

RESUMO

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

Os estresses ambientais são caracterizados como fatores limitantes para a produção agrícola mundial. Esse cenário tem exigido o emprego de tecnologias atenuantes à perda de produtividade, entre elas o melhoramento genético. Entre as fontes de genes para tolerância aos estresses ambientais, as bactérias se destacam pela diversidade de mecanismos adaptativos para se estabelecer nos diferentes ambientes e pela sua aplicabilidade através de engenharia genética. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI 5 é uma bactéria isolada de cana-de-açúcar, conhecida pela capacidade em promover o crescimento vegetal (PGPB, *Plant Growth Promoting Bacteria*). Essa bactéria se destaca pela sua alta tolerância a elevadas concentrações de açúcares, com a capacidade de crescer na presença de 30% de sacarose, além de tolerar diferentes estresses ambientais. Tais características sugerem a existência de relevantes mecanismos moleculares de tolerância a estresses abióticos, os quais são de grande potencial biotecnológico. Nesse sentido, o presente trabalho objetivou identificar mecanismos de tolerância por sacarose em *G. diazotrophicus* PAI 5 e caracterizar novos genes envolvidos na resposta a estresses abióticos e na promoção do crescimento vegetal em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para isso, a bactéria foi cultivada em meio sob condição controle e em meio suplementado em meio contendo 600 mM de sacarose. O estresse causado pela alta concentração de sacarose no meio foi responsável por reduzir em 30% a taxa de multiplicação celular. Tal estresse não foi suficiente para promover alterações morfológicas nas células. Análises proteômicas nas condições de estudo permitiram identificar 869 proteínas: 274 proteínas diferencialmente acumuladas (*Differentially Accumulated Protein* – DAPs), sendo 77 DAPs aumentadas, entre

elas proteínas de metabolismo de carbono e transportadores de osmoprotetores; e 197 DAPs reduzidas, o que engloba as proteínas porinas e transportadores de açúcares. Adicionalmente, as análises proteômicas identificaram 53 DAPs descritas como hipotéticas em *G. diazotrophicus* PAI 5, que passam a ser consideradas novas proteínas envolvidas na resposta a estresse por sacarose. A necessidade de caracterização molecular das proteínas hipotéticas identificadas no trabalho justificou a busca por seus mutantes insercionais na biblioteca de mutantes de *G. diazotrophicus* PAI 5. Apesar de não permitir a identificação de mutantes identificados através das análises proteômica, foi possível selecionar o mutante GDP09A11, responsável por codificar uma proteína predita hipotética em *G. diazotrophicus* PAI 5. Através de ensaios de sensibilidades posteriores, foi comprovada a alta sensibilidade do mutante ao estresse causado por sacarose. Tal característica permitiu a renomeação do gene para *GdSucre01*. Análises constataram a importância do gene *GdSucre01* na tolerância a estresse por cádmio, Na₂SO₄, PEG, sacarose, assim como na fixação biológica de nitrogênio e na interação e promoção do crescimento de *A. thaliana*. Os resultados obtidos por este trabalho revelaram novos genes envolvidos na tolerância de *G. diazotrophicus* ao estresse por sacarose. Adicionalmente, foi possível identificar a nova proteína GdSucre01, com papel importante para a tolerância a estresses abióticos e para a promoção do crescimento vegetal. Nosso estudo abre novas perspectivas para o entendimento dos mecanismos de resistência a estresses em micro-organismos e no processo de interação e promoção do crescimento vegetal.

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