

PAPEL DOS GENES DE BIOSÍNTESE (*otsA*) E DEGRADAÇÃO
(*treA*) DE TREALOSE NA RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA
Gluconacetobacter diazotrophicus A ESTRESSES AMBIENTAIS E NA
SUA INTERAÇÃO COM PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

JULIANA FERREIRA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO – 2014

PAPEL DOS GENES DE BIOSÍNTESE (*otsA*) E DEGRADAÇÃO
(*treA*) DE TREALOSE NA RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA
Gluconacetobacter diazotrophicus A ESTRESSES AMBIENTAIS E NA
SUA INTERAÇÃO COM PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

JULIANA FERREIRA DA SILVA

“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 Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MAIO - 2014

PAPEL DOS GENES DE BIOSÍNTESE (*otsA*) E DEGRADAÇÃO
(*treA*) DE TREALOSE NA RESISTÊNCIA DA BACTÉRIA
Gluconacetobacter diazotrophicus A ESTRESSES AMBIENTAIS E NA
SUA INTERAÇÃO COM PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

JULIANA FERREIRA DA SILVA

“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 Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 30 de maio de 2014.

Comissão Examinadora:

Prof. Eldo Campos (D. Sc- Biociências e Biotecnologia) - UFRJ

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

Prof^a. Rosana Rodrigues (D. Sc. – Produção Vegetal) - UENF

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

"Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.
A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar
porque um belo dia se morre".
Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

A Deus sobre todas as coisas.

Aos meus pais, por tudo que fazem por mim, buscando orientar-me em todos os momentos, pelo carinho, pela amizade, por serem PAI e MÃE.

Aos meus irmãos: Jussara e Luiz Gustavo. Amo vocês.

Ao Diogo Fonseca da Rocha, por estar sempre ao meu lado, por todos os momentos que passamos juntos, pelo companheirismo, carinho, pela amizade. Pelo amor incondicional. Amo você!

Às minhas amigas, Cristiane Stabenow, Luciana Almeida, Monique Neto, Tatiana Lopes, que se fizeram sempre presentes. Nunca cansaram de ouvir os meus desabafos, de vivenciar as minhas alegrias, mostrando-se intensamente AMIGAS.

À grande amiga Renata Vasconcelos que sempre esteve ao meu lado, pelo carinho, amizade. Amo você!

À grande amiga Patrícia Louzada, pelo carinho, companheirismo, por se fazer presente nos momentos tristes e alegres durante a minha trajetória no doutorado. Pelas dicas, sugestões. Por ter-se tornado uma grande amiga. Eternamente especial.

Aos amigos Ana Lúcia, Suzane Ariádina, Luciano Vespoli, Roberta, Leandro pelos excelentes momentos vividos juntos ao longo dessa vida acadêmica.

Ao professor Gonçalo Apolinário pela orientação. Obrigada!

Aos professores(as) Eldo Campos, Vanildo Silveira e Rosana Rodrigues, por aceitarem fazer parte da banca examinadora da tese de doutorado.

Aos professores, técnicos e alunos do LBT e LMGV que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, à FINEP, FAPERJ e FENORTE, pelo apoio financeiro.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

A UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade de realização do Doutorado.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. CAPÍTULOS	6
3.1. PAPEL ESSENCIAL DA TREALASE PERIPLASMÁTICA (<i>treA</i>) DE <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> NA RESISTÊNCIA A ESTRESSES AMBIENTAIS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL EM <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	6
3.1.1. INTRODUÇÃO	6
3.1.2. REVISÃO	8
3.1.2.1. FERTILIZANTES QUÍMICOS	8
3.1.2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	10
3.1.2.3. ESTRESSES AMBIENTAIS	12
3.1.2.4. ESTRESSE OSMÓTICO EM <i>Gluconactobacter diazotrophicus</i>	13

3.1.2.4.1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	13
3.1.2.4.2. Estresse Osmótico	15
3.1.2.5. OSMOPROTETORES.....	17
3.1.2.6. TREALOSE E SUAS FUNÇÕES NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS	18
3.1.2.7. PAPEL DA TREALOSE DURANTE A INTERAÇÃO COM PLANTAS.....	20
3.1.2.8. <i>Arabidopsis thaliana</i> : REFERÊNCIA NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO PLANTA-MICROGANISMO	22
3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.3.1. Cepas bacterianas e condições de cultivo	23
3.1.3.2. Resposta a diferentes estresses ambientais.....	24
3.1.3.3. Microscopia ótica	24
3.1.3.4. Ensaio de quantificação de trealose	25
3.1.3.5. Material vegetal e condições de crescimento.....	25
3.1.3.6. Inoculação e ensaios de colonização.....	26
3.1.3.7. Análises fenotípicas de promoção do crescimento vegetal.....	26
3.1.3.8. Ensaio de colonização.....	26
3.1.3.9. Estatística.....	27
3.1.4. RESULTADOS.....	27
3.1.4.1. A trealase periplasmática é essencial para a resistência ao estresse osmótico em <i>G. diazotrophicus</i>	27
3.1.4.2. O gene <i>treA</i> é essencial para resistência a baixas temperaturas em <i>G. diazotrophicus</i>	32
3.1.4.3. Efeito dos estresses provocado por sacarose e NaCl na morfologia de <i>G. diazotrophicus</i> WT e mutante <i>Gd</i> ▲ <i>treA</i>	32
3.1.4.4. Mutação em <i>treA</i> provoca acúmulo de trealose sob condições de estresse hiperosmótico.....	35
3.1.4.5. O acúmulo de trealose por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> durante a interação com <i>A. thaliana</i> favorece a promoção do crescimento vegetal	36
3.1.5. DISCUSSÃO	38

3.1.6. CONCLUSÕES	42
3.2. O PAPEL ESSENCIAL DE <i>otsA</i> NA RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS EM <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5	44
3.2.1. INTRODUÇÃO	44
3.2.2. REVISÃO	45
3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.2.3.1. Cepas bacterianas, meios e condições de cultivo.....	47
3.2.3.2. Resposta a diferentes estresses ambientais.....	48
3.2.3.3. Ensaio de quantificação de trealose	48
3.2.3.4. Ensaio de solubilização de fósforo e zinco.....	49
3.2.3.5. Ensaio de fixação biológica do nitrogênio	49
3.2.3.6. Análise filogenética da proteína <i>otsA</i>	49
3.2.3.7. Material vegetal e condições de crescimento.....	50
3.2.3.8. Inoculação e ensaios de colonização.....	50
3.2.3.9. Análises fenotípicas de promoção do crescimento vegetal.....	50
3.2.3.10. Ensaios de colonização.....	51
3.2.3.11. Estatística.....	51
3.2.4. RESULTADOS.....	51
3.2.4.1. A via de biossíntese de trealose (<i>otsA</i>) é essencial para resistência ao estresse por metal em <i>G. diazotrophicus</i>	51
3.2.4.2. Envolvimento de <i>otsA</i> na fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fósforo e zinco <i>in vitro</i>	56
3.2.4.3. A mutação no gene <i>otsA</i> não altera o potencial de promoção do crescimento vegetal de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	57
3.2.5. DISCUSSÃO	60
3.2.6. CONCLUSÕES	64
3.2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

DA SILVA, Juliana Ferreira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; maio, 2014; Papel dos genes de biossíntese (*otsA*) e degradação (*treA*) de trealose na resistência da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* a estresses ambientais e na sua interação com plantas de *Arabidopsis thaliana*. Orientador: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Rosana Rodrigues e Ricardo Enrique Bressan Smith.

A utilização maciça de fertilizantes químicos na agricultura representa importantes custos à produção vegetal, além de propiciar consequências danosas ao meio ambiente. A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* tem sido amplamente estudada, já que é capaz de promover o crescimento de culturas agrícolas economicamente importantes. Essa bactéria possui grande potencial de utilização na agricultura como uma alternativa ecologicamente viável e, embora existam trabalhos visando identificar as características de promoção do crescimento vegetal, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a tolerância a estresses abióticos nesta bactéria, bem como sobre sua habilidade de promover o crescimento vegetal. Dentre as características relevantes desta bactéria, está sua elevada tolerância ao estresse osmótico e metais pesados. Após o sequenciamento do seu genoma, genes relacionados com a tolerância a estresses abióticos foram preditos, tais como, *otsA/otsB* e *treA*, os quais participam das vias de biossíntese e degradação de trealose, respectivamente. Trealose é uma molécula osmoprotetora, visto que protege as estruturas

biológicas contra variados tipos de estresses ambientais. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o papel dos genes de biossíntese e degradação de trealose, tanto na resistência desta bactéria a estresses ambientais quanto na sua capacidade de interação com plantas hospedeiras. No capítulo 1, observou-se que a mutação no gene *treA* de *G. diazotrophicus*, o qual codifica para a síntese da trealase periplasmática, altera o perfil de resistência ao estresse osmótico e favorece a promoção do crescimento de *Arabidopsis thaliana*. Os dados demonstraram que a tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse osmótico está associada à presença de uma trealase periplasmática, a qual alivia o excesso de trealose gerada durante o estresse. A inibição da multiplicação celular e alterações morfológicas observadas no mutante *Gd*▲*treA* são, provavelmente, decorrentes do acúmulo de trealose gerado, durante o estresse, e do seu efeito tóxico quando em altas concentrações. Por fim, foi observado o efeito benéfico da inoculação de *Gd*▲*treA* durante a interação com plantas selvagens de *A. thaliana*. No capítulo 2, foi demonstrado que a mutação no gene de biossíntese de trealose (*otsA*) de *G. diazotrophicus* não afeta o perfil de resistência da bactéria ao estresse osmótico quando comparado ao perfil de resistência da estirpe selvagem. Neste sentido, testou-se tal mutante frente a outros estresses ambientais, tais como, alumínio, cádmio, cobalto e zinco, e verificamos a influência dessa via durante a interação planta-bactéria. Os resultados revelaram que a mutação em *otsA* resulta em alta sensibilidade a cádmio e zinco. A mutação favoreceu a resistência da bactéria na presença do alumínio. Quanto à capacidade de solubilizar fósforo e zinco, observou-se que a mutação afeta negativamente o perfil de *G. diazotrophicus* solubilizar ambos os nutrientes. A mutação em *otsA* não altera a capacidade de colonização e promoção do crescimento vegetal de *G. diazotrophicus*. Os dados revelaram que o gene de biossíntese de trealose de *G. diazotrophicus* possui papel essencial na resistência a estresses metálicos. Em suma, este trabalho permitiu verificar o papel essencial dos genes de biossíntese e degradação de trealose de *G. diazotrophicus* durante diversos estresses ambientais e o papel efetivo desses genes durante a interação bactéria-planta.

Palavras-chave: estresses ambientais, metal pesado, trealose, *treA*, *otsA*, *G. diazotrophicus*, *A. thaliana*

ABSTRACT

DA SILVA, Juliana Ferreira; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; maio, 2014; Role biosynthesis (*otsA*) and degradation (*treA*) genes of trehalose on the resistance of the bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* at environmental stress and its interaction with plants of *Arabidopsis thaliana*. Adviser: Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Co-advisers: Rosana Rodrigues e Ricardo Enrique Bressan Smith.

The massive use of chemical fertilizers in agriculture has harmful consequences to the environment. The bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* has been widely studied because it is able to promote plant growth of several economically important crops. This characteristic gives to this bacteria great potential to be used in agriculture as an ecologically viable alternative. Although there are studies to identify the characteristics of plant growth promotion, little is known about the molecular mechanisms involved in tolerance to abiotic stresses in these bacteria, as well as their ability to promote plant growth. Among the relevant characteristics of this bacterium is its high tolerance to osmotic stress and heavy metals. After sequencing of its genome, a set of genes related to abiotic stress tolerance predicted, such as *otsa/otsB* and *treA*, which participate in the process of synthesis and degradation of trehalose, respectively. Trehalose is an osmoprotector molecule. This molecule protects numerous biological structures against various types of stress environmental. This work was dedicated to the characterization of the role of genes of biosynthesis and degradation of trehalose in both the

resistance of the bacteria to environmental stresses and in their ability to interact with host plants. In Chapter 1, it was observed that mutation in the gene *treA* of *G. diazotrophicus* which coded for the synthesis of periplasmic trehalase change the profile of resistance to osmotic stress and promote growth promotion in *Arabidopsis thaliana*. The data demonstrate that tolerance of *G. diazotrophicus* to osmotic stress is associated with the presence of a periplasmic trehalase, which relieves the trehalose excess generated during stress. The inhibition of cell proliferation and morphological changes observed in the mutant *Gd*▲*treA* are probably arising from the accumulation of trehalose generated during stress and its toxic effect at high concentrations. Finally, the beneficial effect of inoculation of *Gd*▲*treA* was observed during the interaction with plants wild type of *A. thaliana*. In chapter 2, it was demonstrated that the mutation in the gene of biosynthesis of trehalose (*otsA*) of *G. diazotrophicus* does not affect the resistance profile of the bacterium to osmotic stress compared with the wild type strain. In this sense, we tested this mutant in comparison to other environmental stresses, such as aluminum, cadmium, cobalt and zinc and checked the influence of this pathway during bacteria-plant interaction. The results revealed that the mutation in *otsA* results in high sensitivity the cadmium and zinc. Interestingly, mutation favors the resistance of the bacteria in the presence of aluminum. As the ability to solubilize phosphate and zinc was observed that mutation affects adversely the profile of *G. diazotrophicus* solubilize both nutrients. A mutation in *otsA* not alters the ability of colonization and plant growth promotion of *G. diazotrophicus*. The data revealed that trehalose biosynthesis pathway of *G. diazotrophicus* has an important role in resistance to metal stress. In short, this work has shown the key role of biosynthetic and degradation genes of trehalose in *G. diazotrophicus* during various environmental stresses and the effective role of these genes in the bacteria-plant interaction.

Keywords: environmental stress, heavy metal, trehalose, *treA*, *otsA*, *G. diazotrophicus*, *A. thaliana*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas dependem de elementos químicos para uma nutrição adequada. Sendo assim, a deficiência desses elementos prejudica o crescimento vegetal e, conseqüentemente, a produtividade agrícola. O uso de fertilizantes químicos foi um dos alicerces para o aumento significativo da produtividade agrícola mundial (Huang et al., 2002). Devido ao aumento populacional e à conseqüente demanda por produtos de origem agrícola, houve uma necessidade cada vez maior no consumo de fertilizantes.

Atualmente, a agricultura mundial consome cerca de 170 milhões de toneladas/ano de fertilizantes químicos (IFA, 2014). No entanto, apesar de necessário, o uso contínuo e elevado de fertilizantes inorgânicos, além de gerar elevados custos para a produção agrícola, tem conseqüências danosas para o meio ambiente. Deste modo, devido aos problemas causados pela utilização de fertilizantes químicos, há uma preocupação significativa no desenvolvimento de métodos que promovam uma agricultura sustentável.

Uma alternativa promissora ao uso maciço de fertilizantes químicos é o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) (Baldani e Baldani, 2005; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011). Entretanto, o efetivo uso dessas bactérias depende da sua capacidade de colonizar eficientemente as plantas inoculadas a campo, além de resistir aos diversos estresses ambientais enfrentados. A desidratação, a salinidade, a

toxidez por metais e a temperatura destacam-se como estresses ambientais que afetam a sobrevivência de bioinoculantes (Moradi et al., 2011).

Os diferentes estresses ambientais supracitados podem afetar direta ou indiretamente o estado fisiológico de um organismo, alterando o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento. No entanto, uma resposta comum dos organismos a tais estresses abióticos é o acúmulo de açúcares e outros solutos compatíveis, tais como, sacarose, prolina, glicina-betaína, manitol, sorbitol, glutamato e glutamina (Hare et al., 1998). Esses solutos compatíveis atuam como osmoprotetores, sendo capazes de conferir tolerância a uma variedade de estresses ambientais em diversas espécies procarióticas e eucarióticas (Iturriaga et al., 2009). Um desses solutos é a trealose, um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose, que desempenha papel fisiológico importante, atuando na proteção ao estresse abiótico em um grande número de organismos, incluindo bactérias, leveduras e invertebrados (Wingler et al., 2002; Elbein et al., 2003).

A trealose tem mostrado estabilizar enzimas, proteínas e membranas lipídicas de forma eficiente, bem como proteger as estruturas biológicas contra danos durante a dessecação. No entanto, altas concentrações de trealose podem tornar-se tóxicas para a célula. No reino vegetal, a maioria das espécies não parece acumular quantidades detectáveis de trealose, com a notável exceção das plantas da “ressurreição” altamente tolerantes à dessecação (Wingler et al., 2002). Embora estudos que demonstrem o papel da trealose durante os estresses abióticos e interações bacterianas tenham sido reportados, informações detalhadas acerca do seu metabolismo e degradação, além do seu papel durante a interação de PGPBs com plantas hospedeiras, ainda são escassas.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma PGPB Gram-negativa, endofítica e diazotrófica, a qual possui amplas características de aplicação biotecnológica, como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, produção de fitormônios, antagonismo a fitopatógenos e controle biológico (Madhaiyan et al., 2004; Blanco et al., 2005; Muthukumarasamy et al., 2006; Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009). Recentemente, a capacidade para tolerar alguns estresses abióticos também tem despertado o interesse em pesquisadores da área, como, por exemplo, a identificação do gene *czcA*, determinante para a tolerância a metais pesados em *G. diazotrophicus* (Intorne et al., 2012). Devido a

essas características biotecnológicas, torna-se interessante e promissor o estudo de genes envolvidos com a tolerância a estresses ambientais e, conseqüentemente, ensaios de inoculação, no intuito de entender o papel dessas vias durante a interação bactéria-planta, uma vez que o conhecimento das estratégias da bactéria desenvolvidas, para esta interação, torna-se uma ferramenta importante para ser usada em favor dos sistemas agrícolas, aumentando a colonização de plantas de interesse agrônômico com bactérias promotoras do crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar o envolvimento dos genes de biossíntese e degradação de trealose, na resistência a diferentes estresses ambientais em *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e a participação dessas vias durante a interação da bactéria com plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2.2. Objetivos específicos

- I) Estudar o papel dos genes de biossíntese e degradação de trealose na resistência a diferentes estresses ambientais usando mutantes de inserção defectivos para os genes *otsA* e *treA* de *G. diazotrophicus* PAL5.
- II) Avaliar o efeito das mutações em *treA* no perfil de crescimento e na morfologia de *G. diazotrophicus* PAL5 na presença dos estressores NaCl, Na₂SO₄, PEG 400 e sacarose cultivada em meio líquido.
- III) Avaliar o efeito da mutação em *otsA* no perfil de crescimento na presença de metais pesados (alumínio, cádmio, cobalto, zinco) cultivada em meio sólido.
- IV) Avaliar o impacto das mutações em *otsA* e *treA* no acúmulo de trealose sobre condições de estresse hiperosmótico.

V) Avaliar a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo e zinco no mutante *otsA*.

VI) Estudar o papel do metabolismo da trealose durante a interação entre *Arabidopsis thaliana*, através da inoculação de plantas ecótipos silvestres (Col-0 e WS) e do mutante COC6 (defectivo para o gene da trealase vegetal), com a bactéria selvagem e com os mutantes defectivos para a biossíntese e degradação de trealose (*otsA* e *treA*).

VII) Verificar a contribuição dos genes *otsA* e *treA* no crescimento e sobrevivência da bactéria durante a colonização vegetal.

3. CAPÍTULOS

3.1. PAPEL ESSENCIAL DA TREALASE PERIPLASMÁTICA (*treA*) DE *Gluconacetobacter diazotrophicus* NA RESISTÊNCIA A ESTRESSES AMBIENTAIS E PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO VEGETAL EM *Arabidopsis thaliana*

3.1.1. INTRODUÇÃO

A agricultura mundial consome anualmente cerca de 170 milhões de toneladas de fertilizantes químicos (IFA, 2014). O uso contínuo e elevado de fertilizantes representa importantes custos para a produção agrícola e tem consequências danosas para o meio ambiente, gerando contaminações para o lençol freático, lagos e rios.

Uma alternativa promissora ao uso maciço de fertilizantes químicos é o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) fornecidas como bioinoculantes (Baldani e Baldani, 2005; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011).

O efetivo uso dessas bactérias depende da sua capacidade de colonizar eficientemente as plantas inoculadas a campo, além de resistir aos diversos estresses ambientais. A desidratação, a salinidade, a toxidez, por metais, e as

amplas variações de temperatura destacam-se como estresses ambientais que afetam a eficiência de bioinoculantes bacterianos (Moradi et al., 2011).

Uma resposta comum dos organismos a estresses ambientais é o acúmulo de osmoprotetores. O dissacarídeo trealose é considerado uma molécula osmoprotetora encontrada em um grande número de organismos, incluindo bactérias, leveduras e plantas, e protege células e biomoléculas de danos causados por estresses (Wingler et al., 2002; Elbein et al., 2003).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm revelado a participação das vias de biossíntese e degradação da trealose na interação planta-microrganismo (Brodmann et al., 2002; Lopez et al., 2008; Suarez et al., 2008). Dentre os componentes de tais vias, o processo de degradação da trealose, realizado pela enzima trealase (treA), tem recebido crescente atenção (Muller et al., 2001; Brodmann et al., 2002; Lopez et al., 2008; Barraza et al., 2013). Esta enzima, responsável pela hidrólise de trealose em duas moléculas de glicose, está envolvida em múltiplas funções regulatórias, incluindo a resposta contra patógenos, a regulação da viabilidade bacteriana e a eficiência de nodulação em interações simbióticas (legume-*Rhizobium*). A trealase vegetal é induzida durante a colonização por microrganismos patogênicos e associações simbióticas (Muller et al., 2001; Brodmann et al., 2002, Lopez et al., 2008; Barraza et al., 2013). Entretanto, informações detalhadas acerca do papel da trealose na associação entre PGPBs e plantas ainda são escassas. Considerando-se a existência de vias de biossíntese e degradação de trealose, tanto nos microrganismos quanto em plantas hospedeiras, permanecem obscuros os mecanismos que promovem a regulação coordenada destas vias durante tais interações.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma PGPB Gram-negativa, endofítica e diazotrófica que possui diversas características potencialmente favoráveis ao desenvolvimento vegetal, como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, produção de fitormônios, antagonismo a fitopatógenos e tolerância a metais pesados (Madhaiyan et al., 2004, Muthukumarasamy et al., 2006, Saravanan et al., 2007, Intorne et al., 2009, Blanco et al., 2010, Intorne et al., 2012). Adicionalmente, uma característica especialmente interessante desta bactéria é a sua elevada tolerância a estresse osmótico, sendo capaz de crescer na presença de concentrações de sacarose tão altas como 30% (Cavalcante e

Döbereiner, 1988). Até o presente, os mecanismos moleculares envolvidos em tal osmotolerância permanecem inexplorados.

A análise do genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* indica a existência de diversas vias de resistência a estresses ambientais, incluindo genes para biossíntese e degradação de trealose (Bertalan et al., 2009). Dentre tais genes, observou-se a presença do gene (*treA*), que codifica uma trealase periplasmática (Bertalan et al., 2009). Entretanto, não foram encontrados genes para a trealase citoplasmática no genoma desta bactéria, indicando o papel crucial da enzima periplasmática na degradação de trealose. Apesar da identificação de genes responsáveis pela síntese e degradação de trealose no genoma de *G. diazotrophicus*, ainda não se sabe o papel de tais vias, tanto na resistência a estresses ambientais quanto durante o processo de interação com plantas hospedeiras. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel do gene de degradação de trealose na proteção de *G. diazotrophicus* PAL5 contra estresses abióticos (NaCl, Na₂SO₄, sacarose, PEG 400 e baixa temperatura), bem como na capacidade de colonização e promoção de crescimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*. Este é o primeiro estudo que caracteriza o envolvimento do gene de degradação de trealose de *G. diazotrophicus* na resistência a estresses ambientais e participação na promoção do crescimento vegetal em *Arabidopsis thaliana*.

3.1.2. REVISÃO

3.1.2.1. FERTILIZANTES QUÍMICOS

Os fertilizantes químicos desempenham um papel importante no desenvolvimento vegetal, entretanto, os mesmos acarretam impactos ambientais, tais como, a contaminação química de solos e águas, além de uma forte elevação nos custos de produção (Gunnell et al., 2007; Leach et al., 2008).

A formulação básica dos fertilizantes é composta por uma combinação de três macronutrientes, o nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K). Por outro lado, além dos macronutrientes (NPK) existem os macronutrientes secundários

(enxofre, magnésio e cálcio) e os micronutrientes (ferro, manganês, zinco, cobre, cobalto, molibdênio, boro, cloro e silício), os quais também são utilizados na formulação dos fertilizantes, de acordo com as condições de solo, região e produtividade (Tavares et al., 2011).

No entanto, grande parte dos nutrientes aplicados nas lavouras não é absorvida pelas plantas. A deficiência desses nutrientes reduz o desenvolvimento vegetal, prejudicando o seu potencial de produção. De acordo com as características dos solos, 60 a 90% dos nutrientes adicionados à lavoura, tendem a ser desperdiçados (Adesemoye & Kloepper, 2009). Conseqüentemente, estes nutrientes poluem o ambiente ao serem lixiviados para corpos d'água ou volatizarem para a atmosfera.

Com a atual demanda de alimentos, nossa sociedade passou a ser dependente da produtividade gerada pelo uso corriqueiro de fertilizantes químicos. Cerca de 40% da população mundial é alimentada a partir da produtividade gerada por fertilizantes (UNEP, 2007). No entanto, o preço e o uso dos fertilizantes têm aumentado com o tempo, uma vez que a matéria-prima que os produz está se esaurindo.

Devido ao uso abusivo de fertilizantes químicos, visando incrementar a produção agrícola, ocorre uma insustentabilidade do sistema atual de produção de alimentos. Por outro lado, se continuarmos seguindo o modelo atual, a fonte de matéria-prima necessária para a síntese de fertilizantes poderá se esgotar e a produtividade agrícola sofrerá sérios prejuízos.

Entre 2007 e 2010, o mercado brasileiro importou 63% dos fertilizantes químicos, no intuito de suprir suas necessidades agrícolas. Atualmente, há uma forte dependência dos produtores internacionais de fertilizantes (Tavares et al., 2011). O mercado disponível para consumo de fertilizantes por cultura está representado na Figura 1.

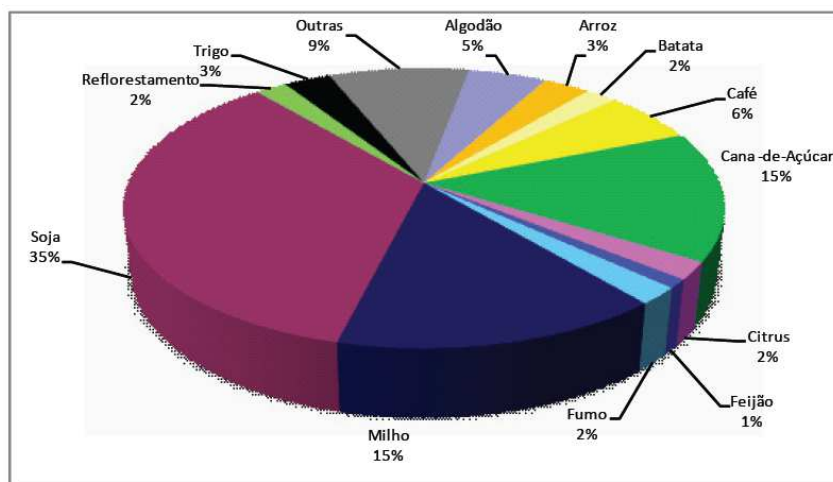


Figura 1: Consumo de Fertilizantes por Cultura em 2010 (%). Adaptado de Gestão de Informação de Marketing da Bunge Fertilizantes S/A, 2011.

Neste sentido, é emergente a busca por insumos biológicos que possam substituir, parcial ou integralmente, os agroquímicos. Atualmente, uma das estratégias utilizadas para melhorar o rendimento médio de culturas vegetais, economicamente importantes para o país, baseia-se no uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal como bioinoculante.

3.1.2.2. BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Abordagens que visam ao uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) são vistas como uma alternativa viável, tanto sob o ponto de vista econômico quanto sob o prisma ambiental, a fim de melhorar o rendimento médio de culturas vegetais economicamente importantes para o país (Sokolova et al., 2011).

Dentre as bactérias promotoras do crescimento vegetal, as endofíticas têm sido alvo de diferentes estudos nas últimas décadas, visto que já foram encontradas colonizando o interior de culturas de interesse econômico, como cana-de-açúcar (Cavalcante e Dobereiner, 1988), citros (Araujo et al., 2001), arroz (Sandhiya et al., 2005), milho (Araujo et al., 2000), banana (Martínez et al., 2003), dentre outras. Tal interação tem despertado o interesse dos pesquisadores devido aos benefícios que tais bactérias trazem para a planta hospedeira.

Esses microrganismos são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e promover o crescimento vegetal, atuando sobre o metabolismo das plantas de

uma maneira positiva por meio da produção de fitormônios como a auxina (Fuentes-Ramirez et al., 1993), giberelinas (Bastián et al., 1998) e citocininas (Bazzicalupo & Okon, 2000). As PGPBs podem conferir às plantas uma maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, proteção contra organismos patogênicos ou induzir a planta a reforçar seus sistemas de resistência a patógenos (Mansoor et al., 2007; Wei et al., 1991; Guo, 2004). As PGPBs atuam na solubilização de fosfato e zinco inorgânico (Verma et al., 2001; Intorne et al., 2009), além de apresentarem resistência a metal pesado (GUO et al., 2010; XIAO et al., 2010; INTORNE et al., 2012).

Devido às características supracitadas, o interesse nestas bactérias aumentou nos últimos anos, principalmente no que diz respeito à possibilidade de seu uso como biofertilizantes e pesticidas (Weyens et al., 2009). De maneira geral, o uso de PGPBs permite uma redução na aplicação de fertilizantes de até 50%, sem haver reduções na produtividade (Baldani et al., 1986; Hayat et al., 2010; Good & Beatty, 2011; Miransare, 2011).

Dentre as características presentes nas PGPBs, a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e de solubilizar nutrientes do solo tem interações diretas na aplicação de fertilizantes. A soja brasileira destaca-se como exemplo de maior sucesso do uso de PGPBs para a redução de fertilizantes e fixação de nitrogênio. Neste sentido, a economia gerada foi de 2,5 bilhões de dólares em 2002 (Alves et al., 2003).

A solubilização de nutrientes (fosfato, zinco, ferro e potássio) interfere diretamente com a fertilização. Desta forma, bactérias capazes de solubilizar esses nutrientes, através da secreção de ácidos orgânicos, permitem que esses elementos sejam disponibilizados para a planta. Isto porque, na forma solúvel, os mesmos poderão ser absorvidos pela bactéria ou pela planta (Panhwar et al., 2011).

A capacidade de atuar em áreas contaminadas, principalmente por metais pesados, destaca-se como outra característica das PGPBs, que tem despertado interesse nos últimos anos (Weyens et al., 2009). Dentre as espécies de bactérias endofíticas, *Gluconacetobacter diazotrophicus* tem sido descrita como promotora do crescimento vegetal, visto que diferentes características encontradas nesta bactéria favorecem o crescimento da planta (Saravanan et al., 2007).

A aplicação das PGPBs na agricultura destaca-se como uma alternativa sustentável e economicamente viável, melhorando o rendimento das culturas vegetais e contribuindo para um melhor uso dos recursos naturais (Thakore, 2006; Triplet et al., 2008; Vessey et al., 2011). No entanto, a eficiência destes inoculantes não depende apenas das características dos vegetais, mas também dos aspectos da bactéria envolvida nesta interação.

Os estudos da interação planta-endófito, desenvolvidos até o momento, têm como objetivo entender as características da bactéria envolvidas na promoção do crescimento vegetal (Vargas et al., 2003; Boddey et al., 2003; Cavalcante et al., 2007). Entretanto, o efetivo uso dessas bactérias depende da sua capacidade de colonizar eficientemente as plantas inoculadas a campo, além de resistir aos diversos estresses ambientais. A desidratação, a salinidade, a toxidez por metais e a temperatura destacam-se como estresses ambientais que afetam a sobrevivência de bioinoculantes (Moradi et al., 2011).

3.1.2.3. ESTRESSES AMBIENTAIS

Plantas e microrganismos são frequentemente desafiados por variações ambientais, tais como, seca, salinidade, extremos de temperatura, exposição a metais tóxicos, deficiência de nutrientes (Moradi et al., 2011). Esses estresses atuam como fatores limitantes ao crescimento de diversos organismos. Por sua vez, no caso dos vegetais, os mesmos causam danos significativos ao rendimento agrícola.

Os diferentes estresses ambientais supracitados podem afetar, direta ou indiretamente, o estado fisiológico de um organismo, alterando o seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento (Larcher, 2003). Seca, salinidade, temperatura e metais pesados interferem no balanço osmótico celular, o qual pode acarretar a perda de turgescência celular. Neste sentido, as membranas tendem a se desorganizar, as proteínas podem perder sua atividade ou se desnaturar e, muitas vezes, os níveis excessivos de espécies reativas de oxigênio (ROS) levam a danos oxidativos (Larcher, 2003; Munns e Tester, 2008).

Dentre os estresses ambientais enfrentados pelos vegetais, o estresse hídrico e o estresse salino são considerados os fatores que mais limitam a

produtividade agrícola, além do mais, tais fatores afetam a sobrevivência de diversas PGPBs durante a colonização vegetal.

Estima-se, por exemplo, que o aumento da salinização das terras aráveis terá efeitos globais devastadores, resultando em 30% de perda de terras dentro dos próximos 25 anos e até 50% no ano de 2050 (Wang et al., 2003), além de afetar o processo de colonização de plantas por bactérias promotoras do crescimento vegetal (Miller et al., 1996; Griffiths et al., 2003; Sugawara et al., 2010). A salinidade gera concomitantemente os estresses iônico e osmótico, alterando o balanço iônico, o pH citoplasmático e a atividade de diversas enzimas, por indisponibilizar a água livre do ambiente (Wang et al., 2003).

3.1.2.4. ESTRESSE OSMÓTICO EM *Gluconacetobacter diazotrophicus*

3.1.2.4.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma bactéria Gram-negativa, endofítica e diazotrófica, e foi isolada pela primeira vez por Cavalcante & Döbereiner (1988) a partir de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar, cultivadas em diversas regiões do Brasil. Posteriormente, *G. diazotrophicus* foi isolada de plantas de café, batata doce, abacaxi, capim elefante, café, banana, arroz, entre outros (Li et al., 1991; Muthukumarasamy et al., 2002; Anitha e Thangaraju, 2010). Inicialmente, a bactéria recém-descoberta foi descrita como uma nova bactéria fixadora de nitrogênio tolerante a ácido, a qual recebeu o nome de *Saccharobacter nitrocaptans* (Cavalcante et al., 1988). Em seguida, Gillis e colaboradores (1989), baseados em análises de hibridação RNA/DNA e DNA/DNA, acharam oportuno reclassificá-la como *Acetobacter diazotrophicus*. Assim, permaneceu até o final dos anos 90, quando novamente a taxonomia foi refeita e surge a nomenclatura adotada atualmente, *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Gluconacetobacter diazotrophicus são bastonetes com extremidades arredondadas e dimensões de 0,7 x 0,9 x 2,0 µm. É Gram-negativa, móvel, contendo flagelos laterais, sem movimento espiralado. A temperatura ótima de crescimento e fixação de N₂ é de 30⁰C, sendo bem adaptada a altas concentrações de sacarose (30%) (Cavalcante et al., 1988), podendo fixar

nitrogênio sobre condições microaerófilas. O pH ótimo, para o crescimento e fixação de nitrogênio, é de 5,5 - 6,0, mas, *in vitro*, pode fixar nitrogênio em pH tão baixos quanto 2,5, no entanto, não cresce em pH maiores do que 7,0 (Gillis et al., 1989). *G. diazotrophicus* produz hormônios promotores do crescimento, tais como, ácido indol acético (IAA), giberilinas (Fuentes-Ramirez, 1993) e bacteriocinas, além do mais são hábeis para solubilizar, *in vitro*, dois micronutrientes essenciais para o crescimento da planta, a saber, zinco e fósforo. Tais características permitem classificar *G. diazotrophicus* como uma bactéria promotora do crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB) (Saravanan et al., 2008).

Segundo Döbereiner (1995), mesmo existindo outras bactérias endofíticas diazotróficas associadas à cultura de cana-de-açúcar, *G. diazotrophicus* é uma das principais bactérias responsáveis pelos altos níveis de fixação biológica de nitrogênio (FBN) observado em canaviais, e isto se deve ao seu caráter endofítico e ao alto número (10^6 células g^{-1}) em que esta bactéria tem sido encontrada em culturas de cana-de-açúcar (Dong et al., 1994; Döbereiner et al., 1995). *G. diazotrophicus* tem sido isolada a partir de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar de diversas regiões do Brasil, Austrália, México, África do Sul e Cuba (Cavalcante et al., 1988).

Diversos estudos já foram demonstrados sobre os benefícios gerados por *G. diazotrophicus* frente à produtividade de cana-de-açúcar, em que a inoculação com a estirpe PAL5 em plantas micropropagadas gerou um aumento do peso fresco da parte aérea de 28% (Baldani e Baldani, 2005). O crescimento de outras espécies economicamente importantes como arroz (Anitha e Thangaraju, 2010) e tomate (Luna et al., 2011) também já foram observadas.

Diferentes análises fisiológicas e bioquímicas têm demonstrado que *G. diazotrophicus* tolera altas concentrações de sacarose e baixos índices de pH, fixando nitrogênio em meios de cultura com até 30% de sacarose e pH em torno de 2,5 (Stephan et al., 1991). A capacidade de *G. diazotrophicus* crescer em situações contendo altas concentrações de sacarose sugere uma elevada tolerância ao estresse osmótico.

3.1.2.4.2. Estresse Osmótico

O estresse osmótico pode ser definido como alterações do volume celular, as quais são ocasionadas pela diferença na concentração de solutos entre os dois lados da membrana citoplasmática (Csonka et al., 1991). Tal fenômeno é considerado o principal responsável pelo efeito tóxico sobre o crescimento vegetal e microbiano (Tripathi et al., 1998; Moradi et al., 2011).

A membrana citoplasmática é altamente permeável à água, no entanto não é capaz de resistir a grandes pressões hidrostáticas. Uma diminuição do potencial hídrico no meio extracelular (condições hiperosmóticas) leva a um rápido efluxo da água e perda da turgescência celular. Por sua vez, em situações extremas, a membrana plasmática sofre retração e se separa da parede celular, fenômeno esse conhecido como plasmólise. De modo inverso, durante o choque hiposmótico, a água tende a entrar na célula, levando a um aumento do volume celular e pressão de turgor, acarretando a lise celular (Poolman e Glaasker, 1998).

A adaptação de PGPBs ao estresse osmótico é de extrema relevância, uma vez que a perda de água ocasionada por períodos de seca e acúmulo de solutos no ambiente inibe importantes atividades de promoção do crescimento vegetal, tais como, a fixação de nitrogênio e a produção de hormônios vegetais.

G. diazotrophicus tem como principal sítio de colonização o apoplasto de plantas de cana-de-açúcar, no qual a concentração de sacarose gira em torno de 10%. No entanto, apesar de favorecer o desenvolvimento desta bactéria, a concentração referida do açúcar gera uma elevada pressão osmótica, que inibe o crescimento de muitos microrganismos (Reis e Dobereiner, 1998). Outra característica marcante de *G. diazotrophicus* é a sua capacidade de colonizar diversos tecidos da cana-de-açúcar, estabelecendo-se nos espaços intercelulares. Dessa forma, a bactéria desenvolve uma relação íntima com a planta, utilizando, assim, os osmoprotetores produzidos pelo vegetal durante a interação. Essa versatilidade de colonização sugere uma grande capacidade de osmo adaptação da bactéria.

A multiplicação de *G. diazotrophicus* ocorre tanto no xilema, onde a concentração de sacarose é muito baixa, quanto no apoplasto, onde a concentração deste açúcar é elevada (James et al., 2001). Por sua vez, a capacidade de reagir às mudanças de osmolaridade torna-se uma vantagem

adaptativa, a qual influencia positivamente a habilidade de *G. diazotrophicus* em colonizar diversos ambientes, incluindo o solo, diversas espécies de plantas e insetos.

De acordo com Muñoz-Rojas e Caballero-Melado (2001), na medida em que vai ocorrendo o amadurecimento da cana-de-açúcar, a população de *G. diazotrophicus* diminui significativamente nos tecidos internos da planta. Os autores sugerem que a redução da população bacteriana está relacionada com o aumento do teor de sacarose e a diminuição do potencial hídrico no interior dos tecidos vegetais.

Em 2009, após o sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus*, um conjunto de genes potencialmente envolvidos com a osmotolerância foram identificados, dentre estes, destacaram-se *otsA/otsB* e *treA*, os quais participam das vias de síntese e degradação de trealose, respectivamente (Bertalan et al., 2009). Sabe-se que *G. diazotrophicus* é tolerante a altas concentrações de sacarose, mostrando-se sensível ao estresse salino. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares utilizados pela bactéria para responder ao estresse osmótico. Em um trabalho desenvolvido por Boniolo e colaboradores (2009), observou-se que glicina betaína suprime os efeitos do estresse salino. Os danos celulares causados por concentrações de até 100 mM de NaCl são revertidos pela adição exógena de 20 mM de glicina betaína. Por outro lado, concentrações superiores de NaCl acarretaram mudanças drásticas no crescimento e morfologia de *G. diazotrophicus*, nas quais a adição de glicina betaína não foi capaz de suprimir o efeito de tal estresse.

Em 2011, Velázquez-Hernández e colaboradores demonstraram o papel da levansucrase (LsdA) na osmo adaptação de *G. diazotrophicus*. Para tanto, os autores utilizaram, em condições de estresse osmótico, mutantes defectivos no gene que codifica para a levansucrase. Com isso, observou-se que o levan formado pela ação desta enzima atua como osmoprotetor, além de ser usado como substrato para a formação de biofilme, o qual protege a bactéria do agente estressor.

A habilidade em controlar o balanço osmótico e reparar os danos induzidos pelo estresse osmótico é essencial à vida celular (Warskulat et al., 2004). Células expostas ao estresse osmótico ativam mecanismos que detectam,

reparam e protegem contra os danos celulares induzidos por esta condição (Lamitina e Strange, 2005).

Os principais mecanismos utilizados para conter o estresse osmótico são: ajustes na osmolaridade intracelular através da absorção e acúmulo de potássio no citoplasma, acúmulo de glutamato e absorção ou biossíntese de solutos compatíveis, também conhecidos como osmoprotetores, tais como, prolina, rafinose, sorbitol, manitol, trealose, glicina betaína, dentre outros (Wood et al., 1999).

3.1.2.5.OSMOPROTETORES

Os organismos, de uma forma geral, quando expostos a diferentes estresses ambientais, respondem através da síntese e acúmulo de solutos compatíveis. Tais solutos atuam como osmoprotetores, a fim de neutralizar os efeitos deletérios da alta osmolaridade e desidratação, sendo capazes de conferir tolerância em diversas espécies procarióticas e eucarióticas (Galinski et al., 1995). Os osmoprotetores são compatíveis com a função celular e servem para estabilizar as proteínas e estruturas celulares e/ou manter a turgescência das células por meio de um equilíbrio da pressão osmótica, sem comprometer processos celulares, os quais poderiam ser inibidos por altos níveis de sais citosólicos (Galinski, 1995; Kurz, 2008; Quiñones, et al., 2005).

Os osmoprotetores são classificados em quatro principais classes: os açúcares, os polióis, os aminoácidos e as aminas quartenárias (Galinski, 1995). O acúmulo desses solutos no citoplasma, seja por síntese *de novo*, seja por absorção do meio de cultivo, previne a perda de água e mantém a pressão de turgor da célula em níveis essenciais para o crescimento. Dentre os solutos compatíveis mais comuns em bactérias, destacam-se sacarose, prolina, glicina-betaína, manitol, sorbitol, glutamato, glutamina e trealose. Embora, todos esses solutos sejam encontrados em plantas, a trealose é mais rara nos vegetais (Rontein et al., 2002). A capacidade em acumular esses osmoprotetores varia entre as espécies.

3.1.2.6. TREALOSE E SUAS FUNÇÕES NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose que é sintetizado por uma ampla variedade de organismos, tais como, leveduras, bactérias e plantas (Wingler et al., 2002; Elbein et al., 2003). Esta molécula ganhou interesse especial devido às suas propriedades multifuncionais, tais como, fonte de carbono e energia para microrganismos e vegetais, bem como o seu papel predominante como soluto compatível ou molécula osmoprotetora, que desempenha papel fisiológico importante, atuando na proteção ao estresse abiótico em um grande número de organismos (Zaparty et al., 2013). Nos vegetais, a trealose possui um papel central como regulador do metabolismo do carbono e fotossíntese. Além do mais, tem sido demonstrado que este açúcar possui um papel importante na interação planta-microrganismos (Aeschbacher et al., 1999; Brodman et al., 2002; Djovonic et al., 2013).

Por sua vez, quando a célula é exposta a alguma condição de estresse ambiental, a síntese de trealose é induzida, e os seus níveis aumentam no citoplasma sem que ocorram interferências no metabolismo celular (Murphy et al., 2005; Zhang et al., 2011). O acúmulo desses solutos no citoplasma leva ao aumento do volume celular, o qual é a chave para a sua função osmoprotetora, visto que tal acúmulo permite a proliferação celular sob condições desfavoráveis.

Os procariontes utilizam vários caminhos para a biossíntese de trealose (Paul et al., 2008; Figura 2), incluindo a via da trealose-6-fosfato sintase (TPS; OtsA) e trealose-6-fosfato-fosfatase (TPP; OtsB), enquanto organismos eucariotos utilizam exclusivamente a via TPS e TPP, que representa a via mais utilizada para a síntese de trealose (Paul et al., 2008). Esta via compreende duas enzimas: trealose-6-fosfato sintase (TPS), o qual catalisa a transferência de glicose a partir de UDP-glicose (UDPG) para glicose-6-fosfato (G6P), formando a trealose-6-fosfato (T6P) e UDP. A trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) desfosforila T6P, liberando trealose e fosfato inorgânico (Paul et al., 2008). O excesso de trealose é excretado e transformado em glicose por uma trealase periplasmática (treA), no intuito de ser reaproveitada (Styrvoid e Strom, 1991). A síntese de trealose é ativada na ausência de glicina betaína e prolina no meio externo (Empadinhas e Da Costa, 2008). Estes osmólitos podem ser produzidos *de novo*, mas, muitas

vezes, são acumulados por absorção, a partir do ambiente extracelular, para reduzir o custo energético para a célula.

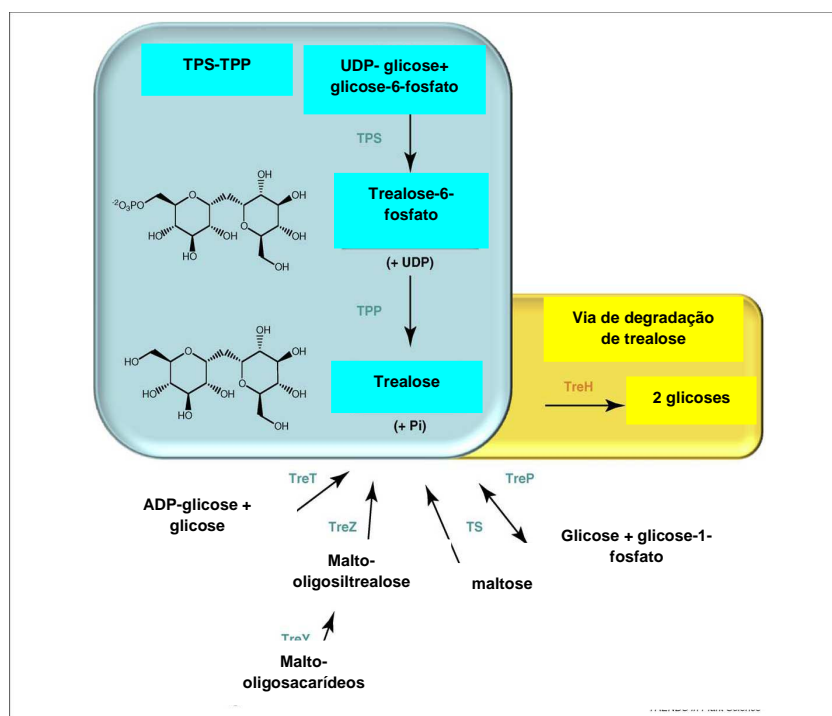


Figura 2. Vias metabólicas de trealose. A única via de síntese de trealose (TPS-TPP), descrita em plantas (caixa azul). A via TPS-TPP também pode ser encontrada em vários organismos eucariotos e procariotos. Vias alternativas de síntese de trealose presentes em outros organismos são mostradas abaixo da caixa azul. As vias TreT, TreY-TreZ e TS foram descritas apenas em organismos procariontes. TreP é restrito aos fungos e bactérias. A via de degradação de trealose em plantas é observada no quadro amarelo. Abreviações: TPS, trealose-6-fosfato sintase; TPP, trealose-6-fosfato fosfatase; TreH, trealase; TreY, Maltooligosil-trealose sintase; TreZ, Maltooligosiltrealose trealohidrolase; TS, trealose sintase; TreT, trealose glicosiltransferase sintase; TreP, trealose fosforilase; UDP, uridina difosfato. Adaptado de Fernandez et al., 2010.

Até recentemente, julgava-se que a presença de trealose e do seu intermediário, trealose-6-fosfato (T6P), ocorria apenas num grupo reduzido de espécies vegetais, conhecidas como plantas da ressurreição, altamente tolerantes à dessecação (Goddijn et al., 1999; Paul et al., 2008). A superexpressão de genes da via de síntese da trealose, por manipulação genética, levou ao aumento de tolerância, de várias espécies de plantas, a diversos estresses abióticos, tais como, o déficit hídrico e salinidade. Neste sentido, a engenharia genética tem contribuído fortemente para o melhoramento vegetal. A tecnologia transgênica permite mobilizar genes a partir de, praticamente, qualquer organismo. Diferentes genes, incluindo aqueles que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de prolina, manitol, glicina betaína, trealose, foram efetivamente utilizados para o

desenvolvimento de plantas transgênicas tolerantes contra estresses múltiplos (Tayal et al., 2004).

Plantas de tabaco, batata e de tomate (*Solanum lycopersicum*), transformadas com genes da biossíntese de trealose, por meio da engenharia genética, são altamente resistentes à seca, baixa e alta temperatura, salinidade e ao estresse oxidativo (Yeo et al., 2000; Almeida et al., 2005; Cortina e Culianez-Macia, 2005).

Por outro lado, Singh e colaboradores (2011), contestando os efeitos benéficos, destacaram que, dependendo da sua concentração, solutos compatíveis podem desestabilizar proteínas. De acordo com os autores, a trealose, quando em alta concentração ou elevado pH, desestabiliza algumas proteínas. Esses aspectos podem modular muitos processos celulares, tais como, a regulação da homeostase proteica (proteostase), interações proteína-proteína e interações proteína-DNA.

3.1.2.7. PAPEL DA TREALOSE DURANTE A INTERAÇÃO COM PLANTAS

Vários microrganismos produzem trealose durante a interação simbiótica ou patogênica com plantas (Muller et al., 1995). Trealose tem um forte efeito no metabolismo e crescimento vegetal. No entanto, sob altas concentrações, ocorre a indução da trealase (treA), o qual catalisa a hidrólise de trealose em duas moléculas de glicose. Brodmann e colaboradores (2002) sugerem que essa ativação é parte da resposta de defesa vegetal para prevenir o excesso de trealose nas células vegetais, visto que altas concentrações de trealose podem interferir na regulação do metabolismo do carbono.

A trealase é requerida para metabolizar trealose, sintetizada a partir de trealose-6-fosfato (T6P), durante interações planta-patógeno e em simbiose (Figura 3). Por exemplo, a atividade da trealase é particularmente alta em nódulos de leguminosas e é fortemente induzida em raízes e hipocótilos de *A. thaliana* infectadas *Plasmodiophora brassicae* (Brodmann et al., 2002).

A liberação de trealose, no interior das células vegetais, por agentes patogênicos, tais como, *P. brassicae*, pode ser capaz de explorar o mecanismo de sinalização de trealose da planta e alterar o metabolismo de carboidratos a seu favor. A concentração de trealose nas células vegetais é regulada pela trealase, a

qual desempenha um importante papel em interações planta-micróbio (Brodmann et al., 2002). Por exemplo, a atividade de trealase aumenta as relações simbióticas de plantas com microrganismos produtores de trealose, tais como: fungos micorrízicos arbusculares (Schubert e Wyss, 1995) e rizóbios (Müller et al., 1994).

A síntese de trealose é induzida em *Arabidopsis thaliana* e pepino infectados por fungos patogênicos (Brodmann et al., 2002; Abood e Losel, 2003). Também já foi observado o acúmulo de trealose em raízes de plantas envolvidas por ectomicorrizas e endomicorrizas, particularmente, durante o estresse hídrico (Schellenbaum et al., 1999; Pfeffer et al., 2004; Lopez et al., 2007).

A trealose foi detectada em nódulos de *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e soja, quando foi possível perceber seu acúmulo em resposta ao estresse hídrico (Streeter e Gomez, 2006; Lopez et al., 2008; Suarez et al., 2008). Este dissacarídeo também é produzido por bacteroides em nódulos de soja (Muller et al., 1996). A síntese de trealose pela soja, durante os eventos iniciais da fixação de nitrogênio, pode ser parte de uma resposta ao estresse desencadeado por colonização ou infecção bacteriana, indicando condições que acarretam o estresse osmótico (Muller et al., 1996).

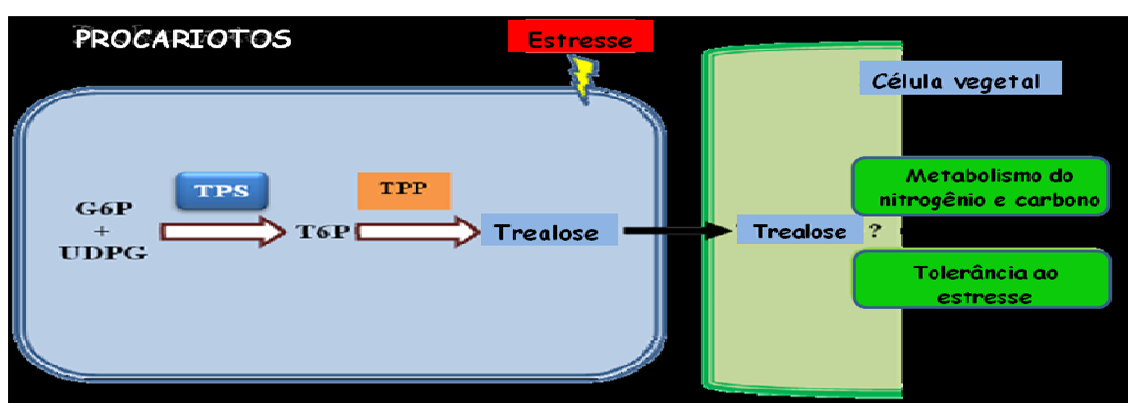


Figura 3. O papel da via de trealose em procariotos. A trealose em procariotos acumula significativamente em condições de estresse osmótico ou térmico; atua, como molécula sinalizadora para a tolerância ao estresse celular de plantas, no metabolismo do nitrogênio e do carbono. Nas plantas, a trealose-6-fosfato (T6P) desempenha um papel central que regula o metabolismo do açúcar e o desenvolvimento da planta. Glicose e trealose são chaves importantes para vias de sinalização e regulatórias, e integram estímulos externos para adaptar as células aos estresses abióticos, crescimento e desenvolvimento. Assim, um papel importante na via de biossíntese de trealose em plantas superiores seria a síntese de pequenas quantidades de T6P e/ou trealose. Adaptado de Iturriaga e colaboradores (2009).

A produção de trealose por microrganismos só influenciará a regulação do metabolismo vegetal, quando a sua liberação na planta e montante acumulado for suficientemente alto para ser percebido pela planta (Brodmann et al., 2002).

3.1.2.8. *Arabidopsis thaliana*: REFERÊNCIA NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO PLANTA-MICROGANISMO

Arabidopsis thaliana é um membro da família da mostarda (Cruciferae ou Brassicaceae), com ampla distribuição natural em toda a Europa, Ásia e América do Norte. *Arabidopsis* é uma planta pequena, amplamente utilizada como organismo-modelo devido aos seus benefícios como ferramenta genética. Possui um genoma pequeno, com 120 megabases, organizado em 5 cromossomos e cerca de 20.000 genes favorável à análise molecular detalhada (Meyerowitz et al., 1994). Diferentes ecótipos estão disponíveis para análise experimental, sendo os ecótipos Columbia (Col-0) e Landsberg os mais utilizados para estudos genéticos e moleculares (Meinke et al., 1998).

O ciclo de vida, incluindo germinação de sementes, formação da roseta, floração e maturação das sementes, é concluído em 6 semanas. As plantas maduras atingem entre 15 a 20 cm de altura e produzem centenas de síliquas com mais de 5000 sementes. As sementes possuem cerca de 0,5 mm de comprimento e suas flores cerca de 2 mm (Meinke et al., 1998).

A. thaliana não é uma planta economicamente importante, mas oferece vantagens para a pesquisa básica em genética e biologia molecular. Estudos em *Arabidopsis* ganharam impulso no início de 1980, com o lançamento de um mapa genético detalhado (Koornneef et al., 1983) e publicações, descrevendo o valor de *Arabidopsis* para pesquisas em fisiologia vegetal, bioquímica e desenvolvimento (Meinke et al., 1980). Esse impulso foi devido, principalmente, a diversos procedimentos simples de química e mutagênese insercional, métodos eficientes para a realização de cruzamentos, introdução de DNA por meio de transformação vegetal, extensas coleções de mutantes com fenótipos diferentes e uma variedade de mapas cromossômicos de genes mutantes e marcadores moleculares (Koncz et al., 1998). *Arabidopsis* possui vários mutantes defectivos em quase todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetal, dentre estes, mutantes no metabolismo de trealose. O genoma de *A. thaliana* contém 11

genes TPS (*AtTPS1-11*), o qual codifica para a trealose-6-fosfato sintase, 10 genes TPP (*AtTPPA1-10*), o qual codifica para a trealose-6-fosfato fosfatase e um gene TRE (*TRE1*), o qual codifica para a trealase (Paul et al., 2008).

Em *Arabidopsis*, as mutações que interferem na gametogênese, a formação das sementes, desenvolvimento foliar e radicular, floração, senescência, vias de transdução de sinal e metabólicas, respostas aos hormônios, patógenos e sinais do ambiente, e muitos processos celulares e fisiológicos, foram identificadas (Meyerowitz et al., 1994).

A maior parte dos conhecimentos básicos que temos sobre resistência a doenças, via de sinalização hormonal, dentre outros têm sido bastante acelerada devido aos estudos genéticos utilizando *A. thaliana* como organismo modelo (Pieterse et al., 2009). O advento da genômica funcional e a disponibilidade de um vasto número de mutantes de *A. thaliana* tem possibilitado vários estudos de interação planta-microrganismo.

Estudos obtidos com *A. thaliana* podem, por sua vez, ser aplicados em sistemas agrícolas importantes, tais como, o arroz, a cana-de-açúcar, dentre outros, visando aumentar a produção, fortalecer as respostas de defesa contra patógenos do solo e/ou favorecendo a associação com microrganismos benéficos.

3.1.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.3.1. Cepas bacterianas e condições de cultivo

A estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 da Coleção de Cultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares. O mutante de *G. diazotrophicus* defectivo para o gene da trealase foi obtido por Intorne e colaboradores (2009), por meio de mutagênese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA). O gene interrompido pelo transposon no mutante foi identificado pelo sequenciamento das regiões flaqueadoras do sítio de inserção do transposon

(Figura 1). De acordo com a base de dados do NCBI, o ID do gene interrompido é 5792099 e codifica uma trealase periplasmática *treA* (Locus tag: GDI_1340), responsável pela degradação de trealose. Tal mutante foi denominado Gd▲*treA*. *G. diazotrophicus* PAL5 selvagem e o mutante Gd▲*treA* foram cultivados em meio DYGS (Rodrigues Neto, 1986) e LGI modificado (composição em g.l⁻¹: glicose 10, K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄·7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 1,32; CaCl₂·2H₂O 0,02; NaMoO₄·2H₂O 0,002 e FeCl₃·6H₂O 0,018 a 30°C (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Canamicina foi adicionada ao meio de cultura quando necessário (50 µg.ml⁻¹) (Intorne et al., 2009).

3.1.3.2. Resposta a diferentes estresses ambientais

G. diazotrophicus PAL5 selvagem e o mutante Gd▲*treA* foram previamente cultivados em meio LGI modificado líquido até atingir (~10⁹ células.ml⁻¹). Em seguida, foram feitas diluições seriadas e submetidas a diferentes estresses abióticos, conforme descrito a seguir:

Sensibilidade e/ou resistência ao estresse osmótico: o meio de cultura foi preparado duas vezes concentrado para permitir a adição de diferentes solutos. As soluções-estoque dos solutos utilizados também foram preparadas duas vezes concentradas. Os solutos utilizados foram NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG 400. Os solutos foram esterilizados por meio de autoclavação. Os ensaios foram mantidos em estufa a 30°C.

Sensibilidade e/ou resistência a diferentes temperaturas: utilizou-se o meio de cultura LGI. Diferentes temperaturas foram avaliadas (16°C; 22°C, 25°C e 30°C).

Após 5 dias de crescimento bacteriano, os experimentos foram avaliados. Os ensaios foram repetidos ao menos três vezes.

3.1.3.3. Microscopia ótica

Foi transferido 1 ml de cultura bacteriana para tubo *ependorf* e centrifugado (1500 g, 25°C, 5 minutos). O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em solução aquosa, contendo 4% de

paraformaldeído em 0,05 M de tampão fosfato salino (PBS), à temperatura ambiente. As bactérias foram fixadas por aproximadamente 12 horas. Após esse período, as amostras foram observadas em microscópio (Zeiss Axiovert 200; Carl Zeiss, Jena, Germany), acoplado a um sistema de gravação fotodigital.

3.1.3.4. Ensaio de quantificação de trealose

G. diazotrophicus PAL5 selvagem e o mutante *Gd*▲*treA* foram cultivados a 30°C em meio LGM controle e LGM acrescidos de 150 mM e 700 mM sacarose até atingirem a fase estacionária. Após atingir a fase estacionária (72 horas), 19 ml da cultura de cada tratamento tiveram a densidade ótica final ajustada para 1 (~10⁹ células.ml⁻¹) e foram utilizadas para a extração da trealose. A cultura bacteriana foi centrifugada a (3000 g, 25°C, 10 minutos) e lavada com água ultrapura. O sobrenadante foi coletado, para quantificação da trealose extracelular, e o *pellet* foi ressuspensão em 0,5 ml de água ultrapura e incubado a 95°C, durante 20 minutos, para a lise celular e posterior quantificação da trealose intracelular (Kandror et al., 2002). As amostras foram filtradas em filtros de 0,2 µm. A concentração de trealose foi determinada por meio de leitura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando-se um detector de espalhamento de luz (ELSDLT II). As áreas e os tempos de retenção da trealose foram avaliados por comparação com padrões em diferentes concentrações.

3.1.3.5. Material vegetal e condições de crescimento

Sementes selvagens (WS) e mutantes (COC6) de *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn), ecótipo Wassilewskija, foram obtidos em colaboração com INRA-Versailles (França). Plântulas de *Arabidopsis* foram crescidas em placas de Petri contendo meio Murashige e Skoog (MS) ½ força com sacarose 0,5% e MES 0,05% a 22°C, 60% de umidade relativa e 70 µmol m⁻² s⁻¹ de luz com fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. As plântulas foram transferidas para vasos contendo o substrato comercial *West Garden* e irrigadas com uma solução de Hoagland 25% (Hoagland e Arnon, 1950) a cada 2 dias durante 60 dias.

3.1.3.6. Inoculação e ensaios de colonização

As culturas bacterianas foram centrifugadas a 12000 g e, após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes em água ultrapura estéril. A densidade ótica final foi 0,01 (10^6 células mL⁻¹) e determinada por meio de espectrofotômetro (o comprimento do raio eletromagnético usado foi de 600 nm). Foram adicionados 20 mL de inóculo as placas de Petri contendo plântulas de *Arabidopsis* com 7 dias de idade. Para o material-controle, foi adicionada água ultrapura estéril em igual volume. Após 3 horas de incubação, as plântulas foram transferidas para vasos contendo substrato comercial *West Garden* e cultivadas tal como descrito anteriormente.

3.1.3.7. Análises fenotípicas de promoção do crescimento vegetal

As amostras foram avaliadas quanto à massa da parte aérea e parte radicular. As regiões aérea e radicular das plantas foram coletadas para determinação da massa de matéria fresca. A massa foi determinada por meio de pesagem, utilizando-se balança analítica, imediatamente após a coleta. Foram avaliadas 20 plantas em cada tratamento. O efeito de colonização por *G. diazotrophicus* PAL5, na promoção do crescimento de plantas de *Arabidopsis*, foi avaliada após 60 dias de inoculação.

3.1.3.8. Ensaios de colonização

Para mensurar o crescimento bacteriano em raízes de *Arabidopsis* inoculadas, foi utilizada uma região de aproximadamente 1,0 cm de raiz. A região radicular foi imersa em Cloramina-T durante 1 minuto. Em seguida, as amostras foram submetidas à maceração em H₂O ultrapura estéril e foram feitas diluições seriadas. As amostras foram, então, plaqueadas em meio LGI-P sólido, contendo em g.L⁻¹: 100,0 sacarose; 0,2 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,2 CaCl₂.2H₂O; 0,002 Na₂MoO₄.H₂O; 0,01 FeCl₃.6H₂O, 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH; 15 ágar, acrescidos dos antibióticos Canamicina e Estreptomomicina 50 µg.mL⁻¹, além de extrato vegetal obtido a partir da maceração de plântulas de *Arabidopsis* com 12 dias de idade, na proporção de 1:15. O pH

inicial do meio foi ajustado para 5,5. As placas foram mantidas sob temperatura de 30°C durante 4 dias.

3.1.3.9. Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e o teste Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos no nível de 5% de significância, utilizando o software Assistat 7.0 Beta.

3.1.4. RESULTADOS

3.1.4.1. A trealase periplasmática é essencial para a resistência ao estresse osmótico em *G. diazotrophicus*

Inicialmente, identificou-se o gene interrompido pelo transposon no mutante. O mutante foi alterado no gene *treA* (Locus tag: GDI_1340), que codifica uma proteína envolvida com a degradação de trealose (Figura 1).

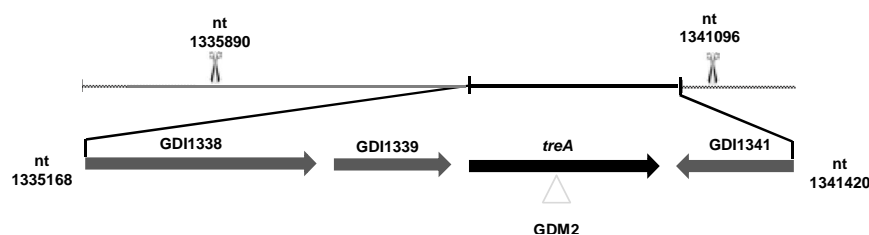


Figura 1. Organização genômica do gene *treA* interrompido em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Cluster gênico flanqueando *treA*. As setas indicam o sentido da transcrição destes genes. nt: nucleotídeo; seta preta: gene interrompido neste estudo; setas cinza claro: genes não interrompidos; tesouras: sítio de restrição para EcoRI; triângulo branco: posição relativa da inserção tn5; *treA*: gene codificante para trealase periplasmática. Adaptado da base de dados NCBI.

O efeito da mutação no gene da trealase periplasmática de *G. diazotrophicus* sobre o desempenho de crescimento bacteriano foi avaliado em meio líquido, em situação-controle e na presença de 150 e 700 mM de sacarose.

A Figura 2 mostra que, mesmo na ausência de estresse (Figura 2A), a mutação em *Gd*▲*treA* afetou o crescimento bacteriano, sugerindo o papel desta enzima mesmo na ausência de estresse. Entretanto, quando foram utilizados 700 mM, o crescimento bacteriano do mutante mostrou-se fortemente inibido em comparação com o da bactéria selvagem (Figura 2C). Juntos, estes dados indicam que o gene *treA* participa tanto de funções metabólicas convencionais da bactéria, quanto de sua resistência ao estresse hiperosmótico.

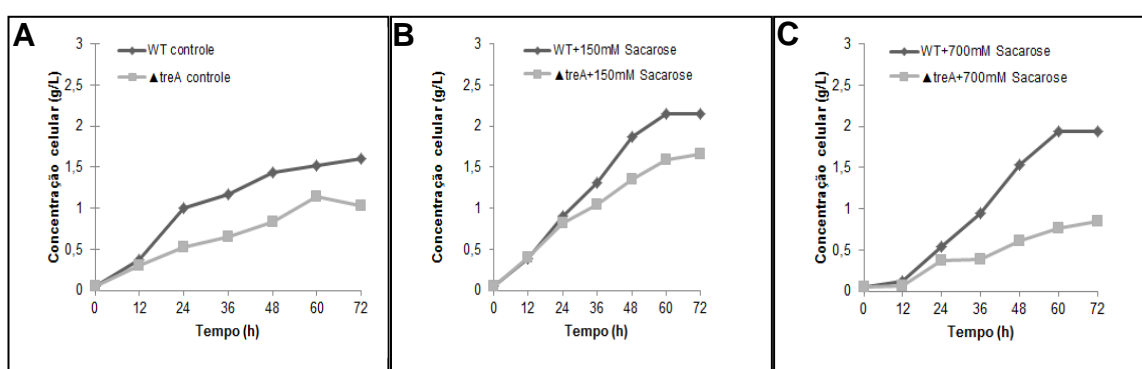


Figura 2. Perfil de crescimento de *G. diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutante ▲*treA* sobre condições de estresse hiperosmótico *in vitro*. O ensaio foi realizado em meio LGI modificado, controle (A) e LGI modificado, contendo 150 mM (B) e 700 mM (C) de sacarose. As células foram incubadas a 30°C, 110 min⁻¹ e monitoradas a cada 12 horas de crescimento até atingir a fase estacionária (72 horas).

A trealose é bem estudada como um soluto compatível, o qual é definido como uma molécula que funciona como um osmólito e ajuda um organismo a sobreviver em condições de estresse osmótico. Com base nisso, testou-se se a mutação em *Gd*▲*treA* favorece a resistência dessa bactéria a outros estresses osmótico e salino. Para tanto, crescentes concentrações de NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG 400 foram testadas em meio sólido. Em todos os estresses, já foi possível observar a inibição do mutante nas menores concentrações testadas, enquanto o mesmo efeito não foi observado para a estirpe selvagem (Figura 3A-D). Os estresses provocados por sacarose e PEG400 foram os mais severos para o mutante *Gd*▲*treA* (Figura 3C e 3D). Os resultados mostraram que *treA* é essencial para a resistência aos estresses, já que a mutação (▲*treA*) elevou sua sensibilidade a todos estressores utilizados (Figura 3A-D).

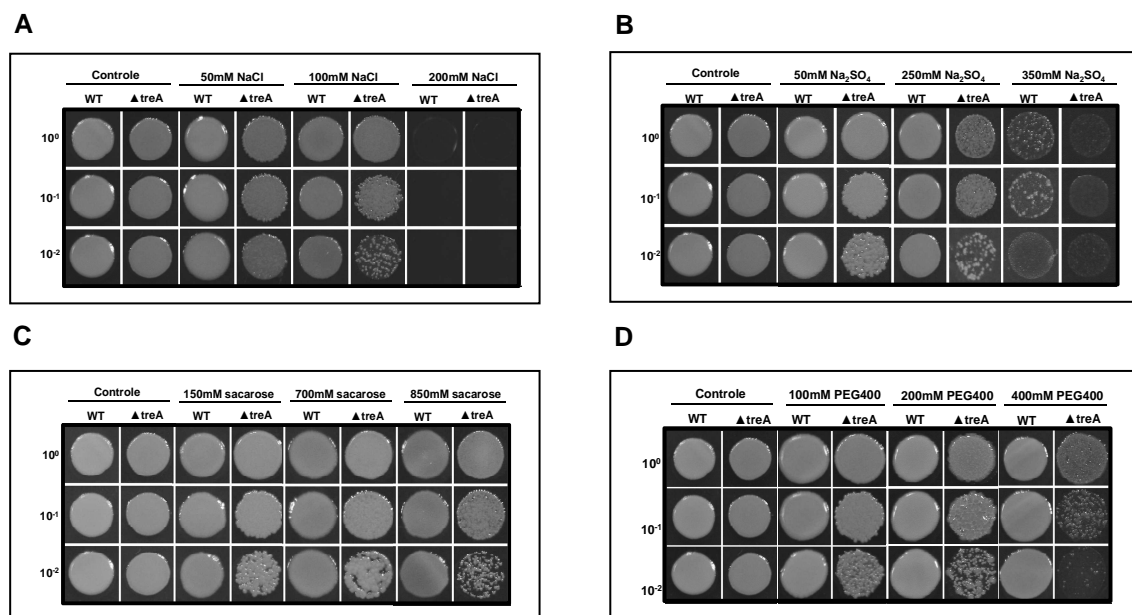


Figura 3. Efeito do estresse osmótico sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem (WT) e mutante *Gd*Δ*treA* em meio sólido. Os ensaios foram realizados, em meio LGI modificado, e analisados após 5 dias de crescimento em estufa a 30 °C (n=3). A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

Visando quantificar a sensibilidade aos referidos estresses resultante da mutação no gene *treA*, a bactéria selvagem e o mutante *Gd*Δ*treA* foram cultivadas em meio líquido LGI, contendo concentrações crescentes dos agentes estressantes. O efeito inibitório de cada estressor foi observado por comparação com as bactérias crescidas na ausência de estresse. A Figura 4 mostra que baixas concentrações de Na₂SO₄ (50 mM) e sacarose (150 mM) favoreceram o crescimento bacteriano para ambas as bactérias. No caso de baixas concentrações de PEG400 (100 mM), apenas a bactéria selvagem foi favorecida. Todas as concentrações de NaCl utilizadas tiveram efeito inibitório sobre ambas as linhagens bacterianas (Figura 4A).

A mutação em *treA* provocou forte redução da resistência a concentrações elevadas de Na₂SO₄, sacarose e PEG400, em comparação à da bactéria normal (Figura 4B, C, D). Pode-se destacar o fato de a bactéria selvagem ser pouco inibida por 850 mM de sacarose (15% de inibição), enquanto o mutante apresentou uma redução de 70% do crescimento bacteriano (Figura 4C). No caso de Na₂SO₄, a concentração de 250 mM do estressor favoreceu (aproximadamente 40%) o crescimento da bactéria selvagem e, inversamente, promoveu uma forte inibição (aproximadamente 80%) na multiplicação do mutante *Gd*Δ*treA* (Figura

4B). Tomados juntos, os dados revelam que a trealase periplasmática de *G. diazotrophicus* é essencial para a tolerância ao estresse provocado por sacarose e sulfato de sódio, evidenciando o seu papel essencial durante o estresse osmótico na bactéria.

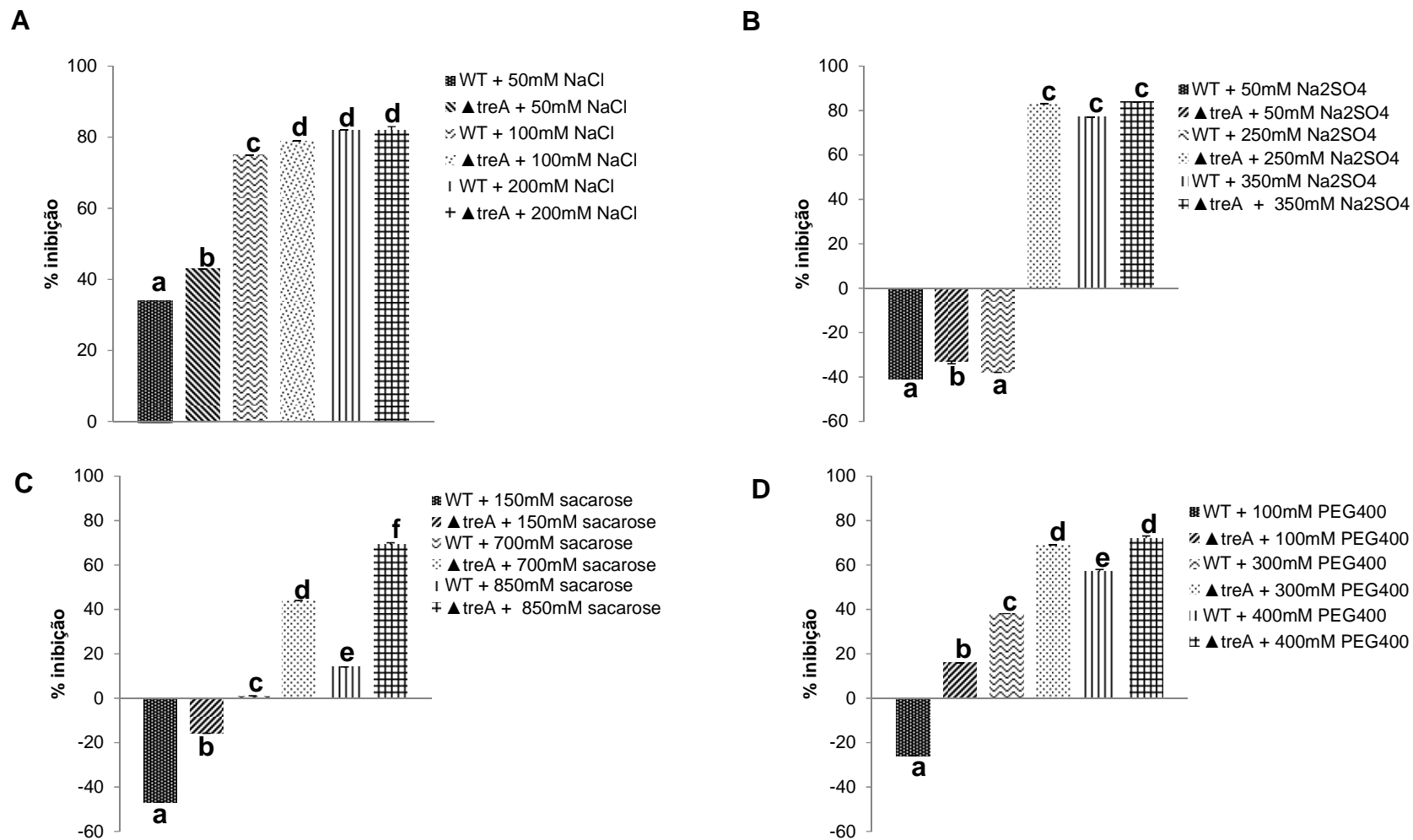


Figura 4. Efeito do estresse osmótico sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem (WT) e mutante *Gd* Δ *treA* em meio líquido. Os ensaios foram realizados em meio LGI modificado, e analisados após 36 horas de crescimento. A média de oito repetições para cada um dos tratamentos foi obtida e analisada para a diferença estatística. Médias com letras diferentes apresentam diferença significativa no nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

3.1.4.2. O gene *treA* é essencial para resistência a baixas temperaturas em *G. diazotrophicus*

Para examinar a participação de *treA* na tolerância de *G. diazotrophicus* PAL5 a baixas temperaturas, a estirpe selvagem e o mutante foram submetidos ao cultivo em meio sólido, em diferentes temperaturas (30°C, 25°C, 22°C, 16°C). Após 5 dias de cultivo, foi observado que temperaturas menores que 25°C afetam significativamente o desempenho do mutante *Gd*▲*treA* (Figura 5). Na medida em que as temperaturas testadas foram afastando-se do ótimo crescimento da bactéria (30°C), tornou-se perceptível que o gene que codifica para a trealase periplasmática (*treA*) é fundamental para a resistência de *G. diazotrophicus* a baixas temperaturas.

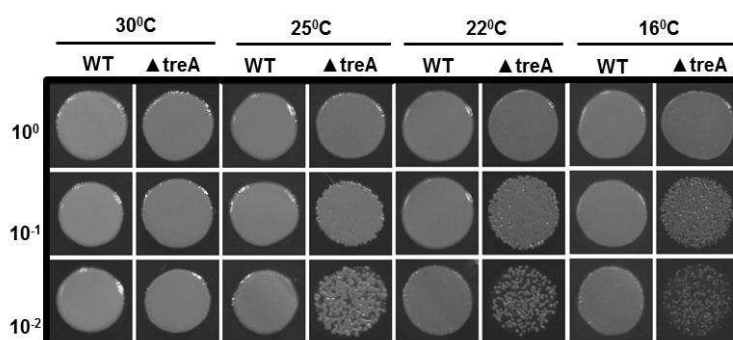


Figura 5. Análise do efeito de diferentes temperaturas sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL 5 WT e mutante *Gd*▲*treA*. Os ensaios foram realizados, em meio LGI modificado, e analisados após 5 dias de crescimento em estufa a 30°C (n=3). A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

3.1.4.3. Efeito dos estresses provocado por sacarose e NaCl na morfologia de *G. diazotrophicus* WT e mutante *Gd*▲*treA*

Alterações morfológicas têm sido descritas como uma resposta a diferentes estresses ambientais em bactérias (Wainwright et al., 1999; Shi et al., 2003). Observados os diferentes efeitos do estresse osmótico sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* e *Gd*▲*treA*, a morfologia de culturas bacterianas, submetida a crescentes concentrações de NaCl, sacarose, Na₂SO₄ e PEG400, foi analisada. A Figura 6 (i-viii) mostra que, em todas as concentrações

testadas, NaCl promove alterações morfológicas celulares, tanto na estirpe selvagem quanto no mutante *Gd*▲*treA*. Nas concentrações de 50 e 100 mM de NaCl (Figura 6ii, iii, vi e vii), as culturas deixam de organizar-se em diplobacilos, passando a formar longas cadeias. Entretanto, no mutante *Gd*▲*treA*, tais alterações são mais preponderantes, conforme destacado nas Figuras 6 (vi) e 6 (vii). No estresse provocado por PEG400 (Figura xxv-xxxii), alterações morfológicas discretas foram verificadas. Para o estresse causado por sacarose (Figura 6ix-xvi) e Na₂SO₄ (Figura 6xvii-xxiv), foi possível observar alterações morfológicas, mesmo que mais discretas somente no mutante *Gd*▲*treA*, destacando a relevância deste gene para a tolerância a tais estresses.

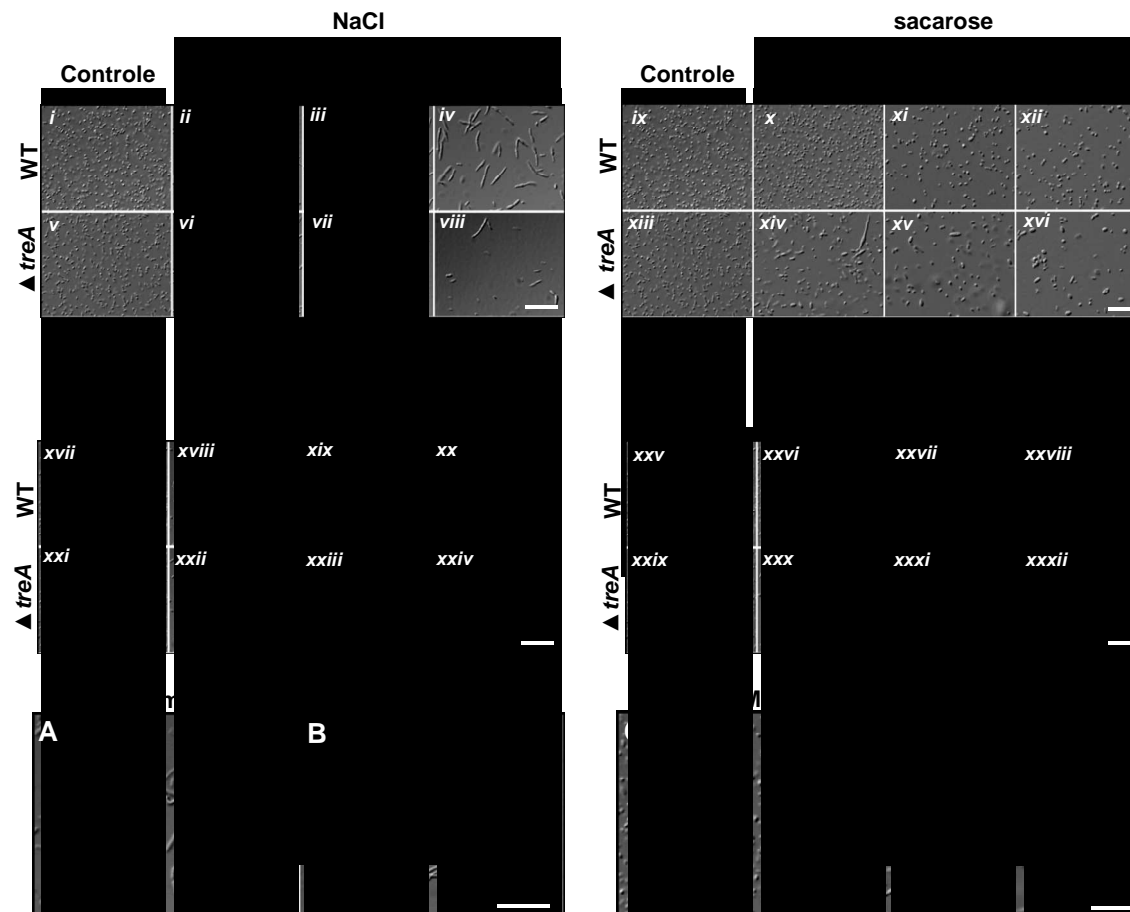


Figura 6. Efeito do estresse osmótico sobre a morfologia de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 selvagem (WT) e mutante $\Delta treA$. i-viii) diferentes concentrações de NaCl. ix-xvi), diferentes concentrações de sacarose. xvii-xxiv), diferentes concentrações de Na_2SO_4 . xxv-xxxii), diferentes concentrações de PEG400. A-B) Ampliação das imagens iii) e vii). C-D) Ampliação das imagens x) e xiv). As colônias bacterianas foram visualizadas por meio de microscopia ótica com aumento de 100X. A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado. A barra branca equivale a 5 μm .

3.1.4.4. Mutação em *treA* provoca acúmulo de trealose sob condições de estresse hiperosmótico

Analisou-se se a maior sensibilidade ao estresse osmótico observada para o mutante *Gd*▲*treA* estaria relacionada com a incapacidade desse mutante em hidrolisar a trealose. Para tanto, foram analisados os teores de trealose intracelulares e extracelulares de bactérias WT e mutantes *Gd*▲*treA*, cultivados em situações-controle, bem como na presença de 150 mM e 700 mM de sacarose. Para testar tal hipótese, foi verificado se, em condições de estresse hiperosmótico causado por sacarose, a mutação em ▲*treA* favoreceria o acúmulo de trealose intra e/ou extracelularmente. Para tanto, foram quantificados os níveis de trealose produzidos pela estirpe selvagem (WT) e pelo mutante *Gd*▲*treA*, quando cultivados na presença de 150 e 700 mM de sacarose. Foi possível observar que a mutação promoveu acúmulo de trealose intra e extracelular, especialmente sob concentrações de 150 mM de sacarose. As concentrações extracelulares foram preferencialmente elevadas, revelando o importante papel da degradação do açúcar secretado para o periplasma, durante situações de estresse osmótico. Sob tal estresse, o acúmulo de trealose extra e intracelular observado no mutante foi superior ao observado na estirpe selvagem, cerca de 2,16x e 2,42x, respectivamente (Figura 7). Sob a concentração de 700 mM de sacarose, apesar de ter sido observado o acúmulo de trealose extra e intracelular quando comparado aos dos controles, o mutante teve a sua capacidade de acumular trealose afetada (Figura 7). É presumível que a queda no acúmulo de trealose, pelo mutante, esteja relacionada com a sua baixa capacidade de multiplicação no meio, contendo altas concentrações de sacarose (Figura 2C). Estes resultados, tomados em conjunto, demonstram que a síntese de trealose é ativada na presença do estresse osmótico e que a enzima trealase é um importante modulador das concentrações desse açúcar no ambiente celular.

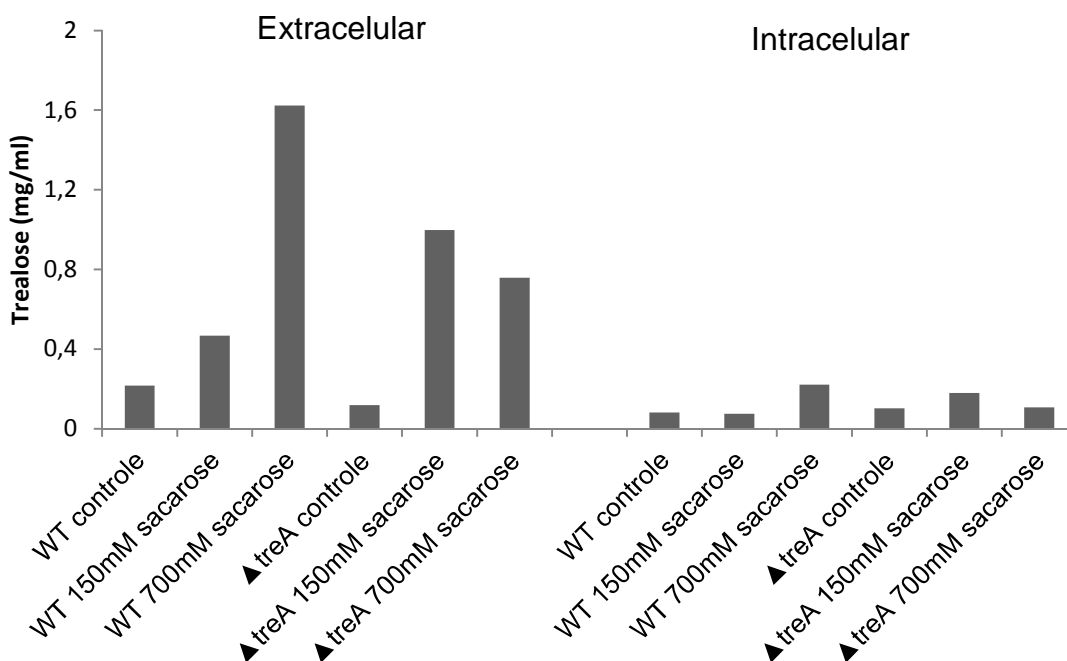


Figura 7. Níveis de trealose em *G. diazotrophicus* e mutante *GdΔtreA*. A estirpe selvagem (WT) de *G. diazotrophicus* PAL5 e mutante *GdΔtreA* foram crescidas em meio LGIm, suplementado com 150 mM e 700 mM de sacarose. A trealose foi extraída e quantificada mediante leituras em HPLC, como descrito em material e métodos.

3.1.4.5. O acúmulo de trealose por *Gluconacetobacter diazotrophicus* durante a interação com *A. thaliana* favorece a promoção do crescimento vegetal

Sabe-se que a trealose pode ser sintetizada durante a interação planta-microrganismo e que esse osmólito pode servir de fonte de carbono para ambos durante a colonização vegetal, além de interferir em processos fisiológicos importantes para a planta (fotossíntese, metabolismo de aminoácidos e carboidratos). Com base nisso, foi testado se o mutante bacteriano *GdΔtreA*, o qual foi capaz de acumular altos níveis de trealose na presença de estresse hiperosmótico (Figura 7), teria uma maior eficiência durante a colonização vegetal e se trealase vegetal desempenharia um papel importante durante a interação planta-bactéria. A hipótese era de que a trealose produzida durante a interação aumentaria a capacidade de colonização bacteriana e, conseqüentemente, favoreceria a promoção do crescimento vegetal. Para tanto, utilizaram-se ecótipos de *A. thaliana* selvagem (WS) e o mutante COC6, o qual é afetado no

metabolismo de trealose. Tal abordagem nos permitiria verificar se o acúmulo de trealose produzida durante a interação planta-bactéria poderia interferir no metabolismo e crescimento vegetal. Os resultados mostraram que plântulas de *A. thaliana* ecótipo WS inoculadas com o mutante bacteriano *Gd*▲*treA* apresentam maior biomassa de parte aérea e raízes, quando comparada à do material não inoculado (controle) e à do inoculado com a estirpe selvagem (Figura 8A e 8B). Para a parte aérea, ecótipos WS inoculados com *G. diazotrophicus* WT e *Gd*▲*treA* apresentaram valores de massa fresca superiores aos dos obtidos para o material não inoculado, 15% e 23%, respectivamente (Figura 8A). Para a parte radicular, o ganho observado foi de 12% e 35% para WT e *Gd*▲*treA*, respectivamente (Figura 8B). A promoção do crescimento observada para o mutante *Gd*▲*treA* superou a encontrada para a estirpe selvagem, que foi superior a 8% e 23% para a parte aérea e radicular, respectivamente (Figura 8A e 8B). Quando a estirpe selvagem e mutante *Gd*▲*treA* foram inoculados no ecótipo COC6, houve perda significativa no crescimento vegetal. Para a parte radicular, foi observada uma redução no crescimento de 26% e 59% em plantas COC6 inoculadas com WT e *Gd*▲*treA*, respectivamente (Figura 8A e 8B). A parte aérea de COC6 foi igualmente afetada quando inoculada com a estirpe selvagem e mutante *Gd*▲*treA*, com inibição do crescimento de aproximadamente 70%. Portanto, a presença da trealase vegetal é essencial para a modulação dos níveis de trealose durante a interação com a bactéria. Na ausência de tal enzima, a interação com *G. diazotrophicus* passa a ser deletéria para a planta. Tal efeito torna-se mais severo quando o mutante *Gd*▲*treA* foi utilizado, visto que este apresenta níveis extracelulares de trealose aumentados.

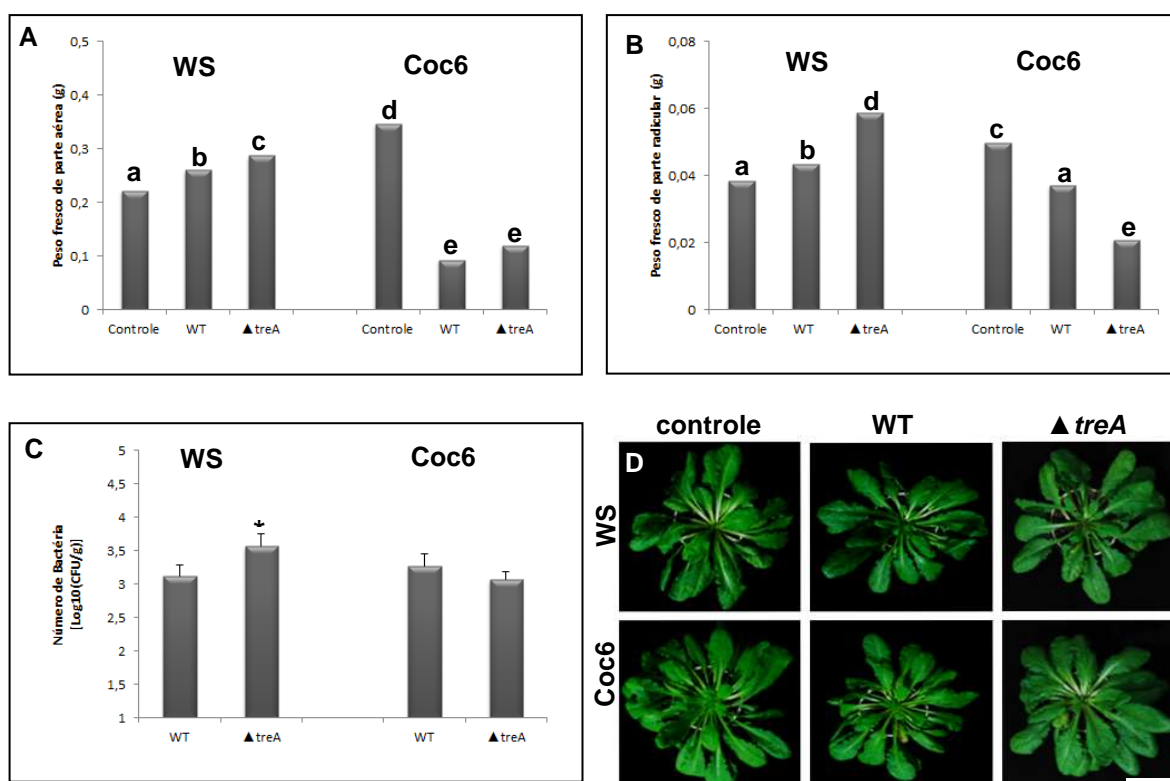


Figura 8. Promoção do crescimento e colonização de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo selvagem (WS) e defeitivo na trealase periplasmática (Coc6). As plantas foram inoculadas aos 7 dias de idade com *G. diazotrophicus* PAL5 e *Gd* $\Delta treA$, na concentração celular de 10^6 CFU/mL. Após 7 semanas, foi analisada a massa fresca da parte aérea (A) e da parte radicular (B) e avaliado o perfil de colonização bacteriano nos ecótipos vegetais selvagem e mutante (C). A Figura D representa as plântulas de *Arabidopsis* controle e inoculadas. A barra branca equivale a 1 cm. As barras representam o desvio-padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por letras (ANOVA, $p \leq 0,05$).

3.1.5. DISCUSSÃO

A trealose é um composto-chave para a sinalização do crescimento vegetal e adaptação ao estresse abiótico em diversos organismos (Reina-Bueno et al., 2012). A manipulação das vias de síntese e degradação deste osmólito tem um grande impacto agrônômico em diversas culturas vegetais importantes. Neste trabalho, investigou-se o papel do gene de degradação de trealose (*treA*) de *G. diazotrophicus* PAL 5 na resposta ao estresse osmótico, salino e diferentes temperaturas, bem como se a mutação no gene que codifica para a trealase periplasmática dessa bactéria ($\Delta treA$) interfere no seu desempenho durante a colonização e promoção do crescimento vegetal.

O efeito do estresse osmótico, causado por NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG400, sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem e do mutante *Gd*▲*treA*, foi avaliado. Os resultados mostraram que o gene de degradação de trealose da bactéria é essencial para a resistência ao estresse osmótico, visto que a mutação no gene *Gd*▲*treA* elevou a sensibilidade de todos os estressores testados (Figura 3A-D). Em relação aos estresses em meio líquido, foi observado que pequena osmolaridade provocada por Na₂SO₄ (50 mM) e sacarose (150 mM) pode afetar de forma positiva o desenvolvimento de *G. diazotrophicus* WT e do mutante *Gd*▲*treA*. No entanto, apesar de o estresse provocado por 150 mM de sacarose estimular positivamente o crescimento de *Gd*▲*treA*, o estímulo foi menor quando comparado ao da estirpe selvagem (Figura 4C). Em relação ao estresse térmico, foi observada grande sensibilidade do mutante *Gd*▲*treA* em todas as temperaturas testadas (25°C, 22°C e 16°C) quando comparadas à da estirpe selvagem (Figura 5).

Diversos trabalhos têm demonstrado o papel da trealose na resposta ao estresse osmótico e na termotolerância em leveduras (de Virgilio et al., 1994) e inúmeras bactérias, incluindo *Sinorhizobium meliloti* (Domínguez-Ferreras et al., 2009), *Bradyrhizobium japonicum* (Sugawara et al., 2010), *Rhizobium etli* (Suárez et al., 2008), *Escherichia coli* (Hengge-Aronis et al., 1991) e a bactéria halofílica *Chromohalobacter salexigens* (Vargas et al., 2008). De acordo com Domínguez-Ferreras e colaboradores (2009), o envolvimento da trealose na osmoadação bacteriana está relacionado com o acúmulo desse osmólito durante o estresse. No entanto, sob altas concentrações, ocorre a indução da trealase (*treA*), a qual catalisa a hidrólise de trealose em duas moléculas de glicose. Brodmann e colaboradores (2002) relatam que essa ativação é parte da resposta de defesa para prevenir o excesso de trealose nas células, tendo em vista que altas concentrações de trealose podem interferir na regulação do metabolismo do carbono e tornarem-se tóxicas para a célula. Neste sentido, tais resultados sugerem que o mutante *Gd*▲*treA* estaria acumulando uma alta concentração de trealose no citoplasma celular e no meio de cultivo durante o estresse osmótico e térmico, o que justificaria o fato de *Gd*▲*treA* ser severamente mais sensível do que a estirpe selvagem (Figura 3A-D; Figura 5A-D).

Outra característica analisada neste trabalho foi o efeito do estresse osmótico sobre a morfologia de *G. diazotrophicus* selvagem e do mutante

Gd▲*treA*. De acordo com Pianetti e colaboradores (2009), mudanças morfológicas em bactérias têm sido descritas como uma resposta a diferentes estresses ambientais. A figura 6 (ii, iii, vi, vii) mostra que concentrações de 50 mM e 100 mM de NaCl promoveram alterações morfológicas nas células da estirpe selvagem e mutante *Gd*▲*treA*. No entanto, na concentração de 100 mM de NaCl, o mutante foi severamente mais afetado (Figura 6B). Sob tais circunstâncias, foi observado que a estirpe selvagem e mutante *Gd*▲*treA* deixam de organizar-se em diplobacilos, passando a formar longas cadeias (Figura 6i-viii). No estresse provocado por sacarose (150 mM), foram observadas alterações morfológicas em *Gd*▲*treA*, quando nenhuma alteração foi verificada para a estirpe selvagem (Figura 6C-D). Alguns trabalhos demonstram alterações na morfologia de *G. diazotrophicus* causadas por NaCl (Boniolo et al., 2009), NH₄Cl, NH₄NO₃ (Muthukumarasamy et al., 2002), pesticidas (Madhaiyan et al., 2006) e zinco (Saravanan et al., 2007). Boniolo e colaboradores (2009), estudando o comportamento de *G. diazotrophicus* PAL5 sobre condições de estresse salino, observaram forte inibição do crescimento nas concentrações de 200 e 300 mM de NaCl, quando ocorreram mudanças drásticas na morfologia celular. No entanto, nenhum trabalho correlacionou o efeito dessas alterações com a alta concentração de trealose produzida durante o estresse.

Moradi e colaboradores (2011) destacam que alterações morfológicas celulares provocadas por salinidade são decorrentes do estresse osmótico, principal responsável pelo efeito tóxico sobre o crescimento microbiano. Por sua vez, a utilização de trealose em concentrações ideais é uma estratégia utilizada para permitir que as células mantenham baixas concentrações de sais em seu citoplasma (Mustakhimov, 2010).

Nos presentes ensaios, avaliou-se se a mutação em *Gd*▲*treA* influencia no acúmulo de trealose em condições de estresse hiperosmótico causado por sacarose. Tais resultados mostraram que a mutação em *Gd*▲*treA* favoreceu significativamente o acúmulo de trealose intra e extracelular, na presença de 150 mM de sacarose, quando comparado ao da estirpe selvagem, 2,16x e 2,42x, respectivamente (Figura 7). Neste sentido, nossos dados sugerem que a resposta diferencial aos estresses testados, observada para a estirpe selvagem e o mutante *Gd*▲*treA*, está relacionada com a alta concentração de trealose

acumulada, em resposta ao estresse osmótico e a incapacidade do mutante *Gd*Δ*treA* em degradá-la, tornando-se tóxica para a bactéria (Figura 9).

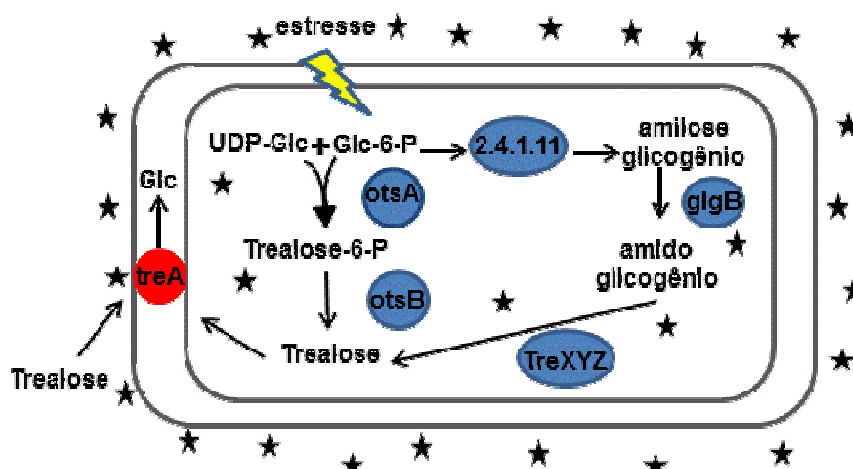


Figura 9. Modelo proposto para a degradação de trealose em *G. diazotrophicus* PAL5. Condições de estresse induzem a síntese de trealose em *G. diazotrophicus* PAL5. Trealose-6-fosfato-sintase (*otsA* GDI_0916); trealose fosfatase (*otsB* GDI_0915); 2.4.1.11 (proteína não identificada); enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano (*glgB* GDI_0544); operon envolvido com a degradação de glicogênio *glgX* (*treXYZ* GDI_0545); trealase periplasmática (*treA* GDI_1340); Glc (glicose). O círculo vermelho representa a proteína mutada nesse estudo. As estrelas representam o acúmulo de trealose intra e extracelular. O modelo foi construído com base nas informações contidas no KEGG.

Os dados retratam que a trealase periplasmática de *G. diazotrophicus* PAL5 é essencial para manter o equilíbrio de trealose, produzida durante o estresse osmótico, contribuindo para sua alta osmotolerância. Tal achado explica a capacidade de *G. diazotrophicus* colonizar naturalmente o interior de colmos de cana-de-açúcar, onde as concentrações de sacarose podem chegar a 20% (Cavalcante e Dobereiner, 1988).

Alguns trabalhos têm demonstrado o papel da trealose durante interações simbióticas e patogênicas com plantas (Brodmann et al., 2002; Müller et al., 1995; Streeter et al., 1985). A liberação de trealose, no interior das células vegetais por microrganismos, pode ser capaz de explorar o mecanismo de sinalização de trealose da planta e alterar o metabolismo de carboidratos a seu favor. Por sua vez, a concentração de trealose nas células vegetais é regulada por uma trealase. Com base nisso, questionou-se se a mutação em *Gd*Δ*treA*, na qual a bactéria acumula altas concentrações de trealose (Figura 7), resultaria numa maior eficiência de colonização e, conseqüentemente, promoveria o crescimento vegetal, ou se o bloqueio na via de degradação de trealose (*treA*) diminuiria o

fitness da bactéria durante a interação. Para tanto, utilizaram-se plantas de *A. thaliana* selvagem (WS) e o mutante afetado no metabolismo de trealose (COC6). Tal abordagem permitiria verificar se o acúmulo de trealose por *G. diazotrophicus*, durante a interação bactéria-planta, poderia interferir no crescimento vegetal. O presente trabalho sugere que a síntese e a liberação de trealose por *G. diazotrophicus*, concomitantemente com a participação de uma trealase vegetal, são primordiais para equilibrar a concentração ideal de trealose durante a interação, favorecendo, assim, o crescimento vegetal (Figura 8). De acordo com Djonovic e colaboradores (2013), uma razão pelo qual a trealose facilita a interação microbiana com os vegetais é o fato de a trealose, mediante uma alta concentração local, favorecer a aquisição de nitrogênio, o qual cria um gradiente osmótico, levando ao efluxo de nitrogênio contendo nutrientes para as células vegetais vizinhas.

Em suma, com este estudo, foram obtidas novas informações sobre os fatores genéticos e metabólicos da estratégia, utilizada por *G. diazotrophicus* PAL5, para lidar com o estresse osmótico, e como o acúmulo de trealose pela bactéria pode influenciar na sua capacidade de colonização vegetal. Os resultados aqui apresentados servem, portanto, como um passo importante para uma melhor compreensão do papel da trealose na biologia de *G. diazotrophicus* PAL5. Em adição a estes resultados, demonstrou-se pela primeira vez o papel da trealase periplasmática de *G. diazotrophicus* durante o processo de colonização vegetal. Por fim, o conhecimento das estratégias utilizadas por PGPBs, durante a interação bactéria-planta, torna-se uma abordagem importante a ser usada em prol dos sistemas agrícolas, potencializando a colonização e elevando a produtividade de plantas de interesse agrônomo.

3.1.6. CONCLUSÕES

- A mutação no gene que codifica para trealase (*treA*) de *G. diazotrophicus* eleva a sensibilidade da bactéria aos estresses provocados por sulfato de sódio, cloreto de sódio, polietilenoglicol, sacarose e temperatura, revelando que a degradação da trealose é um componente essencial da resistência a estresse.

- O gene *treA* é essencial na termoproteção de *G. diazotrophicus*.
- A mutação no gene que codifica para trealase (*treA*) elevou a capacidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* acumular trealose extracelularmente durante o estresse osmótico provocado por sacarose.
- Plantas inoculadas com bactérias mutantes *treA*, que não degradam a trealose, apresentaram maior massa fresca de parte aérea e raiz, sugerindo que a trealose secretada pela bactéria favorece a ação bacteriana na promoção do crescimento vegetal.
- Os efeitos diferenciais da inoculação com a bactéria selvagem e do mutante *treA*, em plantas mutadas para o gene da trealase, revelam o papel essencial da trealose nos mecanismos de interação entre *G.diazotrophicus* e *Arabidopsis*.

3.2. O PAPEL ESSENCIAL DE *otsA* NA RESISTÊNCIA A METAIS PESADOS EM *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

3.2.1. INTRODUÇÃO

Plantas e microrganismos são frequentemente desafiados por variações ambientais, tais como, seca, salinidade, extremos de temperatura, exposição a metais tóxicos, deficiência de nutrientes. Trealose funciona como uma molécula osmoprotetora, conferindo tolerância a uma variedade de estresses ambientais em diversas espécies procarióticas e eucarióticas. *Gluconacetobacter diazotrophicus* possui em seu genoma genes responsáveis pela síntese (*otsA/otsB*) e degradação (*treA*) de trealose. Tal bactéria é considerada um microrganismo com potencial biotecnológico devido a sua habilidade de promover o crescimento vegetal, mediante a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, solubilizar nutrientes, produzir fitormônios, resistir a diferentes estresses ambientais, incluindo metal e pressão osmótica. Neste trabalho, investigou-se o papel dos genes de biossíntese de trealose durante o estresse osmótico e metálico em *G. diazotrophicus*. Para tanto, um mutante de inserção defeitivo, no gene que codifica para a trealose-6-fosfato sintase (\blacktriangle *otsA*), foi utilizado. Inicialmente, o mutante \blacktriangle *otsA* foi avaliado quanto à resistência ao estresse provocado por NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG400. No entanto, não foi observada diferença entre o mutante *otsA* e a estirpe selvagem. Neste sentido, testou-se o efeito dos estresses causados por CdCl₂. H₂O, CoCl₂.6H₂O, ZnCl₂,

$\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Sua habilidade para fixar nitrogênio e solubilizar fósforo e zinco também foi avaliada. Os resultados revelaram que a mutação no gene envolvido na biossíntese de trealose (*otsA*) resulta em alta sensibilidade aos estresses provocados por $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e ZnCl_2 . A mutação favoreceu a resistência da bactéria na presença do metal tóxico alumínio. Análise da capacidade do mutante, para mobilizar zinco e fosfato insolúvel, mostrou que mutação no gene Δ *otsA* afetou a capacidade de solubilização desta bactéria. Os dados revelaram que o gene de biossíntese de trealose de *G. diazotrophicus* possui papel essencial na resistência a estresses ambientais. Por sua vez, os dados obtidos sugerem que a biossíntese de trealose, via *otsA*, não interfere na capacidade de colonização e promoção do crescimento vegetal. Este é o primeiro estudo que caracteriza o envolvimento do gene *otsA* na resistência a estresses ambientais durante a colonização em *G. diazotrophicus*.

3.2.2. REVISÃO

A contaminação do solo com metais pesados tem despertado grandes preocupações, devido à sua toxicidade, persistência e não degradação no ambiente. A contaminação por metais pesados é um dos principais problemas da agricultura mundial (Duman et al., 2011). A presença desses contaminantes pode interferir no crescimento, morfologia e metabolismo de plantas e microrganismos (Giller et al., 1998; Austin et al., 2006). A toxicidade por metais pesados altera a estrutura conformacional de macromoléculas, interfere na fosforilação oxidativa e no balanço osmótico celular (Bruins et al., 2000).

O desenvolvimento de técnicas de remediação economicamente viáveis representa uma questão tecnológica e científica premente. Uma alternativa promissora é a fitorremediação, a qual busca amenizar os prejuízos causados pelo excesso de metais pesados (Bruins et al., 2000; Intorne et al., 2012). Por sua vez, o crescimento lento e a reduzida biomassa de plantas em ambientes contaminados com metal limitam a eficiência desse processo. Assim, uma possibilidade para intensificar a produção de biomassa é a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal como bioinoculantes (*Plant Growth Promoting*

Bacteria – PGPB) (Baldani e Baldani, 2005; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011). No entanto, o uso dessas bactérias depende da sua capacidade de colonizar eficientemente as plantas inoculadas a campo e resistir aos diversos estresses ambientais, dentre estes, os provocados por metais pesados.

Ao longo do processo evolutivo, diversos mecanismos de resistência se desenvolveram em microrganismos visando atenuar a toxicidade causada pelo excesso de metal pesado (Prapagdee e Watcharamusik, 2009). Para prevenir ou reduzir os efeitos adversos, substâncias protetoras, tais como, sacarídeos, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, são frequentemente utilizadas para aumentar a viabilidade dos microrganismos (Hubálek, 2003; Elbein et al., 2003).

A trealose, um dissacarídeo formado por duas moléculas de glicose, é um osmoprotetor encontrado em leveduras, bactérias e plantas (Wingler et al., 2002; Gancedo e Flores, 2004). O acúmulo de trealose, por meio das vias de biossíntese de trealose (*otsA* e *otsB*), pode aumentar a resistência a estresses múltiplos, como o calor, desidratação, congelamento e estresse hiperosmótico (Soto et al., 1999; Kwon et al., 2003). No entanto, nenhum trabalho demonstrou a participação da via de biossíntese de trealose (*otsA*) como primordial para a resistência a metais pesados em bactérias promotoras do crescimento vegetal.

Gluconacetobacter diazotrophicus é uma PGPB Gram-negativa, endofítica e diazotrófica, que possui amplas características de interesse biotecnológico, como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e zinco, produção de fitormônios e controle biológico de fitopatógenos (Madhaiyan et al., 2004; Muthukumarasamy et al., 2006; Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009; Blanco et al., 2010). Recentemente, sua capacidade de tolerância a metais pesados também tem despertado o interesse em pesquisadores da área (Intorne et al., 2012).

O genoma de *G. diazotrophicus* encontra-se sequenciado, disponibilizando grande quantidade de informação para estudos de genômica funcional. Diversas vias de resistência a estresses ambientais, incluindo genes para biossíntese e degradação de trealose, foram identificadas (Bertalan et al., 2009). Dentre tais genes, observou-se a presença do gene (*otsA*), que codifica uma trealose 6 fosfato sintase (Bertalan et al., 2009).

Segundo Foster e colaboradores (2003), a via de biossíntese de trealose (*otsA*) também atua como um fator importante durante a interação planta-

microrganismos. No entanto, apesar da identificação de genes responsáveis pela síntese de trealose no genoma de *G. diazotrophicus*, ainda não se sabe o papel de tais vias tanto na resistência a estresses metálicos quanto durante o processo de interação com plantas hospedeiras.

Neste trabalho, investigou-se o papel do gene de biossíntese de trealose (*otsA*) na proteção contra o estresse osmótico e salino e contra os estresses provocados por cádmio, cobalto, zinco e alumínio em *G. diazotrophicus*. Avaliou-se a participação do gene *otsA* no processo de fixação biológica de nitrogênio e na solubilização de nutrientes, além da sua atuação durante a interação bactéria-planta.

3.2.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.3.1. Cepas bacterianas, meios e condições de cultivo

A estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 da Coleção de Cultura da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil) foi gentilmente cedida pelo Dr. Fábio L. Olivares. O mutante de *G. diazotrophicus* defectivo, na via de biossíntese de trealose, foi obtido por Intorne e colaboradores (2009) mediante a mutagênese insercional, utilizando o kit EZ-Tn5 <R6Kyori/KAN-2>Tnp Transposome (Epicentre, Madison, WI, USA). O gene interrompido pelo transposon no mutante foi identificado pelo sequenciamento das regiões flaqueadoras do sítio de inserção do transposon (Figura 1A). De acordo com a base de dados do NCBI, o ID do gene interrompido é 5789515 e codifica uma trealose-6-fosfato sintase (Locus tag: GDI_0916). Tal mutante foi denominado ▲*otsA*. *G. diazotrophicus* PAL5 e o mutante ▲*otsA* foram cultivados em meio DYGS (Rodrigues Neto, 1986) e LGI modificado (composição em g.l⁻¹: glicose 10, K₂HPO₄ 0,2; KH₂PO₄ 0,6; MgSO₄·7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 1,32; CaCl₂·2H₂O 0,02; NaMoO₄·2H₂O 0,002 e FeCl₃·6H₂O 0,018 a 30°C (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Canamicina foi adicionado quando necessário (50 µg.ml⁻¹) (Intorne et al., 2009).

3.2.3.2. Resposta a diferentes estresses ambientais

G. diazotrophicus PAL5 selvagem e o mutante ▲ *otsA* foram previamente cultivados em meio LGI modificado líquido até atingir ($\sim 10^9$ células.ml⁻¹). Em seguida, foram feitas diluições seriadas e submetidas a diferentes estresses abióticos, conforme descrito a seguir:

Sensibilidade e/ou resistência ao estresse osmótico: o meio de cultura foi preparado duas vezes concentrado para permitir a adição de diferentes solutos. As soluções-estoque dos solutos utilizados também foram preparadas duas vezes concentradas. Os solutos utilizados foram NaCl, Na₂SO₄, sacarose e PEG 400. Os solutos foram esterilizados por meio de autoclavação.

Sensibilidade e/ou resistência ao estresse metálico: utilizou-se o meio de cultura LGI modificado. Os sais metálicos utilizados foram (CdCl₂·H₂O, CoCl₂·6H₂O, AlK(SO₄)₂·12H₂O e ZnCl₂), esterilizados por meio de filtração.

Os ensaios foram mantidos em estufa a 30°C e avaliados após 5 dias de crescimento bacteriano. Os ensaios foram repetidos ao menos três vezes.

3.2.3.3. Ensaio de quantificação de trealose

G. diazotrophicus PAL5 selvagem e o mutante ▲ *otsA* foram cultivados a 30°C em meio LGIm controle e LGIm acrescidos de 150 mM e 700 mM de sacarose até atingirem a fase estacionária. Após a fase estacionária (72 horas), 19 ml da cultura foram utilizados para a extração da trealose. A cultura bacteriana foi centrifugada a (3000 g, 25°C, 10 minutos) e lavada com água ultrapura. O sobrenadante foi coletado para a quantificação da trealose extracelular, e o *pellet* foi ressuspenso em 0,5 ml de água ultrapura e incubado a 95°C durante 20 minutos para a lise celular e posterior quantificação da trealose intracelular (Kandror et al., 2002). As amostras foram filtradas em filtros de 0,2 µm. A concentração de trealose foi determinada por meio de leitura em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando-se um detector de espalhamento de luz (ELSDLT II). As áreas e tempos de retenção da trealose foram avaliados por comparação com padrões em diferentes concentrações.

3.2.3.4. Ensaio de solubilização de fósforo e zinco

Gotas (10 µl) da estirpe selvagem e do mutante ▲ *otsA* cultivados em meio LGl_m (~10⁹ células.ml⁻¹) foram inoculadas em placas de Petri de LGl_m controle e LGl_m suplementado com 0,12% ZnO ou 0,54% Ca₅(PO₄)₃OH. As placas foram incubadas por 4 dias (Saravanan et al., 2007; Intorne et al., 2009). A avaliação da solubilização foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo (cm)= diâmetro total – diâmetro da colônia. Este experimento foi repetido ao menos três vezes (n=5).

3.2.3.5. Ensaio de fixação biológica do nitrogênio

Para verificar possíveis alterações na fixação biológica de nitrogênio no mutante ▲ *otsA*, a estirpe selvagem e o mutante foram cultivados em *erlenmeyers* de 250 mL contendo meio LGl_m (30°C/200 rpm) até atingirem DO₆₀₀ =1 (~10⁹ células.ml⁻¹). Em seguida, 100 µL desse cultivo foram adicionados no centro de frascos contendo 5 mL de meio LGl_m sem nitrogênio semissólido (1,6 g/L ágar bacteriológico). Após 12 dias de cultivo em estufa microbiológica (30°C), a formação de película aerotóxica foi avaliada.

3.2.3.6. Análise filogenética da proteína *otsA*

A sequência proteica de *otsA*, obtida a partir de *G. diazotrophicus* PAL5, sequências similares oriundas de bactérias fixadoras de nitrogênio e outras proteínas ortólogas foram utilizadas para análise filogenética. Estas sequências foram obtidas da base de dados UniProt (Uniprot, 2014). O alinhamento destas proteínas foi realizado por meio do ClustalW (Thompson et al., 1994). A proteína *otsA* de *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 foi utilizada como grupo externo (Número de acesso do Uniprot: NP_416410).

3.2.3.7. Material vegetal e condições de crescimento

Plantas selvagens de *Arabidopsis thaliana*, ecótipo Col-0, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Frederick Ausubel (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA). Plântulas de *Arabidopsis* foram crescidas em placas de Petri, contendo meio Murashige e Skoog (MS) ½ força com sacarose 0,5% e MES 0,05% a 22°C, 60% de umidade relativa e 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz com fotoperíodo de 12 horas durante 7 dias. As plântulas foram transferidas para vasos contendo o substrato comercial *West Garden* e irrigadas com uma solução de Hoagland 25% (Hoagland e Arnon, 1950) a cada 2 dias, durante 60 dias.

3.2.3.8. Inoculação e ensaios de colonização

As culturas bacterianas foram centrifugadas a 12000 *g* e, após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas duas vezes em água ultrapura estéril. A densidade ótica final foi 0,01 (10^6 células mL^{-1}), e foi determinada por meio do espectrofotômetro (o comprimento do raio eletromagnético usado foi de 600 nm). Foram adicionados 20 mL de inóculo às placas de Petri contendo plântulas de *Arabidopsis* com 7 dias de idade. Para o material-controle, foi adicionada água ultrapura estéril em igual volume. Após 3 horas de incubação, as plântulas foram transferidas para vasos, contendo substrato comercial *West Garden* e cultivadas tal como descrito anteriormente.

3.2.3.9. Análises fenotípicas de promoção do crescimento vegetal

As amostras foram avaliadas quanto às massas da parte aérea e parte radicular. As regiões aérea e radicular das plantas foram coletadas para determinação da massa de matéria fresca. A massa fresca foi determinada por meio de pesagem, utilizando-se balança analítica, imediatamente após a coleta. Foram avaliadas 20 plantas em cada tratamento. O efeito de colonização por *G.*

diazotrophicus PAL5, na promoção do crescimento de plantas de *Arabidopsis*, foi avaliado após 60 dias de inoculação.

3.2.3.10. Ensaio de colonização

Para mensurar o crescimento bacteriano em raízes de *Arabidopsis* inoculadas, foi utilizada uma região de aproximadamente 1,0 cm de raiz. A região radicular foi imersa em Cloramina-T durante 1 minuto. Em seguida, as amostras foram submetidas à maceração em H₂O ultrapura estéril e feitas as diluições seriadas. As amostras foram, então, plaqueadas em meio LGI-P sólido contendo em g.L⁻¹: 100,0 sacarose; 0,2 K₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,2 CaCl₂.2H₂O; 0,002 Na₂MoO₄.H₂O; 0,01 FeCl₃.6H₂O, 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH; 15 ágar, acrescidos dos antibióticos Canamicina e Estreptomicina 50 µg.mL⁻¹, além de extrato vegetal obtido a partir da maceração de plântulas de *Arabidopsis* com 12 dias de idade, na proporção de 1:15. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5. As placas foram mantidas sob temperatura de 30°C durante 4 dias.

3.2.3.11. Estatística

Os resultados obtidos foram testados pela análise de variância (ANOVA), e o teste Tukey foi utilizado para mensurar a significância entre os tratamentos no nível de 5% de significância, utilizando o software Assistant 7.0 Beta.

3.2.4. RESULTADOS

3.2.4.1. O gene de biossíntese de trealose (*otsA*) é essencial para resistência ao estresse por metal em *G. diazotrophicus*

Inicialmente, identificou-se o gene interrompido pelo transposon no mutante. O mutante foi alterado no gene *otsA* (Locus tag: GDI_0916), que codifica uma proteína envolvida com a biossíntese de trealose (Figura 1A).

O aumento no conteúdo de trealose sugere uma adaptação dos microrganismos às condições adversas ou estressantes (Tournu, 2013). Visto que o gene interrompido foi afetado na via de biossíntese de trealose (*otsA*), foi verificado se a mutação em \blacktriangle *otsA* altera a produção de trealose durante o estresse hiperosmótico. Curiosamente, os presentes dados demonstraram que a trealose acumula tanto em *G. diazotrophicus* selvagem quanto no mutante \blacktriangle *otsA* em resposta ao estresse osmótico (Figura 1B), mostrando que a mutação em \blacktriangle *otsA* não interfere na capacidade da bactéria em sintetizar trealose na presença do estresse.

Com base nisso, testou-se o perfil de resistência do mutante *otsA* aos estresses provocados por NaCl, Na₂SO₄, PEG400 e sacarose. No entanto, não foi observada nenhuma diferença entre o mutante \blacktriangle *otsA* e a estirpe selvagem em todos os tratamentos (Figura 2). Por sua vez, decidiu-se, então, investigar o efeito da mutação, no gene \blacktriangle *otsA* de *G. diazotrophicus*, quanto à capacidade da bactéria em resistir ao estresse provocado por metais. Para tanto, concentrações crescentes de alumínio, cádmio, cobalto e zinco foram testadas. Os resultados mostraram que, na ausência dos metais, \blacktriangle *otsA* apresentou crescimento similar ao da estirpe selvagem. No entanto, na presença dos metais cádmio (0,3; 0,5 e 1 mM) e zinco (8 e 16 mM), o mutante \blacktriangle *otsA* mostrou elevada sensibilidade quando comparada à da estirpe selvagem (Figura 3A-B). Para o cobalto, o mutante mostrou resposta similar à da estirpe selvagem em todas as concentrações testadas (Figura 3C). O mutante \blacktriangle *otsA* mostrou-se mais resistente ao alumínio (7; 10 e 20 mM) quando comparado com a estirpe selvagem (Figura 3D). Estes dados indicam o papel crucial do gene *otsA* na resistência da bactéria aos metais pesados cádmio e zinco e, por sua vez, demonstram que a mutação pode elevar a capacidade de resistência da bactéria durante o estresse provocado por alumínio. No entanto, esses dados demonstram o papel essencial do gene *otsA* na resposta ao estresse provocado por metais em *G. diazotrophicus* PAL5.

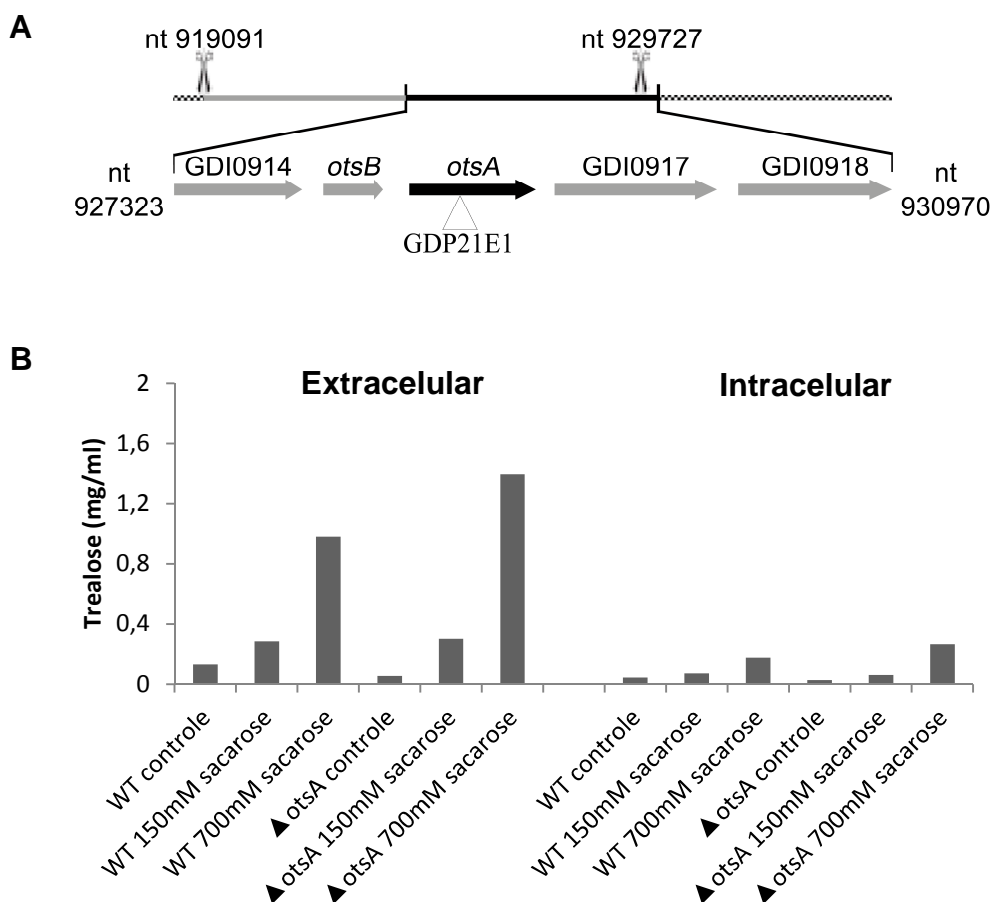


Figura 1. Caracterização do mutante ▲otsA de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. A) Organização genômica do gene *otsA* interrompido em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. Cluster gênico flanqueando *otsA*. As setas indicam o sentido da transcrição destes genes. nt: nucleotídeo; seta preta: gene interrompido neste estudo; setas cinza claro: genes não interrompidos; triângulo branco: posição relativa da inserção *tn5*; *otsA*: gene codificante para trealose-6-fosfato. Adaptado da base de dados NCBI. B) Níveis de trealose em *G. diazotrophicus* e mutante ▲*otsA*. A estirpe selvagem (WT) de *G. diazotrophicus* PAL5 e mutante ▲*otsA* foram crescidas em meio LGIm suplementado com 150 mM e 700 mM de sacarose. Trealose extraída e quantificada por meio de leituras em HPLC, como descrito em material e métodos.

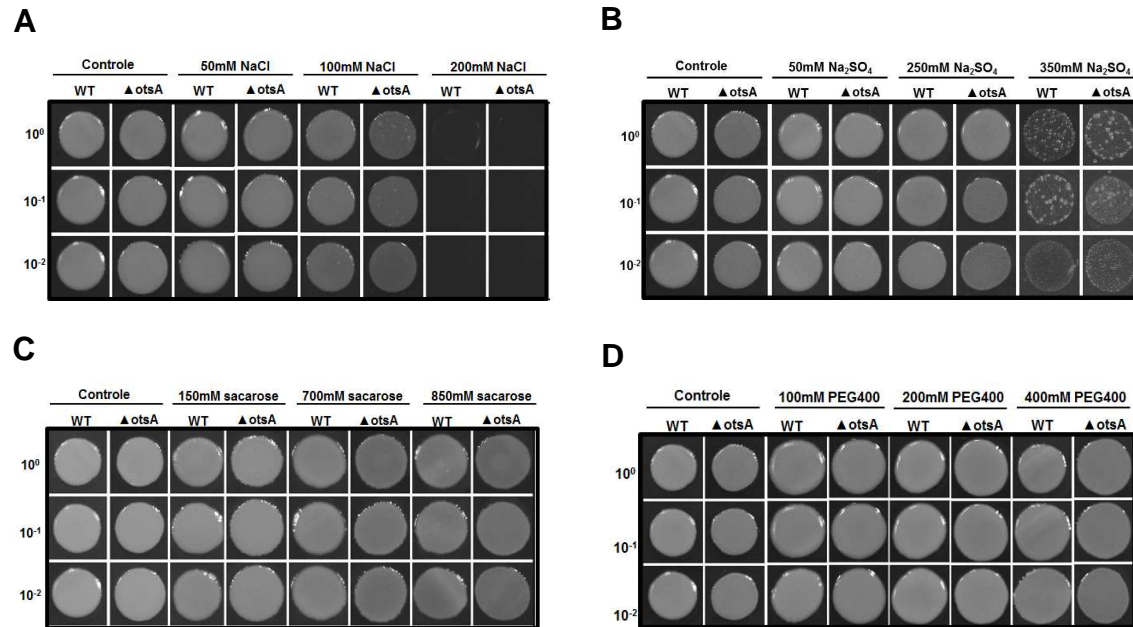


Figura 2. Efeito do estresse osmótico sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem (WT) e mutante Δ otsA em meio sólido. Os ensaios foram realizados, em meio LGI modificado, e analisados após 5 dias de crescimento em estufa a 30°C (n=3). A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

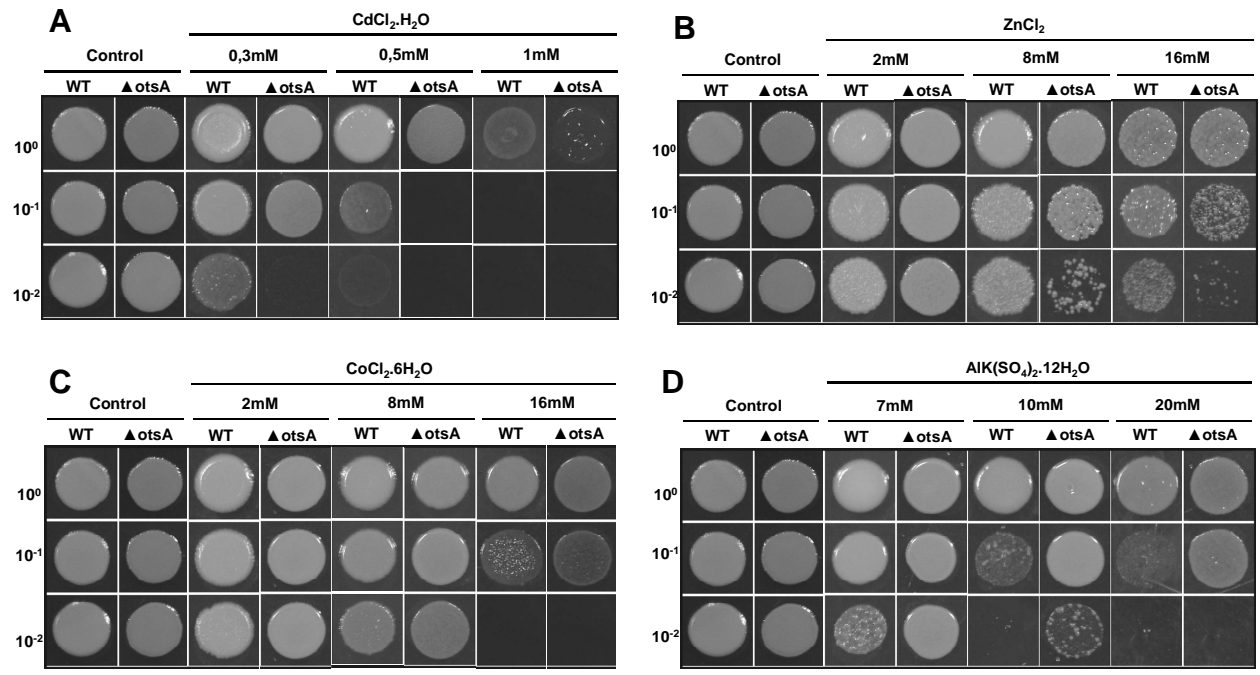


Figura 3. Efeito do estresse por diferentes metais sobre o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem (WT) e mutante Δ otsA em meio sólido. Os ensaios foram realizados, em meio LGI modificado, e analisados após 5 dias de crescimento em estufa a 30°C (n=3). A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

3.2.4.2. Envolvimento de *otsA* na fixação biológica de nitrogênio e solubilização de fósforo e zinco *in vitro*

Dentre as características de *G. diazotrophicus* que favorecem o crescimento vegetal, destacam-se a capacidade de fixação biológica de nitrogênio e potencial para solubilizar fósforo e zinco. Foi avaliado se a mutação no gene *otsA* influencia em tais características. Para verificar a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, a estirpe mutante foi testada qualitativamente em meio de cultivo LGI semissólido sem adição de nitrogênio. Os resultados demonstraram que a mutação em Δ *otsA* não altera a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico quando comparada a da estirpe selvagem (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de solubilização de fósforo e zinco e fixação de nitrogênio do mutante Δ *otsA* de *G. diazotrophicus*

Estirpe	Diâmetro do halo de solubilização de fósforo (cm)	Diâmetro do halo de solubilização de zinco (cm)	Fixação de nitrogênio
Δ <i>otsA</i>	0.62±0.3b	2.34±0.3b	+
WT	1.14±0.5a	3.64±0.3a	+

+, positivo.

Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente entre si no nível de 5% de significância. Os valores são médias de cinco repetições. A figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

O perfil de solubilização de fósforo e zinco foi baseado na presença de uma zona clara ou halo de solubilização ao redor das colônias crescidas em meio sólido LGI suplementado com fosfato de cálcio ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e óxido de zinco (ZnO) (Figura 4). O mutante Δ *otsA* foi o menos eficiente na capacidade de solubilizar tais nutrientes *in vitro*, gerando um halo de solubilização cujo diâmetro foi, em média, de 0,62±0,3cm e 2,34±0,3cm para fósforo e zinco, respectivamente (Tabela 1). Comparativamente, o diâmetro do halo para a estirpe selvagem foi de 1,14±0,5cm e 3,64±0,3cm, respectivamente (Tabela 1).

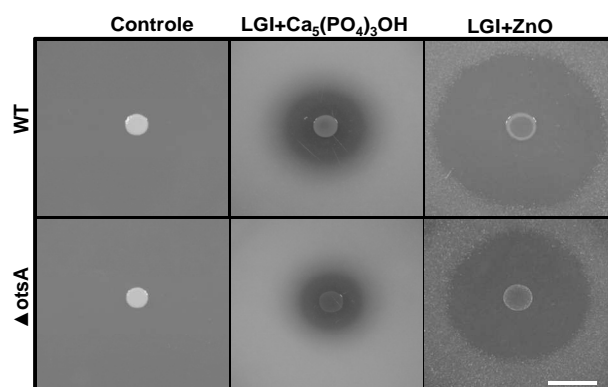


Figura 4. Halos de solubilização de fósforo e zinco de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 selvagem e mutante na via de síntese (*otsA*) de trealose. As estirpes foram inoculadas em meio LGI contendo $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de ZnO e $5,4 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. A barra branca equivale a 1 cm. A Figura representa o resultado de no mínimo três experimentos em separado.

3.2.4.3. A mutação no gene *otsA* não altera o potencial de promoção do crescimento vegetal de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Alguns trabalhos têm demonstrado que o gene *otsA* é importante durante a interação planta-microrganismo (Foster, et al., 2003; Suárez et al., 2008; Djovonic et al., 2013). Com base nisso, foi testado se o mutante bacteriano ▲ *otsA* de *Gluconacetobacter diazotrophicus* teria sua capacidade de colonização afetada, ou mesmo, a consequente promoção do crescimento vegetal quando comparada com a da estirpe selvagem. Para tanto, plântulas de *A. thaliana*, ecótipo Col-0, aos 7 dias de idade, foram inoculadas com a linhagem selvagem e o mutante ▲ *otsA*, e cultivadas em substrato durante 60 dias. Os resultados mostraram que plantas de *A. thaliana* inoculadas com o mutante ▲ *otsA* apresentaram perfil de crescimento similar ao observado para plantas inoculadas com a estirpe selvagem (Figura 5A-B). Foi observado ganho de massa fresca da parte aérea e de raiz de Col-0 para plantas inoculadas com ambas as estirpes quando comparado com o material não inoculado (Figura 5A-B). A Figura 5C mostra que a população bacteriana, em raízes de plantas inoculadas, é similar para ambas as linhagens bacterianas. Tomados em conjunto, os dados demonstram que a mutação no gene *otsA* de *G. diazotrophicus* não interfere na capacidade de colonização e promoção do crescimento vegetal da bactéria.

As relações filogenéticas da proteína *otsA* de *G. diazotrophicus* com vários ortólogos de outras espécies bacterianas foram avaliadas. A Figura 6 mostra que a proteína codificada pelo *otsA* apresenta maior proximidade filogenética com as proteínas *otsA* das espécies *Gluconacetobacter xylinus*, *Xanthomonas oryzae*, *Azospirillum sp.* e *Herbaspirillum seropedicae*.

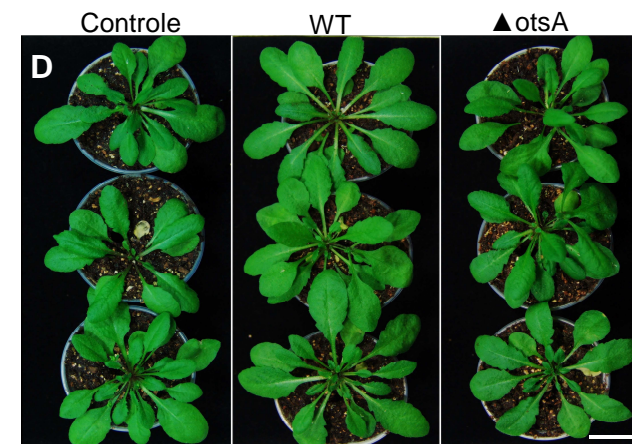
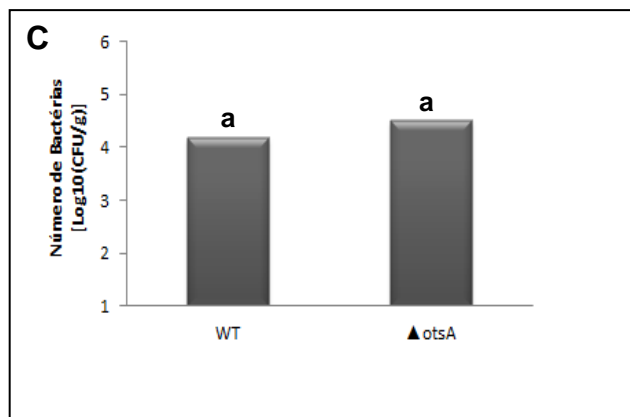
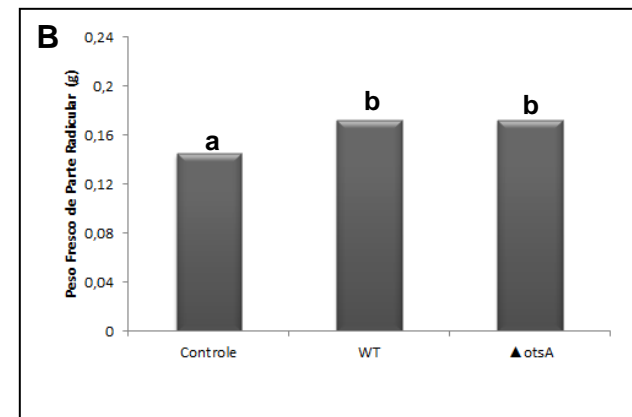
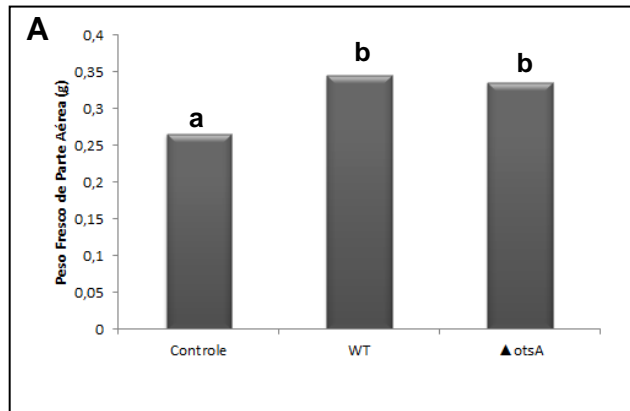


Figura 5. Promoção do crescimento e colonização de plantas de *Arabidopsis thaliana* ecótipo selvagem Col-0. As plantas foram inoculadas aos 7 dias de idade com *G. diazotrophicus* PAL5 e ▲ *otsA*, na concentração celular de 10^6 CFU/mL. Após 7 semanas, foi analisada a massa fresca da parte aérea (A) e da parte radicular (B), e avaliado o perfil de colonização bacteriano (C). A Figura D representa as plântulas de *Arabidopsis* controle e inoculadas. A barra branca equivale 1 cm. As barras representam o desvio-padrão. Diferenças significativas entre os tratamentos são representadas por letras (ANOVA, $p \leq 0,05$).

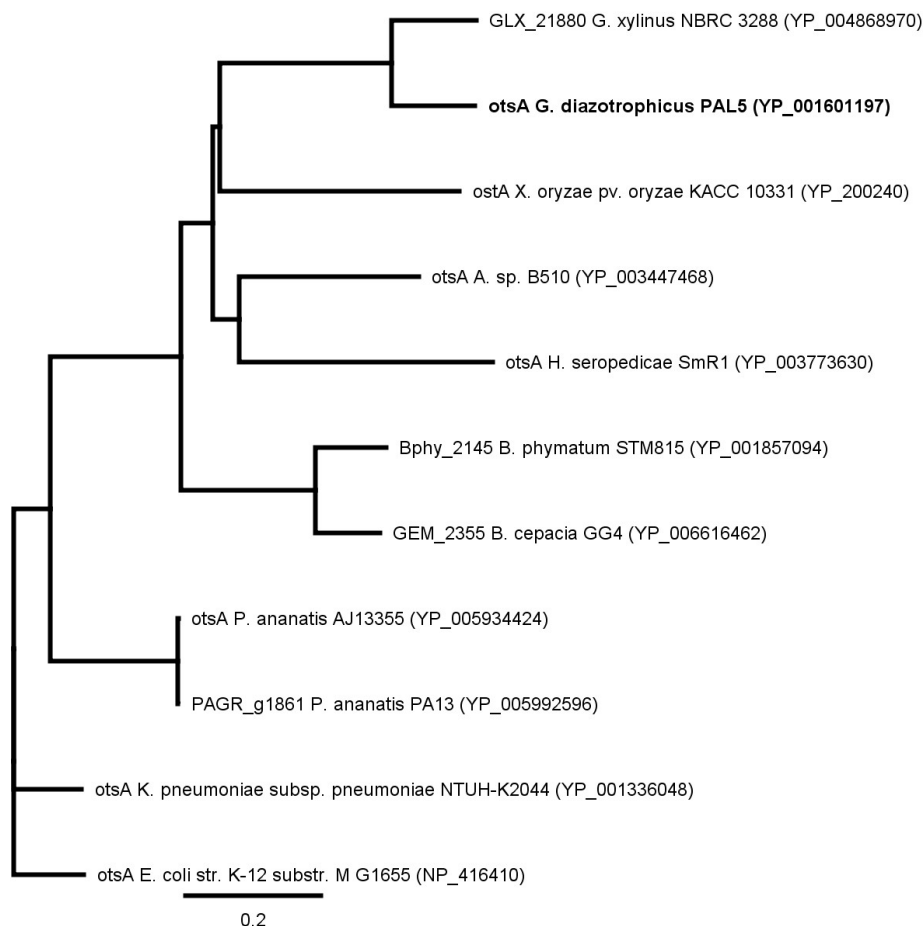


Figura 6. Relação filogenética das seqüências de aminoácidos da proteína otsA de *G. diazotrophicus* PAL5 com proteínas ortólogas de outras espécies bacterianas. OtsA de *G. diazotrophicus* encontra-se em negrito. O comprimento dos ramos é proporcional à distância evolutiva (barra de escala). O número de acesso da seqüência de aminoácidos encontra-se entre parênteses. As análises foram realizadas utilizando o banco de dados UniProt. A proteína otsA de *E. coli* str. K-12 (Número de acesso do UniProt NP_416410) foi utilizada como grupo externo.

3.2.5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, identificou-se o papel do gene de biossíntese de trealose (*otsA*) de *G. diazotrophicus* PAL5 na resposta ao estresse, provocado por estresse osmótico e metais pesados, e a sua importância durante a colonização e promoção do crescimento vegetal.

Inicialmente, foi verificado se a mutação em ▲*otsA* altera a produção de trealose durante o estresse hiperosmótico. Os dados demonstraram que a inativação do gene *otsA* não altera a capacidade de *G. diazotrophicus* acumular trealose em resposta ao estresse osmótico (Figura 1B). Com base nesses

resultados, é possível presumir que *G. diazotrophicus* esteja utilizando uma via alternativa para a biossíntese de trealose, possivelmente, a via metabólica coordenada pelo operon *treXYZ*, o qual está envolvido com a degradação de glicogênio (Figura 7).

De acordo com Giaever e colaboradores (1988), mutantes de inserção no gene *otsA* e *otsB* da bactéria *Escherichia coli* são defectivos para a biossíntese de trealose e, com isso, são incapazes de crescer em meio mínimo contendo glicose com elevada osmolaridade provocada por altas concentrações de NaCl.

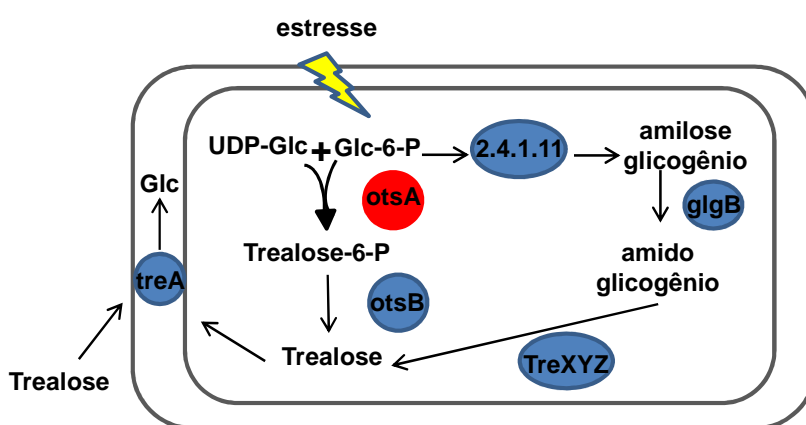


Figura 7. Modelo proposto para a biossíntese de trealose em *G. diazotrophicus* PAL5. Condições de estresse induz a síntese de trealose em *G. diazotrophicus* PAL5. Trealose-6-fosfato-sintase (*otsA* GDI_0916); trealose fosfatase (*otsB* GDI_0915); 2.4.1.11 (proteína não identificada); enzima ramificadora de 1,4-alfa-glucano (*glgB* GDI_0544); operon envolvido com a degradação de glicogênio *glgX* (*treXYZ* GDI_0545); trealase periplasmática (*treA* GDI_1340); Glc (glicose). O círculo vermelho representa a proteína mutada nesse estudo. O modelo foi construído com base nas informações contidas no KEGG.

Neste sentido, testou-se o perfil de resistência do mutante *otsA* de *G. diazotrophicus* aos estresses provocados por NaCl, Na₂SO₄, PEG400 e sacarose. Por sua vez, não foi observada nenhuma diferença entre o mutante \blacktriangle *otsA* e a estirpe selvagem nas concentrações testadas, sugerindo, assim, que o gene *otsA* não é essencial para a resistência ao estresse osmótico em *G. diazotrophicus* (Figura 2).

Como o mutante *otsA* de *G. diazotrophicus* não demonstrou sensibilidade aos estresses salino e osmótico, decidiu-se avaliar o efeito do estresse metálico, causado por alumínio, cádmio, cobalto e zinco, sobre o crescimento de *G. diazotrophicus* selvagem e do mutante \blacktriangle *otsA*. Os resultados mostraram que o

gene de biossíntese de trealose (*otsA*) da bactéria é essencial para a resistência ao estresse provocado por cádmio e zinco, visto que a mutação no gene \blacktriangle *otsA* elevou a sensibilidade a ambos os estressores, quando comparada à da estirpe selvagem (Figura 3A-B). No entanto, em relação ao estresse provocado por cobalto, a resposta de sensibilidade observada para o mutante \blacktriangle *otsA* foi similar à resposta obtida para a estirpe selvagem (Figura 3C). A mutação no gene \blacktriangle *otsA* de *G. diazotrophicus* contribuiu para uma maior resistência ao alumínio em todas as concentrações testadas (Figura 3D).

A alta tolerância de *G. diazotrophicus* PAL5 aos metais pesados, cádmio, cobalto e zinco, já havia sido descrita por Intorne e colaboradores (2012). Os autores demonstraram que a tolerância a tais metais está relacionada com a presença do gene *czcA*, o qual codifica uma proteína pertencente à superfamília dos transportadores RND, que compõem a família de efluxo de metal pesado (Heavy Metal Efflux - HME) (Tseng et al., 1999). Por outro lado, os dados demonstraram a presença de outra via metabólica em *G. diazotrophicus*, a via de biossíntese de trealose (*otsA*), essencial para a tolerância aos metais cádmio e zinco (Figura 3A-B).

Trabalhos realizados com levedura relatam que, durante o estresse provocado por altas concentrações de cádmio, ocorre uma diminuição nos níveis de trealose, acarretando a queda de viabilidade celular (Assmann et al., 1996). O cádmio interage com os fosfolipídios da membrana plasmática em levedura (Steveninck et al., 1966). Visto que esses fosfolipídios atuam no transporte de glicose para dentro da célula, é possível que o transporte seja completamente inibido na presença de cádmio (Griffin et al., 1993; Tijssen et al., 1981). Contudo, não sendo capazes de metabolizar a glicose do meio, as células passam a usar suas reservas endógenas (nitrogênio, trealose e glicogênio) para sobreviver. Uma vez que ocorre o esgotamento destas reservas, ocorrerá a morte dessas células.

Outra característica analisada neste trabalho foi o envolvimento de *otsA* na fixação biológica de nitrogênio e na solubilização de fósforo e zinco *in vitro*. Os resultados demonstraram que a mutação em \blacktriangle *otsA* não altera a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, quando comparada à da estirpe selvagem (Tabela 1). Quanto ao perfil de solubilização de fósforo e zinco, o mutante \blacktriangle *otsA* foi capaz de solubilizar ambos os nutrientes testados. Contudo, foi observado que o mutante foi menos eficiente na capacidade de solubilizar tais nutrientes *in vitro*

(Tabela 1). Suarez e colaboradores (2008) relataram que a mutação no gene *otsA* de *Rhizobium etli* não alterou a capacidade da bactéria em acumular trealose, mas destacam que a mutação tornou o microrganismo osmosensível e reduziu a atividade da nitrogenase e sua capacidade de nodulação. Em contraste aos resultados obtidos por Suarez e colaboradores (2008), nossos dados demonstraram que a mutação em *otsA* de *G. diazotrophicus* não alterou a sua capacidade de fixação biológica do nitrogênio.

Com base em tais resultados, foi avaliado se o mutante bacteriano Δ *otsA* de *G. diazotrophicus* teria sua capacidade de colonização afetada, bem como a promoção do crescimento vegetal, quando comparada à da estirpe selvagem. De acordo com Foster e colaboradores (2003), o gene *otsA* de *Magnaporthe grisea* é importante durante a interação planta-patógeno. Tais autores observaram que a mutação em *otsA* alterou significativamente a capacidade de infecção desse microrganismo. Por sua vez, nossos resultados demonstraram que a mutação em *otsA* não afetou a capacidade de *G. diazotrophicus* colonizar plântulas de *A. thaliana* e, conseqüentemente, não reduziu o potencial de promoção do crescimento vegetal, quando comparado ao da estirpe selvagem (Figura 5). Outra abordagem utilizada, no presente trabalho, foi o estudo filogenético da proteína *otsA* de *G. diazotrophicus* com proteínas ortólogas relacionadas, demonstrando a similaridade dessa proteína com outras espécies bacterianas (Figura 6).

De acordo com Suarez e colaboradores (2008), *R. etli*, superexpressando *otsA*, eleva a sua capacidade de acumular trealose e favorece a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio, aumentando a tolerância à seca. Além disso, a análise do transcriptoma de nódulos em simbiose com *R. etli*, superexpressando *otsA*, revelou a indução de diversos genes envolvidos com a tolerância ao estresse, metabolismo do carbono e nitrogênio, sugerindo que trealose possui papel essencial como molécula-sinal durante a interação simbiótica.

O presente trabalho demonstrou que o gene de biossíntese de trealose (*otsA*) é importante para a resistência a metal pesado em *G. diazotrophicus*, sendo essencial a presença do gene funcional para a resistência a cádmio e zinco. Em contrapartida, a mutação neste gene resulta na elevação da tolerância a alumínio. Por sua vez, a mutação em *otsA* não altera a capacidade da bactéria em promover o crescimento vegetal. Os dados encontrados abrem perspectivas

para futuros estudos acerca do papel da proteína *otsA* nos mecanismos de tolerância a metais pesados em bactérias.

3.2.6. CONCLUSÕES

- O gene *otsA* de *G.diazotrophicus* não é essencial para a síntese de trealose, especialmente durante a exposição da bactéria a estresses osmóticos.
- O gene *otsA* de *G.diazotrophicus* não é essencial para a resistência a estresse osmótico. Porém, tal gene participa da resistência a metais pesados, sendo essencial para a tolerância a cádmio e zinco. Sua mutação eleva a resistência a alumínio.
- A mutação no gene *otsA* não interfere na capacidade da bactéria em fixar nitrogênio. No entanto, a mutação em *otsA* interfere na capacidade da bactéria em solubilizar fósforo e zinco.
- A mutação em *otsA* não altera a capacidade de *G. diazotrophicus* promover o crescimento vegetal.

3.2.7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em virtude do uso excessivo de fertilizantes químicos nas lavouras, da expansão de áreas salinizadas e contaminadas por metais pesados, a agricultura mundial vem sofrendo fortes impactos. Conseqüentemente, surge a necessidade de tecnologias inovadoras para contrapor os danos causados por este cenário. O melhoramento genético vegetal é bastante utilizado visando a tolerância aos estresses abióticos. No entanto, essa abordagem é prejudicada pela carência de genótipos resistentes em cada espécie. No entanto, a utilização de ferramentas biotecnológicas, bem como a transferência genética, inserindo genes exógenos em espécies de interesse agrônômico, passa a ser uma alternativa interessante. Sabe-se que as bactérias destacam-se pela diversidade e capacidade em colonizar diferentes ambientes, incluindo condições de estresse hídrico, osmótico

e salino. As bactérias endofíticas são alvos de estudo devido a sua íntima interação com a planta e a promoção do crescimento vegetal. Dentre elas, *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica diazotrófica que tolera os estresses osmótico, oxidativo e metais pesados como o cádmio, cobalto, zinco e alumínio. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos com a tolerância a tais estresses em *G. diazotrophicus* permanecia inexplorado, o que poderia prejudicar a eficiência de colonização e manutenção à campo. Contudo, este trabalho demonstrou a presença de genes (*otsA* e *treA*) envolvidos na resposta ao estresse osmótico, salino e metais em *G. diazotrophicus*, além de demonstrar que a síntese e degradação de trealose é importante durante o processo de interação planta-bactéria. Os resultados obtidos propiciaram a identificação de novas fontes de resistência a estresses ambientais e melhoria na capacidade de colonização vegetal por *G. diazotrophicus*, passíveis de utilização como ferramenta biotecnológica aplicável em culturas de interesse agrônomico. A aplicação desta tecnologia à agricultura poderá reduzir os custos financeiros, decorrentes do uso de adubos nitrogenados e insumos agrícolas, além de refletir em menor impacto ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abood, J.K., Lösel, D.M. (2003) Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. *Plant Pathology*, 52:256–265.
- Adesemoye, A.O., Kloepper, J.W. (2009) Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:1-12.
- Aeschbacher, R.A., Muller, J., Boller, T., Wiemken, A. (1999) Purification of the trehalase GMTRE1 from soybean nodules and cloning of its cDNA. *GMTRE₁* is expressed at a low level in multiple tissues. *Plant Physiology*, 119:489–496.
- Almeida, A.M., Villalobos, E., Araújo, S.S., Leyman, B., Van Dijck, P., Alfaro-Cardoso, L., Fevereiro, P.S., Torne, J.M., Santos, D.M. (2005) Transformation of tobacco with an *Arabidopsis thaliana* gene involved in trehalose biosynthesis increases tolerance to several abiotic stresses. *Euphytica*, 146:165–176.
- Alves, B.J.R., Boddey, R.M., Urquiaga, S. (2003) The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, 252(1):1-9.

- Anitha, K.G., Thangaraju, M. (2010) Growth promotion of rice seedlings by *Gluconacetobacter diazotrophicus* *in vitro* conditions. *Journal of Cell & Plant Sciences*, 1:6–12.
- Araújo, J.M., Silva, A.C., Azevedo, J.L. (2000) Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43:447-451.
- Araújo, W.L., Marccheroni Jr, W., Aguilar-Vildoso, C.I., Barroso, P.A.V., Saridakis, H.O., Azevedo, J.L. (2001) Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(3):229-236.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Dobereiner, J. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36:86–93.
- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 77(3):549-579.
- Bastian, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A₁ e A₃ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24:7-11.
- Bazzicalupo, M., Okon, Y. (2000) Associative and endophytic symbiosis. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, 38:409-410.
- Bertalan, M., Albano, R., Pádua, V., Rouws, L., Rojas, C., Hemerly, A., Teixeira, K., Schwab, S., Araújo, 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., de Souza Filho, G., Flores, V.M.Q., 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., Ürményi, T., Pereira, A.R., Silva, R., Rondinelli, E., von Krüger, W., 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.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4):366-371.
- Boddey, M.R., Urquiaga, S., Alves, B.J.R., Reis, V. (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 252:139-149.
- Boniolo, F.S., Rodrigues, R.C., Delatorre, E.O., da Silveira, M.M., Flores, V.M.Q., Berbert-Molina, M.A. (2009) Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Current Microbiology*, 59(6): 593-599.
- Brodmann, D., Schuller, A., Ludwig-Müller, J., Aeschbacher, R.A., Wiemken, A., Boller, T., Wingler, A. (2002) Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(7):693-700.
- Cavalcante, J.J.V., Vargas, C., Nogueira, E.M., Vinagre, F., Schwarcz, K., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., Hemery, A.S. (2007) Members of the ethylene signaling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 58:673-686.

- Cavalcante, V., Dobereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108:23-31.
- Cortina, C., Culianez-Macia, F.A. (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science*, 169:75–82.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology*, 54:579–599.
- Csonka, L.N., Hanson, A.D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45:569-606.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., Wiemken, A. (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *European Journal of Biochemistry*, 219:179–186.
- Djonovic´, S., Urbach, J.M., Drenkard, E., Bush, J., Feinbaum, R., Ausubel, J.L., Traficante, D., Risch, M., Kocks, C., Fischbach, M.A., Priebe, G.P., Ausubel, F.M. (2013) Trehalose biosynthesis promotes *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity in plants. *PLoS Pathogens*, 9(3):1-15.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, L.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí-RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- Domínguez-Ferreras, A., Soto, M.J., Pérez-Arnedo, R., Olivares, J., Sanjuán, J. (2009) Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *Journal of Bacteriology*, 191(24):7490–7499.
- Dong, Z., Canny, M.J., McCully, M.E., Roboredo, M.R, Cabadilla, C.F., Ortega, E., Rodés, R.A. (1994) Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. (A new role for the apoplast). *Plant Physiology*, 105:1139-1147.

- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13:17r–27r.
- Empadinhas, N., da Costa, M.S. (2008) Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: distribution of compatible solutes. *International Microbiology*, 11:151-161.
- Fernandez, O., Béthencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S, Clement, C. (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe? *Trends in Plant Science*, 15:409–417.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I.R., Caballero-Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, 154:145-150.
- Galinski, E.A. (1995) Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 37: 272–328.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., De Ley, J. (1989) *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal Systematic Bacteriology*, 39:361-364.
- Goddijn, O.J.M., Van Dun, K. (1999) Trehalose metabolism in plants. *Trends in Plant Science*, 4:315–319.
- Good, A.G., Beatty, P.H. (2011) Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*, 9(8):1-9.
- Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G., Bailey, M.J. (2003) Physiological and community responses of established grassland bacterial populations to water stress. *Applied and environmental microbiology*, 69:6961-6968.

- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M.R., Konradsen, F. (2007) The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health*, 7:357.
- Guo, H.J., Luo, S., Chen, L., Xiao, X., Xi, Q., Wei, W., Zeng, G., Liu, C., Wan, Y., Chen, J., He, Y. (2010) Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulator endophytic bacterium *Bacillus* sp.L14. *Bioresource Technology*, 101:8599-8605.
- Guo, H.J., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H.L., Gong, L.Y., Zhang, L.X., Sun, P.H. (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29(1):66-72.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21(6):535–553.
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., Ahmed, I. (2010) Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4):579-598.
- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimmele, M., Boos, W. (1991) Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173(24):7918–7924.
- Huang, J., Pray, C., Rozelle, S. (2002) Enhancing the crops to feed the poor. *Nature*, 418:678-684.
- IFA. International Fertilizer Industry Association. IFADATA, 2014. <http://www.fertilizer.org/ifa/ifadata/search>
- Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Lima, M.L., da Silva, J.F., Olivares, F.L., de Souza Filho, G.A. (2009) Identification and characterization of

Gluconacetobacter diazotrophicus mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*, 191(5):477-483.

Intorne, A.C., de Oliveira, M.V.V., Pereira, L.M., de Souza Filho, G.A. (2012) Essential role of the *czc* determinant for cadmium, cobalt and zinc resistance in *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5. *International Microbiology*, 15(2):69-78.

Iturriaga, G., Suárez, R., Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9):3793-3810.

James, E.K, Olivares, F.L., De Oliveira, A.L.M., Dos Reis Jr, F.B., Da Silva, L.G., Reis, V.M. (2001) Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, 52(357):747-760.

Koncz, C., Chua, N.H., Schell, J. (1998) *Methods in Arabidopsis Research*. (World Scientific, River Edge, NJ, 1992); J. M. Martinez-Zapater and J. Salinas, Eds., *Arabidopsis Protocols*, vol. 82 of *Methods in Molecular Biology* (Humana, Totowa, NJ).

Koorneef, M., Van Eden, J., Hanhart, C.J., Stamp, P., Braaksma, F.J., Feenstra, W.J. (1983) Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Heredity*, 74:265.

Kurz, M., Montermann, C., Galinski, E.A. (2007) A *Pseudomonas stutzeri* surprise: production of the compatible osmolyte hydroxyectoine. In: abstr. PT015. Abstr. Ann. Conf. Assoc. Gen. Appl. Microbiol., p.195. VAAM, Osnabruck, Germany.

Lamitina S.T., Strange K. (2005) Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 288:C467–C474.

Larcker, W. (2003) *Physiological Plant Ecology*, 4th edn. Springer.

- Leach, A.W., Mumford, J.D. (2008) Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental Pollution*, 151:139–147.
- Li, R.P., Macrae, I.C. (1991) Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:999–1002.
- López, M., Tejera, N.A., Iribarne, C., Lluch, C., Herrera-Cervera, J.A. (2008) Trehalose and trehalase in root nodules of *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, 134(4):575–582.
- Lopez, M.F., Manner, P., Willmann, A., Hampp, R., Nehls, U. (2007) Increased trehalose biosynthesis in Hartig net hyphae of ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 174:389–398.
- Luna, M.F., Aprea, J., Crespo, J.M., Boiardi, J.L. (2011) Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology*, 61: 225-229.
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Yang, J., Sundaram, S., Sa, T. (2004) Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 45:315–324.
- Mansoor, F., Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S. (2007) Enhancement of biocontrol potential of *Pseudomonas aeruginosa* and *Paecilomyces lilacinus* against root rot of mungbean by a medicinal plant *Launaea nudicaulis* L. *Pakistan Journal of Botany*, 39(6):2113-2119.
- Martínez, L., Caballero-Mellado, J., Orozco, J., Martínez-Romero, E. (2003) Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant and Soil*, 257:35-47.

- Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282:662-682.
- Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R. (1994) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, K.J., Wood, J.M. (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 50:101-136.
- Miransari, M. (2011) Soil microbes and plant fertilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5):875-85.
- 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 Journal of Microbiology Research*, 5(2):144-148.
- Müller, J., Boller, T., Wiekman, A. (1995) Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Science*, 112:1-9.
- Muller, J., Boller, T., Wiemken, A. (1996) Pools of non-structural carbohydrates in soybean root nodules during water stress. *Physiologia Plantarum*, 98:723-730.
- Müller, J., Xie, Z.P., Staehelin, C., Mellor, R. B., Boller, T., Wiemken, A. (1994) Trehalose and trehalase in root nodules from various legumes. *Physiologia Plantarum*, 90:86-92.
- Munns, R., Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59:651-681.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero Mellado, J. (2001) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófito. Ed. Martínez-Romero e J. Martínez-Romero. *Microbios en Línea*, 157-176.

- Murphy, H.N., Stewart, G.R., Mischenko, V.V., Apt, A.S., Harris, R., McAlister, M.S.B., Driscoll, P.C., Young, D.B., Robertson, B.D. (2005) The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280:14524–14529.
- Muthukumarasamy, R., Govindarajan, M., Vadivelu, M., Revathi, G. (2006) N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research*, 161(3):238-245.
- Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., Lakshminarasimhan, C. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, 83:137–145.
- Panhwar, Q.A., Othman, R., Rahman, Z.A., Meon, S., Ismail, M.R. (2011) Effect of phosphatic fertilizer on root colonization of aerobic rice by phosphate-solubilizing bacteria. *Proceedings of International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, 9:145-149.
- Paul, M.J., Primavesi, L.F., Jhurrea, D., Zhang, Y. (2008) Trehalose metabolism and signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 59:417–441.
- Pfeffer, P.E., Douds Jr., D.D., Bucking, H., Schwartz, D.P., Shachar-Hill, Y. (2004) The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, 163:617–627.
- 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(4):426-433.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S.C.M. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5:308-316.

- Poolman, B., Glaasker, E. (1998) Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology*, 29:397-407.
- Quiñones, B., Dulla, G., Lindow, S.E. (2005) Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18:682–693.
- Rao, K.N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J.B., Burley, S.K., Swaminathan, S. (2006) Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: biochemical and biological implications. *Protein Science*, 15:1735–1744.
- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Nieto, J.J., Hidalgo-Garcia, A., Iglesias-Guerra, F., Delgado, M.J., Vargas, C. (2012) Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BMC Microbiology*, 12:207.
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(4):435-443.
- Reis, V.M., Döbereiner, J. (1998) Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*, 171:13-18.
- Rontein, D., Basset, G., Hanson, A.D. (2002) Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metabolic Engineering*, 4:49–56.
- Sandhiya, G.S., Sugitha, T.C.K., Balachandar, D., Kumar, K. (2005) Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia sp.* in rice. *Journal of Experimental Biology*, 43:802-807.
- Saravanan V.S., M. Madhaiyan, Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66(9):1794-1798.

- Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., Sa, T.M. (2007) Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, 55(1):130-140.
- Schellenbaum, L., Sprenger, N., Schuepp, H., Wiemken, A., Boller, T. (1999) Effects of drought, transgenic expression of a fructan synthesizing enzyme and of mycorrhizal symbiosis on growth and soluble carbohydrate pools in tobacco plants. *New Phytologist*, 142:67–77.
- Schubert, A., Wyss, P. (1995) Trehalase activity in mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of leek and soybean. *Mycorrhiza*, 5:401-404.
- Singh, L.R., Poddar, N.K., Dar, T.A., Kumar, R., Ahmad, F. (2011) Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin. *Life Sciences*, 88:117-125.
- Stephan, M.P., Oliveira, M., Texeira, K.R.S., Martinez-Drets, G., Döbereiner, J. (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77:67–72.
- Streeter, J.G. (1985) Accumulation of α , α -trehalose by *rhizobium* bacteria and bacteroids. *Journal of Bacteriology*, 164:78-84.
- Streeter, J.G., Gomez, M.L. (2006) Three enzymes for trehalose synthesis in Bradyrhizobium cultured bacteria and in bacteroids from soybean nodules. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:4250–4255.
- Styvold, O.B., Strom, A.R. (1991) Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *Journal of Bacteriology*, 173:1187-1192.

- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M. del C., Cevallos, M.A., Lara, M., Hernández, G., Iturriaga, G. (2008) Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7):958–966.
- Sugawara, M., Cytryn, E.J., Sadowsky, M.J. (2010) Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied Environmental Microbiology*, 76(4):1071–1081.
- Sugawara, M., Cytryn, E.J., Sadowsky, M.J. (2010) Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:1071-1081.
- Tavares, M.F.F., Haberli, J. C. (2011) O mercado de fertilizantes no Brasil e as influências mundiais. ESPM. Central Cases.
- Thakore, Y. (2006) The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology*, 2:194-208.
- Tripathi, A.K., Mishra, B.M., Tripathi, P. (1998) Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* spp. *Journal of Biosciences*, 23:463-471.
- Triplett, E.W., Kaepler, S.M., Chelius, M.K. (2008) *Klebsiella pneumonia* inoculants for enhancing plant growth. *United States Patent*.
- UNEP & WHRC (2007) Reactive nitrogen in the environment: Too much or too little of a good thing. United Nations Environment Programme, Paris.
- Vargas, C., Argandoña, M., Reina-Bueno, M., Rodríguez-Moya, J., Fernández-Aunión, C., Nieto, J.J. (2008) Unravelling the adaptation responses to osmotic

and temperature stress in *Chromohalobacter salexigens*, a bacterium with broad salinity tolerance. *Saline Systems*, 4:14.

Vargas, G.M.C., Lopez, M.J., Elorrieta, M.A., Suarez, F., Moreno, J. (2003) Properties of polysaccharide produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4- hydroxybenzoic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3):388-395.

Velázquez-Hernández, M.L., Baizabal-Aguirre, V.M., Cruz-Vázquez, F., Trejo-Contreras, M.J., Fuentes-Ramírez, L.E., Bravo-Patifio, 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. *Archives of Microbiology*, 193:137-149.

Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, A.K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91:127-141.

Vessey, J.K., Fei, H., Abudureheman, A. (2011) Use of *Gluconacetobacter* with reduced use of nitrogen fertilizer to improve beet crop production. *United States Patent*.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218:1-14.

Warskulat, U., Reinen, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Haussinger, D. (2004) The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *Journal of Investigative Dermatology*, 123:516–521.

Wei, G., Kloepper, J.W., & Tuzun, S. (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select of strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81:1508-1512.

- Weyens, N., Van der Lelie, D., Taghavi, S., Vangronsveld, J. (2009) Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20:248-254.
- Wingler, A. (2002) The function of trehalose biosynthesis in plants *Phytochemistry*, 60(5):437–440.
- Xiao, X., Luo, S., Zeng, G., Wei, W., Wan, Y., Chen, L., Guo, H.J., Cao, Z., Yang, I., Chen, J., Xi, Q. (2010) Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology*, 101:1668-1674.
- Yeo, E.T., Kwon, H.B., Han, S.E., Lee, J.T., Ryu, J.C., Byu, M.O. (2000) Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*, 10:263–268.
- Zaparty, M., Hagemann, A., Brasen, C., Hensel, R., Lupas, A.N., Brinkmann, H., Siebers, B. (2013) The first prokaryotic trehalose synthase complex identified in the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *PLoS ONE*, 8(4):1-11.
- Zhang, R., Pan, Y.T., He, S.M., Lam, M., Brayer, G.D., Elbein, A.D., Withers, S.G. (2011) Mechanistic analysis of trehalose synthase from *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286:35601–35609.