



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RAISSA SOUZA CAMINHA BRET

**CINÉTICA DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM *Vigna unguiculata*
L. (WALP.) E ESTRATÉGIAS DE TOLERÂNCIA DE *Nicotiana tabacum* L. (VAR.
XHANTI) FRENTE À INOCULAÇÃO COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO
CAUPI (CPSMV), UM PATÓGENO NATURAL DE PLANTAS LEGUMINOSAS**

FORTALEZA

2018

RAISSA SOUZA CAMINHA BRET

CINÉTICA DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM *Vigna unguiculata* L.
(WALP.) E ESTRATÉGIAS DE TOLERÂNCIA DE *Nicotiana tabacum* L. (VAR. XHANTI)
FRENTE À INOCULAÇÃO COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI
(CPSMV), UM PATÓGENO NATURAL DE PLANTAS LEGUMINOSAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B852c Bret, Raissa Souza Caminha.

Cinética dos fatores de iniciação da tradução em *Vigna unguiculata* l. (walp.) e estratégias de tolerância de *Nicotiana tabacum* l. (var. xhanti) frente à inoculação com o vírus do mosaico severo do caupi (cpsmv), um patógeno natural de plantas leguminosas / Raissa Souza Caminha Bret. – 2017.

121 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira.

1. CPSMV. 2. *Nicotiana tabacum*. 3. Defesa vegetal. 4. eIF4E. 5. H2O2. I. Título.

CDD 572

RAISSA SOUZA CAMINHA BRET

CINÉTICA DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM *Vigna unguiculata* L.
(WALP.) E ESTRATÉGIAS DE TOLERÂNCIA DE *Nicotiana tabacum* L. (VAR. XHANTI)
FRENTE À INOCULAÇÃO COM O VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI
(CPSMV), UM PATÓGENO NATURAL DE PLANTAS LEGUMINOSAS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovada em: 16 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira (orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Gilvan Pessoa Furtado
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz - CE)

Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Charles Caminha Bret (*in memoriam*),
segundo pai, tio e melhor amigo, que sempre
apostou e acreditou em mim
incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. **José Tadeu**, pela ótima orientação e por dar o exemplo de ética e profissionalismo.

À professora Dra. **Cristina Paiva** por todos os ensinamentos e pela estrutura cedida para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, Dr. **Gilvan Furtado** e Dr. **Renato Moreira**, por todas as contribuições e pela disponibilidade em participar da minha banca de defesa de mestrado.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos Laboratórios de Toxinas Vegetais, de Biologia Molecular de Plantas e de Metabolismo de Plantas por todo apoio prestado.

Aos meus colegas de bancada e do departamento por todos momentos de descontração e por toda ajuda concedida.

Ao **Roger**, meu pai, meu melhor amigo, maior confidente e eterno companheiro, o qual me falta palavras para expressar tamanha gratidão por tudo o que fez e ainda faz por mim.

À **Rosana**, minha “boadrasta”, minha mãe de criação e do coração e melhor amiga, por há doze anos ter aberto suas portas e me acolhido não só em sua casa, mas também em seu coração. Por me dar o exemplo de como eu quero ser “quando crescer” e me inspirar na escolha da carreira acadêmica.

Ao **Yugo**, não só pela imensa paciência, mas também por ter sido de fundamental importância no decorrer deste trabalho e se fazer tão presente todos os dias durante esses anos, mesmo de tão longe.

À minha mais de meia dúzia de irmãs (e irmão), pois afinal apenas um time de vôlei com direito a reserva para aguentar toda a minha carga dramática!

À **Gabriella**, minha prima, por me dar o amor mais puro e mais leve que pode haver. A quem eu hoje literalmente devo a minha vida.

Muito obrigada!

“Eventually, everything connects”

Charles Eames

RESUMO

As doenças provocadas por vírus são a principal causa da perda de rendimento das culturas. O *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), um vírus do gênero Comovirus, infecta especificamente o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.), uma importante cultura mundial. O objetivo principal deste trabalho foi indicar mecanismos de defesa de plantas contra o CPSMV, especificamente utilizando genótipos resistentes e susceptíveis de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp.) e plântulas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi) cultivadas *in vitro* como modelos de estudo. Primeiro, as respostas transcricionais dos fatores de iniciação da tradução 4E (*eIF4E*) e sua isorforma (*eIF(iso)4E*) em resposta à infecção pelo CPSMV foram estudadas em folhas de cinco genótipos de *V. unguiculata* com diferentes níveis de resistência ao vírus. Os resultados mostraram que a transcrição de *eIF4E* e *eIF(iso)4E* foram moduladas após a infecção pelo CPSMV dependentemente do grau de susceptibilidade de cada genótipo testado. Em um segundo experimento, folhas de plântulas de tabaco foram cultivadas *in vitro* foram inoculadas com CPSMV ou com a solução controle, sendo os resultados avaliados 1, 2 e 6 dias após a inoculação. Embora não tenham sido observados sintomas visuais, detectou-se acúmulo de proteína do capsídeo do CPSMV, além de menor acúmulo de proteínas solúveis e RNA em folhas inoculadas com o vírus. Além disso, observou-se acúmulo de H₂O₂ principalmente entre o primeiro e o segundo dias após a inoculação viral. O CPSMV modulou as atividades de algumas enzimas relacionadas à defesa e expressão transcrita no tabaco em benefício próprio, como revelado pela baixa regulação de genes envolvidos na defesa da planta (RDR2, NR, BRI1 e BAK1), aumento da atividade da glucanase, e aumento na regulação do fator de iniciação da transcrição *eIF4E*. Por outro lado, as plântulas de tabaco tentaram superar a infecção viral por modulação dos conteúdos de H₂O₂ e compostos fenólicos e as atividades de enzimas relacionadas (superóxido dismutase, peroxidase de ascorbato, fenilalanina amônia-liase e peroxidase de guaiacol), apresentando padrões de planta tolerante. Assim, sugere-se que *N. tabacum* é tolerante ao CPSMV por promover maior produção de H₂O₂ e composto fenólico e aumento da atividade de algumas enzimas relacionadas à defesa.

Palavras-chave: CPSMV. *Nicotiana tabacum*. Defesa vegetal. *eIF4E*. H₂O₂.

ABSTRACT

The virus diseases are the major cause of crop yield loss. The *Cowpea Severe Mosaic Virus* (CPSMV), a virus from the genus Comovirus, specifically infects cowpea (*Vigna unguiculata* L.), an important crop worldwide. This study mainly aimed to indicate mechanisms for plant defense against CPSMV, specifically using resistant and susceptible genotypes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and *in vitro*-cultivated tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi) as study models. First, the transcriptional responses of the translation initiation factor 4E (*eIF4E*) and its isoform (*eIF(iso)4E*) in response to CPSMV infection were studied in leaves of five *V. unguiculata* genotypes with different levels of virus resistance. The results showed that the transcription of *eIF4E* and *eIF(iso)4E* were modulated after CPSMV infection depending on the degree of susceptibility of each genotype tested. In a second experiment, leaves of tobacco plantlets grown *in vitro* were CPSMV- and mock-inoculated and the results were evaluated at 1, 2 and 6 days post-inoculation. Although no visual symptoms were observed, CPSMV-capsid protein accumulation was detected in infected leaves, in addition to lower accumulation of soluble proteins and RNA. Additionally, a H_2O_2 accumulation was observed mainly between the first and the second day after the virus inoculation. CPSMV modulated the activities of some defense-related enzymes and transcript expression in tobacco to its own benefit, as revealed by down-regulation of genes involved in plant defense (RDR2, NR, BRI1, and BAK1), increase in glucanase activity, and up-regulation of the transcription initiation factor *eIF4E*, which is related to CPSMV protein synthesis, replication, and spread. On the other hand, tobacco plantlets attempted to overcome the viral infection by modulation of the H_2O_2 and phenolic compound contents, and the activities of related enzymes (superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and guaiacol peroxidase), exhibiting patterns of a tolerant plant. Altogether it appears that *N. tabacum* is CPSMV-tolerant because it responds with higher H_2O_2 and phenolic compound production and increased activity of some defense-related enzymes.

Keywords: CPSMV. *Nicotiana tabacum*. Plant defense. *eIF4E*. H_2O_2 .

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX	Ascorbato peroxidase
Avr	Avirulencia
BAK	BRI-associated receptor kinase 1
BANA	N- α -benzoyl-arginine- ρ -naphthylamide
BR	Brassinosteróide
BRI1	Brassinosteroid insensitive 1
CICuBuV	<i>Cotton leaf curl burewala virus</i>
CAT	Catalase
CHI	Quitinase
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CPSMV	<i>Cowpea severe mosaic virus</i> (Virus do mosaico severo do caupi)
DAI	Dias após a inoculação
DMACA	4-Dimethylaminocinnamaldehyde
eEF	Fatores de alongação eucariótico
eIF	Fatores de iniciação da tradução eucariótico
ETI	Imunidade desencadeada por efetores
GLU	β -1,3-Glucanase
HR	Resposta hipersensitiva
MAMPS	Padrões moleculares associados aos microrganismos
MAPK	MAP quinase
miRNA	MicroRNA
NBT	Nitroblue-tetrazolium
nkat	nanokatal
NR	Redutase do nitrato
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PAMPS	Padrões moleculares associados aos patógenos
PC	Compostos fenólicos
PEPYMV	<i>Pepper yellow mosaic virus</i>
PIN	Inibidor de protease
POX	Peroxidase do guaiacol

PP2A	Fosfatase de proteína 2A
PRR	Receptores de reconhecimento de padrões
PTGS	Silenciamento gênico pós-transcricional
PTI	Imunidade desencadeada por PAMPs
PTY	<i>Potato virus Y</i>
RBOH	Proteína homóloga de explosão oxidativa da respiração
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Reação de transcrição reversa pela RNA polimerase dependente de RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAR	Resposta sistêmica adquirida
ShVX	<i>Shallot X virus</i>
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SOD	Superóxido dismutase
sRNAs	Pequenos RNAs
TCA	trans-cinnamic acid
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
UA	Unidade de atividade
UI	Unidade de inibição
VPg	Proteína viral ligada ao genoma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	RESPOSTA TRANSCRICIONAL DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO 4E (eIF4E) E SUA ISORFORMA (eIF(ISO)4E) EM GENÓTIPOS DE <i>Vigna unguiculata</i> L. (WALP.) COM DIFERENTES NÍVEIS DE RESISTÊNCIA AO VÍRUS DO MOSAICO SEVERO DO CAUPI (CPSMV)	34
4	<i>Nicotiana tabacum</i> L. TOLERATES COWPEA SEVERE MOSAIC VIRUS INFECTION WITH INCREASED H ₂ O ₂ AND PHENOL COMPOUND PRODUCTION AND DEFENSE-RELATED ENZYME ACTIVITIES.....	53
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO A - LISTA DE FIGURAS	104
	ANEXO B - TABELA COM OS GENES CITADOS E SUAS RESPECTIVAS SIGLAS E ORGANISMOS	108
	ANEXO C - TABELA COM OS PRIMERS SENSO E ANTI-SENSO UTILIZADOS E SUAS RESPECTIVAS TEMPERATURAS DE ANELAMENTO E ORGANISMOS	109
	ANEXO D - GÉL DE AGAROSE (1,5%) COM 500 UG DE RNA DAS AMOSTRAS DE <i>N. tabacum</i> COM 6 DAI, MOCK (A-C) E INOCULADAS (D-F)	111
	ANEXO E - TESTES DE TEMPERATURAS DE ANELAMENTO PARA OS PRIMERS DE <i>N. tabacum</i>	112
	ANEXO F - CURVAS DE MELTING	114
	ANEXO G – GRÁFICOS REFERÊNTES ÀS CORRIDAS DE qPCR	117