓTICOS E À INTERAÇÃO COM PLANTAS

**LEANDRO FERNANDES ANDRADE**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2017

ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA A ESTRESSE POR  
SACAROSE EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 E  
IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GENE ESSENCIAL À TOLERÂNCIA  
A ESTRESSES ABIÓTICOS E À INTERAÇÃO COM PLANTAS

**LEANDRO FERNANDES ANDRADE**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento de  
Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO - 2017

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF

036/2017

A553 Andrade, Leandro Fernandes.

Análise proteômica da resposta a estresse por sacarose em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 e identificação de um novo gene essencial à tolerância a estresses abióticos e à interação com plantas / Leandro Fernandes Andrade. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

113 f. : il

Bibliografia: f. 83 - 99

Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Gonçalo Apolinario de Souza Filho.

1. Bactéria Endofítica 2. Interação Bactéria-Planta 3. Estresse Osmótico. 4. Mutagênese. 5. Proteômica Comparativa. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 660.65

ANÁLISE PROTEÔMICA DA RESPOSTA A ESTRESSE POR  
SACAROSE EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 E  
IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO GENE ESSENCIAL À TOLERÂNCIA  
A ESTRESSES ABIÓTICOS E À INTERAÇÃO COM PLANTAS

**LEANDRO FERNANDES ANDRADE**


“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas.”

Aprovada em 31 de março de 2017.

Comissão Examinadora:



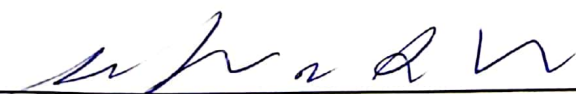
Prof. Marcelo Menossi Teixeira (D.Sc., Genética) – UNICAMP



Prof. Thiago Motta Venâncio (D.Sc., Bioinformática) – UENF



Prof. Vanildo Silveira (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF  
(Orientador)

A Deus e à minha mãe Aurelinda, a quem devo toda a minha vida, pelo seu amor incondicional

Dedico

## **AGRADECIMENTO**

Em quatro anos de caminhada, as pessoas, instituições e departamentos aos quais tenho a necessidade pessoal e profissional de agradecer é imensa e certamente esquecerei nomes. Mas nem por isso deixam de ser importantes em minha vida e minha formação e, menos ainda, deixo de agradecer por todo o apoio. Meus sinceros agradecimentos:

A Deus, fonte de toda o amor e sabedoria, no qual depus minha fé e me deu forças sem as quais eu não teria alcançado esse momento.

À UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, ao coordenador prof. Messias Gonzaga e ao secretário José Daniel, extensivo aos demais membros docentes e técnicos, pela infraestrutura, recursos humanos e pelos conhecimentos compartilhados que culminaram na concretização dessa tese e no meu aperfeiçoamento acadêmico/profissional.

À UENF e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPERJ, CAPES, CNPq, FINEP e INCT pelo suporte financeiro para a execução das pesquisas.

Ao meu orientador Prof. Gonçalo Apolinário pela paciência, compreensão, ensinamentos e compromisso com a minha formação profissional. Obrigado pela orientação durante esses quatro anos de doutorado.

Aos membros da banca de defesa Dr. Marcelo Menossi, Dr. Thiago Venâncio e Dr. Vanildo Silveira, pelas avaliações e contribuições prestadas à melhoria do documento.

Aos professores Dr. Vanildo Silveira, Dr. Fábio Olivares, Dr. Marília Amorim, pelo trabalho sempre colaborativo no decorrer das análises, compartilhando o conhecimento e auxiliando na obtenção dos dados. Agradeço, ainda, aos colaboradores Lucas Passamani, Ricardo Reis, Bruna Pintor e Scheila de Paula.

Aos meus pais, em especial à minha mãe Aurelinda, com quem tenho uma dívida impagável por todo o amor, carinho, paciência, conselhos e por se fazer presente em todos os dias de minha vida com seu amor e suas orações.

Aos meus irmãos Vitor, Lécia e Núbia por serem meus grandes amigos, pelo carinho, amor e suporte. Obrigado por compartilharem os momentos de glória e dificuldades, o que foi fundamental para que eu respirasse fundo e continuasse a caminhada. Aos meus sobrinhos Gabriel, Sara, Rodrigo e Eduardo, pessoas importantes na renovação de energias e de esperança, mostrando-me sempre que há um propósito maior em tudo aquilo que fazemos.

Ao Thiago Pinheiro, meu companheiro, que se tornou meu aprendiz e meu suporte nos momentos mais críticos. Em nenhum momento mediu esforços para auxiliar-me, acompanhar-me e dar-me forças. Não há nada que eu faça que pague tudo que você fez e faz por mim.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia que me acolheram e me fizeram sentir parte de um todo. Aos amigos e membros do grupo de pesquisa Patrícia, Ana Lidia, Juliana, Kate, Ana Márcia, Suzane e Stephany pela amizade, auxílio nas pesquisas e no convívio do dia a dia. Em especial ao Luciano, Mariana e Tamires cuja amizade, companheirismo e ajuda foram essenciais no decorrer dos ensaios e no encurtar dos prazos.

À Roberta, pela amizade, conselhos, ajuda e por clarear-me os caminhos a seguir. Pelas muitas conversas proveitosas e produtivas que pudemos ter.

Aos amigos que a UENF me trouxe, em especial Milene, Hellen, Pollyanna (já de longa data), Nathália, Dalvânia, Sâmmela e tantas outras pessoas especiais que me receberam e me auxiliaram sempre que necessário.

Minha eterna gratidão à Ingrid Gaspar, pela amizade, carinho e por estar comigo em todos os momentos. Da UENF para vida.

Enfim, a todos aqueles que, de algum modo, me ajudaram durante os longos quatro anos de caminhada (que me perdoem aqueles que não citei), meu muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
2.1 Objetivo Geral.....	4
2.2 Objetivos Específicos.....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	6
3.1 Estresse osmótico em plantas.....	6
3.2 Estresse osmótico em bactérias.....	8
3.3 Percepção do estresse osmótico e vias de resposta ao estresse osmótico... 10	
3.4 Sacarose como agente estressor osmótico.....	11
3.5 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> : uma bactéria endofítica com alto potencial biotecnológico.....	13
3.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo para o estudo da promoção do crescimento vegetal.....	15
3.7 Proteômica como ferramenta para estudos de análise de genômica funcional.....	16
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 Micro-organismos e condição de cultivo.....	19
4.2 Efeito do estresse osmótico no crescimento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5 causado por sacarose.....	20



4.2.1 Avaliação do efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	20
4.2.2 Efeito do estresse osmótico causado por sacarose na morfologia celular de <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	21
4.2.3 Análise proteômica.....	22
4.2.3.1 Extração e quantificação de proteínas totais.....	22
4.2.3.2 Digestão trípica de proteínas totais.....	23
4.2.3.3 Análises LC-MS/MS.....	24
4.2.3.4 Bioinformática.....	24
4.2.4 Proteínas hipotéticas diferencialmente acumuladas.....	26
4.3 Seleção de mutantes insercionais de proteínas hipotéticas de <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 sensíveis a estresse osmótico.....	26
4.3.1 Organização genômica e análises <i>in silico</i> do mutante GDP09A11 em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	26
4.3.2 Perfil de multiplicação do mutante $\Delta GdSucre01$ e estirpe selvagem.....	27
4.3.3 Análise da tolerância do mutante a estresses abióticos.....	27
4.3.4 Avaliação do papel do gene <i>gdSucre01</i> nas características de promoção de crescimento.....	28
4.3.4.1 Ensaio de redução do acetileno.....	29
4.3.4.2 Ensaio de solubilização de fósforo e zinco.....	29
4.3.5 Avaliação do papel do gene <i>gdSucre01</i> na promoção de crescimento de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
4.3.5.1 Material vegetal e condições de cultivo.....	30
4.3.5.2 Inoculação de plantas de <i>A. thaliana</i> com estirpe selvagem e mutante $\Delta GdSucre01$ .....	30
4.3.5.3 Análise da promoção do crescimento vegetal.....	31
4.3.5.4 Quantificação da população microbiana nos tecidos vegetais.....	32
<b>5 RESULTADOS</b> .....	34
5.1 Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5.....	34
5.2 Análise proteômica comparativa da resposta de tolerância à sacarose em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	36
5.2.1 Classificação funcional das DAPs.....	39

5.2.2 Análise das principais proteínas e vias reguladas em resposta à sacarose.....	42
5.2.2.1 Principais DAPs em resposta à sacarose localizadas em membrana plasmática.....	43
5.2.2.2 Principais DAPS em resposta à sacarose localizadas em citoplasma....	43
5.2.3 Proteínas hipotéticas diferencialmente acumuladas.....	57
5.3 Seleção de mutantes insercionais para proteínas hipotéticas na tolerância a estresse causado por sacarose em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	57
5.3.1 Organização genômica do gene <i>GDI_1289</i> em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5...	58
5.3.2 Similaridade da proteína hipotética codificada por <i>GDI_1289</i> de <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5 com proteínas de outras espécies.....	59
5.3.3 Efeito da mutação $\Delta GdSucre01$ na multiplicação celular em meio líquido.....	61
5.3.4 Importância da proteína codificada por <i>GdSucre01</i> na tolerância a estresses abióticos em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	62
5.3.5 A proteína <i>GdSucre01</i> não participa do processo de solubilização de nutrientes em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	64
5.3.6 A proteína <i>GdSucre01</i> é essencial para o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	67
5.3.7 A proteína <i>GdSucre01</i> é essencial para a promoção de crescimento vegetal em <i>A. thaliana</i> por <i>G. diazotrophicus</i> PAI 5.....	68
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>80</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>100</b>

## RESUMO

LEANDRO FERNANDES ANDRADE; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Março, 2017. Análise proteômica da resposta a estresse por sacarose em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e identificação de um novo gene essencial à tolerância a estresses abióticos e à interação com plantas. Orientador: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: D.Sc. Rosana Rodrigues e D.Sc. Vanildo Silveira.

Os estresses ambientais são caracterizados como fatores limitantes para a produção agrícola mundial. Esse cenário tem exigido o emprego de tecnologias atenuantes à perda de produtividade, entre elas o melhoramento genético. Entre as fontes de genes para tolerância aos estresses ambientais, as bactérias se destacam pela diversidade de mecanismos adaptativos para se estabelecer nos diferentes ambientes e pela sua aplicabilidade através de engenharia genética. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 é uma bactéria isolada de cana-de-açúcar, conhecida pela capacidade em promover o crescimento vegetal (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*). Essa bactéria se destaca pela sua alta tolerância a elevadas concentrações de açúcares, com a capacidade de crescer na presença de 30% de sacarose, além de tolerar diferentes estresses ambientais. Tais características sugerem a existência de relevantes mecanismos moleculares de tolerância a estresses abióticos, os quais são de grande potencial biotecnológico. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou identificar mecanismos de tolerância por sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5 e caracterizar novos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos e na promoção do crescimento vegetal em plantas

de *Arabidopsis thaliana*. Para isso, a bactéria foi cultivada em meio sob condição controle e em meio suplementado em meio contendo 600 mM de sacarose. O estresse causado pela alta concentração de sacarose no meio foi responsável por reduzir em 30% a taxa de multiplicação celular. Tal estresse não foi suficiente para promover alterações morfológicas nas células. Análises proteômicas nas condições de estudo permitiram identificar 869 proteínas: 274 proteínas diferencialmente acumuladas (*Differentially Accumulated Protein* – DAPs), sendo 77 DAPs aumentadas, entre elas proteínas de metabolismo de carbono e transportadores de osmoprotetores; e 197 DAPs reduzidas, o que engloba as proteínas porinas e transportadores de açúcares. Adicionalmente, as análises proteômicas identificaram 53 DAPs descritas como hipotéticas em *G. diazotrophicus* PAI 5, que passam a ser consideradas novas proteínas envolvidas na resposta a estresse por sacarose. A necessidade de caracterização molecular das proteínas hipotéticas identificadas no trabalho justificou a busca por seus mutantes insercionais na biblioteca de mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5. Apesar de não permitir a identificação de mutantes identificados através das análises proteômica, foi possível selecionar o mutante GDP09A11, responsável por codificar uma proteína predita hipotética em *G. diazotrophicus* PAI 5. Através de ensaios de sensibilidades posteriores, foi comprovada a alta sensibilidade do mutante ao estresse causado por sacarose. Tal característica permitiu a renomeação do gene para *GdSucre01*. Análises constataram a importância do gene *GdSucre01* na tolerância a estresse por cádmio, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PEG, sacarose, assim como na fixação biológica de nitrogênio e na interação e promoção do crescimento de *A. thaliana*. Os resultados obtidos por este trabalho revelaram novos genes envolvidos na tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse por sacarose. Adicionalmente, foi possível identificar a nova proteína GdSucre01, com papel importante para a tolerância a estresses abióticos e para a promoção do crescimento vegetal. Nosso estudo abre novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos de resistência a estresses em micro-organismos e no processo de interação e promoção do crescimento vegetal.

Palavras-chave: bactéria endofítica, interação bactéria-planta, estresse osmótico, *PGPB*, mutagênese, proteômica comparativa.

## ABSTRACT

LEANDRO FERNANDES ANDRADE; D.Sc; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, March, 2017. Proteomic analysis of the response to sucrose stress in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 and identification of a new gene essential to the abiotic stress tolerance and to the plant interaction. Advisor: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Counselors: D.Sc. Rosana Rodrigues e D.Sc. Vanildo Silveira.

Environmental stresses are characterized as limiting factors for global agricultural production. This scenario has required the use of technologies that aim to mitigate the productivity loss, among them, it highlights the plant breeding. Among the sources of genes for tolerance to environmental stresses, the bacteria are distinguished by the diversity of adaptive mechanisms to establish themselves in different environments and by your applicability using genetic engineer. *Gluconacetobacter diazotrophicus* is a bacteria isolated from sugarcane and it is considered plant growth promoting bacteria (PGPB). This bacteria is highlights to your ability to grow in the presence of 30% sucrose, besides to present characteristics of tolerance to different stressors. These characteristics suggest the existence of molecular mechanisms of tolerance to environmental stresses, which are great biotechnological potential. In this sense, the present work aimed to identify mechanisms of sucrose tolerance in *G. diazotrophicus* PAI 5, and to characterize new genes involved in the response to abiotic stresses and in the plant growth promotion of the *Arabidopsis thaliana*. For this, the bacteria was cultured in medium under control condition and in medium supplemented with sucrose 600 mM. The

stress caused for high sucrose reduced the cell growth by 30% but It did not induce morphological changes in the cells. The comparative proteomic analysis in the study conditions identified 869 proteins, in which 77 Differential Accumulated Proteins (DAP) increase were identified, among them carbon metabolism proteins and osmoprotective transporters; and 197 DAPs reduced, among them proteins porins and sugar transporters. The proteomic analyzes performed identified 53 proteins described as hypothetical in *G. diazotrophicus* PAI 5, which considered now as new proteins involved in the response to sucrose stress. To proceed to the molecular characterization of these proteins, it was search for insertional mutants on Mutant Libray of *G. diazotrophicus* PAI 5. Although it was not recognized mutants of the hypothetical proteins identified in this proteomics study, it was possible the selection of the mutant GDP09A11, that coding a hypothetical predicted protein in *G. diazotrophicus* PAI 5. Assays was performed with the mutant with subsequent confirmation of its high sensitivity to sucrose stress. This characteristic allowed renaming the gene to *GdSucre01*. Assays performed with the  $\Delta GdSucre01$  mutant showed the *GdSucre01* gene was identified as important to the stress tolerance by cadmium,  $Na_2SO_4$ , PEG, sucrose, as well as to the fixation biological process and the interaction and promotion growth of *A. thaliana* growth. The results obtained in this work revealed new genes involved in the tolerance of *G. diazotrophicus* to sucrose stress. In addition, it was possible to identify a new *GdSucre01* protein with an important role for a tolerance to abiotic stresses and to plant growth promotion. Our study opens new perspectives for the understanding of mechanisms of stress resistance in microorganisms and in the process of interaction and plant growth promotion.

Keywords: endophytic bacteria, bacteria-plant interaction, osmotic stress, PGPB, mutagenesis, comparative proteomics.

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais atividades econômicas exercidas pelo homem. Sua grande importância está principalmente por dar suporte à existência humana pela sua capacidade de prover alimentos e suprir as necessidades de fonte de energia a outras atividades econômicas. Contudo, as plantas têm natureza sésil e constantemente são submetidas a diversas intempéries no ambiente em que habitam. Essa gama de intempéries é usualmente conhecida por estresses ambientais, o que comumente desafia sua performance de desenvolvimento.

Os estresses ambientais são importantes fatores limitantes da produção agrícola, o que afeta tanto as culturas presentes quanto se tornam barreiras à introdução de novas culturas na região (Cherry *et al.*, 2000). Entre os estresses ambientais, os estresses abióticos chamam a atenção por serem os principais fatores limitantes da agricultura, com atenção ao déficit hídrico e à salinidade (de Farias *et al.*, 2009). Esses fatores ambientais são as principais causas do estresse osmótico, porém ambientes altamente ricos em solventes orgânicos, como açúcares, também são capazes de promover o estresse osmótico (Csonka e Hanson, 1991; Oliveira *et al.*, 2017; Shabala e Shabala, 2011).

O estresse osmótico é caracterizado por alterações na disponibilidade hídrica causados pela redução da quantidade de água ou de sua indisponibilidade, seja por compostos iônicos, como os sais, ou por compostos não iônicos, como os açúcares e outros compostos orgânicos (Altendorf *et al.*, 2009). Os danos provocados são vários, como alterações ou danos à membrana plasmática

(Ragoonanan *et al.*, 2008; Zwiewka *et al.*, 2015), variações nas concentrações de solutos internos das células (Altendorf *et al.*, 2009), acarretando outros danos como produção de espécies reativas de oxigênio (Smirnova *et al.*, 2000), distúrbios na capacidade redox celular, desnaturação de proteínas e outras moléculas (Munns e Tester, 2008; Wani *et al.*, 2013), além de inibir a atividade fotossintética (Delfine *et al.*, 1999; Mansour *et al.*, 2003).

Os mecanismos de tolerância a nível celular desenvolvidos pelas plantas em resposta ao estresse osmótico envolvem principalmente o ajuste osmótico (Cushman e Bohnert, 2000), caracterizado pelo acúmulo de solutos compatíveis no meio intracelular (Singh *et al.*, 2015). O influxo de íons também é uma alteração adaptativa extremamente importante, sendo feito pelos canais de íons com o intuito de regular a pressão osmótica celular (Osakabe *et al.*, 2013).

O estresse osmótico acomete outros organismos, caso das bactérias. Sua organização celular e os ambientes em que se encontram são, em geral, altamente desafiadores exigindo o desenvolvimento de diferentes mecanismos que reduzem ou evitem os danos do estresse ao organismo.

Neste cenário, tem destaque a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma bactéria promotora do crescimento vegetal, com capacidade de crescer na presença de 30% de sacarose (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Esta particularidade faz com que esta bactéria esteja entre as mais tolerantes a altas concentrações de açúcares já descritas (Stevenson *et al.*, 2015).

O sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* (Bertalan *et al.*, 2009) permitiu a descoberta de diferentes mecanismos de resposta através de análises *in silico*, possibilitando estudos de genômica funcional (Intorne *et al.*, 2009; Intorne *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2016). Após a anotação do genoma, foi possível identificar mais de 1.000 sequências que codificam proteínas hipotéticas. Essas sequências carecem de caracterização e validação, abrindo novas perspectivas de pesquisa em genômica funcional e a prospecção de novos genes relacionados à tolerância a estresses ambientais em *G. diazotrophicus*, sendo também importantes para o processo de interação bactéria-planta.

O mecanismo de influxo de potássio já foi descrito para essa espécie (Oliveira *et al.*, 2017), bem como já foram elucidados diferentes outros mecanismos moleculares envolvidos na solubilização de nutrientes insolúveis (Intorne *et al.*, 2009), produção de fitormônios (Bastián *et al.*, 1998) e de compostos



antimicrobianos (Blanco *et al.*, 2005), na tolerância a estresse por metais como cádmio, cobalto e zinco (Intorne *et al.*, 2012). Pelo fato de açúcares como a sacarose serem solutos osmoticamente ativos, a tolerância de *G. diazotrophicus* a altas concentrações destes solutos no meio extracelular sugere que esta bactéria tenha outros mecanismos moleculares responsivos a estresse osmótico ainda não elucidados e de grande interesse biotecnológico.

Adicionalmente, a análise proteômica “label-free” destaca-se como uma ferramenta que permite ampliação dos conhecimentos acerca das interações proteicas, podendo contribuir para a elucidação de mecanismos relacionadas a respostas a estresses abióticos e a associações planta-bactéria ainda desconhecidos em *G. diazotrophicus* PAI 5.

Neste sentido, o presente trabalho objetivou a identificação e caracterização de novos mecanismos de tolerância a estresse causado por sacarose, por meio de análise proteômica. Adicionalmente, foi selecionado um mutante insercional que codifica proteína hipotética relacionado à tolerância a altas concentrações de açúcares. O gene foi então denominado *gdsucre01* e o seu mutante foi utilizado para avaliar seu papel quanto a estresses abióticos. Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para estudos de contexto genômico do gene e análises de sua similaridade com sequências de proteínas de outras espécies.

O papel do gene *gdsucre01* no processo de promoção do crescimento vegetal também foi analisado. A importância do gene nas características de crescimento foi avaliada por ensaios de solubilização de zinco e fósforo bem como pela fixação biológica de nitrogênio. Graças à capacidade de *G. diazotrophicus* colonizar plantas de *Arabidopsis thaliana* (Rangel de Souza *et al.*, 2016), foi possível o estudo do efeito da mutação na colonização e promoção do crescimento vegetal.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho abrem perspectivas para o entendimento de mecanismos de resposta a estresses ambientais em *G. diazotrophicus* PAI 5 bem como para a elucidação dos mecanismos que influenciam na capacidade dessa bactéria de promover o crescimento vegetal. Tal estudo pode ainda servir de insumo para o desenvolvimento de pacotes biotecnológicos através de engenharia genética e transgenia.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Identificar mecanismos de tolerância ao estresse causado por sacarose em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e caracterizar novos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos e na promoção de crescimento vegetal em plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento da bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5;
- Identificar as proteínas envolvidas na resposta de *G. diazotrophicus* PAI 5 a estresse por sacarose por abordagem de análise proteômica comparativa;
- Identificar e caracterizar as proteínas hipotéticas envolvidas na resposta a estresse por sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5;
- Caracterizar a proteína GdSucre01 de *G. diazotrophicus* PAI 5 selecionada quanto à tolerância a estresses abióticos causados pelos metais pesados cádmio, cobalto e zinco, paraquat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PEG 400 e sacarose;
- Avaliar a importância do gene *GdSucre01* na capacidade de fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fósforo e zinco em *G. diazotrophicus* PAI 5;

- Avaliar o papel do gene *Gdsucre01* na interação de *G. diazotrophicus* PAI 5 e *Arabidopsis thaliana* e na sua capacidade de promover crescimento vegetal.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Estresse osmótico em plantas

As plantas estão comumente expostas a condições desafiadoras ao seu crescimento e desenvolvimento nos mais variados ambientes em que se encontram. A quantidade e a variedade de estresses ambientais com os quais esses organismos se deparam são fatores limitantes à sua produção e sobrevivência. Estresses ambientais são importantes na agricultura por serem fatores limitantes para a produção e rendimento agrícola, por reduzirem o desempenho vegetal (Mittler, 2006). Entre esses fatores, destacam-se o déficit hídrico e a salinidade como os principais fatores abióticos que restringem o crescimento de plantas no mundo. Apesar de esses fatores estarem interligados, isoladamente são limitantes ao desenvolvimento e produção agrícola. A primeira fase tanto para o estresse por déficit hídrico quanto por salinidade é o estresse osmótico (Shavrukov, 2013).

Fisiologicamente, as plantas percebem a salinização na forma de estresse osmótico, uma vez que ocasiona a concentração de solutos. A concentração de sais altera as relações hídricas (Bray *et al.*, 2000) e o metabolismo vegetal (Maathuis e Amtmann, 1999).

O estresse osmótico é comumente descrito como mudanças no volume celular, ocasionadas por diferenças nas concentrações de solutos osmoticamente ativos entre os dois lados da membrana citoplasmática (Csonka e Hanson, 1991).

Este tipo de estresse está entre os principais fatores limitantes do desenvolvimento vegetal e microbiano (Moradi *et al.*, 2011; Tripathi *et al.*, 1998).

O aumento da concentração de solutos no meio extracelular tem como consequência a diminuição da disponibilidade de água livre no ambiente (Csonka e Hanson, 1991). Em primeira instância, se não houver mecanismos adaptativos eficientes responsivos a esta situação, a tendência é que ocorra efluxo de água das células. A perda de água leva à uma perda de turgor celular e a um desbalanço nas atividades metabólicas, podendo, em situações extremas, levar à inviabilização celular (Moradi *et al.*, 2011).

A baixa disponibilidade hídrica, o uso de água com altos níveis de salinidade e até mesmo a elevação do lençol freático pela drenagem insuficiente ou inexistente na área são fatores que ocorrem em grande parte das áreas de produção, principalmente nas regiões costeiras (Alexandros e Bruinsma, 2012). A restrição hídrica por longos períodos ocasiona, eventualmente, a salinização dos solos pela concentração de sais.

Os mecanismos de resposta a estresse osmótico ativados nas plantas variam amplamente, a depender do genótipo da planta. A existência e a eficiência de tais mecanismos ditam a tolerância ou suscetibilidade das plantas ao estresse

Durante o estresse, a anatomia do tecido da raiz muda. Grande parte dessa alteração ocorre porque o estresse propicia o desenvolvimento de barreiras apoplásticas de água e fluxo de íons. Além disso, pode reduzir a condutividade hidráulica da membrana de células da raiz pelo fechamento dos canais de água ou aquaporinas que ocorre nessas membranas (Stasovski e Peterson, 1991; Taleisnik *et al.*, 1999). A intensidade do componente celular pode ser reversivelmente regulada pela abertura ou fechamento de canais de água existentes, com o aumento de proteínas aquaporinas nas membranas celulares. No déficit hídrico, o crescimento radicular fica prejudicado pela suberificação do apoplasto e pelo desequilíbrio hídrico causado pelos canais de água, o que afeta a capacidade de absorção das raízes (Frensch *et al.*, 1996).

Entre os mecanismos de tolerância desenvolvidos pelas plantas e outros organismos em resposta ao estresse osmótico, destaca-se o ajuste osmótico, caracterizado pelo acúmulo ativo de solutos osmoticamente ativos no meio intracelular (Held e Sadowski, 2016). Concentrações de solutos orgânicos nos tecidos vegetais foram observados quando expostos à seca ou estresse hídrico

induzido por salinização. Estes compostos são responsáveis pelo ajustamento osmótico e pela proteção de estruturas celulares (Bray *et al.*, 2000). A prolina e a glicina-betaína são exemplos destes compostos, que estão associados à osmoproteção dos tecidos vegetais (Ashraf e Ahmad, 2000).

O prejuízo agrícola destes estresses ambientais alavanca a busca por plantas resistentes ou tolerantes a tais condições. A transformação de plantas com genes de outras espécies que sejam resistentes a tais condições ambientais é uma alternativa promissora. Várias espécies de organismos apresentam mecanismos adaptativos às condições ambientais mais adversas. Entre estes organismos, os microrganismos se destacam pela diversidade de ambientes e condições em que se desenvolvem.

### **3.2. Estresse osmótico em bactérias**

As bactérias estão entre os organismos mais versáteis, podendo colonizar diversas regiões com climas diferentes. Parte desse sucesso é atribuída à sua capacidade de regulação osmótica. Comumente, esses organismos têm a necessidade de manter a pressão osmótica intracelular superior à do seu habitat, para que, assim, seu turgor celular seja mantido (Csonka, 1989; Sheehan *et al.*, 2006).

Em geral, as bactérias têm dois mecanismos de adaptação a mudanças no meio em que vivem. Estes mecanismos são ativados de forma diferente e em tempos diferentes, sendo, primeiramente, uma fase transitória (resposta de choque), em que estão incluídas as respostas rápidas de início do processo de adaptação, e uma fase crônica (resposta ao estresse), caracterizada pelas respostas constantes da bactéria para manter uma taxa de crescimento constante (Gunasekera *et al.*, 2008).

Grandes alterações no gradiente osmótico do ambiente podem levar a um aumento do volume celular acima do tolerável, quando em situação hipertônica, o que pode ocasionar a lise da célula. Porém, quando em ambientes hipotônicos, essa variação pode levar à plasmólise celular (Sheehan *et al.*, 2006). Estresses ambientais como seca, salinidade, variação de temperatura e metais pesados alteram o balanço osmótico das células, alterando o grau de turgescência celular. Além de causar desorganização nas membranas, essas condições podem causar

desnaturação ou perda de atividades de proteínas, acúmulo de EROs (espécies reativas de oxigênio) e, conseqüentemente, danos oxidativos às células (Munns e Tester, 2008).

A total integridade da membrana plasmática é a chave para um bom funcionamento das bombas de H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, além da concentração de alguns metabólitos, que são essenciais para a sobrevivência da bactéria (Krämer, 2010). A membrana citoplasmática tem uma relativa permeabilidade à água, sendo a principal consequência imediata ao estresse osmótico o fluxo de água através da membrana. Esse fluxo é acionado de forma primária para combater mudanças abruptas que podem ocorrer no ambiente (Evans e Wallenstein, 2012; Krämer, 2010).

Quanto ao acúmulo de EROs, ele é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e a remoção desses radicais (Noctor *et al.*, 2014). Diversos estresses ambientais provocam alta produção de EROs, com conseqüentes danos oxidativos, que podem, inclusive, levar à morte celular (Milisav *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012).

Diante do exposto, o desenvolvimento de mecanismos eficientes relacionados à detecção e resposta a desbalanços osmóticos é essencial para manutenção da viabilidade celular. Estes mecanismos estão entre os principais fatores determinantes da capacidade de colonização de diferentes espécies bacterianas nos mais diversos ambientes.

A condição osmótica é um dos principais parâmetros físicos reguladores da diversidade de organismos de um determinado habitat (Csonka, 1989). Pelo fato de as bactérias habitarem os mais diversos ambientes, elas estão expostas a constantes alterações na osmolaridade extracelular.

Apesar de permeável à água, a membrana plasmática funciona como uma efetiva barreira contra grande parte dos metabólitos citoplasmáticos e solutos do meio extracelular. Em situações hiperosmóticas, quando há diminuição na atividade da água no meio extracelular, a tendência é que ocorra um rápido efluxo de água e, conseqüentemente, uma perda do turgor celular. Já em situações hiposmóticas, a tendência é que ocorra um influxo de grandes volumes de água, aumentando a pressão de turgor, podendo levar à lise celular (Poolman e Glaasker, 1998).

A eficiência no controle do balanço osmótico e no reparo dos danos oriundos do estresse osmótico é essencial à vida celular. Diversas respostas

estruturais e moleculares estão associadas à tolerância ao estresse osmótico. Estas respostas podem estar associadas à detecção do estresse, proteção da célula e reparo dos danos ocasionados pelo estresse e proteção (Poolman e Glaasker, 1998).

### **3.3. Percepção do estresse osmótico e vias de resposta ao estresse osmótico**

O estresse osmótico é percebido pelas células bacterianas e, em seguida, são observadas diversas alterações nas atividades enzimáticas e de proteínas transportadoras. Estas mudanças ocorrem para uma rápida restauração do balanço osmótico. Diferentemente do que acontece para a maioria das respostas biológicas, a osmorregulação é ativada a partir por modificações de parâmetros fisiológicos, não por sinais específicos provenientes do ambiente (Sleator e Hill, 2002).

Neste sentido, a detecção do estresse osmótico por proteínas de membrana em bactérias pode ocorrer pela deformação mecânica da membrana, mudança no turgor celular, mudança no estado de hidratação das proteínas, mudanças na concentração ou força iônica, entre outras (Poolman *et al.*, 2002).

O principal mecanismo utilizado pelas bactérias em resposta ao estresse osmótico é a absorção ou biossíntese de solutos compatíveis, também denominados osmoprotetores, tais como prolina, rafinose, sorbitol, manitol, trealose, glicina betaína, entre outros (Wood *et al.*, 1999). Estes compostos são responsáveis pela atenuação dos efeitos deletérios provenientes da alta osmolaridade e da desidratação. Os osmoprotetores têm ação, principalmente, na estabilização de proteínas e estruturas celulares e na manutenção da turgescência das células (Galinski, 1995).

Os osmoprotetores podem ser classificados em quatro principais classes: os açúcares, os aminoácidos, as aminas quaternárias e os polióis (Galinski, 1995). Entre os solutos compatíveis, os mais comumente encontrados em células bacterianas expostas a situações de estresse osmótico são a sacarose, a prolina, o manitol, a glutamina e a trealose (Rontein *et al.*, 2002). Há uma variação entre as espécies bacterianas quanto à capacidade de síntese e acúmulo destes solutos.

Além disso, um outro mecanismo de ajuste osmótico utilizado por bactérias é baseado na ação de moléculas sinalizadoras. O potássio é o principal íon encontrado no ambiente citoplasmático de células procarióticas e eucarióticas. Ele



funciona como uma molécula sinalizadora envolvida no controle de sistemas de transporte e enzimas associados à adaptação da célula a desbalanços osmóticos (Epstein, 2003).

Na bactéria *Escherichia coli*, já foram descritos três sistemas de transportadores de potássio - TrK, Kup e Kdp-ATPase - sendo o Kdp-ATPase definido como de alta afinidade, responsável pela internalização deste íon na presença de estresse osmótico, mesmo em baixa disponibilidade de K<sup>+</sup> (Ballal *et al.*, 2007). Interessantemente, embora a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* tenha todos os genes preditos para a formação do sistema Kdp (Bertalan *et al.*, 2009), trabalhos do nosso grupo indicam que o Kup é o transportador de K<sup>+</sup> de alta afinidade durante o estresse causado por sacarose, quando baixas concentrações de K<sup>+</sup> estão disponíveis (Oliveira *et al.*, 2017).

Adicionalmente, sabe-se que mecanismos de resposta estruturais também estão envolvidos na resposta bacteriana ao estresse osmótico. Entre estes mecanismos, destacam-se, principalmente, o controle da permeabilidade da membrana plasmática e alterações na atividade de canais de água. A depender da osmolaridade do meio, estes mecanismos se adaptam para manter o aporte hídrico ideal para o funcionamento celular (Poolman e Glaasker, 1998).

Tomados em conjunto, os mecanismos envolvidos na tolerância ao estresse osmótico são essenciais para as células bacterianas. O desenvolvimento destes mecanismos é um dos principais fatores determinantes da diversidade de habitats conquistada pelas diferentes espécies bacterianas.

### **3.4. Sacarose como agente estressor osmótico**

Diversos habitats microbianos são caracterizados por conter altas concentrações de açúcar, o que impacta diretamente na ecologia da microbiota destes locais. Estes açúcares podem atuar como fonte de carbono ou agente estressor osmótico (Lievens *et al.*, 2015). Durante a formação de biomassa microbiana, uma alta metabolização de açúcar é requerida para o provimento de carbono para as células. Em média, o consumo de carbono e nitrogênio ocorre na proporção de 8:1 nas células microbianas (Roels, 1983).

Diversas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos já foram descritas em bactérias. Algumas delas têm função no meio intracelular, enquanto

outras estão presentes no meio extracelular. Por meio de transportadores de membrana, estas enzimas podem ser exportadas para o ambiente, onde viabilizam a quebra de carboidratos em unidades reduzidas, podendo, então, ser internalizadas pelas células bacterianas e metabolizadas (Kandler *et al.*, 1983).

Entre os açúcares disponíveis nos mais diversos habitats microbianos, a sacarose se destaca como o dissacarídeo de maior abundância (Reid, 2005), sendo composta por uma unidade de glicose unida a uma unidade de frutose por uma ligação glicosídica. Três principais classes de enzimas bacterianas já foram descritas como relacionadas à quebra de ligações glicosídicas: as enzimas catabólicas, hidrolases e fosforilases de sacarose, e glicosil-nucleotídeo glicosiltransferases (Reid e Abratt, 2005).

Os genes bacterianos presentes em operons relacionados ao metabolismo de sacarose são cuidadosamente regulados. Eles são expressos apenas na ausência de fontes de carbono, requerendo um menor gasto energético para as células. Isto se deve ao fato de a sacarose ser um dissacarídeo, requerendo um gasto energético para sua clivagem antes da sua utilização pelas células bacterianas (Lievens *et al.*, 2015; Reid e Abratt, 2005).

Além disso, alguns trabalhos mostram que a indução e/ou repressão do processo catabólico de açúcar são utilizadas pelas células bacterianas como forma de manter o consumo de açúcar em níveis apropriados. Isto permite que as células bacterianas mantenham ajustadas suas capacidades catabólicas e metabólicas relacionadas ao processamento de carbono (Brückner e Titgemeyer, 2002).

Apesar de os micro-organismos serem capazes de metabolizar açúcares, ambientes ricos em açúcar são desafiadores para seu desenvolvimento. Isto se deve ao fato de o açúcar, soluto osmoticamente ativo, quando em excesso, acarretar diminuição da atividade da água nestes ambientes (Lievens *et al.*, 2015). A baixa proporção de água livre é limitante para a sobrevivência microbiana, visto que a água é requerida, principalmente, para a viabilização das funções metabólicas e para a manutenção da pressão de turgor celular (Brown, 1990).

Entre as bactérias tolerantes a altas concentrações de açúcar já descritas, destaca-se a espécie bacteriana *G. diazotrophicus*. Isolada de plantas de cana-de-açúcar, esta bactéria é capaz de crescer na presença de até 30% de sacarose (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Além da cana-de-açúcar, outras culturas ricas em sacarose já foram descritas como sendo hospedeiras de *G. diazotrophicus*, tais

como abacaxi, batata doce (Muthukumarasamy *et al.*, 2002) e beterraba (Madhaiyan *et al.*, 2004).

Em razão de *G. diazotrophicus* comumente possuir habitats que contêm baixa atividade da água, sugere-se que esta bactéria tenha eficientes mecanismos envolvidos no ajuste osmótico, podendo ser uma promissora fonte de genes envolvidos na tolerância a altas concentrações de açúcar e a estresse osmótico.

### **3.5. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: uma bactéria endofítica com alto potencial biotecnológico**

A bactéria *G. diazotrophicus*, pertencente ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rhodospirillales, família Acetobacteriaceae, é Gram-negativa, do tipo endofítica, fixadora de nitrogênio, ácido-tolerante, apresenta tolerância a tratamento com calor e a elevadas concentrações de sacarose (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Oliveira *et al.*, 2016; Tejera *et al.*, 2003).

*G. diazotrophicus* é comumente encontrada no apoplasto de cana-de-açúcar, onde há uma elevada concentração de sacarose. Sendo incapaz de transportar sacarose, esta bactéria depende da ação da enzima levanasacarase no meio extracelular para quebrar as moléculas de sacarose em glicose e frutose, que serão, então, transportadas para o interior celular e metabolizadas (Velázquez-Hernández *et al.*, 2011).

Esta bactéria é capaz de colonizar diversas espécies de vegetais ricos em sacarose, tais como cana-de-açúcar, de onde foi isolada pela primeira vez, batata doce, abacaxi, café e beterraba (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Madhaiyan *et al.*, 2004; Muthukumarasamy *et al.*, 2002). Além disso, alguns trabalhos mostram que *G. diazotrophicus* é capaz de colonizar algumas espécies que não são suas hospedeiras naturais, como milho, tomate, feijão, *Arabidopsis* e o trigo (Luna *et al.*, 2010; Rangel de Souza *et al.*, 2016).

Adicionalmente, *G. diazotrophicus* é uma PGPB capaz de promover ganhos na biomassa de suas plantas hospedeiras pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de hormônios e sideróforos (Galisa *et al.*, 2012; Riggs *et al.*, 2001). Outras características dessa bactéria ainda podem ser destacadas como produção de hormônios promotores do crescimento vegetal, como o ácido indol acético (AIA) e giberelinas (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993), solubilização de

nutrientes como fósforo e zinco (Intorne *et al.*, 2009; Saravanan *et al.*, 2007), produção de sideróforo (Logeshwaran *et al.*, 2009), além da atuação no biocontrole de fitopatógenos pela produção de bacteriocina (Blanco *et al.*, 2005).

Apesar de seu alto potencial de aplicação biotecnológica, os mecanismos moleculares que envolvem a promoção de crescimento, a resistência a estresses bióticos e abióticos já descritos em *G. diazotrophicus* eram pouco conhecidos. Foi, então, criado o Instituto Virtual Riogene que, em 2001, deu início aos trabalhos de sequenciamento do genoma completo da bactéria *G. diazotrophicus* (Bertalan *et al.*, 2009).

*G. diazotrophicus* foi a primeira bactéria endófitica diazotrófica da classe Alphaproteobacteria a ter seu genoma sequenciado, com sua publicação em 2009. Com as anotações das sequências, foram observadas cerca de 4.000 sequências codificantes. Pelas análises *in silico*, algumas destas sequências foram associadas aos mais diversos mecanismos adaptativos, de tolerância a estresses bióticos e abióticos, bem como à promoção do crescimento vegetal (Bertalan *et al.*, 2009). As informações geradas pelo sequenciamento do genoma dessa bactéria, juntamente com estudos de mutagênese e genômica funcional, permitiram vislumbrar o entendimento de diversos processos desempenhados por essa espécie bacteriana.

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa com alguns mutantes insercionais de *G. diazotrophicus* permitiram selecionar cerca de 134 mutantes que são afetados por altas concentrações de cádmio, zinco e cobalto (dados não publicados). Neste trabalho, 13 mutantes de proteínas hipotéticas foram identificados, sugerindo o envolvimento de proteínas ainda não caracterizadas nas respostas de tolerância de *G. diazotrophicus*.

Proteínas hipotéticas são compreendidas por uma pequena fração de genes não caracterizados de ampla distribuição filética, sendo geralmente intituladas “proteínas conservadas hipotéticas” (Galperin e Koonin, 2004). Após o sequenciamento completo do genoma de *G. diazotrophicus*, foram anotadas mais de 1.000 sequências que codificam proteínas hipotéticas (Bertalan *et al.*, 2009).

A caracterização destas proteínas é um potencial viés para a genômica funcional, abrindo portas para a prospecção de novos genes relacionados aos estresses bióticos e abióticos. Além disso, devido ao fato de *G. diazotrophicus* ser uma PGPB, pode-se inferir que uma parcela destas proteínas hipotéticas esteja associada também ao sucesso desta bactéria na interação com suas plantas

hospedeiras. Destarte, o estudo destas proteínas é uma potencial fonte de insumos para o desenvolvimento de pacotes biotecnológicos.

### **3.6. *Arabidopsis thaliana* como planta modelo para o estudo da promoção do crescimento vegetal**

A importância das bactérias endofíticas como micro-organismos promotores do crescimento vegetal vem sendo objeto de estudo de diversos trabalhos nos últimos anos (Bashan *et al.*, 2014; Glick, 2014; Pedraza *et al.*, 2009; Santoyo *et al.*, 2016). Diferentes espécies vegetais foram utilizadas com o objetivo de elucidar os aspectos relacionados à interação entre plantas e PGPBs (Adediran *et al.*, 2015; Ipek *et al.*, 2014). Entretanto, estabelecer um modelo vegetal que permita obter tais dados de forma mais rápida, fácil e reproduzível é um desafio para a comunidade científica que se dedica a estes estudos.

Apesar de as bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal serem encontradas mais frequentemente em culturas de interesse econômico, como cana-de-açúcar, trigo, arroz e sorgo, a natureza híbrida e a poliploidia de muitas destas espécies não as tornam boas candidatas para estudos da interação planta-bactéria. Neste cenário, *Arabidopsis thaliana* se destaca como um sistema modelo ideal para a elucidação de aspectos fundamentais concernentes ao desenvolvimento vegetal (Meinke, 1998).

*A. thaliana* foi utilizada como organismo modelo pela primeira vez por Friedrich Laibach, em 1943, com o objetivo de atender a necessidade de ter como objeto de estudo uma planta que representasse amplamente as demais espécies vegetais. Desde então, a aplicação desta espécie como modelo vegetal vem sendo cada vez mais aceita e utilizada pela sociedade científica (Haughn e Kunst, 2010), sendo, atualmente, a planta vascular mais bem estudada. A versatilidade de aplicações de *A. thaliana* como modelo vegetal para estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos pode ser atribuída às inúmeras características vantajosas dessa espécie.

Pertencente à família *Brassicaceae*, *A. thaliana* é uma planta de pequeno porte, ciclo de vida curto, de propagação em laboratório fácil e de baixo custo. Além disso, tem um genoma pequeno, totalmente sequenciado, o que facilita o avanço nos estudos de genômica funcional e obtenção de um grande número de mutantes,

tornando possível a condução de diversas pesquisas, entre elas a busca pela elucidação de mecanismos vegetais durante a interação com micro-organismos. A utilização de *A. thaliana* como modelo para o estudo da interação planta-PGPB tem sido reportada na literatura (Khan *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). (Sukweenadhi *et al.* (2015) reportaram o efeito da inoculação de *Paenibacillus yonginensis* DCY84 em plantas de *A. thaliana*, observado no aumento da tolerância vegetal a estresses como salinidade, seca e alumínio. Tal fenótipo de tolerância ainda foi suportado pela observação da alteração de expressão de genes relacionados à resposta a estresses abióticos, em plantas inoculadas.

Resultados recentes obtidos pelo nosso grupo mostraram que a bactéria *G. diazotrophicus* também é capaz de colonizar e promover o crescimento de plantas de *A. thaliana*, aumentando a massa fresca de parte aérea e as taxas fotossintéticas vegetais (Rangel de Souza *et al.*, 2016). O estabelecimento e a utilização desse modelo de interação, *A. thaliana* - *G. diazotrophicus*, aliados a ferramentas moleculares, como proteômica e mutagênese, abrem interessantes perspectivas para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de associação entre esses organismos e na promoção do crescimento vegetal.

### **3.7. Proteômica como ferramenta para estudos de análise de genômica funcional**

A proteômica é definida como uma caracterização em larga escala de diferentes proteínas expressas por um organismo em um dado momento (Wilkins *et al.*, 1996). Enquanto o genoma de um organismo é estático por representar todo o potencial de todas as propriedades celulares que uma célula é capaz de desenvolver, o proteoma é altamente dinâmico e muito mais complexo, refletindo o estado momentâneo do funcionamento do sistema sob condições fisiológicas específicas (Aryal *et al.*, 2014; Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005).

Em meados da década de 1970, O'Farrel e Klose, pela utilização de gel 2D de alta resolução, compararam o perfil proteico de diferentes culturas de *Escherichia coli* (Klose, 1975; O'Farrell, 1975) através da separação isoelétrica e do peso molecular das proteínas analisadas. O advento do primeiro sequenciamento genômico completo de uma bactéria, *Haemophilus influenzae*

estirpe RD KW20 em 1995, fez surgir uma nova era tanto na área da genômica quanto da proteômica microbiana, o que permitiu o estudo do comportamento dinâmico da proteômica bacteriana (Fleischmann *et al.*, 1995). Desde então, o volume de informações geradas pelos estudos proteômicos em todo o mundo vem trazendo grandes avanços para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas respostas moleculares dos microrganismos em diferentes condições.

A partir do final dos anos 2000, houve um aumento significativo na utilização de novas técnicas de análises proteômicas, principalmente com o advento da espectrometria de massa (Cheng *et al.*, 2016). Os avanços na proteômica permitiram evoluir as análises de catalogação de algumas proteínas para a identificação e quantificação de centenas de proteínas em algumas horas (Mann *et al.*, 2013).

Dessa forma, a proteômica comparativa, baseada em espectrometria de massas, tornou-se uma ferramenta inestimável utilizada nos estudos de expressão e de dinâmica das proteínas de forma global. Tais estudos permitem que a proteômica de micro-organismos não se limite somente à caracterização básica *in vitro* de alguns organismos. Hoje em dia, a proteômica microbiana é utilizada em diversos ambientes com alta complexidade e sofisticação, como, por exemplo, na interação planta-patógeno, comunidades microbianas mistas e na metaproteômica microbiana (Otto *et al.*, 2014). Quando observamos os estudos visando à compreensão da resposta de microrganismos a diversos estresses ambientais, verificamos que os números vêm aumentando nos últimos anos. O aumento da quantidade de trabalhos visando a entender sua resposta aos diversos estresses ambientais tem contribuído para compreender os mecanismos moleculares envolvidos.

Weber *et al.*(2006) estudaram a resposta de *Escherichia coli* a estresse osmótico durante o crescimento aeróbico e anaeróbico. O uso das análises proteômica permitiu a identificação de vias importantes na resposta dessa espécie às condições de estudo. Os autores observaram ainda que 50% das proteínas diferencialmente acumuladas participaram da regulação da resposta do estresse osmótico tanto sob condições de crescimento aeróbico quanto em crescimento anaeróbico.

Lima *et al.* (2016) conduziram um experimento em que expuseram *Chromobacterium violaceum* ao estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os resultados das análises proteômica permitiram aos autores identificar forte participação de proteínas associadas ao reparo dos danos causados por espécies reativas de oxigênio. Adicionalmente, foi observada redução de proteínas associadas ao crescimento e ao metabolismo celular.

Diante disso, análises proteômicas são ferramentas em potencial no auxílio da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na ação e resposta de microrganismos ao estresse, além de viabilizarem a elucidação de vias estritamente reguladas durante a interação bactéria-planta.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Micro-organismos e condição de cultivo

A estirpe selvagem de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 utilizada nos ensaios foi cedida pelo Dr. Fábio Lopes Olivares, da Coleção de Cultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil). O mutante insercional de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5, GDP09A11, utilizado no presente trabalho, faz parte da biblioteca de mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5, mantida pelo Laboratório de Biotecnologia da UENF, sob curadoria do prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (Intorne *et al.*, 2009). Tais mutantes foram obtidos com o auxílio do kit inserção do transposon EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp (Epicentre, Madison, WI, USA).

A estirpe selvagem e os mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5 foram cultivados em meio DYGS, composto por (em g.L<sup>-1</sup>) 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 3,75 ácido glutâmico; 5 mL azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2 M; com o pH do meio ajustado para 6,0 (DÖBEREINER *et al.*, 1999); meio LGI modificado composto por (em g.L<sup>-1</sup>) glicose 10,0; 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; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,32; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,02; NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,002; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,018; com o pH ajustado para 5,5; e o meio LGI-P contendo, em g.L<sup>-1</sup>, 100,0 sacarose; 0,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,002 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,01 FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 5,0 mL de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2 M (Cavalcante e Dobereiner,

1988). Ágar foi adicionado ao meio de cultura (meio semissólido 1,6 g.L<sup>-1</sup> e meio sólido 15 g.L<sup>-1</sup>) quando necessário. O cultivo das células bacterianas foi feito sob agitação e temperatura constantes (250 min<sup>-1</sup> e 30 °C) em agitador orbital (C25 Incubator, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) e em placas de Petri, incubadas em estufa bacteriológica (Heraeus, Alemanha) a 30 °C.

O preparo de cultura estoque foi feito a partir de uma colônia isolada da estirpe selvagem ou de cada mutante, tendo sido inoculada em meio DYGS e cultivada até atingir densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>) igual a 1,0 (~10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>). A DO<sub>600</sub> foi determinada pelo uso de espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu Corp., Japão). O volume de 750 µL da cultura foi transferido para microtubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 750 µL de glicerol 25%. As culturas estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer (VIP Freezer MDF-U33V-PE, Sanyo Co.) a -80 °C.

#### **4.2. Efeito do estresse osmótico no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 causado por sacarose**

##### **4.2.1. Avaliação do efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5**

A determinação de uma concentração em que a bactéria ainda apresente tolerância e que, simultaneamente, não afete severamente seu crescimento foi necessária para a condução dos futuros ensaios de avaliação de resposta de *G. diazotrophicus* ao estresse provocado por sacarose. Tal concentração pode ser determinada pela observação de uma taxa de inibição de crescimento de aproximadamente 30%. Para isto, foi obtido pré-inóculo da estirpe selvagem pelo cultivo da cultura estoque (20% v/v) em 200 mL de meio DYGS em frascos Erlenmeyer de 1000 mL. O cultivo foi feito até atingir a DO<sub>600</sub>=1,0, para proceder com o ensaio, quando o pré-inóculo foi utilizado em novo cultivo nas condições testadas.

O novo cultivo foi feito a partir do pré-inóculo (50% v/v) em 50 mL de meio DYGS, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os tratamentos consistiram na condição controle, contendo somente meio de cultura, e nas diferentes concentrações de meio DYGS suplementado com sacarose (concentração final de

400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mM de sacarose). Para suplementar o meio DYGS com sacarose, um estoque na concentração de 2000 mM foi preparado por solubilização de sacarose em meio estéril e posterior filtração em membrana de nitrocelulose 0,22 $\mu$ L. Esse estoque foi utilizado para atingir as concentrações testadas pela diluição com meio DYGS.

As culturas foram mantidas nas condições de cultivo descritas no item 4.1 por 12 horas (h), quando foi feita a leitura de DO<sub>600</sub>. Os dados foram utilizados para determinar a taxa de inibição, que correspondeu à redução percentual na multiplicação celular em relação ao controle. O ensaio foi feito com 3 repetições em cada condição. Para a definição da concentração utilizada para os ensaios posteriores, foi selecionada a concentração de sacarose que induzia uma resposta ao estresse, mas que influenciasse de forma mais branda a multiplicação celular da estirpe selvagem.

Os dados de taxa de inibição do crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5 sob estresse por sacarose foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### **4.2.2. Efeito do estresse osmótico causado por sacarose na morfologia celular de *G. diazotrophicus* PAI 5**

O ensaio foi conduzido nas mesmas condições de cultivo como descrito no item 4.2.1, utilizando os tratamentos controle e 600 mM de sacarose. Após 12 horas de cultivo, os resultados foram avaliados pela leitura de DO<sub>600</sub>. O ensaio foi feito com 9 repetições em cada condição.

O efeito do estresse osmótico na morfologia das células foi avaliado por microscopia óptica de contraste de fase. Para tanto, 1 mL de inóculo de cada frasco Erlenmeyer foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 5.000 min<sup>-1</sup> por 3 min (Mikro 120, Hettich). O sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas em solução aquosa contendo 2,5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em 0,05 M de PBS. As bactérias fixadas foram mantidas em geladeira até a observação em microscópio.

Uma alíquota de 10  $\mu$ L das amostras de células foi então disposta em lâminas e observada em microscópio óptico Axioplan-EL-Einsatz (Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas usando o software Motic Images Plus 2.0 (Motic, China).

#### **4.2.3. Análise proteômica**

As proteínas diferencialmente acumuladas em resposta ao estresse osmótico foram avaliadas por análise proteômica. Para essa avaliação, cada réplica biológica foi obtida através da junção de 3 cultivos independentes, 50 mL cada, conforme descrito no item 4.2.2, totalizando 150 mL de cultura por repetição biológica. Um total de 3 réplicas biológicas foram obtidas por tratamento. As culturas foram distribuídas em microtubos de 2,0 mL e centrifugados a 14.000 g por 1 min a 4 °C Mikro 120 (Hettich, Alemanha). Ao final das centrifugações, as células foram coletadas em dois tubos de 2,0 mL por repetição, lavadas com água milli-Q gelada para retirada de meio e congeladas em nitrogênio líquido para posterior extração de proteínas.

##### **4.2.3.1. Extração e quantificação de proteínas totais**

Para a extração de proteínas totais, foi utilizado o protocolo descrito por Damerval *et al.*, (1986) modificado. Para tanto, adicionou-se 1 mL de tampão de extração TCA/Acetona as amostras (ácido tricloroacético 10% em acetona com 20 mM de ditioneitol - DTT) e elas foram mantidas sob agitação constante a 4 °C por 60 min. Em seguida, foram incubadas por 60 min a -20 °C e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 g a 4 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado três vezes pela adição de acetona gelada contendo 20 mM de DTT, breve agitação e centrifugação a 12.000 g por 5 min, 4 °C. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o pellet secou à temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspensos em 0,7 mL de tampão ureia/tiourea ( 7M ureia, 2M tiourea, 1% DTT, 2% triton X-100, 5 $\mu$ M pepstatina, 1mM fenilmetanosulfonilfluorídrico – PMSF) e mantidos sob agitação até completa homogeneização das amostras. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min, a 4 °C, o sobrenadante

proveniente desta centrifugação foi coletado e as proteínas totais foram quantificadas.

A concentração de proteínas totais foi estimada utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare, UK) segundo recomendações do fabricante. A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão com soro de albumina bovina (BSA, GE Healthcare, UK) foi feita em leitor de microplacas Synergy 2 Multi-mode Reader (Biotek Instruments, USA) a 480 nm. As amostras foram normalizadas com base na quantificação individual para obter a concentração final de 100 µg de proteínas totais por amostra. Elas foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C até as análises proteômicas.

#### **4.2.3.2. Digestão trípica de proteínas totais**

Antes da etapa de digestão trípica, as amostras normalizadas contendo 100 µg de proteínas totais foram dessalinizadas pelo uso da membrana Amicon Ultra-0,5 3KDa (Merck Millipore Corp., Alemanha), utilizando bicarbonato de amônio a 50 mM pH 8,5 como tampão de lavagem. As membranas contendo as amostras foram completadas até sua capacidade máxima com bicarbonato de amônio e centrifugadas a 15.000 g por 10 min a 20 °C. Esse procedimento foi repetido por mais sete vezes. Na última lavagem, as membranas foram centrifugadas até atingir aproximadamente 50 µL de amostra.

A metodologia utilizada para digestão de proteínas foi conduzida conforme descrito por Calderan-Rodrigues et al. (2014). Para tanto, foram adicionados 25 µL de 0,2% (v/v) de Rapigest® (Waters, CT, USA) às amostras previamente obtidas, que foram vortexadas por 5 s e aquecidas em um Thermomixer® (Eppendorf, Alemanha) durante 15 min a 80 °C. Então, 2,5 µL de DTT 100 mM foram adicionados a cada amostra e os tubos foram incubados a 60 °C por 30min sob agitação no Thermomixer®. Foram adicionados 2,5 µL de iodoacetoamida 300 mM, na sequência, foram feitas agitação por 5 s e posterior incubação à temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. Posteriormente, a digestão foi feita pela adição de 20 µL de solução de tripsina 50 ng/µL (Promega, WI, USA) preparada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM. As amostras foram incubadas a 37 °C *overnight*. Para a precipitação do Rapigest®, 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (v/v) foram adicionados e os tubos incubados por 30 min a 37 °C, seguido de

centrifugação por 30 min a 15.000 g, a 8 °C. As amostras digeridas foram então transferidas para frascos tipo Total Recovery (Waters, CT, USA).

#### 4.2.3.3. Análises LC-MS/MS

As análises de *shotgun* foram feitas pelo sistema nanoAcquity UPLC, acoplado ao espectrômetro de massas Synapt G2-Si HDMS (Waters, CT, USA), usado para análises ESI-QTOF HDMS<sup>E</sup>, de acordo Reis et al. (2016). A etapa cromatográfica foi feita pela injeção de 1 µL das amostras digeridas para a normalização antes da quantificação relativa de proteínas. A normalização de cada amostra foi baseada nas mensurações estequiométricas das contagens de íons totais das corridas de *scouting* que antecederam às análises, com o intuito de garantir valores molares padronizados para todas as condições. Posteriormente, as corridas consistiram de injeção normalizada de aproximadamente 1 µg de proteínas totais digeridas, por amostra biológica. Durante a separação, as amostras foram carregadas na coluna nanoAcquity UPLC 5 µm C18 (180 µm x 20 mm) a 5 µL.min<sup>-1</sup> durante 3 min e depois para a coluna analítica de fase reversa nanoAcquity HSS T3 1.8 µm (75 µm x 150 mm) a 500 nL.min<sup>-1</sup>, com a temperatura de coluna de 45 °C. Para eluição dos peptídeos, utilizou-se um gradiente binário que consistiu de água MS e ácido fórmico 0,1% como fase móvel A e de acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico como fase móvel B. A eluição de gradiente foi iniciada a 7% da fase móvel B e mantida durante 3 min, quando aumentou de 7% para 40 % até 90 min e de 40% a 85% até 94 min, mantendo-se a 85% até 98 min. O espectrômetro de massas foi operado em modo de resolução (modo V) e positivo com mobilidade iônica; transferência de energia de colisão de 19 a 45 V, no modo de alta energia; cone de tensão e capilar de 30 V e 2800 V, respectivamente e temperatura da fonte de 70 °C. Em parâmetros TOF, o tempo de verificação foi definido para 0.5 s, em modo contínuo, com um intervalo de massa de 50 a 2000 Da. A [GLu1]-fibrinopeptídeo B humana a 100 fmol.µL<sup>-1</sup> foi utilizada como calibrador externo e a aquisição de sua massa feita a cada 30 s.

#### 4.2.3.4. Bioinformática

O programa Progenesis QI for Proteomics V.2.0 (Nonlinear Dynamics, UK) foi utilizado para o processamento do espectro e identificação de proteínas. O banco de proteínas da espécie *G. diazotrophicus* PAI 5, proveniente do Banco de Dados Uniprot (UniProt Consortium, 2017) (<http://www.uniprot.com> - *Release date* 16-09-2016, Número de acessos inclusos 5906 proteínas), foi utilizado para identificação das proteínas, com identificação de peptídeos com, no máximo, uma perda de clivagem por tripsina, modificações variáveis por carbamidometil (C), fosforilação (STY), e oxidação (M), e a taxa de falsa descoberta (FDR) de 1%. Outros parâmetros de identificação ainda foram levados em consideração, como o número mínimo de 2 fragmentos de íons por peptídeo, 5 fragmentos de íons por proteína, 2 peptídeos por proteína e *score peptide* mínimo de 4.

Após a identificação, as proteínas foram selecionadas de acordo a análise ANOVA e o nível de acúmulo (*fold change*) entre os tratamentos, em que o último foi calculado pela função logarítmica na base 10. As proteínas foram consideradas diferencialmente acumuladas (*Differentially Accumulated Protein* - DAP) quando  $p < 0,05$  e a diferença de pelo menos 1,5 vezes do *fold change*, denominadas DAPs reduzidas quando *Log fold change* = -0,58 e DAPs aumentadas quando *Log fold change* = 0,58.

As proteínas selecionadas foram então submetidas à caracterização funcional, utilizando o programa Blast2GO v4.0 PRO Release 16-03-2107 (<http://www.blast2go.com>) (Götz *et al.*, 2008), considerando os parâmetros padrões especificados pelo programa (Filtro do E-Value do hit 1.0E-3, Número de Blast Hits 20, Limiar de anotação 55, Peso de GO 5, Cobertura de corte Hsp-Hit 0). As anotações foram previamente simplificadas, utilizando os recursos GOSlim do programa.

A predição da localização subcelular foi feita pela sequência FASTA das proteínas selecionadas pela ferramenta FUEL-mLoc (<http://bioinfo.eie.polyu.edu.hk/FUEL-mLoc/>) (Wan *et al.*, 2016), utilizando os seguintes parâmetros: Organismo: Bactéria Gram-negativa; Base de dados: GO-Term Online Database. Os dados de predição obtidos foram contrastados com as informações de localização subcelular presentes no banco de proteínas de *G. diazotrophicus* PAI 5 no Uniprot KB Database (UniProt Consortium, 2017) e no KEGG Orthology Database (Kanehisa *et al.*, 2017).

#### **4.2.4. Proteínas hipotéticas diferencialmente acumuladas**

Com o objetivo de caracterizar novos genes envolvidos na resposta de *G. diazotrophicus* PAI 5 ao estresse causado por sacarose, foram feitas buscas específicas dentro do banco de mutantes desenvolvido por Intorne *et al.* (2009). As sequências de novos genes ainda não caracterizados (genes de proteínas hipotéticas), do banco de mutantes, foram utilizadas para busca de suas respectivas proteínas nos dados de proteínas diferencialmente acumuladas. Os dados foram contrastados para seleção de mutantes insercionais para caracterização.

#### **4.3. Seleção de mutantes insercionais de proteínas hipotéticas de *G. diazotrophicus* PAI 5 sensíveis a estresse osmótico**

A estirpe selvagem e os mutantes da biblioteca insercional de *G. diazotrophicus* PAI 5, que codificam proteínas hipotéticas, foram utilizados para avaliar o papel de proteínas não identificadas nas análises proteômicas realizadas. Os mutantes selecionados ainda foram caracterizados quanto às demais características inerentes à espécie.

As bactérias foram cultivadas conforme descrito no item 4.1 até atingir a  $DO_{600}=1,0$ , quando foram utilizadas para plaqueamento nos tratamentos controle (DYGS sólido) e 600 mM de sacarose. As placas de Petri foram incubadas durante 3 dias, quando foi avaliado o crescimento no tratamento de sacarose em relação ao controle. O ensaio foi feito com 5 repetições por tratamento.

##### **4.3.1. Organização genômica e análises *in silico* do mutante GDP09A11 em *G. diazotrophicus* PAI 5**

A identificação do sítio de inserção do transposon Tn5 foi previamente determinada por Oliveira (2012), e a sequência do gene, compreendendo o gene interrompido (RefSeq NC\_010125), foi obtida na base de dados do NCBI.

As sequências de aminoácidos de proteínas homólogas foram obtidas no banco de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) pelo alinhamento feito pela ferramenta BLAST, segundo sequência de aminoácidos da proteína



correspondente ao gene *gdsucre01*, que codifica proteína hipotética (UNIPROT\_ID A9HEH2) com os parâmetros padrões da ferramenta (E-Threshold 10, Matrix automático, Sem filtro e Gapped permitido). Foram selecionadas proteínas homólogas à proteína do gene *gdsucre01* de espécies filogeneticamente próximas a *G. diazotrophicus*: *Acetobacter orientalis* 21F-2 (NZ\_BAMX00000000.1), *A. tropicalis* NBRC 101654 (NZ\_BABS01000773.1), *A. cerevisiae* (NZ\_LHZA00000000.1), *A. pasteurianus* (NC\_013209.1) e a espécie promotora do crescimento vegetal *Frateuria aurantia* ATCC 33424 (NC\_017033.1).

Os alinhamentos das sequências selecionadas de aminoácidos foram feitos pelo algoritmo EMBOOLS Needle (Li *et al.*, 2015). A análise de domínios transmembrana (TMH) das proteínas selecionadas foi feita pela ferramenta TMHMM Server 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) (Krogh *et al.*, 2001). Análises de

#### **4.3.2. Perfil de multiplicação do mutante $\Delta GdSucre01$ e estirpe selvagem**

Para compreender o perfil de multiplicação dos isolados, a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram cultivados até suas fases exponenciais. O cultivo do pré-inóculo foi feito a partir de 750  $\mu$ L de cultura estoque em meio LGI modificado, q.s.p. 7,5 mL, em tubos tipo Falcon de 50 mL. As células foram cultivadas sob agitação constante de 250  $\text{min}^{-1}$ , a 30 °C até atingir a  $\text{DO}_{600}=1,0$ .

O inóculo foi cultivado em novo frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de cultivo em meio LGI modificado, a partir de 5,0 mL (10% v/v) de pré-inóculo de cada estirpe bacteriana. Os frascos foram então mantidos sob cultivo conforme descrito em 4.1. O crescimento das culturas foi acompanhado pela leitura de  $\text{DO}_{600}$  a cada 2 h, nas primeiras 12 h e, posteriormente, a cada 3 horas, até completar 36 h de cultivo.

Os dados foram utilizados para determinar o perfil de multiplicação da estirpe selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$ . O ponto médio da fase exponencial de multiplicação de cada isolado foi adotado para proceder com os ensaios posteriores. Esse ponto foi denominado como fase exponencial de crescimento da estirpe selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$ .

#### **4.3.3. Análise da tolerância do mutante a estresses abióticos**

Para caracterização do papel do gene *GdSucre01* na resposta de *G. diazotrophicus* PAI 5 aos estresses abióticos, o mutante foi submetido a ensaios de sensibilidade aos diferentes agentes estressores em meio LGI modificado. Para tanto, inóculos da estirpe selvagem e do mutante foram preparados conforme item 4.3.2, ajustados para  $DO_{600}=1,0$  e utilizados nos diferentes tratamentos. O volume de 500  $\mu\text{L}$  de cada cultura foi utilizado para inocular os novos frascos

O ensaio foi conduzido em frascos tipo Erlenmeyer de 50 mL, contendo 45 mL de meio LGI modificado, suplementado com os diferentes agentes estressores: metais pesados  $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,09 mM,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2 mM e  $\text{ZnCl}_2$  0,9 mM; o oxidativo paraquat 70  $\mu\text{M}$ ; e os agentes estressores osmótico-salino NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  160 mM, PEG 400 200 mM e sacarose 750 mM. As concentrações empregadas foram previamente determinadas por Souza (2015). As culturas, nas condições controle e submetidas aos diferentes estresses, foram cultivadas sob agitação constante a  $250 \text{ min}^{-1}$ , a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 24 horas, quando foram coletados os resultados. O ensaio foi feito com 5 repetições por tratamento.

Adicionalmente, a sensibilidade do mutante  $\Delta\text{GdSucre01}$  ao estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio foi avaliado em meio sólido. Para tanto, foi feito o ensaio por disco de difusão em meio sólido, conforme Alquéres *et al.* (2013). O volume de 100  $\mu\text{L}$  de inóculo utilizado para os ensaios dos demais estresses foi plaqueado em meio DYGS sólido com o auxílio de alça de Drigalski. Foi disposto um disco de papel estéril embebido com 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM no centro de cada placa de Petri. As placas foram incubadas em estufa a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 dias, quando foram feitas mensurações de halo de inibição. O ensaio constou de 5 repetições por tratamento.

Os dados de taxa de inibição do crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5 sob os diferentes estresses estudados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### **4.3.4. Avaliação do papel do gene *gdSucre01* nas características de promoção de crescimento**

#### 4.3.4.1. Ensaio de redução do acetileno

A estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram avaliados quanto à sua capacidade de fixar  $N_2$  por meio do ensaio de redução de acetileno, conforme Baldani et al. (2014). Os inóculos foram crescidos em frascos com capacidade de 15 mL, contendo 5 mL de meio LGI-P semissólido. Esses frascos foram inoculados com 20  $\mu$ L da bactéria crescida conforme 4.3.2, em que a  $DO_{600}$  foi ajustada para 1,0 e, posteriormente, foram incubados por 48 horas a 30 °C. Após esse período, foi avaliada a formação de película no meio, e os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfuráveis do tipo *subseal* esterilizadas. Com o auxílio de uma seringa, 1 mL do ar no interior de cada frasco foi retirado e substituído por 1 mL de acetileno. Os frascos foram incubados a 30 °C, por 1h, e 1 mL da fase gasosa foi analisada por cromatógrafo a gás com ionização por chama (Perkin Elmer, MA, USA) para determinar a concentração de etileno em cada amostra. Essa análise foi feita com 3 repetições por tratamento, e o ensaio foi repetido duas vezes.

Os dados de taxa de fixação biológica de nitrogênio durante o crescimento da estirpe selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$  de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio LGI-P foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### 4.3.4.2. Ensaio de solubilização de fósforo e zinco

Para o ensaio de solubilização dos nutrientes fósforo e zinco, os inóculos da estirpe selvagem e mutante  $\Delta GdSucre01$  foram cultivados conforme item 4.3.2, e a  $DO_{600}$  foi ajustada para 1,0. Gotas de 10  $\mu$ L de cada cultura foram dispostas no centro de placas de Petri contendo meio LGI modificado, suplementado com 0,54% de  $Ca_5(PO_4)_3OH$  (concentração final de fósforo de 0,1%) e meio DYGS suplementado com 0,12% de ZnO (concentração final de zinco de 0,1%). Em ambos os meios, foram adicionados 5 mL.L<sup>-1</sup> de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2 M. As placas foram incubadas em estufa a 30 °C, por 3 dias, quando foi mensurado o halo de solubilização nas diferentes condições testadas. Cada ensaio foi composto de 3 repetições, e os ensaios foram repetidos três vezes.

Os dados de taxa de solubilização de fósforo e zinco da estirpe selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$  de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio LGI-P foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### **4.3.5. Avaliação do papel do gene *gdSucre01* na promoção de crescimento de *Arabidopsis thaliana***

##### **4.3.5.1. Material vegetal e condições de cultivo**

Sementes de *A. thaliana*, do ecótipo Columbia (Col-0), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Harvard Medical School, Boston, MA, USA). As sementes foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95%, durante 1 min, seguida de solução de hipoclorito de sódio 2,5%, sob agitação, por 10 min. O excesso desses reagentes foi removido mediante seis lavagens em água ultrapura estéril. As sementes foram mantidas por 2 dias, a 4 °C, na ausência de luz, antes da semeadura.

Para o processo de semeadura, as sementes foram acondicionadas em copos plásticos de 50 mL, contendo o substrato West Garden. Os copos foram mantidos em bandejas cobertas com filme PVC transparente, com o objetivo de manter a umidade ideal para a germinação. As bandejas foram mantidas em sala de cultivo sob temperatura de 22 °C, 60% de umidade do ar e irradiância de 120 mol.fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, durante 12 horas diárias.

##### **4.3.5.2. Inoculação de plantas de *A. thaliana* com estirpe selvagem e mutante $\Delta GdSucre01$**

Plantas de *A. thaliana* (Col-0), com 10 dias de idade, provenientes do cultivo descrito no item 4.3.5.1, foram empregadas para o processo de inoculação. Para cada tratamento, foram utilizadas 36 plantas, as quais foram retiradas do substrato, com posterior lavagem das suas raízes com água destilada. Após a lavagem, elas foram mantidas em placas de Petri, utilizando suportes plásticos com

orifícios que permitiam o contato apenas das suas raízes com os tratamentos presentes nas placas.

Para o processo de inoculação, 10 mL da cultura estoque de *G. diazotrophicus* e do mutante  $\Delta GdSucr01$  foram transferidos para um frasco do tipo Erlenmeyer de 50 mL, contendo 40 mL de meio líquido DYGS, e este foi submetido a uma constante agitação em agitador orbital a 30 °C, até que a cultura bacteriana atingisse a densidade ótica ( $DO_{600nm}$ ) 1,0 [correspondendo a, aproximadamente,  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU)/mL-1]. Após esta etapa, a densidade ótica da cultura bacteriana foi ajustada em meio DYGS líquido para  $DO_{600nm} 1 \times 10^4$  CFU/mL-1. Em seguida, 10 mL de cada suspensão bacteriana foram dispostos em placa de Petri. Como controle, foi empregado apenas o meio DYGS.

Após o contato das raízes com os diferentes tratamentos, as placas foram mantidas por 3 horas conectadas a um sistema contendo uma bomba compressora de ar (Bomba Compressora Boyu para aquários U-2800) para manutenção do fornecimento de oxigênio para as plantas e para a suspensão bacteriana. Após a inoculação, as plantas foram transferidas para vasos de 200 mL contendo substrato West Garden, os quais foram acondicionados em bandejas cobertas com filme de PVC transparente, para manter a umidade adequada por 10 dias. Ao término deste período, o filme PVC foi removido e as plantas foram irrigadas, em intervalo de dois dias, com solução de Hoagland modificada (Epstein e Bloom, 2004), até completar seu ciclo final. O pH da solução foi ajustado para 6,5. A sala de cultivo utilizada foi mantida sob temperatura de 22 °C, 60% de umidade do ar e irradiância de  $120 \text{ mol.fótons.m}^{-2} .\text{s}^{-1}$ , durante 12 horas diárias

#### **4.3.5.3. Análise da promoção do crescimento vegetal**

A promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana* foi avaliada por meio da área foliar da roseta e das massas de matéria frescas e secas. As áreas foliares das rosetas das plantas de cada tratamento foram mensuradas por meio do software *Easy Leaf Area* versão 1.02 (Easlon e Bloom, 2014) em intervalos de 3 dias, até o 28° dia após a inoculação. No final do experimento (28 dpi), as partes aéreas e radiculares dos diferentes tratamentos foram coletadas, separadamente, para a determinação da massa de matéria fresca por meio da pesagem em balança

analítica, imediatamente após a coleta. Após a pesagem, os materiais foram secos em estufa a 70 °C por 24 horas para a obtenção da massa de matéria seca.

Os dados de massa fresca de parte aérea e radicular bem como da área foliar de plantas de *A.thaliana* inoculadas com a estirpe selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$  de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio LGI-P foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

#### **4.3.5.4. Quantificação da população microbiana nos tecidos vegetais**

A quantificação da população de *G. diazotrophicus* e do mutante  $\Delta GdSucre01$  foi feita pela contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), 28 dias após a inoculação. Para a quantificação das populações na parte aérea, foram empregadas 3 plantas por tratamento, das quais foram retiradas dois discos foliares (0,5 cm de diâmetro) por planta. Estes discos foram desinfestados superficialmente pela imersão em etanol 70% durante 3 min, seguida de 3 lavagens em água ultrapura. Posteriormente, os discos foliares foram macerados em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL, estéreis, contendo 100  $\mu$ L de água ultrapura estéril e diluições seriadas foram feitas. Na área radicular, 3 plantas de cada tratamento foram, inicialmente, lavadas para remoção de qualquer substrato remanescente. Cada raiz foi pesada em balança analítica e, em seguida, macerada em almofariz que continha 3 mL de água ultrapura estéril. Após, 1 mL de cada tecido macerado foi transferido para tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL e feitas diluições seriadas. As amostras dos diferentes tecidos, após as diluições, foram plaqueadas em meio sólido LGI-P (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Reis *et al.*, 1994) contendo (in g L<sup>-1</sup>): 100,0 sacarose; 0,2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,2 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,002 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,01 FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 5,0 mL azul de bromotimol 0,5% em 0,2M KOH; 15,0 agar. Foi adicionado ao meio de cultivo canamicina (50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>). O pH do meio foi ajustado para 5,5 e as placas, incubadas sob temperatura de 30 °C durante 4 dias.

Os dados de população bacteriana por unidades formadoras de colônia da parte aérea e radicular de plantas de *A.thaliana* inoculadas com a estirpe selvagem

e do mutante  $\Delta GdSucre01$  de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio LGI-P foram submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos. As análises dos dados obtidos foram feitas pelo software GraphPad Prism v6.01 For Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## 5. RESULTADOS

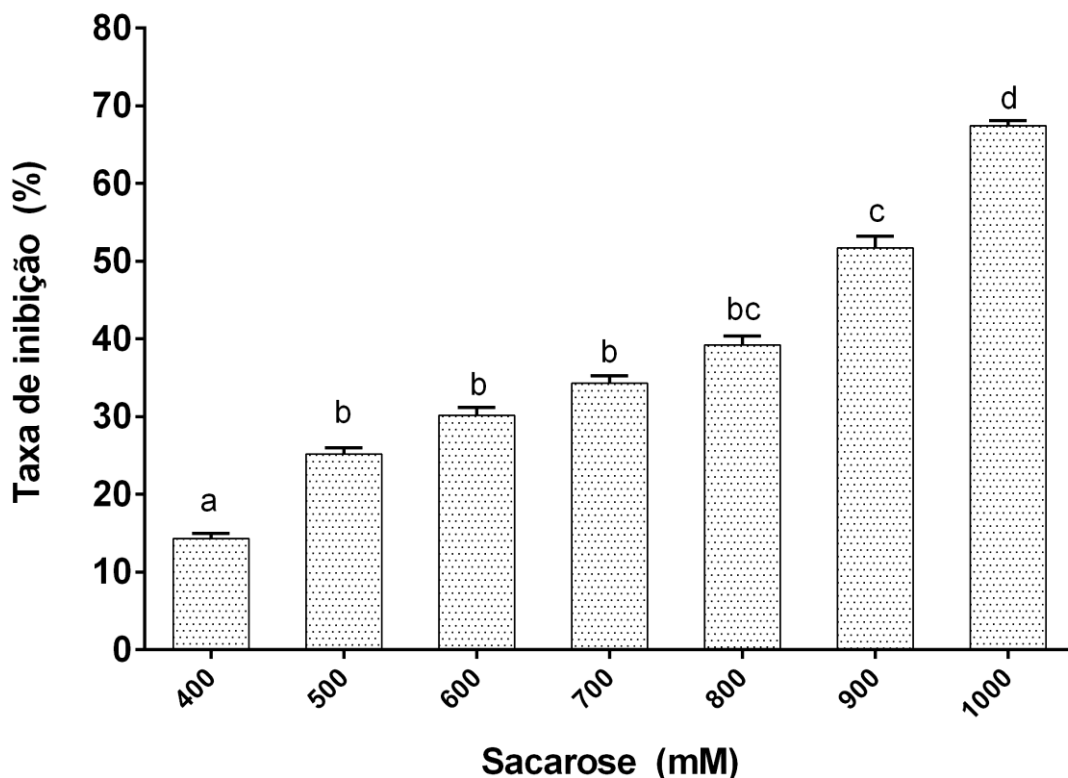
### 5.1. Efeito de diferentes concentrações de sacarose no crescimento da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5.

Com o objetivo de identificar mecanismos de resposta/tolerância ao estresse por sacarose, buscou-se estabelecer condições de exposição ao estressor que promovessem a ativação dos mecanismos de resposta bacterianos sem, no entanto, causar danos severos. Assim, foi avaliado o efeito da exposição a diferentes concentrações, objetivando determinar a concentração de sacarose necessária para uma inibição de 20-30% da multiplicação celular da bactéria *G. diazotrophicus* PAI 5. Para isso, a estirpe selvagem foi cultivada em meio DYGS líquido suplementado com diferentes concentrações de sacarose por 12 h.

A inibição no crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5 variou entre 14% na concentração de 400 mM até 73% na concentração de 1000 mM (Figura 1).

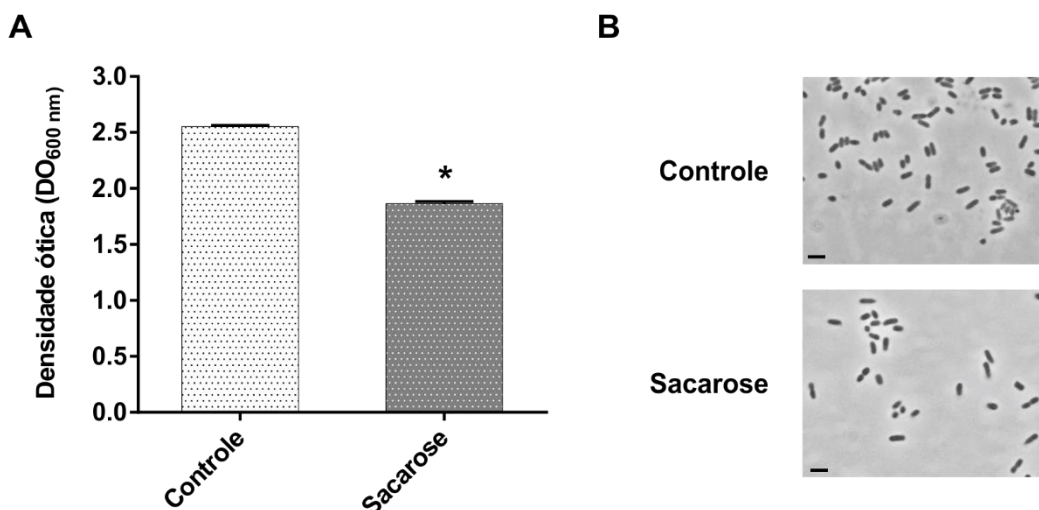
Entre as concentrações testadas, a concentração de 600 mM foi responsável por inibir o crescimento da bactéria em 30%. Tal concentração foi escolhida para posterior validação e futuros ensaios.





**Figura 1. Taxa de inibição no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sobre diferentes concentrações de sacarose em meio DYGS líquido.** O ensaio foi feito pela determinação do crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio DYGS líquido suplementado com diferentes concentrações de sacarose após 12 horas de cultivo, a 30 °C, sob agitação de 250 min<sup>-1</sup>. n=3. Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Um novo ensaio foi feito com maior número de repetições para confirmação dos dados e coleta de células para microscopia e extração proteica, utilizando 600 mM de sacarose. Como observamos na Figura 2A, os resultados de tolerância se confirmaram para a concentração de 600 mM de sacarose, concentração responsável por provocar 27% de inibição no crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5. As análises de microscopia ótica possibilitaram observar que não houve alterações morfológicas significativas nas células bacterianas quando expostas a 600 mM de sacarose (Figura 2B).



**Figura 2. Efeito do estresse causado por sacarose no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 em meio DYGS líquido.** Taxa de inibição (A) e microscopia óptica de contraste de fases (B) de *G. diazotrophicus* PAI 5 em meio DYGS líquido (controle) e sob estresse causado pela suplementação com 600 mM do agente estressor (Sacarose) após 12 horas de cultivo, a 30 °C, sob agitação constante de 250 min<sup>-1</sup>. As barras em (A) representam o erro padrão da média. Média seguida por (\*) difere estatisticamente do seu controle pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=9). A barra de escala em (B) representa 1 µm.

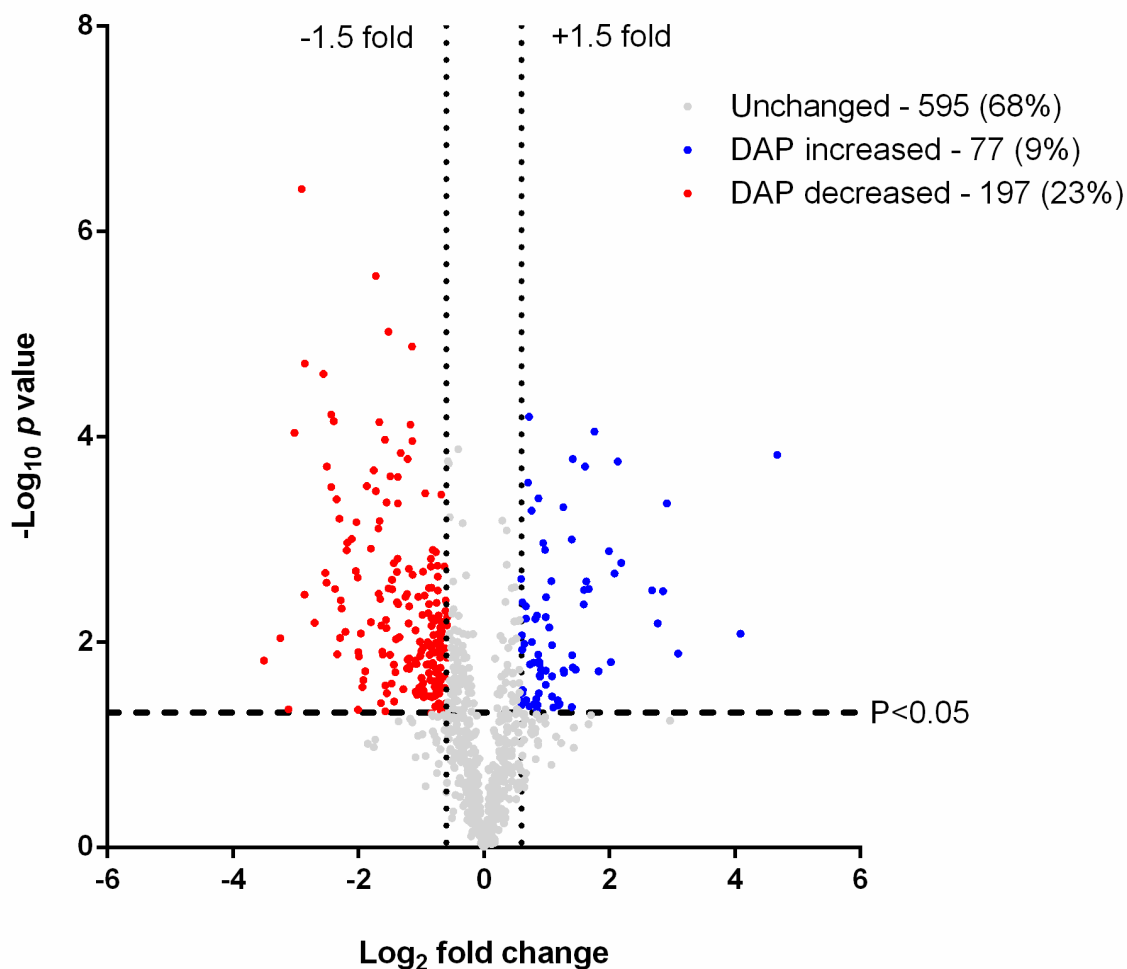
## 5.2. Análise proteômica comparativa da resposta de tolerância à sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5

Os resultados anteriores revelaram que a concentração de 600 mM não provoca alterações morfológicas nas células de *G. diazotrophicus* PAI 5, mas inibe parcialmente o crescimento da bactéria e, possivelmente, altera o metabolismo geral bacteriano, ativando mecanismos de resposta a tal estresse.

Com o objetivo de avaliar as principais vias bioquímicas envolvidas com essas alterações/respostas desencadeadas por sacarose, as proteínas diferencialmente acumuladas em resposta ao tratamento foram analisadas por meio da técnica proteômica quantitativa comparativa

As análises proteômicas foram feitas nos tratamentos controle e 600 mM de sacarose, após 12 h de cultivo. Para cada tratamento (controle e sacarose 600 mM), os extratos proteicos foram obtidos de 3 réplicas biológicas, cada uma composta pela junção de 3 cultivos bacterianos independentes. As análises proteômicas foram feitas por espectrometria de massas.

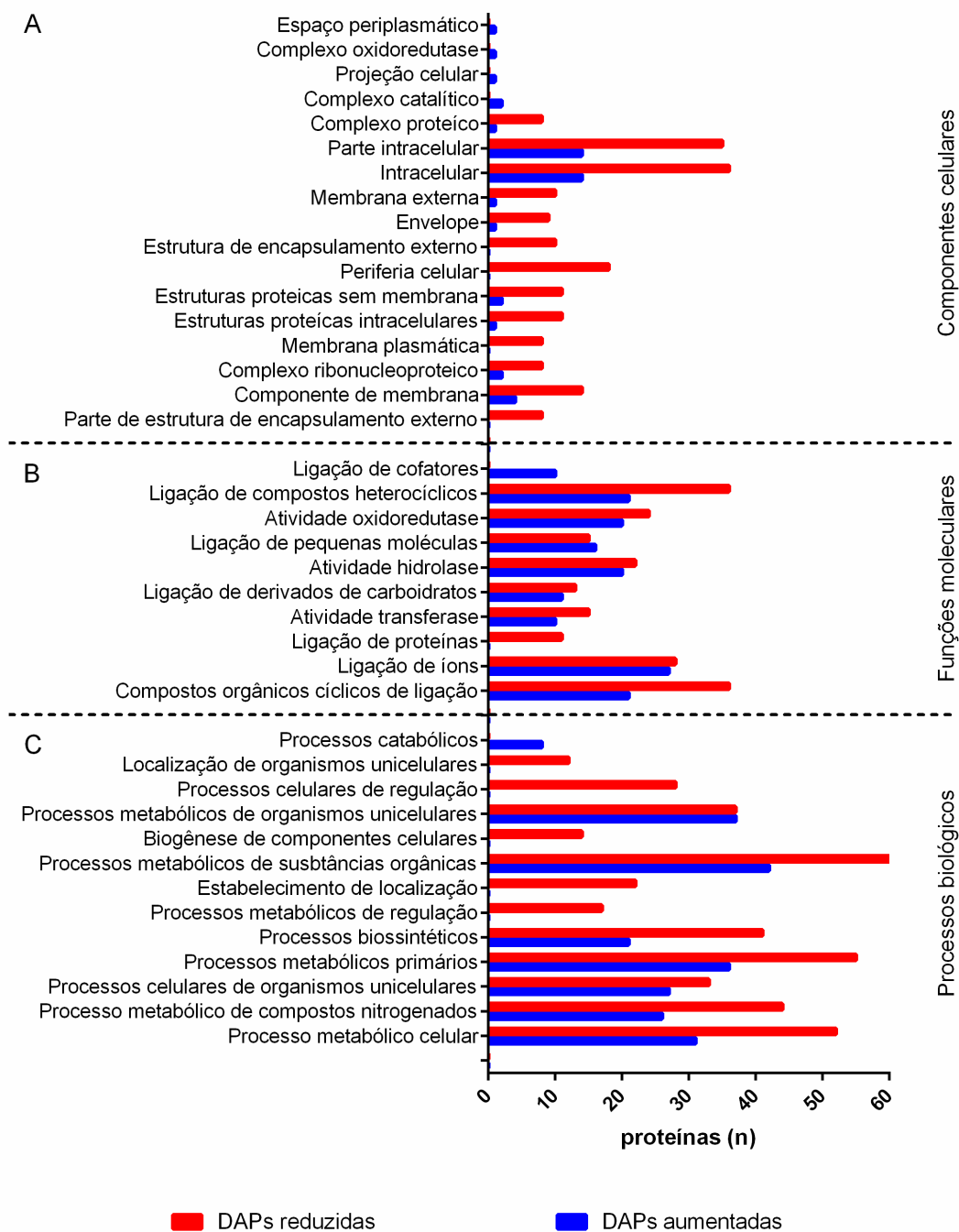
Os resultados das análises proteômicas permitiram obter a cobertura de 22% das proteínas preditas para a espécie, o que corresponde à identificação de 869 proteínas (Figura 3). Entre as proteínas identificadas, 32% delas foram diferencialmente acumuladas com *fold change* superior a 1,5 vezes, entre os tratamentos, e quando  $p < 0,05$ , pela ANOVA (Figura 3A). Esses parâmetros permitiram identificar 77 DAPs aumentadas e 197 DAPs reduzidas na presença de sacarose em relação ao controle (Figura 3B; Tabela Suplementar 1; 2).



**Figura 3. Distribuição das proteínas identificadas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob condição de estresse causado por sacarose.** Volcano plot das proteínas identificadas. Os pontos representam o acúmulo diferencial (Log<sub>2</sub> fold change) das 869 proteínas identificadas nas análises proteômicas em função do nível de significância estatística (-Log<sub>10</sub> p-value da ANOVA). Os pontos vermelhos representam as 197 proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs - *Differentially Accumulated Protein*) aumentadas; os azuis, as 77 DAPs reduzidas; e os cinzas, as 595 proteínas que não apresentaram alteração no acúmulo em relação ao controle. A linha na horizontal representa o nível de significância de p<0,05 em “-Log<sub>10</sub> p-value” (>1,3), enquanto as linhas nas horizontais na esquerda e na direita representam, em Log<sub>2</sub> fold change, a significância negativa (-0,58) e positiva (0,58) no acúmulo de proteínas, respectivamente, aos níveis de, pelo menos, 1,5 vezes.

### 5.2.1. Classificação funcional das DAPs

As DAPs observadas pelo estresse causado por 600 mM de sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5 foram funcionalmente classificadas por meio de análises de ortologia gênica pelo uso do Software Blast2GO (Figura 4). Tal classificação foi conduzida por meio de três critérios: componentes celulares (17 classes), processos biológicos (13 classes identificadas) e funções moleculares (10 classes identificadas). Vale ressaltar que uma mesma proteína pode participar de mais de uma via.



**Figura 4. Classificação funcional das proteínas diferencialmente acumuladas em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob estresse causado por sacarose.** Número de proteínas envolvidas em componentes celulares (A), funções moleculares (B) e processos biológicos (C). As barras representam o número de proteínas envolvidas em cada classificação específica. Barra em vermelho representa as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs - *Differentially Accumulated Protein*) reduzidas e barra em azul, as DAPs aumentadas.

O critério “processos biológicos” nos permitiu categorizar as proteínas diferencialmente acumuladas em 13 classes, sendo que algumas dessas classes foram representadas exclusivamente em uma das classes. Foram observadas cinco classes exclusivamente em DAPs reduzidas, compreendendo os processos metabólicos de regulação (4%), estabelecimento de localização (5%), biogêneses de componentes celulares (3%), processos celulares de regulação (7%) e localização de organismos unicelulares (3%), enquanto os processos catabólicos (4%) foram observados somente nas DAPs aumentadas. As demais classes foram representadas por DAPs aumentadas e reduzidas, respectivamente, processos metabólicos celulares (14%, 13%), processos metabólicos de compostos nitrogenados (11%, 11%), processos celulares de organismos unicelulares (12%, 8%), processos metabólicos primários (16%, 13%), processos biossintéticos (9%, 10%), processos metabólicos de substâncias orgânicas (18%, 15%) e processos metabólicos de organismos unicelulares (16%, 9%).

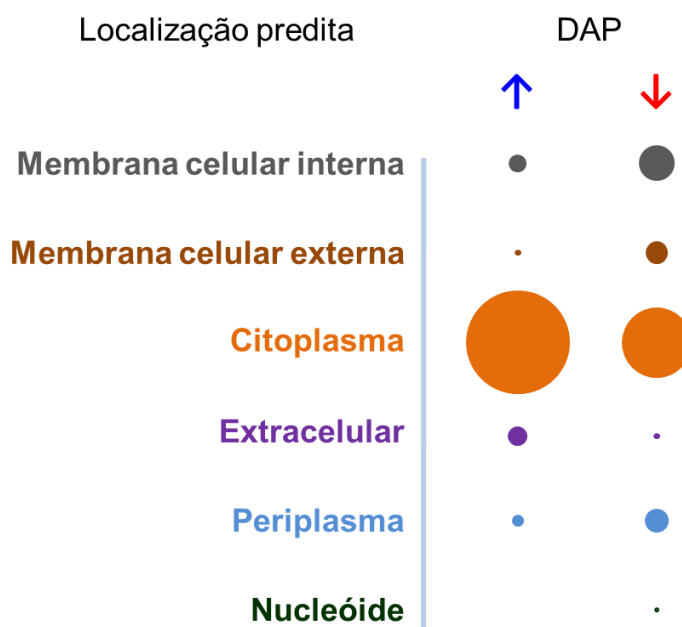
Quando foi utilizado o critério “funções moleculares”, duas categorias foram exclusivas de uma das condições, tendo a ligação de proteínas (6%) sido categorizada exclusivamente em DAPs reduzidas, enquanto ligação de cofatores (6%) foi exclusivamente classificada entre as DAPs aumentadas. As demais classes foram representadas por DAPs aumentadas e reduzidas, respectivamente, como compostos orgânicos cíclicos de ligação (13%, 18%), ligação de íons (17%, 14%), atividade transferase (6%, 8%), ligação de derivados de carboidratos (7%, 7%), atividade hidrolase (13%, 11%), ligação de pequenas moléculas (10%, 8%), atividade oxidoreductase (13%, 12%) e ligação de compostos heterocíclicos (13%, 18%).

O critério de “componentes celulares” foi o que apresentou maior número de classes. Entre as 17 classes categorizadas, algumas foram representadas apenas por DAPs reduzidas, como parte de estrutura de encapsulamento externo (4%), periferia celular (10%), estrutura de encapsulamento externo (5%) e membrana plasmática (4%); enquanto as classes que foram apenas DAPs aumentadas englobam complexo catalítico (4%), projeção celular (2%), complexo oxidoreductase (2%), espaço periplasmático (2%). As demais classes foram representadas por DAPs aumentadas e reduzidas, respectivamente, como componente de membrana (9%, 8%), complexo ribonucleoproteico (4%, 4%), estruturas proteicas intracelulares (2%, 6%), estruturas proteicas sem membrana

(4%, 6%), envelope (2%, 5%), membrana externa (2%, 5%), intracelular (31%, 19%), parte intracelular (31%, 19%) e complexo proteico (2%, 4%).

### 5.2.2. Análise das principais proteínas e vias reguladas em resposta à sacarose

Com o objetivo de identificar as DAPs em resposta ao estresse provocado por sacarose, localizadas em membrana e citoplasma, utilizamos a ferramenta FUEL-Mloc para predição de localização subcelular e os bancos de dados KEGG Orthology e Uniprot para confirmar e/ou complementar os dados. As DAPs identificadas em membrana correspondem a 19% do total de DAPs aumentadas e a 50% das DAPs reduzidas. Já as DAPs identificadas com localização citoplasmática correspondem a 69% de DAPs aumentadas e a 46% das DAPs reduzidas. Outras proteínas de localização no nucleóide ou extracelular correspondem a 12% das DAPs aumentadas e a 4% das DAPs reduzidas (Figura 5).



**Figura 5. Localização celular das proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs - *Differentially Accumulated Protein*) em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob condição de estresse causado por sacarose. Localização subcelular por predição através de análises pela ferramenta FUEL-mLoc. As áreas dos círculos correspondem à proporção percentual de cada condição. Seta azul: DAPs aumentadas; seta vermelha: DAPs reduzidas.**



### **5.2.2.1. Principais DAPs em resposta à sacarose localizadas em membrana plasmática**

A predição de localização subcelular permitiu observar 15 DAPs aumentadas localizadas na membrana plasmática (Tabela 1). Entre estas DAPs, 5 proteínas estão na região periplasmática, enquanto as demais se distribuíram entre a camada externa (2 proteínas) e interna (8 proteínas) da membrana (Tabela 1).

Desse grupo, a proteína gluconato 2-desidrogenase (A9H186) se destaca por atuar diretamente no metabolismo do carbono. Outras proteínas que se mostraram interessantes são as transportadoras do tipo ABC de glicina-betaina (B5ZM28), atuando no influxo desse osmoprotetor, e a proteína de tolerância a tolueno (A9HBF1), envolvida na integridade da parede celular.

Entre as DAPs reduzidas, 97 estão localizadas na membrana (Tabela 1). A predição permitiu observar 26 proteínas na região da membrana externa, enquanto 28 proteínas foram localizadas na região periplasmática e 43 proteínas na região da camada interna da membrana plasmática.

Entre as DAPs reduzidas, estão as proteínas do tipo TonB dependentes (A9H7M7, A9HEU6, A9H7L7, A9HH16, A9HFL0, A9HFV5) e as proteínas TolR (A9HAZ8) e TolB (B5ZH27), que estão envolvidas no influxo de solutos, principalmente carboidratos. Adicionalmente, o presente trabalho identificou mais duas DAPs reduzidas, associadas ao influxo de açúcares - os transportadores tipo ABC de xilose (A9HNP0) e a proteína de ligação a D-ribose (A9HFZ1). Esses resultados sugerem redução do influxo de carboidratos.

Outras DAPs reduzidas interessantes são as porinas (A9HPF6, B5ZH63) e as proteínas OmpH (B5ZHX1) e OmpC (P84838), responsáveis pelo transporte de água e pequenas moléculas. Os dados sugerem redução de influxo de outros açúcares pelo fato de as DAPs reduzidas estarem associadas ao influxo desses carboidratos.

### **5.2.2.2. Principais DAPS em resposta à sacarose localizadas em citoplasma**

Em nosso trabalho foi possível identificar 142 DAPs presentes no citoplasma: 53 DAPs aumentadas e 89 DAPs reduzidas. Os resultados de predição

ainda nos permitiram identificar 5 DAPs com ação no meio extracelular e 2 DAPs no nucleóide (Tabela 2).

Entre as DAPs aumentadas, destacamos as proteínas glucose-6-fosfato desidrogenase (A9H0G0) e a transaldolase (A9H320), envolvidas no metabolismo de carboidratos, o que sugere sua ação na redução do potencial osmótico no meio intracelular. Outras proteínas identificadas foram as chaperonas DnaJ (A9HEA1) e HtpG (A9HLJ9), que são comumente associadas à proteção de macromoléculas sob condições de estresse celular, sendo sua presença indicio da ativação de mecanismos de proteção das células contra os danos causados pelo estresse por sacarose.

Já entre as DAPs reduzidas, chamam-nos atenção as proteínas envolvidas direta e indiretamente no processo de crescimento e divisão celular, como as proteínas de subunidades ribossomais (A9HS66, A9H1M6, A9H3I6, A9HS05, A9H3K9, A9HHS1, A9H3S4, B5ZJP1, A9HKW6), ATP sintases (A9H9A6, A9H9A1) bem como as proteínas de divisão celular FtsZ (A9H0K4) e ZapA (A9H7W9). Tais proteínas se destacam pelo seu importante papel na redução da taxa de multiplicação celular como resposta ao estresse por sacarose observado no presente trabalho.

**Tabela 1. Proteínas diferencialmente acumuladas com localização subcelular por predição na membrana plasmática de células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob estresse osmótico causado por 600 mM de sacarose em relação ao controle.** As proteínas foram consideradas diferencialmente acumuladas (DAPs - *Differentially Accumulated Protein*) quando apresentaram  $p < 0,05$  e diferença mínima de *fold change* de 1,5 em relação ao controle ( $\log_2$  *fold change*  $> 0,58$  DAPs aumentadas e  $< 0,58$  DAPs reduzidas). LC: Localização celular predita da proteína, MI: membrana interna, P: periplasma, ME: membrana externa.

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
DAPs aumentadas					
A9HED6	ME	ompW	OmpW family protein	0,6009	0,0408
B5ZM28	ME	Gdia_3402	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system	1,0871	0,0107
B5ZJL4	MI	Gdia_3086	Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase molybdopterin binding	0,7368	0,0165
A9H186	MI	adhB	Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)	0,8798	0,0155
B5ZJL7	MI	Gdia_3089	Membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase	0,8462	0,0055
A9HRT4	MI	nouF	NADH-quinone oxidoreductase chain F	4,0861	0,0083
A9HFG1	MI	GDI1414	Putative ATPase	1,0866	0,0337
A9H878	MI	GDI0555	Putative oxidoreductase	0,7583	0,0005
A9H9H6	MI	GDI3767	Uncharacterized protein	0,9838	0,0190
A9HIN9	MI	GDI1851	Uncharacterized protein	0,9889	0,0037
A9HBF6	P	galM	Aldose 1-epimerase	0,9763	0,0013
A9HA05	P	GDI3833	Beta-lactamase domain protein	1,0743	0,0025
B5ZJN0	P	Gdia_3102	Dihydroorotase	0,8331	0,0358
A9H221	P	GDI0146	Putative polyketide synthase	0,7965	0,0404
A9HBF1	P	GDI0864	Putative toluene tolerance	0,8182	0,0059
DAPs reduzidas					
A9H1M6	MI	rpsR	30S ribosomal protein S18	-1,5722	0,0469
A9HHS1	MI	rpmE	50S ribosomal protein L31	-1,0897	0,0151

**Tabela 1, Cont.**

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HPE7	MI	GDI2637	ABC transporter related (Sugar uptake ABC transporter ATP-binding protein)	-1,3727	0,0004
A9H9A6	MI	atpG	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit)	-1,1465	0,0000
A9H9A1	MI	atpH	ATP synthase subunit delta (ATP synthase F(1) sector subunit delta)	-0,7838	0,0272
A9HAR7	MI	GDI0785	Conserved protein	-0,6103	0,0393
B5ZDY0	MI	dadA	D-amino acid dehydrogenase	-0,7778	0,0059
A9HFZ1	MI	rbsB	D-ribose-binding protein	-2,3476	0,0004
B5ZLV1	MI	Gdia_1868	Entericidin EcnAB	-2,8583	0,0034
A9HPE1	MI	GDI2634	Extracellular solute-binding protein family 1 (Putative transporter protein)	-2,9039	0,0000
A9HB55	MI	GDI0826	Ferritin Dps family protein (Ferritin-like protein)	-0,6941	0,0072
A9HHD1	MI	fliN	Flagellar motor switch protein FlIN	-1,0925	0,0076
A9HK15	MI	adhB	Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)	-0,7334	0,0023
A9H108	MI	GDI3250	Glutamate-cysteine ligase	-1,8672	0,0003
A9HRU3	MI	nuoB2	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 2	-0,6792	0,0004
B5ZIC0	MI	Gdia_2922	Peptidase M16 domain protein	-0,7912	0,0240
A9HPB9	MI	rbsB	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	-2,8540	0,0000
A9HAZ8	MI	tolR	Protein TolR (Putative biopolymer transport protein)	-0,7661	0,0013
A9HDN7	MI	GDI1182	Putative exported protein	-0,9664	0,0295
A9HNY4	MI	GDI2576	Putative exported protein	-1,9357	0,0273
A9HAA2	MI	GDI0720	Putative membrane protein	-0,8193	0,0123
A9HI92	MI	GDI1796	Putative rare lipoprotein A (Rare lipoprotein A)	-0,7650	0,0125
A9HRH3	MI	tlpA	Putative Thiol:disulfide interchange protein tlpA	-1,6606	0,0007
A9H8F8	MI	tatA	Sec-independent protein translocase protein TatA	-2,2931	0,0091
B5ZCH4	MI	Gdia_0442	Sporulation domain protein	-1,1827	0,0170
B5ZID6	MI	Gdia_2938	Uncharacterized protein	-1,3763	0,0015
B5ZIU9	MI	Gdia_3009	Uncharacterized protein	-1,3995	0,0093
A9H4L3	MI	GDI3509	Uncharacterized protein	-1,5621	0,0061

**Tabela 1, Cont.**

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HJ39	MI	GDI1906	Uncharacterized protein	-0,6984	0,0140
B5ZH29	MI	Gdia_1355	Uncharacterized protein	-0,6829	0,0083
B5ZIB2	MI	Gdia_2914	Uncharacterized protein	-0,7532	0,0300
A9HAF1	MI	GDI0739	Uncharacterized protein	-0,8852	0,0052
A9HJF8	MI	GDI1958	Uncharacterized protein	-1,0333	0,0284
B5ZJP6	MI	Gdia_3118	Uncharacterized protein	-0,7644	0,0102
B5ZI01	MI	Gdia_1357	Uncharacterized protein	-2,0414	0,0020
A9H6W3	MI	GDI3616	Uncharacterized protein	-0,7596	0,0198
B5ZE49	MI	Gdia_2175	Uncharacterized protein	-0,8291	0,0343
A9HSZ0	MI	GDI3880	Uncharacterized protein	-2,0051	0,0455
A9HSC1	MI	GDI3113	Uncharacterized protein	-2,1804	0,0011
A9HFF2	MI	GDI1410	Uncharacterized protein	-2,2665	0,0047
A9HRJ8	MI	GDI2983	Uncharacterized protein	-2,2077	0,0079
A9HMQ3	MI	GDI2392	Uncharacterized protein	-1,0155	0,0137
A9HIX9	MI	GDI1885	Uncharacterized protein	-0,8271	0,0338
A9HT68	ME	GDI3901	Conjugal transfer	-0,6274	0,0215
A9HFQ7	ME	GDI1453	Conserved protein	-0,8931	0,0100
A9HRX5	ME	iscA	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein	-0,5986	0,0490
A9HS35	ME	GDI3078	Lipoprotein SmpA/OmlA family (SmpA/OmlA domain protein)	-0,9800	0,0054
A9HK87	ME	mltA	MltA domain protein	-1,6773	0,0034
B5ZIL8	ME	Gdia_1481	Nitrogen regulatory protein P-II	-1,4293	0,0379
A9GZP4	ME	GDI0041	OmpA/MotB domain protein (Outer membrane protein)	-0,5911	0,0141
A9HB05	ME	omp	Outer membrane lipoprotein omp16 (Peptidoglycan-associated lipoprotein)	-1,6823	0,0008
P84838	ME	GDI2185	Outer membrane protein (OMPC)	-0,7225	0,0055
A9H0L0	ME	bamD	Outer membrane protein assembly factor BamD	-0,5890	0,0068
B5ZH63	ME	Gdia_1247	Porin	-0,6889	0,0235

**Tabela 1, Cont.**

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HPF6	ME	oprB	Porin	-1,5224	0,0000
A9H7Z8	ME	glnB	Putative nitrogen regulatory protein	-1,2271	0,0034
A9HMOV6	ME	ctrA	Putative polysaccharide export protein	-0,6056	0,0460
A9HEU6	ME	GDI1338	Putative tonB-dependent receptor	-1,7586	0,0002
A9H7L3	ME	GDI3713	Putative TonB-dependent receptor	-2,4329	0,0003
A9H7M7	ME	GDI3718	Putative tonB-dependent receptor protein	-1,3236	0,0001
A9HH16	ME	TonB	Putative tTnB-dependent receptor (TonB-dependent receptor)	-2,5030	0,0002
A9H134	ME	GDI3260	Pyrrolo-quinoline quinone	-0,8445	0,0018
A9HLS1	ME	hfq	RNA-binding protein Hfq	-0,6997	0,0269
A9HFL0	ME	GDI1434	TonB-dependent receptor	-0,7664	0,0267
A9HFV5	ME	GDI1471	TonB-dependent Receptor protein	-0,8365	0,0058
A9HRD5	ME	GDI2939	Uncharacterized protein	-0,8758	0,0043
A9HSF6	ME	GDI3129	Uncharacterized protein	-1,4095	0,0196
A9HB64	ME	GDI0829	Uncharacterized protein	-0,8128	0,0013
A9HLI9	ME	GDI2229	Uncharacterized protein	-0,8866	0,0164
B5ZE32	P	Gdia_2158	2-alkenal reductase	-0,9585	0,0301
A9HS66	P	rpsP	30S ribosomal protein S16	-0,6244	0,0279
A9H3I6	P	rplQ	50S ribosomal protein L17	-1,4940	0,0133
A9HS05	P	rpmB	50S ribosomal protein L28	-1,2166	0,0147
A9H3K9	P	rpmD	50S ribosomal protein L30	-0,6287	0,0484
A9H3S4	P	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	-1,6132	0,0132
B5ZF45	P	Gdia_2335	Amine dehydrogenase	-0,7359	0,0031
B5ZIA2	P	clpS	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS	-1,1898	0,0181
A9HA12	P	GDI3836	CBS domain containing protein	-3,0195	0,0001
A9H1L4	P	surA	Chaperone SurA	-0,8424	0,0015
A9HID9	P	GDI1814	Conserved protein	-0,9149	0,0166

**Tabela 1, Cont.**

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HHR5	P	GDI1728	Conserved protein	-1,0315	0,0277
A9HIK8	P	GDI1838	DSBA oxidoreductase (Thioredoxin protein)	-0,7730	0,0422
A9HNPO	P	xylF	D-xylose ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein	-2,5608	0,0000
B5ZD75	P	Gdia_0514	Gamma-glutamyltranspeptidase	-3,1131	0,0452
A9HM18	P	ggt	Gamma-glutamyltranspeptidase	-0,8461	0,0112
A9HKL6	P	GDI2113	NADH dehydrogenase (Ubiquinone)	-1,5787	0,0001
B5ZL84	P	Gdia_3299	NUDIX hydrolase	-1,0661	0,0326
A9HKU8	P	GDI2144	Outer membrane protein	-2,3734	0,0030
A9H103	P	lolA	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	-0,6872	0,0094
B5ZF17	P	Gdia_0871	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator	-1,3718	0,0002
A9HNW8	P	GDI2570	PRC-barrel protein	-0,8028	0,0085
B5ZH27	P	tolB	Protein TolB	-0,7679	0,0179
A9HN59	P	GDI2454	Putative endoribonuclease protein	-0,8641	0,0133
A9HGR9	P	GDI1597	Putative extracellular solute-binding protein, PotD/PotF family	-0,9617	0,0305
A9H577	P	GDI0354	Putative periplasmic binding proteins	-2,3930	0,0001
A9HRF1	P	sucD	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	-2,0115	0,0024
A9HFY2	P	GDI1483	Ycel family protein	-1,4594	0,0025

**Tabela 2. Proteínas citoplasmáticas, por predição, diferencialmente acumuladas em células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob estresse osmótico causado por 600 mM de sacarose em relação ao controle.** As proteínas foram consideradas diferencialmente acumuladas (DAPs - *Differentially Accumulated Protein*) quando apresentaram  $p < 0,05$  e diferença mínima de 1,5 vezes de abundância em relação ao controle ( $\log_2$  fold change  $> 0,58$  DAPs aumentadas e  $< 0,58$  DAPs reduzidas). LC: Localização celular predita da proteína, CI: citoplasma, EX: extracelular, NU: nucleóide.

Uniprot_ID	LC	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
DAPs aumentadas					
A9HNX4	CI	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	2,9159	0,0004
A9HL10	CI	GDI2166	6-phosphogluconate dehydrogenase NAD-binding	1,6127	0,0002
B5ZLQ6	CI	ackA	Acetate kinase	1,0398	0,0072
A9HHS9	CI	GDI1733	Acetoin(Diacetyl) reductase	0,6683	0,0059
A9HJB2	CI	pdhC	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	1,6742	0,0030
A9HRP0	CI	GDI3009	Acyl-[acyl-carrier-protein]--udp-n-acetylglucosamine o-acyltransferas	0,6161	0,0314
B5ZE05	CI	ahcY	Adenosylhomocysteinase	1,4005	0,0431
A9HNN4	CI	adhC	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein	0,8453	0,0462
A9HNA5	CI	adh	Alcohol dehydrogenase	1,4018	0,0010
B5ZFA6	CI	Gdia_2400	Aldehyde Dehydrogenase	0,8896	0,0212
A9H4V7	CI	aldA	Aldehyde Dehydrogenase	0,8925	0,0216
A9HBU6	CI	otsA	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)	0,7252	0,0420
A9HMM0	CI	GDI2378	Aminopeptidase	1,2065	0,0399
A9HFU5	CI	GDI1467	Aminopeptidase	0,6058	0,0389
B5ZLC7	CI	Gdia_3342	Beta-lactamase domain protein	1,2682	0,0190
A9HK54	CI	GDI2054	Carboxymethylenebutenolidase	0,9842	0,0057
A9HEA1	CI	dnaj	Chaperone protein DnaJ	0,7186	0,0001
A9HLJ9	CI	htpG	Chaperone protein HtpG	1,4052	0,0134
B5ZKX2	CI	Gdia_0285	Cytochrome-c peroxidase	1,4138	0,0002



**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HRP9	CI	hemB	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	0,6738	0,0368
A9HI24	CI	coaBC	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	1,0837	0,0215
B5ZL88	CI	fusA	Elongation factor G	1,1774	0,0366
A9HE55	CI	GDI1243	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	0,6105	0,0119
B5ZGM4	CI	Gdia_1149	Fumarate hydratase class I	1,1793	0,0413
A9H0G0	CI	zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,8761	0,0314
A9HM86	CI	glyrs	Glycine--tRNA ligase beta subunit	0,7653	0,0099
A9HKK6	CI	GDI2110	Group B oligopeptidase pepB	0,8830	0,0163
B5ZFU6	CI	Gdia_2504	Homoserine dehydrogenase	0,9120	0,0186
B5ZH61	CI	Gdia_1245	Intracellular protease, Pfpl family	1,2672	0,0005
A9HJY3	CI	pepA	Leucyl aminopeptidase	0,7877	0,0159
A9HK29	CI	lysS	Lysine--tRNA ligase	0,6707	0,0045
A9HH05	CI	mod1	Malate dehydrogenase (Oxaloacetate-decarboxylating) (NADP(+))	3,0931	0,0129
A9HBL5	CI	mtlK	Mannitol 2-dehydrogenase	2,0806	0,0021
B5ZEV5	CI	Gdia_0809	Methylenetetrahydrofolate reductase	1,7625	0,0001
B5ZDG9	CI	Gdia_2039	Peptidase M20	1,5965	0,0031
A9HGX3	CI	GDI1617	Probable phosphoketolase	1,6324	0,0026
A9HMR4	CI	klb	Putative 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	1,1035	0,0431
A9H7X7	CI	GDI0518	Putative acyl-CoA thioester hydrolase	2,1868	0,0017
A9HNX8	CI	GDI2574	Putative methyltransferase protein	2,1311	0,0002
A9HJA9	CI	pdhB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta	1,4140	0,0176
A9HIP1	CI	frmA	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase	1,5932	0,0043
A9HIP3	CI	GDI1853	S-formylglutathione hydrolase	1,9919	0,0013
A9GZG8	CI	aroE	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))	0,6193	0,0293
B5ZG30	CI	Gdia_1049	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	1,8278	0,0192
A9HS68	CI	ffh	Signal recognition particle protein	0,8535	0,0409

**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
B5ZK29	CI	Gdia_0168	TOBE domain protein	0,8652	0,0132
A9H320	CI	tal	Transaldolase	2,7681	0,0066
B5ZF58	CI	Gdia_2348	Transketolase	2,6804	0,0031
A9H3Z8	CI	GDI3437	Uncharacterized protein	1,2744	0,0199
A9HKE4	CI	GDI2087	Uncharacterized protein	0,8680	0,0004
A9HH52	CI	GDI1651	Uncharacterized protein	0,9825	0,0261
A9HCR3	CI	GDI1037	Uncharacterized protein	0,5929	0,0024
A9HKW8	CI	pyrH	Uridylate kinase	0,6447	0,0104
A9H5P1	EX	GDI0415	Bacteriocin protein	0,5961	0,0373
A9HKD9	EX	GDI2085	Carboxypeptidase 1	0,6039	0,0086
A9HH66	EX	flaC	Flagellin	0,7024	0,0003
A9HBG9	EX	GDI0871	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase	1,4597	0,0186
B5ZG78	EX	Gdia_2538	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3	4,6723	0,0001
A9HSA2	EX	GDI3106	Oligoendopeptidase F	2,0238	0,0156
A9HN12	EX	GDI2435	Putative glycyl aminopeptidase	0,9447	0,0011
A9HC53	EX	GDI0957	Uncharacterized protein	2,8558	0,0032
A9HDU3	EX	GDI1201	UPF0303 protein GDI1201	0,6151	0,0041
DAPS reduzidas					
A9HK46	CI	groS	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)	-0,6972	0,0105
A9HPH9	CI	groS	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)	-1,4348	0,0017
A9HL34	CI	dgoA	3.3.7	-1,4907	0,0002
A9HPH6	CI	groL2	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)	-0,8352	0,0029
A9H073	CI	GDI3142	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein (Putative D-xylulose reductase)	-1,3635	0,0043
A9H8D2	CI	ahpD	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD	-0,6306	0,0018
A9HNM6	CI	GDI2523	Amidinotransferase (Arginine deiminase)	-0,6638	0,0432
A9H743	CI	arsC	Arsenate reductase	-1,8941	0,0192

**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HCR1	CI	clpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-0,7256	0,0084
A9H7G6	CI	BFR	Bacterioferritin	-1,4375	0,0166
A9HDN9	CI	purH	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH [Includes: IMP cyclohydrolase	-0,6960	0,0177
A9H0K4	CI	ftsZ	Cell division protein FtsZ	-0,9355	0,0004
A9H7W9	CI	GDI0515	Cell division protein ZapA	-1,2851	0,0286
B5ZCI4	CI	htpG	Chaperone protein HtpG	-2,4343	0,0001
A9H2I4	CI	GDI0213	Choloylglycine hydrolase	-1,2503	0,0036
B5ZGZ0	CI	Gdia_1174	CHRD domain containing protein	-1,6230	0,0124
A5YJ14	CI	csp	Cold shock protein (Cold-shock DNA-binding domain protein)	-1,0196	0,0099
A9HIW8	CI	cspE	Cold shock-like protein cspE	-0,9697	0,0021
A9HSH2	CI	GDI3136	Conserved protein	-0,7206	0,0208
A9HLD1	CI	GDI2208	CRISPR-associated protein, Cse2 family	-0,7557	0,0041
A9H4K8	CI	GDI3507	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase	-0,8324	0,0070
A9HRU7	CI	hup	DNA-binding protein HU (Histone family protein DNA-binding protein)	-1,3842	0,0041
A9HKY5	CI	rpoZ	DNA-directed RNA polymerase subunit omega (RNAP omega subunit)	-0,6868	0,0464
B5ZJ92	CI	ybeY	Endoribonuclease YbeY	-2,3399	0,0131
A9H0F2	CI	proB	Glutamate 5-kinase	-1,6437	0,0392
A9H0B5	CI	ihfB	Integration host factor subunit beta (IHF-beta)	-0,7626	0,0271
A9HBR3	CI	icd	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	-2,1099	0,0010
B5ZD05	CI	purE	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase (N5-CAIR mutase)	-0,8757	0,0200
A9H FY5	CI	GDI1484	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)	-1,2180	0,0002
B5ZL17	CI	Gdia_1775	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase	-0,7404	0,0018
B5ZH X1	CI	Gdia_2868	Outer membrane chaperone Skp (OmpH)	-0,8525	0,0234
B5ZE41	CI	Gdia_2167	Peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase	-1,4594	0,0031
B5ZDT0	CI	Gdia_0622	Peptidase M29 aminopeptidase II	-0,6612	0,0477
B5ZD42	CI	msrA	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA	-0,9447	0,0035

**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9H8M9	CI	pckA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (PCK)	-1,6652	0,0001
A9HEA5	CI	grpE	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)	-0,9581	0,0344
A9H2M9	CI	GDI0231	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase	-0,8730	0,0030
A9H716	CI	GDI3639	Putative Acetyltransferase	-1,7218	0,0003
A9HQR7	CI	GDI2841	Putative aldo-keto reductase	-1,9615	0,0082
A9HHE7	CI	cheY	Putative chemotaxis protein cheY (Response regulator receiver protein)	-0,9705	0,0251
A9HQE8	CI	GDI2784	Putative dehydrogenase	-0,6114	0,0039
A9HQJ8	CI	GDI2811	Putative DNA binding protein	-0,8121	0,0160
A9HR15	CI	hup	Putative DNA-binding protein HU	-0,6134	0,0050
A9HCM2	CI	GDI1020	Putative DNA-binding protein HU-beta	-0,7259	0,0106
B5ZCR1	CI	Gdia_1959	Putative ferric uptake regulator, Fur family	-0,7084	0,0280
A9HP16	CI	GDI2589	Putative GAF sensor protein	-0,9715	0,0114
A9HEQ1	CI	GDI1321	Putative membrane protein	-1,0882	0,0303
A9HM21	CI	GDI2298	Putative oxidoreductase	-0,7119	0,0316
A9HQA9	CI	msrB	Putative peptide methionine sulfoxide reductase msrB	-2,3040	0,0006
A9H0U0	CI	osmC	Putative peroxiredoxin osmC	-0,6232	0,0114
A9HHP4	CI	GDI1720	Putative pyruvate dehydrogenase E2 component	-1,1427	0,0001
A9HPG2	CI	rbtD	Putative ribitol 2-dehydrogenase	-1,7238	0,0000
A9HR22	CI	GDI2884	Putative ROS/MUCR transcriptional regulator protein	-1,4650	0,0025
A9HFD0	CI	GDI1401	Putative transcriptional Regulator	-1,5704	0,0265
A9H0C0	CI	mucR	Putative transcriptional regulator protein (Transcriptional regulator)	-1,6505	0,0038
A9HRZ0	CI	GDI3060	Putative transcriptional regulator, rrf2 family (Transcriptional regulator)	-1,0434	0,0036
A9H9Q2	CI	GDI3795	Putative transcriptional regulator, TetR family (Transcriptional regulator)	-0,8450	0,0166
B5ZJP1	CI	Gdia_3113	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E	-0,7855	0,0126
A9HKW6	CI	frr	Ribosome-recycling factor (RRF) (Ribosome-releasing factor)	-0,9968	0,0223
A9H9Q9	CI	dksA	RNA polymerase-binding transcription factor DksA	-2,0343	0,0007

**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HFC1	CI	GDI1397	ROS/MUCR transcriptional regulator protein (Transcriptional regulator)	-1,4732	0,0252
B5ZM10	CI	aroE	Shikimate dehydrogenase (NADP(+)) (SDH)	-0,7758	0,0332
B5ZEZ8	CI	Gdia_0852	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	-1,0755	0,0163
A9HT87	CI	GDI3912	Single-stranded DNA-binding protein	-1,9948	0,0138
B5ZEL9	CI	Gdia_2254	Thioredoxin domain	-0,5853	0,0057
B5ZL80	CI	Gdia_3295	Transcriptional regulator, MerR Family	-0,6740	0,0078
A9HFM1	CI	infA	Translation initiation factor IF-1	-0,9300	0,0333
A9HJ86	CI	tpiA	Triosephosphate isomerase (TIM) (TPI)	-1,1726	0,0001
A9HJ43	CI	ubiG	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase	-1,1969	0,0019
A9HKU5	CI	lpxD	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase	-1,1909	0,0045
B5ZDK7	CI	Gdia_2077	Uncharacterized protein	-0,6712	0,0064
A9HC81	CI	GDI0968	Uncharacterized protein	-1,6369	0,0069
B5ZL86	CI	Gdia_3301	Uncharacterized protein	-3,2460	0,0092
B5ZK04	CI	Gdia_0143	Uncharacterized protein	-0,6899	0,0072
B5ZD88	CI	Gdia_0527	Uncharacterized protein	-1,5231	0,0030
B5ZH69	CI	Gdia_1253	Uncharacterized protein	-0,8703	0,0335
A9HFW9	CI	GDI1477	Uncharacterized protein	-1,9240	0,0234
B5ZKM7	CI	Gdia_3274	Uncharacterized protein	-0,7717	0,0061
A9HT05	CI	GDI3884	Uncharacterized protein	-0,9978	0,0123
A9HFS9	CI	GDI1460	Uncharacterized protein	-2,0002	0,0125
A9HT76	CI	GDI3906	Uncharacterized protein	-1,3851	0,0021
A9HJX9	CI	GDI2026	Uncharacterized protein	-1,1982	0,0066
A9HMM2	CI	GDI2379	Uncharacterized protein	-1,1906	0,0143
A9HMD9	CI	GDI2353	Uncharacterized protein	-1,3483	0,0090
A9GZL6	CI	GDI0031	Uncharacterized protein	-1,5572	0,0073
A9HB09	CI	GDI0808	Uncharacterized protein	-1,7998	0,0012

**Tabela 2, Cont.**

Uniprot_ID	LM	Gene	Proteína	Log <sub>2</sub> Fold change	p-value
A9HPS1	CI	GDI2682	Uncharacterized protein	-2,2838	0,0039
A9H6D7	CI	GDI0505	Uncharacterized protein	-0,8383	0,0492
A9H298	CI	GDI0182	UPF0434 protein GDI0182/Gdia_2252	-1,5462	0,0314
A9HS32	EX	GDI3077	Conserved protein	-1,2280	0,0180
A9H211	EX	GDI0212	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase (Putative Glyoxalase)	-1,8022	0,0064
A9H732	EX	GDI3645	Uncharacterized protein	-0,6776	0,0125
A9H0M6	EX	GDI3204	Uncharacterized protein	-2,5104	0,0026
A9H0F8	EX	GDI3176	UPF0335 protein GDI3176	-2,6973	0,0065
A9HLY4	NU	minE	Cell division topological specificity factor	-0,7178	0,0394
A9HLY0	NU	minC	Probable septum site-determining protein MinC	-2,1864	0,0013

### 5.2.3. Proteínas hipotéticas diferencialmente acumuladas

Nossos trabalhos de análise proteômica permitiram identificar 141 proteínas previamente descritas como hipotéticas, revelando que se tratam de proteínas reais. Entre elas, 53 se mostraram diferencialmente acumuladas em resposta à sacarose - 7 DAPs aumentadas e 46 DAPs reduzidas (Tabela suplementar 1; 2).

Entre as proteínas preditas na região de membrana, destaca-se a presença de 2 DAPs aumentadas e de 22 DAPs reduzidas que ainda não foram caracterizadas (proteínas hipotéticas) (Tabela 1). No citoplasma, por sua vez, foram encontradas 4 DAPs aumentadas e 18 DAPs reduzidas (Tabela 2). As análises de predição de localização subcelular ainda permitiram identificar 1 DAP aumentada e 2 proteínas DAPs reduzidas de ação extracelular. Houve 4 DAPs tidas como hipotéticas, cujos estudos de predição de localização subcelular não puderam identificar sua localização.

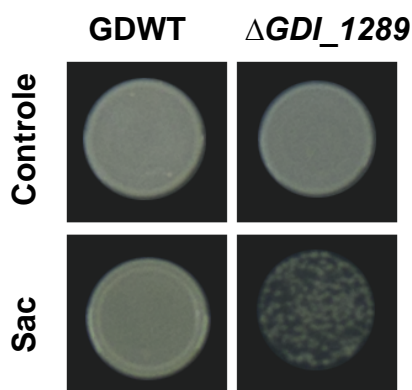
Essas proteínas representaram 9% das DAPs aumentadas e 21% das DAPs reduzidas que até então não apresentavam quaisquer caracterizações a respeito de sua função em *G. diazotrophicus*. Essas proteínas foram diferencialmente acumuladas em *G. diazotrophicus* PAI 5 em resposta ao estresse causado por sacarose quando comparadas ao seu controle, sugerindo a importância de seu estudo. Nossos resultados mostram que essas proteínas desempenham papel importante na resposta a estresse por sacarose, merecendo, portanto, caracterizações futuras.

### 5.3. Seleção de mutantes insercionais para proteínas hipotéticas na tolerância a estresse causado por sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5

A observação de que diversas proteínas hipotéticas participam da resposta a estresse por sacarose justificou a análise de um banco de mutantes insercionais de *G. diazotrophicus* PAI 5, no intuito de identificar genes codificadores de proteínas hipotéticas cujo silenciamento afetasse a resistência à sacarose.

Neste sentido, procedeu-se a um *screening* de mutantes insercionais para proteínas hipotéticas, utilizando o banco de mutantes de *G. diazotrophicus* (Intorne *et al.*, 2009). Mutantes da biblioteca foram analisados em meio DYGS sólido,

suplementado com 600 mM de sacarose. Os resultados permitiram selecionar o mutante GDP09A11, gerado pela inserção do transposon Tn5 no gene *GDI\_1289* (*Locus tag*: GDI\_1289), responsável por codificar uma proteína hipotética com domínio de função desconhecida DUF1275, segundo dados do *Conserved Domain Database* (CDD) do NCBI. O mutante  $\Delta GDI_1289$  apresentou menor crescimento em relação à estirpe selvagem (GDWT) quando cultivado em meio DYGS sólido suplementado com 600 Mm de sacarose. Essa diferença de crescimento entre as estirpes selvagem (GDWT) e  $\Delta GDI_1289$  não foi observada na condição controle (Figura 6). O resultado observado sugere a importância da proteína hipotética codificada por *GDI\_1289* na resposta de tolerância à sacarose.



**Figura 6. Sensibilidade do mutante  $\Delta GDI_1289$  ao estresse por sacarose.** Comparação entre a estirpe selvagem (GDWT) e  $\Delta GDI_1289$  quanto à sensibilidade a 600 mM de sacarose em meio DYGS sólido. Sac: sacarose 600 mM.

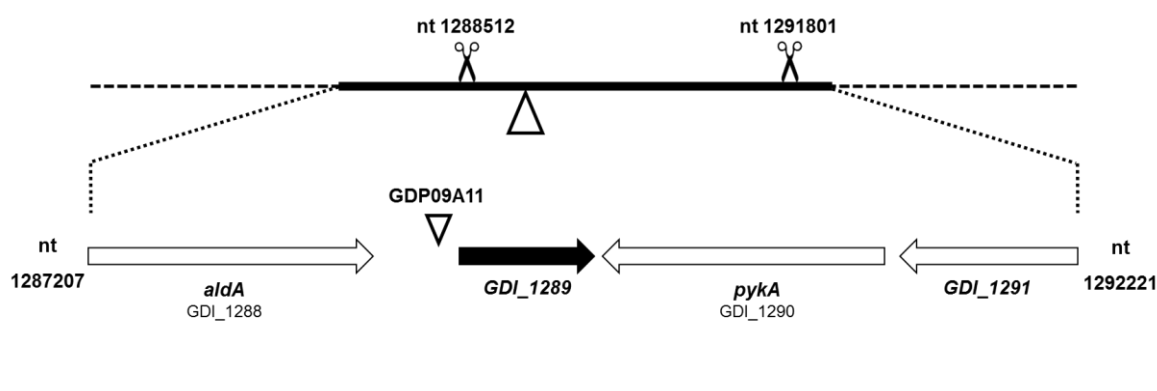
### 5.3.1. Organização genômica do gene *GDI\_1289* em *G. diazotrophicus* PAI 5

Para identificar a região de inserção do transposon Tn5 no mutante  $\Delta GDI_1289$ , a sequência da região flanqueadora do transposon foi utilizada para análises de alinhamento de sequências com base no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5. Os resultados mostraram que a inserção ocorreu na posição -116 pb *upstream* ao gene *GDI\_1289* (Figura 7), sugerindo que a inserção tenha ocorrido na região regulatória do gene interrompido. A análise do contexto genômico do gene *GDI\_1289*, também foi feita (Figura 7). O gene *pykA* (*Locus tag*: GDI\_1290),



imediatamente posterior ao gene *GDI\_1289*, codifica a enzima piruvato quinase. Contudo, suas fases de leitura aberta estão orientadas em sentidos opostos da transcrição. Análises da região anterior ao gene *GDI\_1289* mostraram presença do gene *aldA* (*Locus tag*: *GDI\_1288*), que codifica a enzima aldeído desidrogenase, cuja distância intergênica entre eles é de 431 pb. A análise de contexto genômico permitiu identificar um outro gene, *GDI\_1291*, responsável por codificar outra proteína hipotética.

Nossos resultados nos permitem afirmar que o gene não se encontra organizado em operon, permitindo sugerir que o gene tem região regulatória ainda não caracterizada. Análises futuras de complementação funcional fazem-se necessárias para confirmar que a região de inserção do transposon é responsável pela regulação do gene *GDI\_1289*.



**Figura 7. Localização genômica do mutante  $\Delta GDI_1289$ .** Organização genômica dos genes flanqueando a inserção do transposon Tn5 em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. Grupo gênico flanqueando *GDI\_1289* de acordo com a base de dados do NCBI. As setas indicam a orientação da fase de leitura aberta. Seta preta: gene *GDI\_1289* interrompido neste estudo; setas brancas: genes não interrompidos; nt; nucleotídeo; tesouras pretas: sítios de restrição de *EcoRI* imediatamente antes e após o local de inserção de Tn5 no gene *GDI\_1289*; triângulo branco: sítio de inserção de Tn5 na região *upstream* do gene *GDI\_1289*. Barra de escala: 500 pb.

### 5.3.2. Similaridade da proteína hipotética codificada por *GDI\_1289* de *G. diazotrophicus* PAI 5 com proteínas de outras espécies

No intuito de avaliar a similaridade entre a proteína hipotética codificada pelo gene *GDI\_1289* e proteínas homólogas de outras espécies de bactérias, foi feito seu alinhamento. A sequência da proteína hipotética codificada por *GDI\_1289* apresentou alta similaridade (64,9 – 72,5%), com sequências de proteínas da espécie *Frateuria aurantia* e do gênero *Acetobacter*. A análise de domínios transmembrana possibilitou identificar alta similaridade do número de domínios entre as proteínas das espécies avaliadas, variando de 4 - 6 (Tabela 2). É importante destacar que todas as proteínas analisadas apresentaram alta similaridade com a proteína hipotética codificada por *GDI\_1289* e também o domínio DUF1275, como observado no banco de dados Uniprot.

**Tabela 2. Comparação das sequências da proteína hipotética de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 com proteínas homólogas**

Organismo	S(%) <sup>a</sup>	I(%) <sup>b</sup>	AA <sup>c</sup>	TMH <sup>d</sup>	Acesso <sup>e</sup>
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAI 5	100	100	228	6	A9HEH2
<i>Frateuria aurantia</i> (ATCC 33424)	72,5	59,2	231	5	H8L1Q4
<i>Acetobacter orientalis</i> 21F-2	71,6	57,6	227	6	A0A0D6NLR5
<i>A. tropicalis</i> NBRC 101654	71,4	55,6	232	5	F7VH63
<i>A. cerevisiae</i>	71,2	55,0	227	4	A0A149UY63
<i>A. pasteurianus</i>	64,9	49,2	243	6	C7JEM2

<sup>a</sup>Porcentagem de similaridade

<sup>b</sup>Porcentagem de identidade

<sup>c</sup>Número de aminoácidos

<sup>d</sup>Número de domínios transmembrana (TMH)

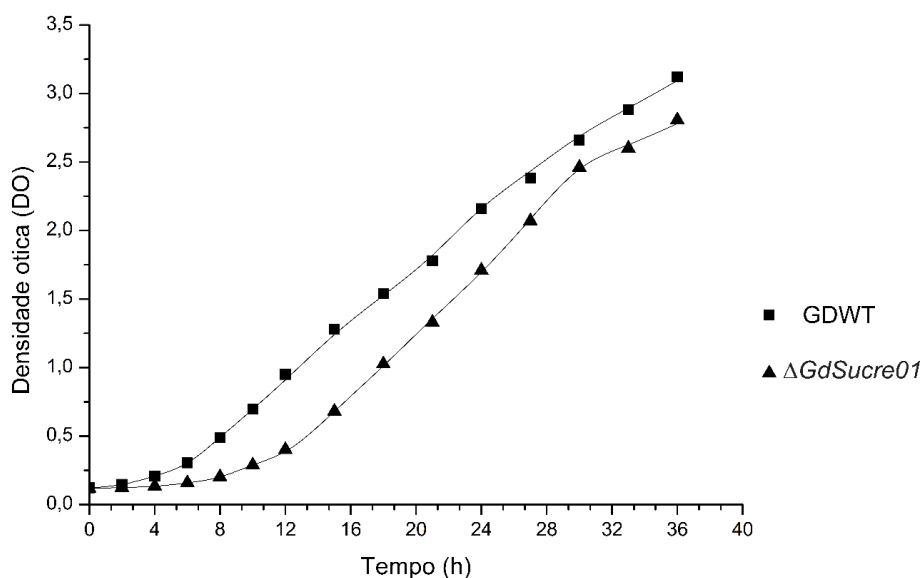
<sup>e</sup>Código de acesso Uniprot

A proteína codificada pelo gene *GDI\_1289* não tem caracterização prévia em *G. diazotrophicus*, tendo sido anotada como proteína hipotética. No entanto, nossos resultados acerca da relevância funcional desse gene sugerem tratar-se de uma proteína responsiva ao estresse provocado por sacarose. Neste sentido, propomos que o gene *GDI\_1289* seja renomeado como *GdSucre01* e seu respectivo mutante  $\Delta GdSucre01$ . Tais nomenclaturas serão utilizadas nas abordagens subsequentes deste trabalho.

### 5.3.3. Efeito da mutação $\Delta GdSucre01$ na multiplicação celular em meio líquido

Com o objetivo de avaliar o efeito da mutação na multiplicação celular, a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram cultivados em meio LGI modificado por 36 horas, tendo seu crescimento sido avaliado no decorrer desse tempo. O mutante apresentou taxa de crescimento menor que a estirpe selvagem, mostrando ter uma fase *lag* inicial média de 8 horas, correspondente ao dobro do tempo observado para a estirpe selvagem (Figura 8). Os resultados mostram, portanto, que a mutação afeta a fisiologia de crescimento do mutante  $\Delta GdSucre01$  em relação à estirpe selvagem.

Para maior acurácia dos resultados quanto à caracterização do papel do gene *GdSucre01* na tolerância a diferentes estresses abióticos e características de promoção de crescimento, foram utilizados a estirpe selvagem e o mutante em mesma condição fisiológica, de acordo com a curva de cultivo feita. Para tanto, a fase exponencial de crescimento utilizada para a estirpe selvagem foi fixada em  $DO_{600}$  de 1,6 e para o mutante em  $DO_{600}$  de 1,2.



**Figura 8. Comparação entre as curvas de crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 e do mutante.** A estirpe selvagem (GDWT) e mutante  $\Delta GdSucre01$  foram crescidos em meio LGI modificado, a 30 °C, a 250 min<sup>-1</sup>. O crescimento foi avaliado por leitura de densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) a cada 2 horas até 12 horas de cultivo e a cada 3 horas até 36 horas de cultivo.

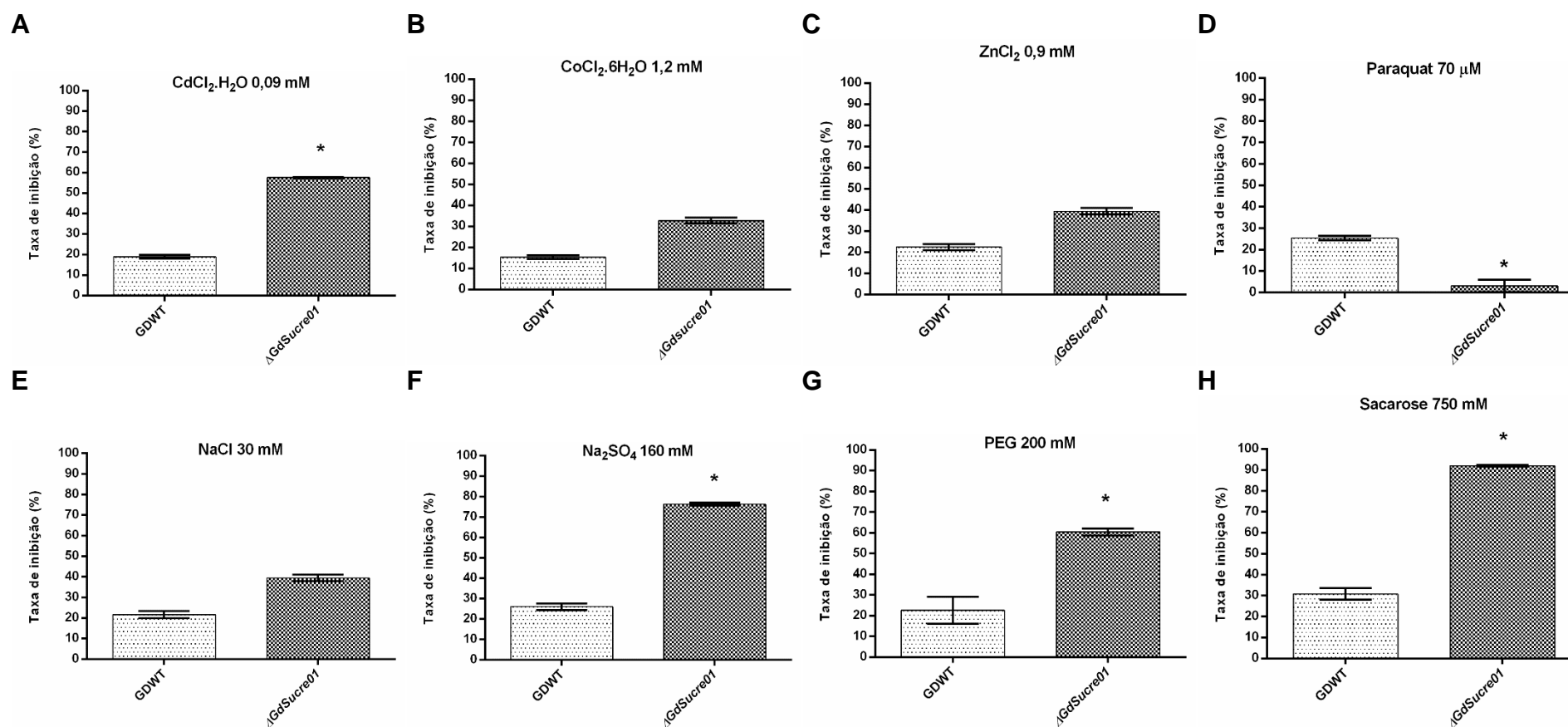
#### 5.3.4. Importância da proteína codificada por *GdSucre01* na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* PAI 5

Com o objetivo de avaliar a importância do gene *GdSucre01* na tolerância a estresses abióticos em *G. diazotrophicus* PAI 5, a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram cultivados em meio líquido LGI modificado na condição controle e sob diferentes estresses abióticos. Foram avaliados os seguintes agentes estressores: cádmio ( $CdCl_2 \cdot H_2O$  0,09 mM), cobalto ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  1,2 mM) e zinco ( $ZnCl_2$  0,9 mM) (estresse por metais pesados); cloreto de sódio (NaCl 30 mM), sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$  160 mM), polietilenoglicol 400 (PEG400 200 mM) e sacarose (750 mM) (estresse osmótico/salino); e paraquat (70  $\mu M$ ) (estresse oxidativo).

O mutante  $\Delta GdSucre01$  apresentou sensibilidade em relação à estirpe selvagem quando submetido aos diferentes estresses por metais pesados, destacando-se uma maior taxa de inibição para o metal cádmio (57%) (Figura 9A). Quando observamos a taxa de inibição no estresse salino, o mutante apresentou sensibilidade ao estresse salino provocado por cloreto de sódio (39%).

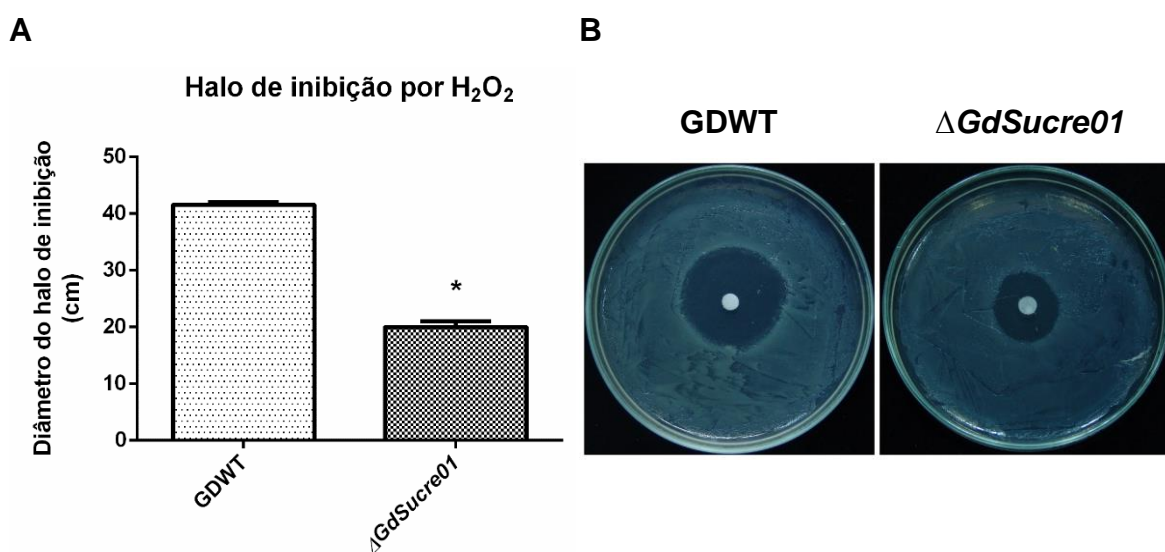
O mutante apresentou elevada sensibilidade aos agentes que provocam estresses osmóticos, com forte inibição do crescimento provocada por sulfato de sódio (76% de inibição), PEG400 (60% de inibição) e sacarose (92% de inibição) (Figura 9F-H). Esses resultados relacionados confirmaram a importância do gene *GdSucre01* na tolerância de *G. diazotrophicus* a condições de estresse osmótico.

Em contrapartida, o mutante  $\Delta GdSucre01$  apresentou aumento na tolerância ao estresse provocado por paraquat (3% de inibição) em comparação à estirpe selvagem (25% de inibição) (Figura 9D).



**Figura 9. Efeito dos diferentes estresses abióticos no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5 selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$ .** Taxa de inibição baseada no percentual de crescimento da bactéria na presença do estresse em relação aos seus respectivos controles. A estirpe selvagem (WT) e mutante  $\Delta GdSucre01$  foram crescidas em meio líquido LGI modificado, suplementado com diferentes agentes estressores: (A) cádmio ( $CdCl_2 \cdot H_2O$  0,09 mM), (B) cobalto e (C) zinco (metais pesados); (D) paraquat (Paraquat 70  $\mu M$ ) (oxidativo); (E) cloreto de sódio (NaCl 30 mM), (F) sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$  160 mM), (G) polietilenoglicol 400 (PEG400 200 mM) e (H) sacarose (sacarose 750 mM) (salino/osmótico). Os resultados foram coletados após 24 horas de cultivo. Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (n=5).

Para avaliar o papel do gene de estudo na resposta ao estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio, foi feito um ensaio de halo de inibição. Os resultados observados mostraram que o mutante  $\Delta GdSucre01$  apresentou maior tolerância à presença de peróxido de hidrogênio, com halo de inibição 48% menor em relação ao halo observado para a estirpe selvagem (Figura 10).



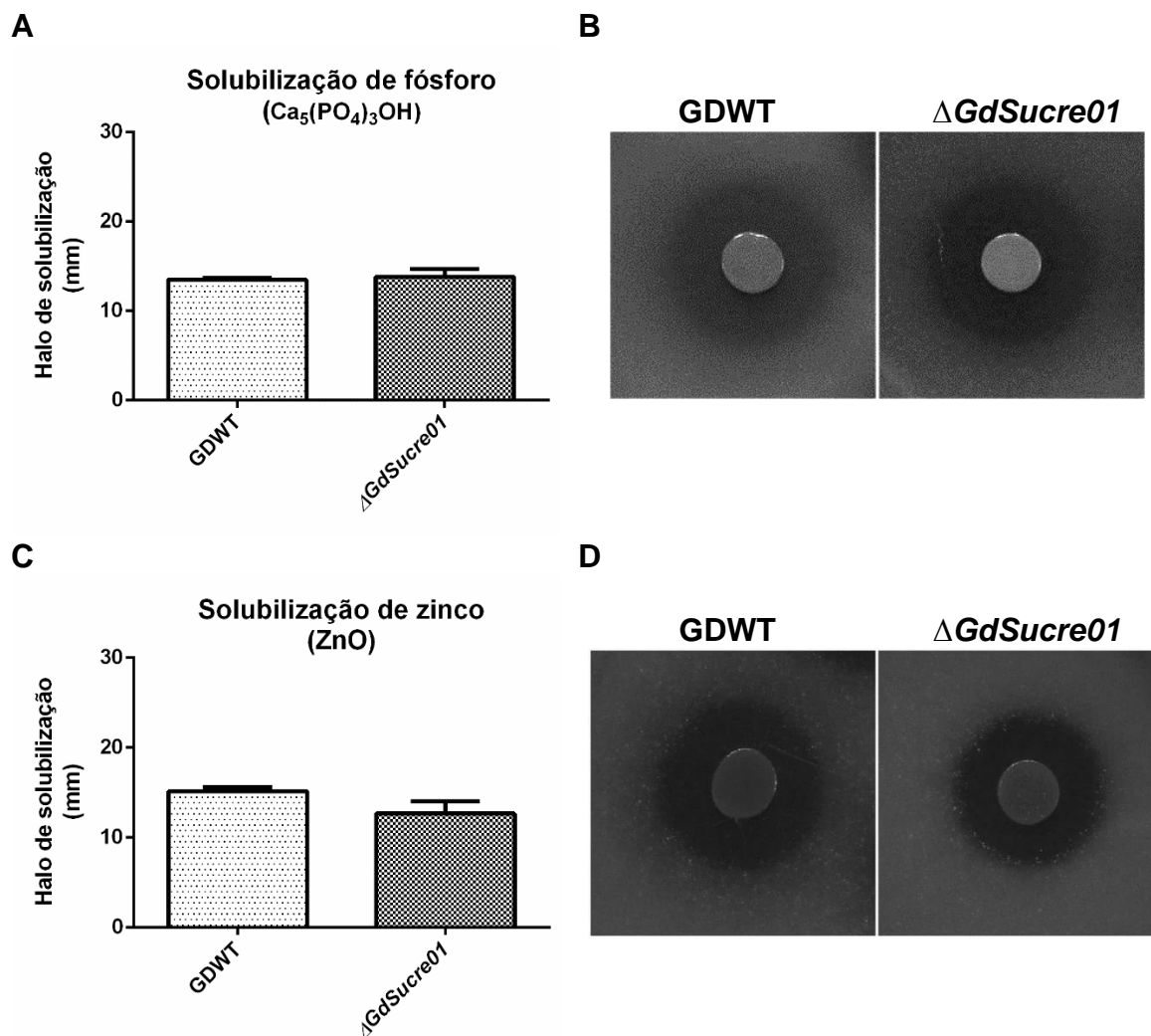
**Figura 10. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem e do mutante  $\Delta GdSucre01$ .** Estirpe selvagem (GDWT) e mutante  $\Delta GdSucre01$  foram plaqueados (100  $\mu$ L) em meio DYGS sólido, contendo disco de papel filtro embebido com 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). O resultado foi obtido pela (A) mensuração do halo após três dias de cultivo em estufa, a 30 °C, e (B) registro fotográfico das placas. Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Barras do gráfico representam o erro padrão da média. (n=3).

Juntos, os dados revelam que, embora o gene seja importante para resistência ao metal cádmio e aos estresses osmótico/salino, sua mutação repercutiu na elevação da tolerância ao estresse oxidativo, associado aos estressores Paraquat e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 5.3.5. A proteína GdSucre01 não participa do processo de solubilização de nutrientes em *G. diazotrophicus* PAI 5

Com o objetivo de avaliar a importância do gene *GdSucre01* na solubilização de nutrientes em *G. diazotrophicus* PAI 5, a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fósforo e zinco por meio de ensaios de solubilização em meios sólidos LGI modificado e DYGS, respectivamente

Os resultados apresentados na Figura 11 mostraram que a solubilização de fósforo ( $Ca_5(PO_3)_4OH$ ) e do zinco (ZnO) não foi afetada pela mutação no gene *GdSucre01*. Esse resultado indica que o gene em estudo não participa das vias de solubilização desses nutrientes em *G. diazotrophicus* PAI 5.

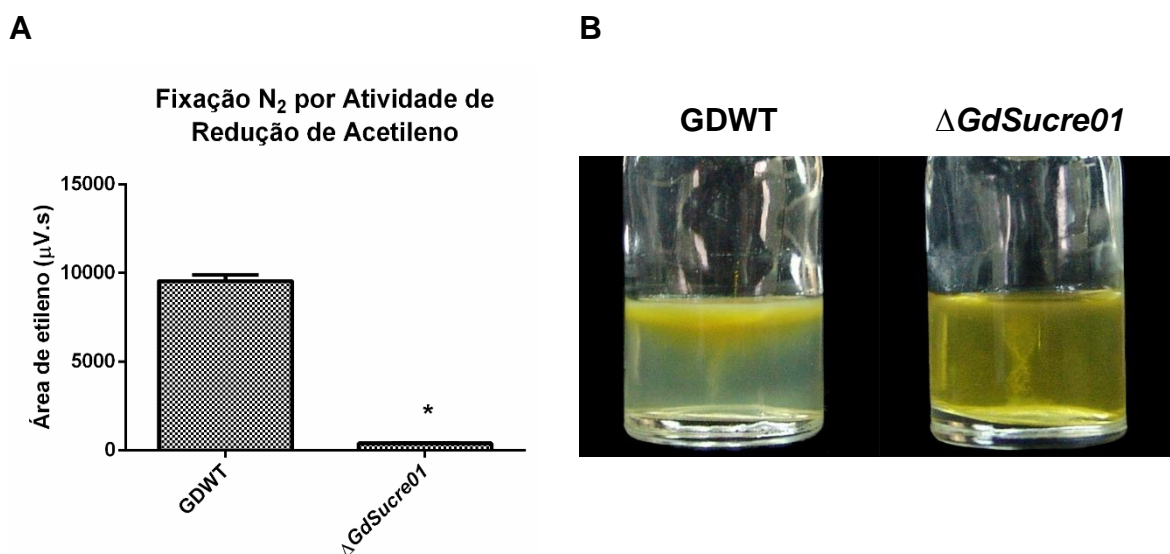


**Figura 11. Comparação da capacidade de solubilização de fósforo e zinco entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem e o mutante  $\Delta\text{GdSucre01}$ .** A estirpe selvagem e o mutante  $\Delta\text{GdSucre01}$  foram inoculados em meio sólido LGI modificado, suplementado com  $\text{Ca}_5(\text{PO}_3)_4\text{OH}$ . (A e C) mensuração dos halos e (B e D) registro fotográfico das placas de ensaio de solubilização de fósforo e zinco, respectivamente, após 5 dias de cultivo em estufa, a 30 °C. Barras do gráfico representam o erro padrão da média. (n=3).



### 5.3.6. A proteína GdSucre01 é essencial para o processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) em *G. diazotrophicus* PAI 5

Com o intuito de avaliar a importância do gene  $\Delta GdSucre01$  na FBN em *G. diazotrophicus* PAI 5, a estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram avaliados quanto à capacidade de fixar biologicamente nitrogênio por meio de ensaio de redução de acetileno e de formação de película aerotóxica. Os resultados mostraram que o mutante  $\Delta GdSucre01$  apresentou redução de 96% da capacidade de fixar nitrogênio por meio da atividade de redução de acetileno (Figura 12A). Adicionalmente, o mutante  $\Delta GdSucre01$  foi capaz de crescer em meio LGI-P na ausência de nitrogênio, sem, no entanto, formar película aerotóxica, característica do processo de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* (Figura 12B). Os resultados evidenciam a importância da proteína hipotética codificada por GdSucre01 na via de FBN realizada por *G. diazotrophicus* PAI 5.



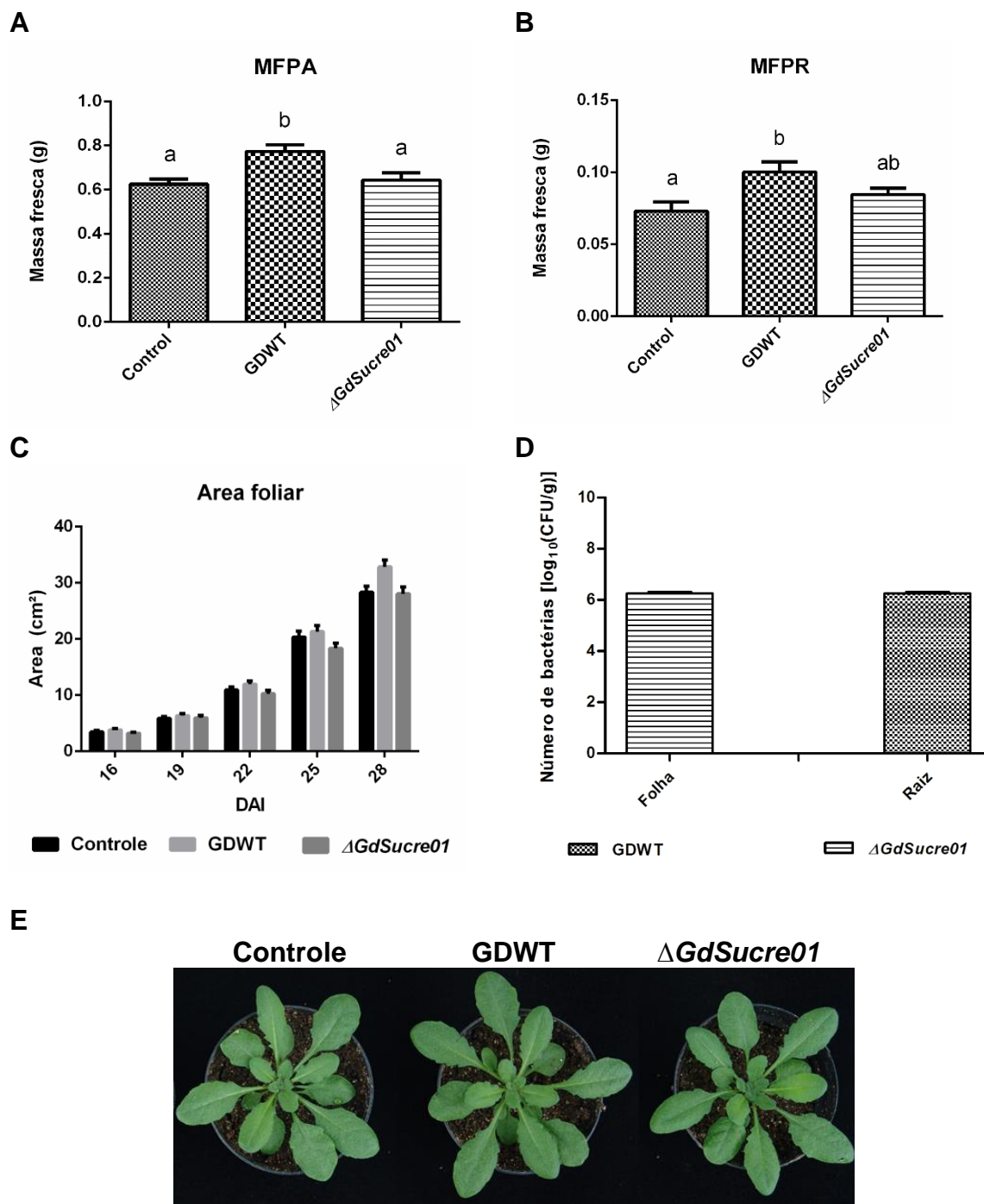
**Figura 12. Análise da fixação biológica de nitrogênio em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$ .** Estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram cultivados em meio LGI-P semissólido por 48 h, a 30 °C. Posteriormente, foi retirado 1 mL de ar atmosférico do frasco e injetado 1 mL de acetileno. A capacidade de fixar nitrogênio foi avaliada pela atividade da redução de acetileno em etileno. O resultado foi obtido pela quantificação de etileno por cromatografia gasosa. A área de quantificação do etileno (A) e formação de película aerotóxica em meio LGI-P (B). Médias seguidas de asterisco diferem do controle pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Barras do gráfico representam o erro padrão da média. ( $n=3$ ).

### 5.3.7. A proteína GdSucre01 é essencial para a promoção de crescimento vegetal em *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* PAI 5

Para avaliar a importância do gene *GdSucre01* no processo de promoção do crescimento de *A. thaliana*, estirpe selvagem e o mutante  $\Delta GdSucre01$  foram inoculados em plantas com 10 dias de idade.

Após 28 dias de cultivo, foi possível observar que a estirpe selvagem promoveu o crescimento de *A. thaliana*. Em contrapartida, o mutante  $\Delta GdSucre01$  não promoveu o crescimento, apresentando valores estatisticamente iguais à condição controle (Figura 12A-B). Ao avaliar a área foliar durante o experimento, foi observado que as plantas inoculadas com a estirpe selvagem apresentaram resultados de promoção de crescimento a partir dos 22 dias após a inoculação (DAI). Já plantas inoculadas com  $\Delta GdSucre01$  não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle quanto a esse parâmetro durante o período avaliado (Figura 12C).

A capacidade de colonização da estirpe selvagem e do mutante também foi avaliada por meio de ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Os resultados indicaram que ambas as estirpes são capazes de colonizar os tecidos de *A. thaliana*. No entanto, a localização de cada estirpe é diferente, sendo observado que a estirpe selvagem foi capaz de colonizar apenas os tecidos radiculares ( $1,2 \times 10^6$  UFC/g de tecido), em contrapartida, o mutante  $\Delta GdSucre01$ , apenas os tecidos foliares ( $2 \times 10^6$  UFC/g de tecido). (Figura 12D). Esses resultados mostram a importância da proteína GdSucre01 no processo de colonização e promoção do crescimento de plantas de *A. thaliana*.



**Figura 13.** Análise da promoção do crescimento em *Arabidopsis thaliana* inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem e o mutante  $\Delta$ GdSucre01. Plantas do ecótipo Col-0 foram inoculadas aos 10 dias com a estirpe selvagem (GDWT) e o mutante  $\Delta$ GdSucre01. Após 28 dias, as características (A) massa fresca da parte aérea (MFPA) e (B) massa fresca da parte radicular (MFPR) foram avaliadas. Ao longo do ensaio, a partir do 16º dia, a cada 3 dias, foi registrada a área foliar das plantas. (D) A colonização dos tecidos de *A. thaliana* foi avaliada por meio de ensaio de unidades formadoras de colônia, após 28 dias. (E) O fenótipo de plantas representativas do ensaio foi registrado e comparado. As barras representam o erro padrão da média (n=18). Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 6. DISCUSSÃO

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica, inicialmente isolada de tecidos de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988; James *et al.*, 1994), que se destaca por promover o crescimento de espécies vegetais de interesse agrônomo como sorgo, trigo (Luna *et al.*, 2010), milho (Mehnaz e Lazarovits, 2006), arroz (Anitha e Thangaraju, 2010) e tomate (Luna *et al.*, 2012). Sua capacidade de crescer em ambientes com altas concentrações de açúcares sugere a existência de mecanismos moleculares de tolerância, os quais são de grande potencial biotecnológico, porém, pouco elucidados. No presente trabalho, foram feitas análises proteômicas comparativas, visando à compreensão das vias envolvidas na resposta à sacarose. Adicionalmente, o uso de mutagênese insercional permitiu a identificação e a caracterização de novo gene envolvido nos mecanismos de tolerância à sacarose, na interação com plantas e na promoção do crescimento vegetal.

Um estudo acerca da performance de crescimento bacteriano durante a exposição a diferentes concentrações de sacarose mostrou efeito na redução da multiplicação celular. Contudo, a bactéria ainda manteve um baixo grau de multiplicação mesmo sob concentrações de sacarose tão altas quanto 1 M (Figura 1). *G. diazotrophicus* pertence ao grupo de bactérias altamente tolerantes a açúcares, com capacidade de tolerar concentrações que reduzam a atividade de água no ambiente (Stevenson *et al.*, 2015), tornando interessante os dados obtidos neste trabalho. Embora altas concentrações de açúcar sejam um fator limitante

para a sobrevivência de grande parte dos microrganismos, *G. diazotrophicus* se destaca pela sua capacidade de habitar ambientes com altas concentrações deste soluto, como apoplastos de plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988). Embora tenha alta tolerância à sacarose, o ponto de estudo escolhido para os ensaios subsequentes foi determinado por promover uma inibição de 20-30% da multiplicação celular de *G. diazotrophicus* PAI 5, que foi correspondente a 600 mM de sacarose.

A sacarose é um açúcar que pode contribuir para o desenvolvimento celular, servindo como fonte de energia e carbono para os diferentes processos biológicos da célula, além de desempenhar papel osmoprotetor sob condições de estresse (Barbosa *et al.*, 2006; Bougouffa *et al.*, 2014). Contudo, devido ao fato de este açúcar ser um soluto osmoticamente ativo, concentrações elevadas podem ter consequências deletérias, tais como redução da atividade de água, redução de turgor celular e inibição da divisão celular (Lievens *et al.*, 2015). Nossos resultados de microscopia ótica mostram que a capacidade de crescimento de *G. diazotrophicus* é afetada em 600 mM de sacarose, não ocorrendo alterações significativas na morfologia celular.

Diversas respostas adaptativas são observadas em bactérias sob condições estressantes com o intuito de atenuar consequências danosas ao funcionamento celular (Pianetti *et al.*, 2009; Shi e Xia, 2003; Wainwright *et al.*, 1999). Muitas vezes, estas respostas envolvem alterações morfológicas, de modo a permitir o prolongamento de sua sobrevivência (Pianetti *et al.*, 2009; Seshasayee *et al.*, 2006). Oliveira *et al.* (2016) avaliaram as alterações morfológicas causadas por ação de estressores osmóticos e salinos em *G. diazotrophicus* PAI 5. O estudo revelou que a bactéria apresenta alterações morfológicas adaptativas às condições de estresse causadas pelos sais KCl e NaCl, não havendo alterações quando submetidas a estresse osmótico não iônico. Portanto, tais dados corroboram os resultados obtidos no presente trabalho.

No intuito de compreender os mecanismos envolvidos com a tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse por sacarose, foram feitas análises proteômicas comparativas. *G. diazotrophicus* PAI 5 teve seu genoma sequenciado por Bertalan *et al.* (2009), o que permitiu avaliar os dados proteômicos com acurácia. Entre as proteínas identificadas pela análise proteômica, 32% foram diferencialmente acumuladas, entre as quais 77 DAPs foram aumentadas e 197 DAPs foram

reduzidas na presença de sacarose em relação ao controle. Entre as DAPs aumentadas, foi possível identificar 53 proteínas citoplasmáticas e 15 de membrana, enquanto as DAPs reduzidas apresentaram 89 proteínas citoplasmáticas e 97 proteínas de membrana. Desta forma, os dados mostram que 69% das DAPs aumentadas e 45% das DAPs reduzidas pertenciam ao citoplasma.

As bactérias têm demanda energética para diversos processos metabólicos bem como para a produção de biomassa microbiana. Entre os processos, as maiores demandas de energia compreendem as reações de polimerização e síntese proteica, seguidas da biossíntese de monômeros *per se* (Stouthamer, 1979). Para sobreviver às alterações rápidas e extremas de mudanças de condições, as bactérias necessitam perceber as mudanças e então responder com alterações apropriadas à regulação gênica e à expressão proteica (Boor, 2006). Comumente, condições ambientais desafiadoras não favorecem o crescimento bacteriano, exigindo da bactéria a ativação de mecanismos de defesa bem como de redução da taxa de crescimento (Wood, 2011). Dessa forma, há um aumento na síntese de proteínas específicas de resposta. Mas de modo geral, devido à redução da taxa de crescimento, observa-se redução na síntese proteica bem como de enzimas envolvidas na síntese de ATP (Shah e Duncan, 2015).

No presente estudo, a alta concentração de sacarose disponível no meio se apresentou como desfavorável para o crescimento de *G. diazotrophicus* PAI 5, e a bactéria foi capaz de perceber o ambiente desafiador. Como resposta, observou-se modulação do processo de multiplicação celular pela redução do acúmulo de proteínas ribossomais e enzimas ATP sintase. Essa resposta era esperada, uma vez que há redução na demanda de aporte de proteínas para atender a menor taxa de multiplicação celular, observada sob condições de estresse quando comparada às condições controle de crescimento.

Durante a multiplicação celular, uma das etapas cruciais é a divisão celular propriamente dita. A divisão ocorre, comumente, após a replicação do material genético e se inicia próximo ao final da segregação do cromossomo pela formação de um anel citocínico no sítio nascente da divisão pela ação da proteína FtsZ. Essa proteína é homóloga à proteína tubulina eucariótica (Erickson *et al.*, 1996; Rothfield *et al.*, 1999), estando associada à formação da estrutura chamada “anel Z”, que circunda toda a face interna da membrana citoplasmática (Bi e Lutkenhaus, 1991). A principal função do anel Z é funcionar como arcabouço responsável por

recrutar as demais proteínas para o processo de divisão que causa a invaginação das camadas do envelope celular para formar o septo de divisão (Harry *et al.*, 2006). A disponibilidade de nutrientes e a taxa de crescimento podem potencialmente afetar essa etapa de multiplicação celular (Wang e Levin, 2009). Nos resultados das análises proteômicas do presente trabalho, é possível observar, entre as proteínas diferencialmente acumuladas, redução no acúmulo da proteína FtsZ. Esse mecanismo é uma importante via de resposta de *G. diazotrophicus* PAI 5 quando exposta a concentrações de 600 mM de sacarose, o que resulta na redução na taxa de crescimento em cerca de 30% (Figuras 1 e 2).

*G. diazotrophicus* tem capacidade de assimilar diversas fontes de carbono, como a sacarose, glicose, glicerol, manitol, gluconato, entre outros (Barbosa *et al.*, 2006; Bellone *et al.*, 1997; Gillis *et al.*, 1989; Ureta *et al.*, 1995). A assimilação de sacarose não ocorre de forma direta, havendo a necessidade da ação de enzimas que promovem a quebra do carboidrato. A enzima levansucrase, secretada via periplasma, catalisa a conversão da sacarose em moléculas menores, a glicose e frutose, que são internalizadas (Arrieta *et al.*, 2004). Essas fontes de carbono podem ser diretamente metabolizadas por ação conjunta das enzimas glicose fosfato desidrogenase (GDH) e pela ação de gluconato 2-desidrogenase (GADH) (Luna *et al.*, 2006).

Nas condições do presente trabalho, sugere-se que a alta concentração de sacarose no meio de cultura tenha resultado em um desbalanço osmótico entre os ambientes extra e intracelular. Paralelamente, a elevada disponibilidade do açúcar poderia induzir vias de metabolismo de carboidratos. Os dados de classificação funcional das proteínas diferencialmente acumuladas nas análises proteômicas revelaram 33 DAPs aumentadas, envolvidas em processos metabólicos celulares como o metabolismo de carbono. Estes resultados sugerem que alterações no metabolismo energético são uma das principais respostas que *G. diazotrophicus* PAI 5 ativa quando se encontra sob estresse por sacarose.

*G. diazotrophicus* assimila ácido glucônico pela oxidação da glicose por ação da enzima GDH. Este ácido é então oxidado pela ação da enzima GADH e convertido a 2-cetogluconato, utilizado pela célula como fonte de energia pela ação da enzima  $\alpha$ -cetoglutatarato desidrogenase (KGDH) (Luna *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2006). Nossos resultados mostraram que, durante o estresse por sacarose, as enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e gluconato-2-desidrogenase foram

aumentadas em *G. diazotrophicus*. Os resultados sugerem que o acúmulo dessas enzimas é importante para a resposta de *G. diazotrophicus* a altas concentrações de sacarose.

Foi identificada em nossos resultados a enzima transaldolase bifuncional, codificada pelo gene *tal*, aumentada em células de *G. diazotrophicus* PAI 5 em resposta a estresse por sacarose. As proteínas transaldolases também estão diretamente envolvidas no metabolismo de carbono, mais precisamente na via da glicólise (Iida *et al.*, 1993). Sob condições de alta concentração de açúcares, essas enzimas desempenham papel importante no balanço dos metabólitos envolvidos na via da pentose fosfato (Weber *et al.*, 2006). Os dados sugerem a ativação da glicólise, permitindo especular que os metabolismos de ácido glucônico e de glicose ocorrem paralelamente sob altas concentrações de sacarose.

Iwata *et al.* (2015) estudaram, por mutagênese, o papel de dois genes que codificam as proteínas transaldolases no fungo *Moniliella megachiliensis*, um microrganismo conhecido pela capacidade de crescer em meio com até 60% de sacarose. Os resultados mostraram que esses genes foram importantes para a tolerância a estresse osmótico causado por NaCl, tanto pelo seu papel na via de pentose fosfato quanto pela produção de eritritol. Nossos resultados sugerem que o papel das transaldolases esteja ligado ao equilíbrio osmótico por ação do metabolismo de glicose. Porém, futuras análises, utilizando mutantes defectivos para tais vias, podem trazer informações mais consistentes acerca de tal hipótese.

Outro mecanismo utilizado por bactérias para reduzir o potencial osmótico dentro da célula é o controle do influxo de outras fontes de carbono. Duas enzimas de membrana, que foram reduzidas em resposta ao estresse, têm relação direta com o influxo de açúcares do meio extracelular para o citoplasma: a proteína de ligação a D-ribose e xilose ABC transporter. Sabe-se que, em *E. coli*, xilose ABC transporter tem afinidade também para outros açúcares, como a ribose (Song e Park, 1998). Nossos resultados sugerem que em *G. diazotrophicus*, sob estresse por sacarose, há redução do influxo de carboidratos pela diminuição de proteínas envolvidas com o transporte de açúcares como xilose e ribose.

Um outro grupo de proteínas, que foi aumentado no citoplasma de *G. diazotrophicus* em resposta ao estresse por sacarose, foi o das chaperonas. Nossas análises mostraram presença de duas chaperonas: a proteína chaperona DNAJ e a *Heat Shock Protein 90* (Hsp90). Essas proteínas são fundamentais em



processos de resposta celular a estresses ao evitarem a desnaturação e interações incorretas de outras proteínas (Taipale *et al.*, 2010).

As proteínas chaperonas DNAJ são comumente associadas à resposta ao choque hiperosmótico e a temperaturas elevadas (Nogales *et al.*, 2002; Schröder *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2006). Além de poder atuar na proteção das proteínas contra a potencial desnaturação provocada pelas alterações osmóticas no interior da célula, as chaperonas DNAJ também atuam no processo de divisão celular (Susin *et al.*, 2006). A alta concentração de sacarose a que *G. diazotrophicus* foi exposta resulta em estresse oxidativo com consequentes danos estruturais proteicos. A presença, em maior quantidade, de chaperonas no citoplasma sugere proteção contra as desnaturações de proteínas e pode estar relacionada à maior tolerância ao estresse por sacarose apresentada pela bactéria, além de poder atuar como uma das proteínas envolvidas no processo de divisão celular de bactérias sob estresse.

Em estudos desenvolvidos por Yang *et al.* (2006), em *Sacharomyces cerevisiae*, os autores encontraram dois homólogos à Hsp90, codificadas por *hsp82e hsc82*. Os resultados do trabalho destes autores utilizando mutantes dos genes *hspc82* e *hsc82* mostraram o papel sensível a estresse osmótico essencial dessa proteína para tolerância a glicerol, um agente estressor osmótico não iônico, assim como a sacarose. O acúmulo da proteína Hsp90 no citoplasma das células de *G. diazotrophicus* expostas a elevadas concentrações de sacarose pode estar associado a um viés osmosensitivo desta proteína, auxiliando no ajuste osmótico das células.

A interação física entre as chaperonas DNAJ e Hsp90 tem sido previamente demonstrada em humanos e leveduras (Lee *et al.*, 2014; Orthwein *et al.*, 2012), reforçando a hipótese da atuação conjunta destas proteínas nos mecanismos de resposta a estresse osmótico em *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Adicionalmente, em leveduras, foi demonstrada a interação física entre Hsp90 e proteínas homólogas às transaldolases (Collins *et al.*, 2007). Conforme discutido anteriormente, tais transaldolases também foram aumentadas em resposta à sacarose e são potencialmente envolvidas na resistência a estresses osmóticos em microrganismos. Juntos, estes dados evidenciam que as chaperonas DnaJ e Hsp90 interagem com as transaldolases em *G. diazotrophicus*, e o aumento nas

concentrações deste conjunto de proteínas participa dos mecanismos de osmotolerância nesta bactéria.

Em nossos resultados, foram identificadas proteínas negativamente acumuladas, como as porinas, as proteínas de membrana *porin-like* OmpH e OmpC, mostrando as alterações ocorridas nas células para o controle da perda de água. Sabe-se que a ativação dos mecanismos de canais de água é um dos primeiros mecanismos de resposta da célula sob estresse osmótico (Vera-Estrella *et al.*, 2004). Outro papel importante das porinas é o transporte passivo de moléculas menores que 600 Da (Ozkanca e Flint, 2002). Como a alta concentração de açúcares leva ao desbalanço osmótico entre o meio intra e extracelular, um dos mecanismos utilizados neste cenário é a redução das proteínas envolvidas no transporte transmembrana de água e pequenas moléculas, tais como as porinas.

Nossos resultados também mostraram que as proteínas do sistema de transporte de glicina-betaína do tipo ABC foram positivamente acumuladas sob altas concentrações de açúcares. Esse osmoprotetor é amplamente conhecido nos diversos organismos como a principal molécula acumulada pelas células como resposta a estímulo osmótico (Ashraf e Foolad, 2007). Sabe-se que a ativação de transportadores de osmoprotetores é um mecanismo de defesa amplamente conhecido como resposta a estresses osmóticos (Bhaskara *et al.*, 2015; Metris *et al.*, 2014). Estas moléculas desempenham o papel importante de proteger as células tanto dos possíveis danos causado pelo desbalanceamento osmótico quanto dos efeitos danosos causados nas diversas proteínas e biomoléculas pela dessecação ou indisponibilidade de água (Altendorf *et al.*, 2009; Wood, 2015).

No presente trabalho, não foram feitas análises de integridade de membrana, mas foi possível identificar enzimas já descritas em outros estudos como importantes para alterações na conformação dos ácidos graxos e de fosfolípidos. Uma proteína de tolerância a tolueno foi identificada como DAP aumentada em resposta à alta concentração de sacarose. Essa proteína tem sido associada à integridade da membrana, uma vez que, além de atuar como extrusora de tolueno, há relatos de seu papel na alteração da composição de ácidos graxos e fosfolípidos em *Pseudomonas putida* (Kim *et al.*, 1998). Esse mecanismo envolve a alteração da membrana externa, com aumento de sua rigidez. Essa estratégia visa, principalmente, a prevenir a entrada de solventes através da membrana.

Rubiano-Labrador *et al.*, (2014) observaram em *Tistlia consotensis*, halobactéria, ação de resposta adaptativa da membrana lipídica envolvida com a diferença de concentração de sais no meio. Esses autores relataram que a ação de proteínas da família, conhecida como transportadores de tolerância a tolueno, foi importante para alterar a fluidez da membrana e preservar as funções biológicas da bactéria. Em nossos trabalhos com *G. diazotrophicus*, foi possível observar acúmulo positivo da proteína de tolerância a tolueno, o que nos permite especular que essa proteína esteja envolvida na alteração conformacional da parede celular de modo a reduzir os danos causados pelo estresse por sacarose. Estudos mais aprofundados fazem-se necessários para confirmar a ação dessas proteínas na membrana plasmática e sua ação na tolerância a estresse por sacarose.

Entre as proteínas diferencialmente acumuladas NA membrana, destacam-se também os transportadores receptores dependentes de Ton-B. Esses transportadores são componentes de membrana de bactérias Gram-negativas, apresentando alta afinidade e especificidade por sideróforos (Noinaj *et al.*, 2010; Wiener, 2005). O transporte é feito de forma ativa, e a energia requerida é proveniente da bomba motriz de prótons presente região da membrana interna. Desta forma, são transportados metais quelatos através da membrana plasmática (Ferguson e Deisenhofer, 2004; Wiener, 2005). Contudo, estudos têm mostrado que esses transportadores também são responsáveis por transportar outros compostos como vitaminas e carboidratos, inclusive a sacarose, para o meio extracelular (Schauer *et al.*, 2008).

Zhang *et al.* (2005) desenvolveram estudos em *E. coli* acerca das proteínas envolvidas na regulação de influxo de carbono e ferro. Esses autores observaram que a síntese de quatro proteínas de transporte dependentes de TonB foi modulada em resposta tanto à disponibilidade de ferro quanto de carbono. Em nossos resultados, observamos repressão de vários transportadores dependentes de TonB, além das proteínas relacionadas TolB e TolR. Tais observações permitem sugerir que a bactéria atue reduzindo a ação de transportadores TonB com o intuito de evitar o influxo de sacarose para o interior da célula como forma de se proteger do excesso de açúcar presente no meio extracelular.

O potencial de pesquisa acerca do papel das proteínas de *G. diazotrophicus* na resposta a estresses ambientais passou a ser interessante para vários grupos de pesquisa a partir do seu sequenciamento, quando vias envolvidas

na resposta a diferentes estresses abióticos aos quais *G. diazotrophicus* PAI 5 está intimamente ligada foram elucidadas por análises *in silico* (Bertalan *et al.*, 2009). Outro ponto interessante com o sequenciamento do genoma foi a identificação de 1077 proteínas cujas funções e/ou estruturas ainda não foram determinadas (Bertalan *et al.*, 2009). Nossos trabalhos permitiram a identificação 120 proteínas hipotéticas, das quais 53 foram diferencialmente acumuladas: 7 DAPs aumentadas e 46 reduzidas. Tais proteínas podem compor novos mecanismos de tolerância a estresse por sacarose em bactérias.

O considerável número de proteínas hipotéticas envolvidas na resposta a estresse por sacarose representa uma perspectiva interessante de identificação e caracterização de novos genes envolvidos em vias de tolerância a estresse ambiental. Considerando os resultados apresentados no presente trabalho, uma futura reanotação dessas proteínas no genoma de *G. diazotrophicus* PAI 5 faz-se necessária, tendo como base os dados obtidos nesse trabalho.

Nossos dados mostraram que a estratégia utilizada para identificação de novos genes envolvidos com a resposta a estresse por sacarose, através da seleção de mutante insercional de *G. diazotrophicus* PAI 5, foi eficiente. Tendo em vista essa estratégia, conseguimos selecionar o mutante  $\Delta GDI_{1289}$ , posteriormente denominado  $\Delta GDSucre01$ , que codifica uma proteína até então anotada como proteína hipotética. Os resultados de predição de domínios transmembrana sugerem que a proteína GDSucre01 se localiza na membrana plasmática de *G. diazotrophicus*, com seis domínios transmembrana, Tabela 2, mas seu papel bioquímico ainda está por ser elucidado.

Ao caracterizar o papel do gene *gdSucre01*, foi possível observar que tal mutante apresentou aumento da tolerância ao estresse provocado por paraquat e a estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio. Entretanto, a mutação no gene *GDI\_1289* não afetou os processos de solubilização de fósforo e zinco, indicando que o gene em estudo não participa das vias de solubilização desses nutrientes em *G. diazotrophicus* PAI 5. Adicionalmente, foi demonstrada sua importância no processo de multiplicação celular na presença de 600 mM de sacarose, na tolerância a metais pesados como o cádmio, na tolerância a estresses osmóticos como sulfato de sódio e PEG 400, no processo de fixação biológica de nitrogênio e na promoção do crescimento vegetal. O conjunto de dados obtidos

mostra a importância desse gene nas vias de tolerância a estresses abióticos e no processo de interação bactéria x planta.

Os resultados do estudo do papel do gene *GDSucre01* na interação bactéria x planta são interessantes. Rangel de Souza *et al.*, (2016) mostraram a promoção de crescimento vegetal em *Arabidopsis thaliana* por inoculação de planta inteira com *G. diazotrophicus* PAI 5; mostraram ainda a ativação de vias de defesa do sistema imune vegetal aos 28 dias após a inoculação, promovendo o crescimento somente aos 50 dias após a inoculação.

Em nossos resultados, foram feitas alterações na metodologia de inoculação para otimizar o processo de promoção de crescimento. Contudo, os resultados obtidos com o mutante mostraram crescimento igual ao do controle, mesmo havendo multiplicação da bactéria no interior da planta (Figura 11). Ainda, o mutante  $\Delta$ *GDSucre01* foi capaz de se multiplicar na parte aérea e não se estabelecer na raiz, diferentemente da estirpe selvagem. Esses resultados sugerem que o mutante foi capaz de subverter os mecanismos de defesa do sistema imune da parte aérea e se estabelecer em folha, o que não aconteceu na raiz. Contudo, são necessárias análises com mutantes vegetais para entendimento do papel do gene *GDSucre01* na modulação da interação bactéria x planta.

Destarte, os dados obtidos no presente trabalho permitiram avaliar vias metabólicas de defesa e de transporte envolvidas na resposta a estresse por sacarose por *G. diazotrophicus* PAI 5. A resposta dessa bactéria sugere a interação de diferentes proteínas para suportar a tolerância a estresse por açúcares. Adicionalmente, nossos resultados permitiram identificar novos genes potencialmente envolvidos na resposta a estresse por sacarose e a identificação de um gene *GDSucre01*, envolvido na tolerância a estresse por cádmio, estresses osmótico/salino, na fixação biológica de nitrogênio e na interação bactéria x planta. Nossos dados contribuem para o entendimento dos mecanismos de tolerância a estresses por sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5 bem como na interação dessa bactéria com a planta modelo *A. thaliana*. Assim, o presente trabalho abre novas perspectivas para estudos visando a caracterizar os mecanismos de resposta a estresses em *G. diazotrophicus* e seu papel no processo de interação com plantas hospedeiras.

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ A concentração de 600 mM de sacarose provoca estresse osmótico em *G. diazotrophicus* Pal 5, afetando seu crescimento em 30%, sem promover alterações morfológicas significativas em células de *G. diazotrophicus* Pal 5;
- ✓ As análises proteômicas identificaram 869 proteínas de *G. diazotrophicus* Pal 5 em resposta ao estresse por sacarose, sendo 77 DAPs aumentadas e 197 reduzidas na presença do estresse;
- ✓ O estresse causado por sacarose apresentou DAPs aumentadas relacionadas às vias de metabolismo de carbono e transporte de osmoprotetores e DAPs reduzidas envolvidas em vias de transporte de açúcares e porinas;
- ✓ A predição de localização subcelular permitiu identificar 53 DAPs aumentadas e 89 DAPs reduzidas no citoplasma. Foram preditas 15 DAPs aumentadas e 97 DAPs reduzidas na membrana plasmática;
- ✓ As análises proteômicas identificaram 49 DAPs previamente descritas como hipotéticas em *G. diazotrophicus* PAI 5, que passam a ser consideradas proteínas envolvidas na resposta a estresse por sacarose;

- ✓ O mutante do gene *GDI1289*, responsável por codificar uma proteína predita hipotética em *G. diazotrophicus* PAI 5, apresenta alta sensibilidade ao estresse causado por 600 mM de sacarose. Dessa forma, tal gene foi renomeado como *GdSucre01* e seu mutante como  $\Delta$ *Sucre01*;
- ✓ O gene *GdSucre01* desempenha papel fundamental na tolerância a estresse por metal pesado cádmio e ao estresse causado por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PEG e sacarose;
- ✓ Mutações no gene *GdSucre01* conferem maior resistência ao estresse causado por paraquat e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- ✓ O gene *GdSucre01* desempenha papel essencial no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN);
- ✓ O gene *GdSucre01* é essencial na capacidade de *G. diazotrophicus* PAI 5 promover o crescimento de *A. thaliana* bem como interfere na sua localização de estabelecimento dentro da planta, sugerindo sua participação nas vias de interação planta - bactéria.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ✓ Validar os resultados de análises proteômicas de *G. diazotrophicus* PAI 5 sob estresse por sacarose através de mutagênese;
- ✓ Avaliar a resposta da estirpe selvagem de *G. diazotrophicus* PAI 5 pela superexpressão de genes candidatos com base em dados de análises proteômicas para ganho de função;
- ✓ Fazer a complementação funcional do mutante do gene *GdSucre01* por meio de clonagem sob orientação de promotor nativo;
- ✓ Avaliar a resposta da superexpressão do gene *GdSucre01* na estirpe selvagem sob orientação do promotor 35S quando expostos aos estresses abióticos relacionados;
- ✓ Avaliar quais proteínas interagem com a proteína codificada pelo gene *GdSucre01* por meio da superexpressão desse gene conjugada à cauda HA, seguida de imunoprecipitação e análises proteômicas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adediran, G.A., Ngwenya, B.T., Mosselmans, J.F.W., Heal, K. V, Harvie, B.A. (2015) Mechanisms behind bacteria induced plant growth promotion and Zn accumulation in *Brassica juncea*. *J Hazard Mater* **283**: 490–499.
- Alexandros, N., Bruinsma, J. (2012) *WORLD AGRICULTURE TOWARDS 2030 / 2050 The 2012 Revision PROOF COPY*. FAO., FAO, Rome.
- Alquères, S., Meneses, C., Rouws, L., Rothballer, M., Baldani, I., Schmid, M., Hartmann, A. (2013) The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol Plant-Microbe Interact* **26**: 937–945.
- Altendorf, K., Booth, I.R., Gralla, J., Greie, J.-C., Rosenthal, A.Z., Wood, J.M. (2009) Osmotic Stress. *EcoSal* **3**: 1–41.
- Anitha, K.G., Thangaraju, M. (2010) Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* under in vitro conditions. *J Cell Plant Sci* **1**: 6–12.
- Arrieta, J.G., Sotolongo, M., Menéndez, C., Alfonso, D., Trujillo, L.E., Soto, M., Ramírez, R., Hernández, L. (2004) A type II protein secretory pathway required for levansucrase secretion by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Bacteriol*

**186:** 5031–5039.

Aryal, U.K., Xiong, Y., McBride, Z., Kihara, D., Xie, J., Hall, M.C., Szymanski, D.B. (2014) A Proteomic Strategy for Global Analysis of Plant Protein Complexes. *Plant Cell* **26**: 3867–3882.

Ashraf, M., Ahmad, S. (2000) Influence of sodium chloride on ion accumulation , yield components and fibre characteristics in salt-tolerant and salt-sensitive lines of cotton ( *Gossypium hirsutum* L .). **66**: 115–127.

Ashraf, M., Foolad, M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* **59**: 206–216.

Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H., Baldani, V.L.D. (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* **384**: 413–431.

Ballal, A., Basu, B., Apte, S.K. (2007) The Kdp-ATPase system and its regulation. *J Biosci* **32**: 559–568.

Barbosa, E.A., Perin, L., Reis, M. (2006) Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. 827–833.

Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.-P. (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant Soil* **378**: 1–33.

Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A 1 and A 3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul* **24**: 7–11.

Bellone, C.H., Bellone, S.D.V.C. De, Pedraza, R.O., Monzon, M.A. (1997) Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biol Biochem* **29**: 965–967.

Bertalan, M., Albano, R., Pádua, V. de, Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K.R.D.S., Schwab, S., Araujo, J., Oliveira, A., França, L., Magalhães, V.,

- Alquéres, S., Cardoso, A., Almeida, W., Loureiro, M.M., Nogueira, E., Cidade, D., Oliveira, D., Simão, T., Macedo, J., Valadão, A., Dreschsel, M., Freitas, F., Vidal, M., Guedes, H., Rodrigues, E., Meneses, C., Brioso, P., Pozzer, L., Figueiredo, D., Montano, H., Junior, J., Souza Filho, G. de, Martin Quintana Flores, V., Ferreira, B., Branco, A., Gonzalez, P., Guillobel, H., Lemos, M., Seibel, L., Macedo, J., Alves-Ferreira, M., Sachetto-Martins, G., Coelho, A., Santos, E., Amaral, G., Neves, A., Pacheco, A.B., Carvalho, D., Lery, L., Bisch, P., Rössle, S.C., Urményi, T., Rael Pereira, A., Silva, R., Rondinelli, E., Krüger, W. von, Martins, O., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics* **10**: 450.
- Bhaskara, G.B., Yang, T.-H., Verslues, P.E. (2015) Dynamic proline metabolism: importance and regulation in water limited environments. *Front Plant Sci* **6**: 484.
- Bi, E., Lutkenhaus, J. (1991) FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161–164.
- Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M.-E., Vicente, C. (2005) Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J Biosci Bioeng* **99**: 366–371.
- Boor, K.J. (2006) Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. *PLoS Biol* **4**: e23.
- Bougouffa, S., Radovanovic, A., Essack, M., Bajic, V.B. (2014) DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways. *Database* **2014**: bau100-bau100.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnik, E. (2000) Response to abiotic stresses. In *Biochemistry and Molecular biology of plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (eds). American Society of Plant Physiologists, pp. 1158–1249.
- Brötz-Oesterhelt, H., Bandow, J.E., Labischinski, H. (2005) Bacterial proteomics and its role in antibacterial drug discovery. *Mass Spectrom Rev* **24**: 549–565.
- Brown, A.D. (1990) *Microbial water stress physiology. Principles and perspectives*.

- Brückner, R., Titgemeyer, F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 141–148.
- Calderan-Rodrigues, M.J., Jamet, E., Bonassi, M.B.C.R., Guidetti-Gonzalez, S., Begossi, A.C., Setem, L.V., Franceschini, L.M., Fonseca, J.G., Labate, C.A. (2014) Cell wall proteomics of sugarcane cell suspension cultures. *Proteomics* **14**: 738–749.
- Cavalcante, V.A., Dobereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**: 23–31.
- Cheng, K., Chui, H., Domish, L., Hernandez, D., Wang, G. (2016) Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *PROTEOMICS - Clin Appl* **10**: 346–357.
- Cherry, J.H., Locy, R.D., Rychter, A. (eds) (2000) *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.-C.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S., Krogan, N.J. (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* **6**: 439–450.
- Csonka, L.N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* **53**: 121–147.
- Csonka, L.N., Hanson, A.D. (1991) Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**: 569–606.
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 117–24.
- Damerval, C., Vienne, D. De, Zivy, M., Thiellement, H. (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* **7**: 52–54.
- Delfine, S., Alvino, A., Villani, M.C., Loreto, F. (1999) Restrictions to carbon dioxide

- conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *Plant Physiol* **119**: 1101–6.
- DÖBEREINER, J., ANDRADE, V. de O., BALDANI, V.L.D. (1999) *Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia*. EMBRAPA Agrobiologia, Seropedica.
- Easlon, H.M., Bloom, A.J. (2014) Easy Leaf Area: Automated digital image analysis for rapid and accurate measurement of leaf area. *Appl Plant Sci* **2**.
- Epstein, E., Bloom, A.J. (2004) *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Epstein, W. (2003) The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **75**: 293–320.
- Erickson, H.P., Taylor, D.W., Taylor, K.A., Bramhill, D. (1996) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 519–23.
- Evans, S., Wallenstein, M. (2012) Soil microbial community response to drying and rewetting stress: does historical precipitation regime matter? *Biogeochemistry* .
- Farias, S.G.G. de, Santos, D.R. dos, Freire, A.L. de O., Silva, R.B. e (2009) Growth and mineral nutrition of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Steud seedlings in nutrient solution under saline stress. *Rev Bras Ciência do Solo* **33**: 1499–1505.
- Ferguson, A.D., Deisenhofer, J. (2004) Metal import through microbial membranes. *Cell* **116**: 15–24.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496–512.
- Frensch, J., Hsiao, T.C., Steudle, E. (1996) Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* **198**: 348–355.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I.R., Caballero-

- Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant Soil* **154**: 145–150.
- Galinski, E.A. (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol* **37**: 272–328.
- Galisa, P.S., Silva, H.A.P. da, Macedo, A.V.M., Reis, V.M., Vidal, M.S., Baldani, J.I., Simões-Araújo, J.L. (2012) Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. *J Microbiol Methods* **91**: 1–7.
- Galperin, M.Y., Koonin, E. V (2004) “Conserved hypothetical” proteins: prioritization of targets for experimental study. *Nucleic Acids Res* **32**: 5452–5463.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., Ley, J. De (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *Int J Syst Bacteriol* **39**: 361–364.
- Glick, B.R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol Res* **169**: 30–39.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J., Conesa, A. (2008) High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res* **36**: 3420–3435.
- Gunasekera, T.S., Csonka, L.N., Paliy, O. (2008) Genome-wide transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 to continuous osmotic and heat stresses. *J Bacteriol* **190**: 3712–3720.
- Harry, E., Monahan, L., Thompson, L. (2006) Bacterial Cell Division: The Mechanism and Its Precision. In *International review of cytology*. pp. 27–94.
- Haughn, G., Kunst, L. (2010) *Arabidopsis thaliana*: a model organism for molecular genetic studies in plants: How and why was arabidopsis chosen over other plants? In *Biology on the Cutting Edge: Concepts, Issues, and Canadian Research around the Globe*. S.L. Gillies, and S. Hewitt (eds). Pearson, Canada.

pp. 7–11.

- Held, C., Sadowski, G. (2016) Compatible solutes: Thermodynamic properties relevant for effective protection against osmotic stress. *Fluid Phase Equilib* **407**: 224–235.
- Iida, A., Teshiba, S., Mizobuchi, K. (1993) Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 5375–83.
- Intorne, A.C., Oliveira, M.V. V De, Lima, M.L., Silva, J.F. da, Olivares, F.L., Souza Filho, G.A. de, Oliveira, M.V. V, Lima, M.L., Silva, J.F. da, Olivares, F.L., Souza Filho, G.A. de (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Arch Microbiol* **191**: 477–483.
- Intorne, A.C., Oliveira, M.V. V de, M Pereira, L. de, Souza Filho, G.A. de (2012) Essential role of the czc determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Int Microbiol* **15**: 69–78.
- Ipek, M., Pirlak, L., Esitken, A., Figen Dönmez, M., Turan, M., Sahin, F. (2014) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Pgpr) Increase Yield, Growth And Nutrition Of Strawberry Under High-Calcareous Soil Conditions. *J Plant Nutr* **37**: 990–1001.
- Iwata, H., Mizushima, D., Kobayashi, Y., Ookura, T., Ogiwara, J., Kato, J., Kasumi, T. (2015) Two transaldolase isogenes from *Moniliella megachiliensis* behave in a different way depending on the stress class. *J Biosci Bioeng* **119**: 148–152.
- James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1994) Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *J Exp Bot* **45**: 757–766.
- Kandler, O., König, H., Wiegel, J., Claus, D. (1983) Occurrence of Poly-gamma-D-Glutamic Acid and Poly-alpha-L-Glutamine in the Genera Xanthobacter, Flexithrix, Sporosarcina and Planococcus. *Syst Appl Microbiol* **4**: 34–41.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., Morishima, K. (2017) KEGG:

- new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **45**: D353–D361.
- Khan, A., Hossain, M.T., Park, H.C., Yun, D.-J., Shim, S.H., Chung, Y.R. (2016) Development of root system architecture of *Arabidopsis thaliana* in response to colonization by *Martelella endophytica* YC6887 depends on auxin signaling. *Plant Soil* **405**: 81–96.
- Kim, K., Lee, S., Lee, K., Lim, D. (1998) Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *J Bacteriol* .
- Klose, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**: 231–243.
- Krämer, R. (2010) Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. *Chem Rec* **10**: 217–229.
- Krogh, A., Larsson, B., Heijne, G. von, Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**: 567–580.
- Lee, K.K., Sardi, M.E., Swanson, S.K., Gilmore, J.M., Torok, M., Grant, P.A., Florens, L., Workman, J.L., Washburn, M.P. (2014) Combinatorial depletion analysis to assemble the network architecture of the SAGA and ADA chromatin remodeling complexes. *Mol Syst Biol* **7**: 503–503.
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y.M., Buso, N., Lopez, R. (2015) The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res* **43**: W580-4.
- Lievens, B., Hallsworth, J.E., Pozo, M.I., Belgacem, Z. Ben, Stevenson, A., Willems, K.A., Jacquemyn, H. (2015) Microbiology of sugar-rich environments: diversity, ecology and system constraints. *Environ Microbiol* **17**: 278–298.
- Lima, D.C., Duarte, F.T., Medeiros, V.K.S., Carvalho, P.C., Nogueira, F.C.S., Araujo, G.D.T., Domont, G.B., Batistuzzo de Medeiros, S.R. (2016) GeLC-MS-



based proteomics of *Chromobacterium violaceum*: comparison of proteome changes elicited by hydrogen peroxide. *Sci Rep* **6**: 28174.

- Logeshwaran, P., Thangaraju, M., Rajasundari, K. (2009) Hydroxamate Siderophores of Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolated from Sugarcane Roots. *Aust J Basic Appl Sci* **3**: 3564–3567.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M., Boiardi, J.L. (2012) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Appl Soil Ecol* **61**: 225–229.
- Luna, M.F., Bernardelli, C.E., Galar, M.L., Boiardi, J.L. (2006) Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 3. *Curr Microbiol* **52**: 163–8.
- Luna, M.F., Galar, M.L., Aprea, J., Molinari, M.L., Boiardi, J.L. (2010) Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnol Lett* **32**: 1071–6.
- Luna, M.F., Mignone, C.F., Boiardi, J.L. (2000) The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 564–9.
- Maathuis, F.J.M., Amtmann, A. (1999) K<sup>+</sup>Nutrition and Na<sup>+</sup>Toxicity: The Basis of Cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>Ratios. *Ann Bot* **84**: 123–133.
- Madhaiyan, M., Saravanan, V.S., Jovi, D.B.B.S.S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K., Sa, T. (2004) Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. *Microbiol Res* **159**: 233–243.
- Mann, M., Kulak, N.A., Nagaraj, N., Cox, J. (2013) The Coming Age of Complete, Accurate, and Ubiquitous Proteomes. *Mol Cell* **49**: 583–590.
- Mansour, M.M.F., Salama, K.H.A., Al-Mutawa, M.M. (2003) Transport proteins and salt tolerance in plants. *Plant Sci* **164**: 891–900.
- Mehnaz, S., Lazarovits, G. (2006) Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* **51**: 326–35.

- Meinke, D.W. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* (80- ) **282**: 662–682.
- Metris, A., George, S.M., Mulholland, F., Carter, A.T., Baranyi, J. (2014) Metabolic shift of *Escherichia coli* under salt stress in the presence of glycine betaine. *Appl Environ Microbiol* **80**: 4745–56.
- Milisav, I., Poljsak, B., Šuput, D. (2012) Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use. *Int J Mol Sci* **13**: 10771–10806.
- Mittler, R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–19.
- Moradi, A., Tahmourespour, A., Hoodaji, M., Khorsandi, F. (2011) Effect of salinity on free living-diazotroph and total bacterial populations of two saline soils. *African J Microbiol Res* **5**: 144–148.
- Munns, R., Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651–81.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* ( syn . *Acetobacter diazotrophicus* ), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Curr Sci* **83**: 137–145.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H. (2014) Update on the Physiology of Reactive Oxygen Metabolism during Drought The Roles of Reactive Oxygen Metabolism in Drought: Not So Cut and Dried. *Plant Physiology* **164**: 1636–1648.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., Sanjuan, J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 225–32.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., Buchanan, S.K. (2010) TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43–60.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**: 4007–4021.

- Oliveira, M.V. V., Intorne, A.C., Vespoli, L. de S., Andrade, L.F., Pereira, L. de M., Rangel, P.L., Souza Filho, G.A. de (2017) Essential role of K<sup>+</sup> uptake permease (Kup) for resistance to sucrose-induced stress in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *Environ Microbiol Rep* .
- Oliveira, M.V. V, Intorne, A.C., Vespoli, L. de S., Madureira, H.C., Leandro, M.R., Pereira, T.N.S., Olivares, F.L., Berbert-Molina, M.A., Souza Filho, G.A. De (2016) Differential effects of salinity and osmotic stress on the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Arch Microbiol* .
- Oliveira, M.V.V. de (2012) Análise da resposta de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 ao estresses osmótico e iônico: aspectos fisiológico e moleculares. .
- Orthwein, A., Zahn, A., Methot, S.P., Godin, D., Conticello, S.G., Terada, K., Noia, J.M. Di (2012) Optimal functional levels of activation-induced deaminase specifically require the Hsp40 DnaJa1. *EMBO J* **31**: 679–91.
- Osakabe, Y., Arinaga, N., Umezawa, T., Katsura, S., Nagamachi, K., Tanaka, H., Ohiraki, H., Yamada, K., Seo, S.-U., Abo, M., Yoshimura, E., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2013) Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 609–24.
- Otto, A., Becher, D., Schmidt, F. (2014) Quantitative proteomics in the field of microbiology. *Proteomics* **14**: 547–565.
- Ozkanca, R., Flint, K.P. (2002) The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol* **35**: 533–537.
- Pedraza, R.O., Bellone, C.H., Carrizo de Bellone, S., Boa Sorte, P.M.F., Teixeira, K.R. dos S. (2009) Azospirillum inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *Eur J Soil Biol* **45**: 36–43.
- Pianetti, A., Battistelli, M., Citterio, B., Parlani, C., Falcieri, E., Bruscolini, F. (2009) Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron* **40**: 426–433.

- Poolman, B., Blount, P., Folgering, J.H.A., Friesen, R.H.E., Moe, P.C., Heide, T. van der, Heide, T. van der (2002) How do membrane proteins sense water stress? *Mol Microbiol* **44**: 889–902.
- Poolman, B., Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397–407.
- Ragoonanan, V., Malsam, J., Bond, D.R., Aksan, A. (2008) Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta* **1778**: 2283–90.
- Rangel de Souza, A.L.S., Souza, S.A. De, Oliveira, M.V. V De, Ferraz, T.M., Figueiredo, F.A.M.M.A., Silva, N.D. Da, Rangel, P.L., Panisset, C.R.S., Olivares, F.L., Campostrini, E., Souza Filho, G.A. De (2016) Endophytic colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its effect on plant growth promotion, plant physiology, and activation of plant defense. *Plant Soil* **399**: 257–270.
- Reid, S.J., Abratt, V.R. (2005) Sucrose utilisation in bacteria: genetic organisation and regulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **67**: 312–321.
- Reis, R., Vale, E. de M., Heringer, A. (2016) Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *J. J.*
- Reis, V.M., Olivares, F.L., Döbereiner, J. (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World J Microbiol Biotechnol* **10**: 401–5.
- Riggs, P.J., Chelius, M.K., Iniguez, A.L., Kaeppler, S.M., Triplett, E.W. (2001) Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Funct Plant Biol* **28**: 829–836.
- Roels, J.A. (1983) *Energetics and kinetics in biotechnology*. Elsevier Biomedical Press, .
- Rontein, D., Basset, G., Hanson, A.D. (2002) Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants. *Metab Eng* **4**: 49–56.
- Rothfield, L., Justice, S., García-Lara, J. (1999) Bacterial Cell Division. *Annu Rev*

- Genet* **33**: 423–448.
- Rubiano-Labrador, C., Bland, C., Miotello, G., Guérin, P., Pible, O., Baena, S., Armengaud, J. (2014) Proteogenomic insights into salt tolerance by a halotolerant alpha-proteobacterium isolated from an Andean saline spring. *J Proteomics* **97**: 36–47.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Carmen Orozco-Mosqueda, M. del, Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol Res* **183**: 92–99.
- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* **66**: 1794–1798.
- Schauer, K., Rodionov, D.A., Reuse, H. de (2008) New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the “tip of the iceberg”? *Trends Biochem Sci* **33**: 330–338.
- Schröder, H., Langer, T., Hartl, F.U., Bukau, B. (1993) DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO J* **12**: 4137–4144.
- Seshasayee, A.S., Bertone, P., Fraser, G.M., Luscombe, N.M. (2006) Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol* **9**: 511–519.
- Shabala, S., Shabala, L. (2011) Ion transport and osmotic adjustment in plants and bacteria. *Biomol Concepts* **2**: 407–19.
- Shah, N.B., Duncan, T.M. (2015) Aerobic growth of *Escherichia coli* is reduced, and ATP synthesis is selectively inhibited when five C-terminal residues are deleted from the  $\epsilon$  subunit of ATP synthase. *J Biol Chem* **290**: 21032–41.
- Sharma, V., Anderson, D., Dhawan, A. (2012) Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* **17**: 852–870.
- Shavrukov, Y. (2013) Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *J Exp Bot* **64**: 119–127.

- Sheehan, V.M., Sleator, R.D., Fitzgerald, G.F., Hill, C. (2006) Heterologous expression of BetL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2170–2177.
- Shi, B., Xia, X. (2003) Morphological Changes of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* in Response to Temperature Selection. *Curr Microbiol* **46**: 120–123.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* .
- Sleator, R.D., Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 49–71.
- Smirnova, G. V, Muzyka, N.G., Oktyabrsky, O.N. (2000) The role of antioxidant enzymes in response of *Escherichia coli* to osmotic upshift. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 209–13.
- Song, S., Park, C. (1998) Utilization of D-ribose through D-xylose transporter. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 255–261.
- Souza, S.A. de (2015) O papel das vias de pirroloquinolina quinona em *Gluconacetobacter diazotrophicus* na tolerância a estresses ambientais e na promoção do crescimento vegetal. .
- Stasovski, E., Peterson, C. a (1991) The effects of drought and subsequent rehydration on the structure, vitality, and permeability of *Allium cepa* adventitious roots. *Can J Bot* **69**: 1170–1178.
- Stevenson, A., Cray, J.A., Williams, J.P., Santos, R., Sahay, R., Neuenkirchen, N., McClure, C.D., Grant, I.R., Houghton, J.D., Quinn, J.P., Timson, D.J., Patil, S. V, Singhal, R.S., Antón, J., Dijksterhuis, J., Hocking, A.D., Lievens, B., Rangel, D.E.N., Voytek, M.A., Gunde-Cimerman, N., Oren, A., Timmis, K.N., McGenity, T.J., Hallsworth, J.E. (2015) Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *ISME J* **9**: 1333–51.
- Stouthamer, H.A. (1979) The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. *Int Rev Biochem Microb Biochem* **21**: 1–48.

- Sukweenadhi, J., Kim, Y.-J., Choi, E.-S., Koh, S.-C., Lee, S.-W., Kim, Y.-J., Yang, D.C. (2015) *Paenibacillus yonginensis* DCY84T induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression against aluminum, drought, and salt stress. *Microbiol Res* **172**: 7–15.
- Susin, M.F., Baldini, R.L., Gueiros-Filho, F., Gomes, S.L. (2006) GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **188**: 8044–53.
- Taipale, M., Jarosz, D.F., Lindquist, S. (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 515–528.
- Taleisnik, E., Peyrano, G., Cordoba, A., Arias, C. (1999) Water Retention Capacity in Root Segments Differing in the Degree of Exodermis Development. *Ann Bot* **83**: 19–27.
- Tejera, N. a., Ortega, E., Gonzalez-Lopez, J., Lluch, C. (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *J Appl Microbiol* **95**: 528–535.
- Tripathi, A.K., Mishra, B.M., Tripathi, P. (1998) Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* spp. *J Biosci* **23**: 463–471.
- UniProt Consortium (2017) UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* **45**: D158–D169.
- Ureta, A., Alvarez, B., Ramón, A., Vera, M.A., Martinez-Drets, G. (1995) Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. *Plant Soil* **172**: 271–277.
- Velázquez-Hernández, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M.J., Fuentes-Ramírez, L.E., Bravo-Patiño, A., Cajero-Juárez, M., Chávez-Moctezuma, M.P., Valdez-Alarcón, J.J. (2011) *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Arch Microbiol* **193**: 137–49.

- Vera-Estrella, R., Barkla, B.J., Bohnert, H.J., Pantoja, O. (2004) Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* **135**: 2318–29.
- Wainwright, M., Canham, L.T., Al-Wajeeh, K., Reeves, C.L. (1999) Morphological changes (including filamentation) in *Escherichia coli* grown under starvation conditions on silicon wafers and other surfaces. *Lett Appl Microbiol* **29**: 224–7.
- Wan, S., Mak, M., Kung, S. (2016) FUEL-mLoc: feature-unified prediction and explanation of multi-localization of cellular proteins in multiple organisms. *Bioinformatics* .
- Wang, J.D., Levin, P.A. (2009) Metabolism, cell growth and the bacterial cell cycle. *Nat Rev Microbiol* **7**: 822–7.
- Wani, S.H., Singh, N.B., Haribhushan, A., Mir, J.I. (2013) Compatible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance - role of glycine betaine. *Curr Genomics* **14**: 157–65.
- Weber, A., Kögl, S.A., Jung, K. (2006) Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 7165–75.
- Wiener, M.C. (2005) TonB-dependent outer membrane transport: Going for Baroque? *Curr Opin Struct Biol* **15**: 394–400.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* **13**: 19–50.
- Wood, J.M. (2011) Bacterial osmoregulation: a paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu Rev Microbiol* **65**: 215–38.
- Wood, J.M. (2015) Bacterial responses to osmotic challenges. *J Gen Physiol* **145**: 381–8.
- Yang, X.-X., Maurer, K.C.T., Molanus, M., Mager, W.H., Siderius, M., Vies, S.M. Van Der (2006) The molecular chaperone Hsp90 is required for high osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**: 195–204.



- Zhang, Y.Y., Li, Y., Zhang, Y.Y., Wang, Z., Zhao, M., Su, N., Zhang, T., Chen, L., Wei, W., Luo, J., Zhou, Y., Xu, Y., Xu, P., Li, W., Tao, Y. (2016) Quantitative Proteomics Reveals Membrane Protein-Mediated Hypersaline Sensitivity and Adaptation in Halophilic *Nocardiopsis xinjiangensis*. *J Proteome Res* **15**: 68–85.
- Zhang, Z., Gosset, G., Barabote, R., Gonzalez, C.S., Cuevas, W.A., Saier, M.H. (2005) Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 980–90.
- Zhou, D., Huang, X.-F., Chaparro, J.M., Badri, D. V, Manter, D.K., Vivanco, J.M., Guo, J. (2016) Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant Soil* **401**: 259–272.
- Zwiewka, M., Nodzyński, T., Robert, S., Vanneste, S., Friml, J. (2015) Osmotic Stress Modulates the Balance between Exocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* **8**: 1175–87.

## **APÊNDICES**

**Tabela suplementar 1. Proteínas diferencialmente acumuladas (*Differentially Accumulated Proteins - DAPs*) reduzidas em células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob estresse osmótico, causado por 600 mM de sacarose em relação ao controle.**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HK46	13	10	125,3284	0,0105	1,6213	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)
A9HPH9	5	5	42,0423	0,0017	2,7034	10 kDa chaperonin (GroES protein) (Protein Cpn10)
B5ZE32	2	2	10,5381	0,0301	1,9433	2-alkenal reductase
A9HL34	4	3	24,2015	0,0002	2,8103	3.3.7
A9HS66	6	4	66,1147	0,0279	1,5416	30S ribosomal protein S16
A9H1M6	2	2	17,7710	0,0469	2,9736	30S ribosomal protein S18
A9H3I6	11	11	77,8300	0,0133	2,8166	50S ribosomal protein L17
A9HS05	6	5	68,6699	0,0147	2,3240	50S ribosomal protein L28
A9H3K9	3	2	28,5088	0,0484	1,5461	50S ribosomal protein L30
A9HHS1	5	5	43,2411	0,0151	2,1283	50S ribosomal protein L31
A9H3S4	9	8	121,8531	0,0132	3,0593	50S ribosomal protein L7/L12
A9HPH6	25	10	207,5194	0,0029	1,7841	60 kDa chaperonin 2 (GroEL protein 2) (Protein Cpn60 2)
A9HPE7	10	7	68,7345	0,0004	2,5896	ABC transporter related (Sugar uptake ABC transporter ATP-binding protein)
A9H073	4	4	21,4627	0,0043	2,5731	Alcohol dehydrogenase GroES domain protein (Putative D-xylulose reductase)
A9H8D2	8	6	98,1934	0,0018	1,5482	Alkyl hydroperoxide reductase AhpD
A9HNM6	2	1	11,8593	0,0432	1,5843	Amidino transferase (Arginine deiminase)
B5ZF45	5	4	31,1324	0,0031	1,6654	Amine dehydrogenase
A9H743	3	2	15,5860	0,0192	3,7170	Arsenate reductase
A9H9A6	18	16	130,7927	0,0000	2,2138	ATP synthase gamma chain (ATP synthase F1 sector gamma subunit)
A9H9A1	14	9	108,6552	0,0272	1,7216	ATP synthase subunit delta (ATP synthase F(1) sector subunit delta)

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
B5ZIA2	5	1	44,3652	0,0181	2,2812	ATP-dependent Clp protease adapter protein ClpS
A9HCR1	16	5	137,3951	0,0084	1,6536	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit
A9H7G6	13	8	106,6974	0,0166	2,7085	Bacterioferritin
A9HDN9	3	2	23,0144	0,0177	1,6200	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH [Includes: IMP cyclohydrolase
A9HA12	2	2	19,4672	0,0001	8,1091	CBS domain containing protein
A9H0K4	24	16	198,5735	0,0004	1,9125	Cell division protein FtsZ
A9H7W9	6	3	31,2924	0,0286	2,4369	Cell division protein ZapA
A9HLY4	5	5	36,1609	0,0394	1,6446	Cell division topological specificity factor
B5ZCI4	33	5	223,0227	0,0001	5,4049	Chaperone protein HtpG
A9H1L4	18	12	146,5920	0,0015	1,7930	Chaperone SurA
A9H2I4	3	2	21,8659	0,0036	2,3789	Choloylglycine hydrolase
B5ZGZ0	9	3	97,9761	0,0124	3,0801	CHRD domain containing protein
A5YJ14	5	3	44,4899	0,0099	2,0273	Cold shock protein (Cold-shock DNA-binding domain protein) (Putative cold shock protein) (Fragment)
A9HIW8	19	15	217,2397	0,0021	1,9584	Cold shock-like protein cspE
A9HT68	16	13	170,5416	0,0215	1,5448	Conjugal transfer
A9HAR7	9	7	80,0735	0,0393	1,5266	Conserved protein
A9HFQ7	7	6	67,4951	0,0100	1,8572	Conserved protein
A9HID9	6	6	46,1884	0,0166	1,8855	Conserved protein
A9HHR5	8	8	53,9954	0,0277	2,0441	Conserved protein
A9HSH2	9	6	93,0117	0,0208	1,6479	Conserved protein
A9HS32	3	2	17,6012	0,0180	2,3424	Conserved protein
A9HLD1	7	4	46,9034	0,0041	1,6885	CRISPR-associated protein, Cse2 family

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9H4K8	5	4	34,1303	0,0070	1,7806	Cys-tRNA(Pro)/Cys-tRNA(Cys) deacylase
B5ZDY0	7	4	39,9698	0,0059	1,7145	D-amino acid dehydrogenase
A9HRU7	8	6	88,5415	0,0041	2,6102	DNA-binding protein HU (Histone family protein DNA-binding protein)
A9HKY5	3	3	31,6376	0,0464	1,6097	DNA-directed RNA polymerase subunit omega (RNAP omega subunit)
A9HFZ1	6	5	33,2225	0,0004	5,0899	D-ribose-binding protein
A9HIK8	12	11	108,0874	0,0422	1,7088	DSBA oxidoreductase (Thioredoxin protein)
A9HNP0	20	16	225,8663	0,0000	5,9005	D-xylose ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein
B5ZJ92	4	2	33,9343	0,0131	5,0627	Endoribonuclease YbeY
B5ZLV1	2	2	16,2826	0,0034	7,2518	Entericidin EcnAB
A9HPE1	11	8	103,6266	0,0000	7,4843	Extracellular solute-binding protein family 1 (Putative transporter protein)
A9HB55	11	6	74,6451	0,0072	1,6179	Ferritin Dps family protein (Ferritin-like protein)
A9HHD1	3	3	23,5021	0,0076	2,1324	Flagellar motor switch protein FliN
B5ZD75	21	1	210,1165	0,0452	8,6526	Gamma-glutamyltranspeptidase
A9HM18	22	2	230,3834	0,0112	1,7976	Gamma-glutamyltranspeptidase
A9HK15	19	16	210,2409	0,0023	1,6626	Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)
A9H0F2	3	2	18,3686	0,0392	3,1247	Glutamate 5-kinase
A9H108	5	4	25,7826	0,0003	3,6481	Glutamate-cysteine ligase
A9H211	6	3	43,3849	0,0064	3,4876	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase (Putative Glyoxalase)
A9H0B5	3	3	25,6444	0,0271	1,6966	Integration host factor subunit beta (IHF-beta)
A9HRX5	3	3	20,0417	0,0490	1,5142	Iron-sulfur cluster assembly accessory protein (Putative iron-binding protein iscA)
A9HBR3	20	4	118,2822	0,0010	4,3165	Isocitrate dehydrogenase [NADP]
A9HS35	3	3	30,4069	0,0054	1,9725	Lipoprotein SmpA/OmlA family (SmpA/OmlA domain protein)

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HK87	6	3	35,1326	0,0034	3,1982	MltA domain protein (Putative membrane-bound lytic murein transglycosylase A)
B5ZD05	4	4	26,7865	0,0200	1,8349	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mutase (N5-CAIR mutase)
A9HFY5	5	3	36,8238	0,0002	2,3263	NAD(P)H dehydrogenase (quinone)
A9HKL6	8	6	58,4735	0,0001	2,9870	NADH dehydrogenase (Ubiquinone)
A9HRU3	10	7	58,2524	0,0004	1,6012	NADH-quinone oxidoreductase subunit B 2
B5ZL17	6	4	33,2884	0,0018	1,6706	Nitrilase/cyanide hydratase and apolipoprotein N-acyltransferase
B5ZIL8	7	1	49,6976	0,0379	2,6932	Nitrogen regulatory protein P-II
B5ZL84	2	1	17,6463	0,0326	2,0938	NUDIX hydrolase
A9GZP4	14	6	128,4882	0,0141	1,5063	OmpA/MotB domain protein (Outer membrane protein)
B5ZHX1	10	7	92,8256	0,0234	1,8057	Outer membrane chaperone Skp (OmpH)
A9HB05	18	13	205,2426	0,0008	3,2094	Outer membrane lipoprotein omp16 (Peptidoglycan-associated lipoprotein)
A9HKU8	17	12	196,3544	0,0030	5,1815	Outer membrane protein
P84838	17	13	209,1411	0,0055	1,6500	Outer membrane protein (OMPC)
A9H0L0	19	10	155,3800	0,0068	1,5042	Outer membrane protein assembly factor BamD
A9H103	5	4	30,9428	0,0094	1,6102	Outer-membrane lipoprotein carrier protein
B5ZE41	30	3	248,8516	0,0031	2,7499	Peptidase M1 membrane alanine aminopeptidase
B5ZIC0	32	1	218,6111	0,0240	1,7306	Peptidase M16 domain protein
B5ZDT0	13	2	104,4102	0,0477	1,5814	Peptidase M29 aminopeptidase II
B5ZD42	8	7	64,8846	0,0035	1,9248	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA (Protein-methionine-S-oxide reductase)
B5ZF17	18	1	174,5437	0,0002	2,5880	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator
A9HPB9	19	16	232,6092	0,0000	7,2302	Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator (Putative D-ribose-binding protein)
A9H8M9	9	5	59,4991	0,0001	3,1716	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) (PCK) (PEP carboxykinase) (PEPCK)

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
B5ZH63	10	2	54,5649	0,0235	1,6121	Porin
A9HPF6	13	8	88,4988	0,0000	2,8726	Porin
A9HNV8	3	2	23,9021	0,0085	1,7445	PRC-barrel protein
A9HLY0	3	2	22,9263	0,0013	4,5518	Probable septum site-determining protein MinC
A9HEA5	13	10	117,9275	0,0344	1,9427	Protein GrpE (HSP-70 cofactor)
B5ZH27	22	13	197,6744	0,0179	1,7028	Protein TolB
A9HAZ8	4	3	48,7607	0,0013	1,7007	Protein TolR (Putative biopolymer transport protein)
A9H2M9	10	8	89,9956	0,0030	1,8315	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase
A9H716	2	2	11,1801	0,0003	3,2986	Putative Acetyltransferase
A9HQR7	4	1	20,4232	0,0082	3,8947	Putative aldo-keto reductase
A9HHE7	10	8	83,9762	0,0251	1,9595	Putative chemotaxis protein cheY (Response regulator receiver protein)
A9HQE8	11	8	83,8859	0,0039	1,5277	Putative dehydrogenase
A9HQJ8	5	5	38,6896	0,0160	1,7558	Putative DNA binding protein
A9HR15	7	6	60,9207	0,0050	1,5299	Putative DNA-binding protein HU
A9HCM2	4	3	29,2878	0,0106	1,6539	Putative DNA-binding protein HU-beta
A9HN59	7	7	62,8809	0,0133	1,8202	Putative endoribonuclease protein
A9HDN7	5	4	29,7790	0,0295	1,9540	Putative exported protein
A9HNY4	2	1	10,5846	0,0273	3,8257	Putative exported protein
A9HGR9	2	1	11,2109	0,0305	1,9476	Putative extracellular solute-binding protein, PotD/PotF family
B5ZCR1	3	3	15,1025	0,0280	1,6340	Putative ferric uptake regulator, Fur family
A9HP16	4	4	35,5330	0,0114	1,9609	Putative GAF sensor protein
A9HAA2	10	10	88,2328	0,0123	1,7646	Putative membrane protein

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HEQ1	4	2	37,8119	0,0303	2,1261	Putative membrane protein
A9H7Z8	7	1	55,8186	0,0034	2,3409	Putative nitrogen regulatory protein
A9HM21	14	10	117,1859	0,0316	1,6380	Putative oxidoreductase
A9HQA9	3	1	19,1945	0,0006	4,9382	Putative peptide methionine sulfoxide reductase msrB
A9H577	14	11	152,3220	0,0001	5,2524	Putative periplasmic binding proteins
A9H0U0	4	3	28,9285	0,0114	1,5403	Putative peroxiredoxin osmC
A9HMV6	16	11	144,5480	0,0460	1,5217	Putative polysaccharide export protein
A9HHP4	14	10	89,1700	0,0001	2,2080	Putative pyruvate dehydrogenase E2 component
A9HI92	8	6	55,3469	0,0125	1,6994	Putative rare lipoprotein A (Rare lipoprotein A)
A9HPG2	16	13	140,7567	0,0000	3,3029	Putative ribitol 2-dehydrogenase
A9HR22	9	4	67,9704	0,0025	2,7606	Putative ROS/MUCR transcriptional regulator protein
A9HRH3	7	6	48,5809	0,0007	3,1615	Putative Thiol:disulfide interchange protein tlpA
A9HEU6	55	46	450,0852	0,0002	3,3836	Putative tonB-dependent receptor
A9H7L3	21	11	159,1969	0,0003	5,3998	Putative TonB-dependent receptor
A9H7M7	24	17	206,4066	0,0001	2,5030	Putative tonB-dependent receptor protein
A9HFD0	4	2	21,7149	0,0265	2,9699	Putative transcriptional Regulator
A9H0C0	13	9	138,0628	0,0038	3,1393	Putative transcriptional regulator protein (Transcriptional regulator, MucR family)
A9HRZ0	6	6	37,2044	0,0036	2,0611	Putative transcriptional regulator, rrf2 family (Transcriptional regulator, BadM/Rrf2 family)
A9H9Q2	4	3	28,8699	0,0166	1,7962	Putative transcriptional regulator, TetR family (Transcriptional regulator, TetR family)
A9HH16	10	9	58,5992	0,0002	5,6687	Putative tTnB-dependent receptor (TonB-dependent receptor)
A9H134	11	7	88,5248	0,0018	1,7957	Pyrrolo-quinoline quinone
B5ZJP1	11	8	68,5366	0,0126	1,7237	Ribosomal RNA small subunit methyltransferase E



**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HKW6	22	16	201,6619	0,0223	1,9955	Ribosome-recycling factor (RRF) (Ribosome-releasing factor)
A9H9Q9	4	4	44,0088	0,0007	4,0964	RNA polymerase-binding transcription factor DksA
A9HLS1	8	6	83,4313	0,0269	1,6241	RNA-binding protein Hfq
A9HFC1	9	6	77,5571	0,0252	2,7764	ROS/MUCR transcriptional regulator protein (Transcriptional regulator, MucR family)
A9H8F8	4	3	28,2044	0,0091	4,9010	Sec-independent protein translocase protein TatA
B5ZM10	6	3	32,0421	0,0332	1,7121	Shikimate dehydrogenase (NADP(+)) (SDH)
B5ZEZ8	8	5	40,2365	0,0163	2,1075	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR
A9HT87	5	2	28,4522	0,0138	3,9855	Single-stranded DNA-binding protein
B5ZCH4	3	2	17,0016	0,0170	2,2700	Sporulation domain protein
A9HRF1	4	2	30,0218	0,0024	4,0320	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha
B5ZEL9	13	12	108,9599	0,0057	1,5003	Thioredoxin domain
A9HFLO	13	11	72,5425	0,0267	1,7010	TonB-dependent receptor
A9HFV5	38	28	358,6617	0,0058	1,7858	TonB-dependent Receptor protein
B5ZL80	8	5	67,0350	0,0078	1,5955	Transcriptional regulator, MerR family
A9HFM1	2	1	14,4790	0,0333	1,9053	Translation initiation factor IF-1
A9HJ86	6	5	54,8485	0,0001	2,2542	Triosephosphate isomerase (TIM) (TPI)
A9HJ43	11	7	90,2365	0,0019	2,2924	Ubiquinone biosynthesis O-methyltransferase (2-polyprenyl-6-hydroxyphenol methylase)
A9HKU5	18	13	116,2557	0,0045	2,2830	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase
B5ZID6	3	2	21,6097	0,0015	2,5961	Uncharacterized protein
B5ZIU9	7	5	70,8395	0,0093	2,6381	Uncharacterized protein
A9H4L3	5	4	34,6851	0,0061	2,9528	Uncharacterized protein
A9HJ39	8	7	74,9211	0,0140	1,6227	Uncharacterized protein

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
B5ZHZ9	2	2	12,7307	0,0083	1,6053	Uncharacterized protein
B5ZIB2	5	5	54,8497	0,0300	1,6856	Uncharacterized protein
A9HAF1	10	10	89,3935	0,0052	1,8470	Uncharacterized protein
A9HJF8	4	4	37,5652	0,0284	2,0467	Uncharacterized protein
B5ZJP6	13	11	87,3913	0,0102	1,6987	Uncharacterized protein
B5ZI01	2	2	24,1286	0,0020	4,1166	Uncharacterized protein
A9H6W3	2	2	11,6831	0,0198	1,6930	Uncharacterized protein
B5ZE49	7	2	40,7790	0,0343	1,7766	Uncharacterized protein
A9HSZ0	2	1	12,4411	0,0455	4,0141	Uncharacterized protein
A9HSC1	4	2	29,9990	0,0011	4,5328	Uncharacterized protein
A9HFF2	3	3	26,6304	0,0047	4,8116	Uncharacterized protein
A9HRJ8	3	1	28,0412	0,0079	4,6194	Uncharacterized protein
A9HMQ3	5	4	55,0910	0,0137	2,0217	Uncharacterized protein
A9HIX9	5	2	31,8744	0,0338	1,7741	Uncharacterized protein
A9HRD5	13	8	106,4082	0,0043	1,8350	Uncharacterized protein
A9HSF6	3	2	17,7452	0,0196	2,6564	Uncharacterized protein
A9HB64	8	5	37,7453	0,0013	1,7566	Uncharacterized protein
A9HLI9	3	3	25,4465	0,0164	1,8489	Uncharacterized protein
B5ZDK7	4	2	27,8921	0,0064	1,5924	Uncharacterized protein
A9HC81	3	1	18,7830	0,0069	3,1101	Uncharacterized protein
B5ZL86	5	3	32,7256	0,0092	9,4873	Uncharacterized protein
B5ZK04	2	2	12,3590	0,0072	1,6132	Uncharacterized protein

**Tabela suplementar 1, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
B5ZD88	4	2	33,9240	0,0030	2,8740	Uncharacterized protein
B5ZH69	9	6	72,2134	0,0335	1,8280	Uncharacterized protein
A9HFW9	7	6	77,6812	0,0234	3,7946	Uncharacterized protein
B5ZKM7	7	3	58,6057	0,0061	1,7073	Uncharacterized protein
A9HT05	4	2	32,6370	0,0123	1,9970	Uncharacterized protein
A9HFS9	6	2	33,4328	0,0125	4,0007	Uncharacterized protein
A9HT76	6	4	66,2289	0,0021	2,6120	Uncharacterized protein
A9HJX9	6	6	44,2115	0,0066	2,2945	Uncharacterized protein
A9HMM2	9	7	99,7139	0,0143	2,2825	Uncharacterized protein
A9HMD9	5	3	53,3887	0,0090	2,5461	Uncharacterized protein
A9GZL6	2	1	31,8938	0,0073	2,9428	Uncharacterized protein
A9HB09	12	8	100,5194	0,0012	3,4818	Uncharacterized protein
A9HPS1	5	4	29,3378	0,0039	4,8697	Uncharacterized protein
A9H6D7	6	4	36,0700	0,0492	1,7879	Uncharacterized protein
A9H732	14	1	90,9770	0,0125	1,5995	Uncharacterized protein
A9H0M6	5	1	30,9848	0,0026	5,6980	Uncharacterized protein
A9H831	2	2	11,9475	0,0022	2,1975	Uncharacterized protein
A9HHR0	2	2	11,3449	0,0150	11,3494	Uncharacterized protein
A9HJR9	3	3	42,0261	0,0021	5,7674	Uncharacterized protein
A9H9E8	5	4	32,9868	0,0004	2,9299	Uncharacterized protein
A9H0F8	5	2	40,6290	0,0065	6,4857	UPF0335 protein GDI3176
A9H298	6	3	56,2447	0,0314	2,9204	UPF0434 protein GDI0182/Gdia_2252
A9HFY2	8	7	71,4994	0,0025	2,7499	Ycel family protein

**Tabela suplementar 2. Proteínas diferencialmente acumuladas (*Differentially Accumulated Proteins - DAPs*) aumentadas em células de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 sob estresse osmótico, causado por 600 mM de sacarose em relação ao controle.**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HNX4	40	32	395,9859	0,0004	7,5469	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase
A9HL10	14	8	121,3103	0,0002	3,0583	6-phosphogluconate dehydrogenase NAD-binding
B5ZLQ6	8	5	47,2747	0,0072	2,0560	Acetate kinase
A9HHS9	10	9	71,7964	0,0059	1,5892	Acetoin(Diacetyl) reductase
A9HJB2	12	7	94,6297	0,0030	3,1913	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
A9HRP0	2	2	10,9535	0,0314	1,5327	Acyl-[acyl-carrier-protein]--udp-n-acetylglucosamine o-acyltransferas (Udp-n-acetylglucosamine acyltransferase)
B5ZE05	8	5	45,3040	0,0431	2,6400	Adenosylhomocysteinase
A9HNA5	12	10	117,5052	0,0010	2,6423	Alcohol dehydrogenase
A9HNN4	9	7	62,3544	0,0462	1,7966	Alcohol dehydrogenase zinc-binding domain protein
B5ZFA6	22	17	149,0597	0,0212	1,8527	Aldehyde Dehydrogenase
A9H4V7	29	24	299,0038	0,0216	1,8564	Aldehyde Dehydrogenase
B5ZJL4	5	4	27,3814	0,0165	1,6665	Aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase molybdopterin binding
A9HBF6	10	8	95,6068	0,0013	1,9674	Aldose 1-epimerase
A9HBU6	8	7	50,9917	0,0420	1,6531	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase (UDP-forming)
A9HMM0	14	1	128,4475	0,0399	2,3078	Aminopeptidase
A9HFU5	33	3	280,5868	0,0389	1,5218	Aminopeptidase
A9H5P1	13	11	105,4568	0,0373	1,5116	Bacteriocin protein
A9HA05	2	2	11,0668	0,0025	2,1058	Beta-lactamase domain protein
B5ZLC7	26	21	235,2588	0,0190	2,4086	Beta-lactamase domain protein

**Tabela suplementar 2, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HK54	8	7	64,9599	0,0057	1,9783	Carboxymethylenebutenolidase
A9HKD9	17	14	144,9198	0,0086	1,5198	Carboxypeptidase 1
A9HEA1	15	13	112,5194	0,0001	1,6456	Chaperone protein DnaJ
A9HLJ9	30	2	222,7446	0,0134	2,6485	Chaperone protein HtpG
B5ZKX2	11	5	75,4051	0,0002	2,6643	Cytochrome-c peroxidase
A9HRP9	13	10	87,1363	0,0368	1,5953	Delta-aminolevulinic acid dehydratase
A9HI24	8	2	73,8929	0,0215	2,1195	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase
B5ZJN0	3	2	17,0665	0,0358	1,7815	Dihydroorotase
B5ZL88	37	31	307,8218	0,0366	2,2616	Elongation factor G
A9HE55	14	12	93,6795	0,0119	1,5268	Enoyl-CoA hydratase/isomerase
A9HH66	2	1	23,1414	0,0003	1,6272	Flagellin
B5ZGM4	10	8	57,8182	0,0413	2,2647	Fumarate hydratase class I
A9H186	6	4	36,1868	0,0155	1,8401	Gluconate 2-dehydrogenase (Acceptor)
A9H0G0	25	16	181,1788	0,0314	1,8355	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
A9HM86	13	10	75,5834	0,0099	1,6997	Glycine--tRNA ligase beta subunit
A9HBG9	4	2	23,1491	0,0186	2,7506	Glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
A9HKK6	10	7	58,5993	0,0163	1,8442	Group B oligopeptidase pepB
B5ZG78	6	5	33,0114	0,0001	25,4975	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 3
B5ZFU6	10	7	76,4053	0,0186	1,8816	Homoserine dehydrogenase
B5ZH61	3	3	26,3868	0,0005	2,4070	Intracellular protease, Pfpl family
A9HJY3	5	4	28,5596	0,0159	1,7264	Leucyl aminopeptidase
A9HK29	11	8	74,9658	0,0045	1,5918	Lysine--tRNA ligase

**Tabela suplementar 2, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HH05	3	3	15,9576	0,0129	8,5332	Malate dehydrogenase (Oxaloacetate-decarboxylating) (NADP(+))
A9HBL5	22	16	228,0726	0,0021	4,2299	Mannitol 2-dehydrogenase
B5ZJL7	5	4	30,3790	0,0055	1,7977	Membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase
B5ZEV5	12	1	86,5138	0,0001	3,3929	Methylenetetrahydrofolate reductase
A9HRT4	2	1	11,3214	0,0083	16,9835	NADH-quinone oxidoreductase chain F
A9HSA2	3	2	22,3663	0,0156	4,0666	Oligoendopeptidase F
A9HED6	10	9	113,6194	0,0408	1,5166	OmpW family protein
B5ZDG9	19	1	128,6310	0,0031	3,0242	Peptidase M20
A9HGX3	31	22	273,0745	0,0026	3,1002	Probable phosphoketolase
A9HMR4	4	2	29,0152	0,0431	2,1488	Putative 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase
A9H7X7	2	1	11,2654	0,0017	4,5530	Putative acyl-CoA thioester hydrolase
A9HFG1	4	3	26,5623	0,0337	2,1237	Putative ATPase
A9HN12	20	13	160,8603	0,0011	1,9248	Putative glycyl aminopeptidase
A9HNX8	5	4	36,8577	0,0002	4,3806	Putative methyltransferase protein
A9H878	4	2	26,5012	0,0005	1,6915	Putative oxidoreductase
A9H221	3	1	21,2121	0,0404	1,7369	Putative polyketide synthase
A9HBF1	9	1	78,9862	0,0059	1,7632	Putative toluene tolerance
A9HJA9	9	5	67,5132	0,0176	2,6647	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta
A9HIP1	11	9	85,6977	0,0043	3,0172	S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase
A9HIP3	6	2	35,5891	0,0013	3,9775	S-formylglutathione hydrolase
A9GZG8	5	4	26,4837	0,0293	1,5361	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))
B5ZG30	6	1	32,9869	0,0192	3,5499	Short-chain dehydrogenase/reductase SDR

**Tabela suplementar 2, Cont**

Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Description
A9HS68	20	15	124,1521	0,0409	1,8069	Signal recognition particle protein
B5ZM28	2	2	11,6628	0,0107	2,1244	Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system
B5ZK29	5	5	35,9614	0,0132	1,8216	TOBE domain protein
A9H320	65	1	597,0420	0,0066	6,8122	Transaldolase
B5ZF58	36	1	391,7074	0,0031	6,4105	Transketolase
A9H9H6	11	4	83,6334	0,0190	1,9777	Uncharacterized protein
A9HIN9	3	2	18,5758	0,0037	1,9847	Uncharacterized protein
A9H3Z8	6	1	41,0188	0,0199	2,4190	Uncharacterized protein
A9HKE4	12	8	88,4535	0,0004	1,8251	Uncharacterized protein
A9HH52	3	1	15,1967	0,0261	1,9758	Uncharacterized protein
A9HCR3	12	11	92,1134	0,0024	1,5082	Uncharacterized protein
A9HC53	2	1	10,7785	0,0032	7,2389	Uncharacterized protein
A9HDU3	9	9	69,8241	0,0041	1,5317	UPF0303 protein GDI1201
A9HKW8	9	8	63,7025	0,0104	1,5634	Uridylate kinase