



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

FRANCISCO LUCAS PACHECO CAVALCANTE

**MODULAÇÃO METABÓLICA EM VARIEDADES CONTRASTANTES DE SORGO
INDUZIDAS PELO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

FORTALEZA

2021

FRANCISCO LUCAS PACHECO CAVALCANTE

MODULAÇÃO METABÓLICA EM VARIEDADES CONTRASTANTES DE SORGO
INDUZIDAS PELO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.

Coorientador: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho

FORTALEZA

2021

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)

- C364m Cavalcante, Francisco Lucas Pacheco.
Modulação metabólica em variedades contrastantes de sorgo induzidas pelo estresse do retículo endoplasmático / Francisco Lucas Pacheco Cavalcante. – 2021.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.
Coorientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Estresses abióticos. 2. Metabolômica. 3. Sorghum bicolor. 4. Tunicamicina. I. Título.
- CDD 572
-

FRANCISCO LUCAS PACHECO CAVALCANTE

MODULAÇÃO METABÓLICA EM VARIEDADES CONTRASTANTES DE SORGO
INDUZIDAS PELO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Lineker de Sousa Lopes
Secretaria da Educação do Estado do Ceará (Seduc)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar e iluminar meus caminhos!

Aos meus pais, Lucineide Pacheco e Francisco Alberto, meus maiores heróis que, com muita dedicação, paciência e sabedoria, sempre me mostraram a importância de seguir os caminhos da honestidade e do caráter, além do apoio necessário em muitos momentos. A vocês, minha eterna gratidão.

A Kênia Edjane, Dona Leonice e minha prima Luciliana Pacheco que sempre acreditaram no meu potencial em realizar meus objetivos, me aconselharam e que nunca me deixaram desanimar nos momentos difíceis.

Como bem disse a escritora Helen Keller: “Sozinhos, pouco podemos fazer; juntos, podemos fazer muito” com esses versos que agradeço aos amigos que conquistei no LabFive durante essa etapa e que compartilhei momentos de risadas, tristezas, superações e desabafos: Karol Roger, Dalton Oliveira, Igor Costa, Stelamaris Paula, Sávio, Anderson.

Aos amigos e colegas de mestrado que me acompanharam durante toda essa trajetória, vivenciando em conjunto os desafios e recompensas experienciados: Veríssimo Vieira, Íris Flávia, Lara Dias, Patrícia Gomes, Ewerton Lima, Lucas Lopes, Mateus Farias e Yandra Pereira.

Aos meus amigos Jaiane, Reijannya Silva, Viviane Sousa, Deninha, Rafael Souza e Elita Pinheiro que ajudaram, apoiaram e me incentivaram.

A professora e amiga Luana Lima agradeço pelos ensinamentos, lições de vida e por me ajudar em muitas ocasiões com suas palavras sinceras e acolhedoras.

Em especial, com meus mais sinceros agradecimentos, ao meu orientador Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho pela orientação, paciência, disponibilidade, conselhos, por compartilhar suas histórias e por sempre acreditar no potencial de todos os seus orientandos. Espero que possamos continuar essa parceria! Muito obrigado.

A Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Coordenação do PPGB e aos professores e técnicos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela excelência e qualidade no ensino, proporcionando condições para que este trabalho fosse realizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de mestrado e ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), representado pelo Dr. José Nildo Tabosa, por fornecer o material vegetal base para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Ao Coorientador Prof. Dr. Enéas Gomes-Filho, Prof. Dr. Lineker de Sousa Lopes (grandes mestres do LabFive) e Prof. Dra. Rosilene Oliveira Mesquita (grande parceira do nosso laboratório) por aceitarem participar da minha banca, contribuindo através dos seus conhecimentos com a melhoria do trabalho. Muito obrigado!

A todos os doutorandos e mestrados parceiros que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigado!

RESUMO

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma importante cultura de cereal nativo do continente africano e pertencente à família Poaceae. É o quinto cereal mais produzido no mundo e, no ponto de vista agrônômico, este crescimento é explicado, principalmente, pelo alto potencial de produção de grãos e matéria seca da cultura. No entanto, como todo organismo vivo, o sorgo pode ser afetado por estresses abióticos e bióticos que comprometem sua produtividade. Diversas respostas frente às condições desfavoráveis são moduladas pelas plantas, como por exemplo, os ajustes morfofisiológicos e moleculares, além da indução da via de resposta às proteínas mal dobradas que ocorre no retículo endoplasmático (RE). De fato, o RE se apresenta como uma organela chave para a sobrevivência das plantas frente a estresses. Dessa forma, foi desenvolvida uma revisão que inclui os avanços no conhecimento da resposta do RE induzida pelos tratamentos com tunicamicina (TM) e ditiotreitol (DTT), especialmente seus efeitos fisiológicos a jusante a fim de ajudar a elucidar possíveis mecanismos de ajuste aos estresses ambientais e os mecanismos de adaptação para sobrevivência ou morte. Em seguida, para complementar o entendimento das diversas respostas aos estresses, realizou-se um estudo envolvendo a metabolômica, uma ciência multidisciplinar que oferece possibilidades únicas de decodificar modulações metabólicas por uma abordagem que vai além do transcriptoma e do proteoma, geralmente utilizadas. A eficiência do RE em lidar com o acúmulo de proteínas mal dobradas é fundamental para a sobrevivência das plantas em qualquer situação de estresse. Portanto, se torna relevante identificar genótipos que apresentem diferentes respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares em relação aos níveis de sensibilidade ao estresse. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar alterações nos perfis metabólicos de duas variedades de sorgo, CSF18 e CSF20, sob estresse do RE induzido por concentrações crescentes de tunicamicina. Os resultados demonstraram que o estresse induziu uma redução do crescimento, principalmente da raiz. A menor concentração de TM induziu uma maior peroxidação lipídica em ambas as variedades. Os resultados do *Score plot* indicaram uma separação dos tratamentos TM com o grupo controle. Notou-se uma modulação negativa de metabólitos chaves na CSF18 e positiva modulação deles na CSF20, a qual apresentou uma melhor performance frente ao estresse, relacionado a um significativo aumento de carboidratos e ácidos orgânicos.

Palavras-chave: Estresses abióticos. Metabolômica. *Sorghum bicolor*. Tunicamicina.

ABSTRACT

Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) is an important cereal crop native to the African continent and belonging to the Poaceae family. It is considered the fifth most-produced cereal in the world and, from the agronomic point of view, this growth is mainly explained by the high potential of grain production and dry matter of the crop. However, like any living organism, sorghum can be affected by abiotic and biotic stresses that compromise its productivity. Several responses to unfavorable conditions are modulated by plants, such as morphophysiological and molecular adjustments, in addition to the induction of the poorly unfold protein response pathway that occurs in the endoplasmic reticulum (ER). In fact, ER presents itself as a key organelle for the survival of plants in the face of stress. Thus, a review was developed that includes advances in the knowledge of the ER response induced by treatments with tunicamycin (TM) and dithiothreitol (DTT), especially their physiological effects downstream in order to help elucidate possible mechanisms of adjustment to environmental stresses from the mechanisms of adaptation for survival or death. Then, to complement the understanding of the various responses used in the face of stresses, a study was carried out involving metabolomics, multidisciplinary science that offers unique possibilities to decode metabolic modulations through an approach that goes beyond the transcriptome and the proteome. The efficiency of the ER in dealing with the accumulation of poorly folded proteins is fundamental for the survival of the plants in any situation of stress. Therefore, it is relevant to identify genotypes that present different physiological, biochemical, and molecular responses in relation to the levels of sensitivity to stress. Therefore, the aim of this research was to evaluate changes in the metabolic profiles of two varieties of sorghum seedlings, CSF18 and CSF20, under endoplasmic reticulum (ER) stress-induced by increasing tunicamycin concentrations. The results showed that stress-induced a reduction in growth, mainly of the root. The lower concentration of TM induced the highest lipid peroxidation of both varieties. The *Score plot* results indicated a separation of the TM treatments with control. There was a negative modulation of key metabolites in CSF18 and a positive modulation of them in CSF20, which performed better in the face of stress, related to a significant increase in carbohydrates and organic acids.

Keywords: Abiotic stresses. Metabolomics. *Sorghum bicolor*. Tunicamycin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	HIPÓTESE.....	13
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	Objetivo geral	13
3.2	Objetivos específicos	13
4	PHYSIOLOGICAL RESPONSES INDUCED BY ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN PLANTS UNDER TUNICAMYCIN AND DITHIOTHREITOL.....	14
4.1	Introduction.....	15
4.2	Endoplasmic reticulum stress response in Arabidopsis.....	16
4.3	Physiological responses induced by tunicamycin in plants.....	19
4.4	Downstream physiological responses of dithiothreitol in plants.....	26
4.5	Concluding remarks.....	30
5	SORGHUM VARIETIES CSF18 AND CSF20 PRESENT DIFFERENTIAL METABOLOMIC PROFILES INDUCED BY ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS.....	33
5.1	Introduction.....	33
5.2	Materials and Methods.....	35
5.2.1	<i>Plant material and growth conditions.....</i>	35
5.2.2	<i>Growth analysis: seedling length and dry matter determination.....</i>	36
5.2.3	<i>Peroxidation of membrane lipids and hydrogen peroxide (H₂O₂) contents.....</i>	36
5.2.3.1	<i>Preparation of extracts.....</i>	36
5.2.3.2	<i>Peroxidation of membrane lipids.....</i>	37
5.2.3.3	<i>Determination of hydrogen peroxide (H₂O₂) contents.....</i>	37
5.2.4	<i>Metabolic profile by GC-MS and data analysis.....</i>	37
5.2.5	<i>Experimental design and statistical analysis.....</i>	38
5.3	Results.....	39
5.3.1	<i>Growth parameters.....</i>	39
5.3.2	<i>Peroxidation of membrane lipids and hydrogen peroxide.....</i>	41
5.3.3	<i>Metabolic profiling of sorghum shoot and root under different TM concentrations.....</i>	42

5.3.4	<i>Principal component analysis (PCA) of metabolic profiles.....</i>	42
5.3.5	<i>Differential metabolite modulation in shoots and roots induced by crescent TM concentrations.....</i>	45
5.3.6	<i>Comparative PCA of two sorghum varieties under all treatments with TM..</i>	48
5.3.7	<i>Identification of potential biomarkers for ER stress in sorghum varieties....</i>	51
5.4	Discussion.....	53
5.4.1	<i>The sorghum varieties present contrasting sensibility to ER stress</i>	53
5.4.2	<i>Differentially regulated metabolites by ER Stress between CSF18 and CSF20.....</i>	54
5.5	Conclusions.....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A - TABLE S1: LIST OF DETECTED METABOLITES IN SHOOT AND ROOTS OF SORGHUM WITH THEIR CLASSIFICATION IN COMPOUND TYPES, THEIR RETENTION TIME, RESPECTIVELY, AND WITH THEIR KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES IDENTIFIER NUMBER (KEGG ID).....	70
	APÊNDICE B - FIGURE S1 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS BILOT. CONTRIBUTIONS OF METABOLITES PROFILE FOR SHOOT (A, B) AND ROOT (C,D). THE DIRECTION AND MAGNITUDE OF THE LOADINGS VECTORS VISUALLY DEMONSTRATE HOW EACH METABOLITE CONTRIBUTES IN EACH TM CONCENTRATION.....	73
	APÊNDICE C - TABLE S2: RELATIVE CONCENTRATION VALUES OF METABOLITES IN SEEDLINGS OF SORGHUM, VARIETIES CSF18 AND CSF20 UNDER ABSENCE (0 TM) AND PRESENCE OF TM (0.5, 1.5, 2.5 µg ml⁻¹). VALUES REPRESENT THE MEANS OF FIVE REPETITIONS ± STANDARD ERROR. DIFFERENT LETTERS INDICATE SIGNIFICANT DIFFERENCE BY ANOVA p<0,05.....	74