



Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Molecular

Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas

Aisy Botega Baldoni

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

**Brasília - DF
Julho de 2010**

Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas

Aisy Botega Baldoni

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular, curso de Pós-Graduação em Biologia Molecular como parte do requisito à obtenção do título de Doutora em Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Lima Aragão

**Brasília
Julho de 2010**

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Donizetti e Ana,
que são a razão da minha vida
e das minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por iluminar meus caminhos e estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais, Donizetti e Ana, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos de minha vida. Aos meus irmãos e familiares que torceram à distância. Ao meu companheiro Flávio, por estar ao meu lado nos momentos importantes.

Ao meu orientador, Francisco J. L. Aragão, pelos ensinamentos na ciência e na vida, pela dedicação, apoio e confiança.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro e à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por disponibilizar laboratórios e equipamentos para a condução desse trabalho.

Às estagiárias, Mayara, Rebeca, Rosana e Natália, pelo auxílio na condução desse projeto e pela amizade.

À pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Ana Cláudia Guerra Araújo e à Ana Cristina M. Mendes Gomes, pela orientação na condução do trabalho na área de microscopia de luz e eletrônica e pela amizade. À professora da Universidade de Brasília, Sônia Nair Bão, pela disponibilização do microscópio eletrônico de transmissão.

Aos grandes e eternos amigos do Laboratório de Transferência de Genes do Cenargen: Elsa, Cristiana, Thaís, Maria Laine, Sérgio, Cristiane, Livia, Nayhanne, Nicolau, Bárbara, Aline, Emanuel, Welcimar, Paula, Luisa, Daniel, Thaina, André, Bruno, Emanuel, Marly, Giovanni, Cristiano, Dona Isabel, Warley, Luís, Roberto, Pedro. À Déia, pelas contribuições e sugestões valiosas na condução do meu trabalho e pela amizade.

Enfim, agradeço a todos, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desse projeto.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	vii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I – <i>Diversidade em acessos de mamona do banco de germoplasma brasileiro quanto à concentração de ricina nas sementes</i>	1
1) A mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	2
2) Características agronômicas da mamona	4
3) Propriedades do óleo da mamona	5
4) Torta de mamona	7
5) Ricina	10
Características estruturais	10
Modo de ação e toxicidade	12
Aplicações na medicina	14
OBJETIVO GERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIAIS E MÉTODOS	15
Material vegetal	15
Extração de proteínas das sementes de mamona	17
ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	18
Curva-padrão da concentração de ricina	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
CONCLUSÕES	22
CAPÍTULO II - <i>Estudo do acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona (Ricinus communis L)</i>	23
1) Desenvolvimento da semente de mamona e imunolocalização da ricina	24
OBJETIVO GERAL	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
Materiais vegetais e estágios de desenvolvimento	26

Extração de proteínas e ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	27
Processamento das sementes	28
Processamento para microscopia de luz	29
Imunomarcacão para microscopia de luz	29
Processamento para microscopia eletrônica	29
Imunomarcacão para microscopia eletrônica	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÕES	37
ANEXO: Baldoni AB, Araújo ACG, Carvalho MH, Gomes ACMM, Aragão FJL (2010) <i>Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (<i>Ricinus communis L</i>) seed development International Journal of Plant Biology, volume 1:e12</i>	39
CAPÍTULO III - <i>Silenciamento do gene que codifica a ricina em mamona (<i>Ricinus communis L.</i>)</i>	44
1) Cultura de tecidos e transformacão genética da mamona.....	45
2) RNA interferente (RNAi)	46
OBJETIVO GERAL	49
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
MATERIAIS E MÉTODOS	50
Construçãõ do vetor para transformacão de mamona	50
Preparo do material vegetal para a transformacão genética	51
Curva de seleçãõ para o imazapir	51
Transformacão genética e cultura de tecidos	51
Análises moleculares	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
CONCLUSÕES	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Faixas de variação do percentual de ácidos graxos do óleo de mamona	6
Figura 1: Estrutura molecular do triglicéride do ácido ricinoléico e sua relação com alguns de seus derivados (Adaptado de Azevedo <i>et al.</i> , 2009; Savy Filho, 2005)	7
Tabela 2: Quantidade de torta de mamona produzida de acordo com a eficiência do processo de extração do óleo	8
Tabela 3: Composição da torta de mamona como adubo orgânico	8
Tabela 4: Composição química da torta de mamona, em percentual	9
Figura 2: Proteína ricina; A: estrutura tridimensional da ricina, sendo em azul a cadeia A e, em vermelho, a cadeia B; B: estrutura da ricina mostrando na seqüência: o peptídeo sinal, a cadeia A, o peptídeo de ligação e a cadeia B (Adaptado de Halling <i>et al.</i> , 1985)	11
Figura 3: Tráfego intracelular da ricina nas células do endosperma da mamona. A partícula de reconhecimento de sinal (SRP) se liga ao peptídeo sinal da preproricina permitindo a inserção no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Ocorre a remoção do sinal pela peptidase sinal (SP), originando a proricina e formação da ligação dissulfeto intramolecular entre as subunidades A e B pela PDI catalase. Em seguida, a protease vacuolar (VP) remove o propeptídeo formando a ricina madura (Adaptado de Maltman <i>et al.</i> , 2007)	12
Figura 4: Mecanismo de toxicidade da ricina A) Proteína ricina mostrando a cadeia A, com o sítio enzimático e a cadeia B, com os sítios para ligação para a galactose da superfície celular, ambas ligadas por uma ligação dissulfeto; B) A cadeia B liga-se à galactose na superfície celular e a ricina penetra na célula Ela é transportada em vesículas para o Complexo de Golgi, ou pode retornar a superfície celular por exocitose ou ser degradada em lisossomos C) Do Complexo de Golgi, algumas moléculas são transportadas para o Retículo Endoplasmático onde ocorre a clivagem das cadeias A e B e apenas a cadeia A se encaminha para o citosol da célula D) A cadeia A inativa os ribossomos pela remoção da adenina no rRNA 28S, na subunidade ribossomal 60S inativando a síntese protéica em eucariotos (Adaptado de Audi <i>et al.</i> , 2005)	13
Figura 5: Padrão fenotípico das sementes de mamona dos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão Barra = 15,9mm	16
Tabela 5 – Esquema da análise de variância com as respectivas fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM), estatística F e esperanças de quadrados médios [E(QM)]	17
Tabela 6: Análise de variância com as fontes de variação (FV), seus respectivos graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM) e estatística F para a concentração de ricina (ng/µg de proteína total) avaliadas em 20 genótipos pertencentes ao banco de germoplasma de mamona da Embrapa Algodão, num delineamento inteiramente ao acaso	19
Tabela 7: Concentração de ricina (ng de ricina/µg de proteína total) em variedades nacionais e genótipos de mamona do Banco de Germoplasma da Embrapa Algodão ...	21
Figura 6: Alterações morfológicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de mamona da cv BRS Energia Flor (0 DAP); frutos (à esquerda, 10-60 DAP); sementes com tegumento (à direita, 10-30 DAP, no meio em 40 a 60 DAP) e sementes sem	

tegumento (a direita, 40-60 DAP) DAP, dias após a polinização Barras de escala representam 10 mm	27
Figura 7: Concentração média de ricina em sementes maduras das cultivares BRS Paraguaçu (Pa), BRS Nordestina (N), BRS Energia (E) e BRS Pioneira (Pi) (A), e acúmulo de ricina durante o desenvolvimento das sementes da cv BRS Energia (B) As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3)	31
Figura 8: Estrutura celular (esquerda) e imunomarcação (direita) do endosperma de sementes de mamona da cv BRS Energia com 10DAP, 30DAP e 60DAP (dias após a polinização) A coluna da esquerda mostra as modificações na estrutura e composição celular com o desenvolvimento do endosperma da semente Na coluna da direita, observa-se o aumento na marcação (seta) da proteína ricina com o desenvolvimento da semente de mamona Barra = 50 µm	33
Figura 9: Estrutura celular do endosperma nos diferentes estágios de desenvolvimento: 30 DAP (A), 40 DAP (B e C), 50 DAP (D) e 60 DAP (E) ER: retículo endoplasmático; V: vacúolos; mt: mitocôndrias, N: núcleo; PSV: vacúolos de armazenamento de proteínas; LB: corpos lipídicos, p: cavidades globóides de fitina; cr: cristalóides; m: matriz DAP, dias após a polinização Barras representam 2 µm (em A e C), 10 µm (em B, D e E) e 2,5 µm (no detalhe de E)	35
Figura 10: Imunolocalização da ricina durante o desenvolvimento de células do endosperma da semente de mamona em 40 DAP (A), 50 DAP (B) e 60 DAP (C e D) PSV: vacúolos de armazenamento de proteínas; LB: corpos lipídicos; p: cavidades globóides de fitina; cr: cristalóides; m: matriz DAP, dias após a polinização Setas nas inserções mostram partículas de ouro coloidal (20 nm) localizando a ricina Barras representam 2,0 µm (em A, B, C e D) e 0,5 µm (nas inserções) Inserções mostram detalhes da área marcada com as setas brancas	36
Figura 11: Estrutura do RNA e a eficácia das construções para o silenciamento gênico PTGS indica a porcentagem de plantas silenciadas para o gene <i>gus</i> ; n = número de plantas em cada tratamento (Adaptado de Wesley <i>et al</i> , 2001)	47
Figura 12: Modelo do mecanismo de RNAinterferente A presença de RNA de fita dupla (dsRNA) na célula ativa o complexo protéico DICER que cliva-o em pequenos fragmentos (<i>small interfering</i> RNA - siRNA) Esses fragmentos se associam a outro complexo enzimático (RISC) que os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, e quando houver homologia total clivará também esta fita complementar (Adaptado de Dykxhoorn <i>et al</i> , 2003)	48
Figura 13: Construção do vetor de transformação A) Fragmento da ricina (480pb) com sítios enzimáticos de <i>HindIII/KpnI/XhoI/XbaI</i> inserido no vetor pGEM-T Easy B) Construção do cassete de transformação inserindo no vetor pKANNIBAL o fragmento do gene da ricina (RIC) no sentido sense e anti-sense, retirado do vetor pGEM-T Easy C) O cassete de transformação é retirado do vetor pKANNIBAL com o sítio de <i>NotI</i> e inserido no vetor pAC321, gerando o vetor de transformação (pAC321RIC) Esse vetor possui o gene <i>ahas</i> , que funcionará como agente seletivo para as plantas transgênicas	54
Figura 14: Curva de seleção dos explantes de mamona para o herbicida imazapir em meio de cultura sólido, nas dosagens de 0nM, 200nM, 400nM, 600nM e 800nM (A) e	

em meio de cultura líquido, nas dosagens de 0nM, 100nM, 200nM e 300nM (B) Barra: 10 mm	55
Figura 15: Expressão do gene <i>gus</i> em embriões bombardeados com o vetor pBI 426 Os pontos azuis indicam a reação das células transformadas com o substrato X-glu A e B : dois experimentos bombardeados com o mesmo vetor mostrando um grande número de pontos azuis, ou seja, células transformadas	57
Figura 16: Gel de agarose 1% mostrando as bandas amplificadas na reação de PCR de algumas das plantas analisadas com os primers do gene <i>ahas</i> , que amplificam um fragmento esperado de aproximadamente 700pb M: marcador molecular 1Kb DNA ladder (Promega); Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada)	58
Figura 17: Etapas do processo de cultura de tecidos dos explantes de mamona que passaram pelo processo de bombardeamento A) embriões retirados das sementes e submetidos ao meio com TDZ 1mg/L, no escuro, por 4 dias; B) explante após o bombardeamento, depois de uma semana no meio de cultura sem regulador de crescimento; C) explantes em meio de cultura com seleção (imazapir); D) explantes com brotações alongadas e raízes	60
Tabela 8: Resumo dos bombardeamentos mostrando o número de embriões bombardeados, plantas alongadas sob seleção e número de plantas com reação positiva para PCR	61
Figura 18: Gel de eletroforese 1% mostrando a amplificação de uma banda de aproximadamente 700pb, correspondente ao fragmento do gene <i>ahas</i> Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada); C+: controle positivo (reação de PCR com o vetor de transformação)	62
Figura 19: Gel de eletroforese 1% mostrando a amplificação de uma banda de aproximadamente 400pb, correspondente ao fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada); C+: controle positivo (reação de PCR com o vetor de transformação)	63
Tabela 9: Plantas analisadas por PCR com os primers para um fragmento do gene <i>ahas</i> (AHAS) e para um fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação (Δ RIC)	64

RESUMO

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância social e econômica. O óleo extraído de suas sementes é utilizado na produção de biodiesel e como insumo para as indústrias químicas, de cosméticos e de lubrificantes. Além do óleo extraído das sementes, sua cadeia produtiva gera subprodutos, especialmente a torta de mamona, que pode ser utilizada como adubo orgânico de boa qualidade (alta concentração de nitrogênio) ou como alimento animal (alta concentração de proteína). O principal entrave de seu uso como alimento animal é a ricina, uma proteína altamente tóxica, encontrada na semente. A ricina é uma lectina, composta por duas subunidades conhecidas como cadeias A e B. Quando ingerida a cadeia B liga-se à galactose na superfície celular, fazendo com que a proteína penetre na célula. Dentro da célula, a cadeia A, que possui atividade enzimática, inativa a subunidade 60S do ribossomo impedindo a produção de proteínas, levando a célula à morte. Os objetivos desse trabalho foram: avaliar a existência de variabilidade genética para concentração de ricina em sementes de mamona de 20 acessos do banco de germoplasma da Embrapa; estudar a distribuição e acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona na cultivar BRS Energia; e realizar a transformação genética visando o silenciamento dos genes que codificam para a ricina em sementes de mamona geneticamente modificadas. Para tanto, foram utilizadas técnicas de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) para a quantificação da ricina nos extratos protéicos totais das sementes, análises imunocitoquímicas, utilizando microscopia de luz e eletrônica para a localização da ricina nas células do endosperma da semente e transformação genética por biobalística visando o silenciamento dessa proteína na semente de mamona, utilizando a metodologia de RNA interferente. Os resultados obtidos mostraram a existência de variabilidade para a concentração de ricina nos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, sendo possível a seleção de genótipos com alto e baixo teor de ricina. As cultivares comerciais IAC Guarani, BRS Nordeste e BRS Paraguaçu apresentaram as menores concentrações de ricina, sendo, as mais indicadas para trabalhos de melhoramento visando à utilização da torta como ração animal. Dentre as cultivares comerciais, a BRS Energia apresentou o valor mais elevado na concentração dessa proteína. Durante o desenvolvimento das células do endosperma da semente de mamona da cultivar BRS Energia ocorreu um aumento no número de vesículas de reserva (vacúolos de armazenamento de proteínas e corpos lipídicos) e diminuição do volume citoplasmático celular. O acúmulo de ricina na cultivar BRS Energia aumentou com o desenvolvimento da semente, sendo que na semente madura (60DAP) essa concentração foi máxima. A ricina pode ser encontrada também nos cristalóides dos vacúolos de armazenamento de proteínas (PSV) e não só na matriz, contrariando observações bioquímicas anteriores em que os componentes protéicos foram encontrados apenas compartimentalizados dentro dos corpos protéicos. Na etapa relacionada à transformação genética da mamona, em cultura de tecidos, o regulador TDZ foi mais eficiente na indução de brotações que o BAP. A adição ao meio de cultura de IBA e AgNO_3 foi importante para o alongamento das brotações e enraizamento dos explantes. O uso de biorreatores visando o alongamento dos explantes foi eficiente por curtos períodos. É possível obter plantas geneticamente modificadas de mamona usando imazapir como agente seletivo. O sistema de transformação genética por biobalística apresentou eficiência similar a outros sistemas de transformação de mamona. Assim, no presente trabalho, além de estudar a variabilidade para a concentração de ricina em diferentes genótipos, foi possível identificar seu acúmulo durante o desenvolvimento da semente de mamona. Foram obtidas também plantas transgênicas, que deverão ser analisadas para confirmar a redução total ou parcial da ricina, bem como avaliar em seus descendentes a herança do silenciamento.

ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oilseed of great economic and social importance. The oil extracted from its seeds is used in biodiesel production and as raw material for chemicals, cosmetics and lubricants. Besides the oil extracted from the seeds, their production chain generates side-products, which can be used as organic fertilizer of good quality (high nitrogen concentration) or as animal food (with high protein content). The main obstacle to its use for animal feeding is ricin, a highly toxic protein, found in the seed. Ricin is a lectin composed of two subunits known as chains A and B. When ingested, the B chain binds to galactose on the cell surface, penetrating into the cell. Inside the cell, the A chain, which has enzymatic activity, inactivates the 60S subunit of the ribosomes preventing the production of proteins, leading to cell death. The objectives of this study was (1) to assess the existence of genetic variability for the concentration of ricin in castor bean seeds from 20 accessions of germplasm bank of Embrapa, (2) study the distribution and accumulation of ricin during seed development, and (3) perform genetic transformation aimed at silencing the genes coding for ricin in genetically modified castor bean seeds. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) was used to quantify ricin in total protein extracts of seeds, immunocytochemical analysis using light and electron microscopy for the localization of ricin in cells of the endosperm of the seed and genetic transformation by biolistic targeting the silencing of this protein in castor seeds, using the strategy of interfering RNA (RNAi). The results showed the existence of variability for the concentration of ricin in accessions of the germplasm bank of Embrapa Algodão, it is possible to select genotypes with high and low levels of ricin. The cultivars IAC Guarani, BRS Nordestina and BRS Paraguaçu had the lowest concentrations of ricin, and are quite suitable for breeding aiming to use the seed cake to feed animals. Among the commercial cultivars, BRS Energia presented the highest concentration of this protein. During the development of cells in the endosperm of castor seeds of BRS Energia exhibited an increasing number of reserve vesicles (protein storage vacuoles and lipid bodies) and decreased cytoplasmic volume. The accumulation of ricin in the BRS Energia increased with seed development, and in the mature seed (60DAP) the concentration was the maximum. Ricin can also be found in crystalloids of protein storage vacuoles (PSV) and not only in the matrix, contrary to previous biochemical observations that the protein components were found only compartmentalized within the protein bodies. Genetic transformation of castor bean was developed, with the regulator TDZ being more effective in inducing shoots than BAP. In addition, IBA and AgNO₃ were important for the elongation of shoots and rooting of explants. The use of bioreactors in order to elongate the explants was effective for short periods. It is possible to obtain genetically modified castor bean using as selective agent the imazapyr. The transformation system based on the biolistic process presented efficiency similar to other protocols.

CAPÍTULO I

*Diversidade em acessos de mamona do banco de germoplasma brasileiro quanto à
concentração de ricina nas sementes*

1) A mamona (*Ricinus communis* L.)

A mamona é uma importante oleaginosa que pertence à família *Euphorbiaceae*. Sua domesticação ocorreu há muito tempo, sendo que os primeiros relatos sobre seu uso pelo homem foram encontrados no Egito, no ano 4.000 a.C. (Savy Filho, 2005). Alguns autores acreditam que a mamona originou-se na Etiópia e veio para o Brasil com os escravos africanos; já outros autores defendem a hipótese de origem asiática, tendo sido introduzida no Brasil pelos portugueses, com a finalidade de utilizar seu óleo para a iluminação e lubrificação de eixos de carroças (Moreira *et al.*, 1996; Savy Filho, 1999; Pina *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2007). O que não há dúvidas é sobre a grande capacidade de dispersão e adaptabilidade desta espécie, que permitiu sua propagação por todo o território nacional.

A mamoneira é diplóide, com $2n = 2x = 20$ cromossomos e possui grande variabilidade para diversas características, como hábito de crescimento, porte, cor das folhas e do caule, cor e teor de óleo das sementes (Savy Filho, 2005). A planta possui o sistema reprodutivo do tipo misto, ocorrendo tanto autofecundação como cruzamento ao acaso. As taxas de alogamia são afetadas pelo seu porte e tipo de ramificação, variando de 25 a 40%. A polinização é predominantemente anemófila, ou seja, o pólen é transportado pelo vento para as flores femininas (Savy Filho, 2005).

Em geral, seu sistema radicular do tipo pivotante é vigoroso e profundo, com grande número de radículas ao longo das raízes, contribuindo para a absorção de umidade e nutrientes do solo. Quando não há impedimento para a penetração vertical, o sistema radicular pode atingir profundidades entre 1,5 e 3,0 m de profundidade (Savy Filho, 2005; Beltrão & Azevedo, 2007).

O caule apresenta nós bem definidos, com cicatrizes foliares proeminentes, grande variação na cor, presença de cera e rugosidade. Em plantas novas é brilhante, tenro e suculento e, à medida que envelhece, torna-se lenhoso (Beltrão & Azevedo, 2007).

As folhas são simples, digitolobadas, denticuladas, com largura do limbo variando entre 10 cm e 40 cm. Os pecíolos são longos, com 20 cm a 50 cm de comprimento. As principais variações nas folhas da mamoneira estão na cor, na cerosidade, no número de nervuras principais, no comprimento do pecíolo, no número de glândulas e na profundidade dos lóbulos (Beltrão & Azevedo, 2007).

A parte aérea apresenta um padrão característico de desenvolvimento, que consiste na emissão de ramos laterais logo após a emissão da inflorescência primária. A planta possui crescimento do tipo indeterminado, com vários estágios de crescimento e desenvolvimento, como: germinação, formação da estrutura vegetativa, formação da inflorescência principal ou de primeira ordem, florescimento e amadurecimento das sementes de cada inflorescência, iniciando-se pela principal. O surgimento de novas inflorescências só é paralisado pela seca ou pelo frio nas regiões onde a planta se encontra (Beltrão *et al.*, 2007).

A mamoneira é uma planta monóica, ou seja, possui órgãos sexuais masculinos e femininos na mesma planta, mas não na mesma flor. Sua inflorescência é constituída por uma ráquis, onde as flores femininas ocupam o ápice e as masculinas, a base. É uma planta protogínica, onde os pistilos das flores femininas atingem a maturação cerca de 5 a 10 dias antes da maturação do pólen nas flores masculinas. Fatores ambientais podem afetar a expressão do sexo, sendo que a deficiência hídrica e altas temperaturas induzem a formação de maior proporção de flores masculinas. Por sua vez, solos férteis proporcionam um maior número de flores femininas (Savy Filho, 2005).

O fruto consiste em uma cápsula que se abre em sutura e libera três sementes. Uma das características da mamona é a deiscência do fruto, que quando seco e maduro expulsa naturalmente as sementes. Em genótipos com frutos indeiscentes a abertura não é natural, necessitando de processamento mecânico para a extração das sementes (Savy Filho, 2005).

Sua semente é lisa e ovóide, com a face dorsal geralmente convexa e a face ventral achatada. Possui grande variabilidade para cor, forma, tamanho, peso, proporção do tegumento, presença ou ausência de carúncula, e maior ou menor aderência do tegumento ao endosperma. O tegumento é coriáceo, espesso, duro e diversamente colorido. O endosperma é abundante e oleoso; os cotilédones são grandes, largos e chatos. A semente perde a viabilidade facilmente se armazenada por longos períodos (Beltrão & Azevedo, 2007).

Diante da grande variabilidade da mamona são encontrados tipos botânicos com porte baixo ou arbóreo, ciclo anual ou semiperene, com folhas e caules verdes, vermelhos ou rosas, com a presença ou não de cera no caule, com frutos inermes ou com espinhos, deiscentes ou indeiscentes, com sementes de diversos tamanhos e colorações e diferentes teores de óleo (Savy Filho, 2005).

A mamona apresenta grande importância social e econômica. O óleo extraído de suas sementes é utilizado para diversos fins, dentre eles para a produção de biodiesel e como insumo industrial.

O biodiesel é um biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores à combustão interna e para geração de outros tipos de energia (Knothe, 2006). É um combustível biodegradável, constituído de uma mistura de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, obtidos da reação de transesterificação de qualquer triglicerídeo com um álcool de cadeia curta, como o metanol e o etanol (Beltrão & Lima, 2007). A mamona se destaca como importante matéria-prima para a produção do biodiesel, por possuir elevada concentração de óleo nas sementes, representando de 43 a 45% da constituição total (Ribeiro, 2006).

Por sua vez, como insumo industrial, parte significativa do consumo do óleo da mamona é destinada à indústria química, cosmética e de lubrificantes, na composição de tintas, vernizes, plásticos entre outros (Santos *et al.*, 2007).

A mamona é uma importante opção de renda para o pequeno agricultor, pois é um sistema agrícola que utiliza poucos insumos e necessita de baixo investimento em mecanização. É cultivada em quase todo o país, excluindo apenas alguns ecossistemas específicos, como o Pantanal, a Amazônia e locais muito frios e de baixa altitude (Santos *et al.*, 2007).

Além do óleo extraído das sementes (produto principal), a cadeia produtiva gera uma série de outros subprodutos, especialmente a torta de mamona, que pode se constituir em outra fonte de renda importante para os produtores rurais.

2) Características agronômicas da mamona

Os programas de melhoramento genético da mamoneira visam obter cultivares com características que atendam às particularidades do produtor rural, maximizando o rendimento econômico e industrial da cultura. Dentre as características agronômicas consideradas ideais, pode-se citar: porte baixo, para facilitar a colheita; alto potencial de produtividade de grãos; resistência às principais doenças (causadas por *Fusarium*, *Botrytis*, *Alternaria* e *Xanthomonas*); frutos indeiscentes (minimizando as perdas na colheita); sementes de tamanho médio, uniformes, com baixo teor de toxinas e com alto teor de óleo; tolerância à seca; precocidade, entre outros (Savy Filho, 2005).

A mamoneira é uma planta com alta adaptabilidade, desenvolvendo-se bem nas mais diversas condições edafoclimáticas. Para seu máximo potencial produtivo é necessário condições de clima quente e úmido, com chuvas regulares. O excesso de umidade pode afetar a produtividade, principalmente nos estágios finais de desenvolvimento e maturação do fruto, favorecendo a incidência de doenças e provocando a queda e perda dos frutos maduros (Beltrão *et al.*, 2007).

A quantidade de óleo em suas sementes é afetada pela temperatura. Estudos mostram que o conteúdo de óleo das sementes é proporcional à soma das horas de calor recebida pela planta durante todo seu ciclo vegetativo (Beltrão *et al.*, 2007). Entretanto, a ocorrência de temperaturas muito elevadas, superiores a 40 °C provoca substancial redução no conteúdo de óleo das sementes, diminuindo assim, a produtividade e a qualidade, além de aborto das flores (Beltrão & Severino, 2006).

A planta se desenvolve e reproduz em qualquer tipo de solo, com exceção aos de textura argilosa. A drenagem deficiente desses solos e o excesso de água afetam a produtividade, em razão de sua sensibilidade ao encharcamento (Beltrão *et al.*, 2007). Ainda, a respeito do solo, a correção da acidez e a adubação têm reflexos diretos sobre a produção de massa verde das culturas e fornecem o máximo potencial produtivo das plantas (Maria & Ramos, 2007).

As principais pragas da mamoneira são percevejos, cigarrinhas, ácaros, pulgões e lagartas. A importância de cada uma depende da região de cultivo, pois cada local favorece o crescimento de determinadas espécies de pragas (Soares & Dias, 2006).

As doenças de importância econômica da mamoneira variam de acordo com as condições climáticas da região de cultivo. Em regiões mais chuvosas e úmidas, as doenças mais importantes e que ocorrem com maior frequência são as manchas-foliares, causadas por *Alternaria ricini*, *Cercospora ricinella* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *ricini*, e o mofo-cinzento, causado por *Amphobotrys ricini*. Já em regiões mais secas é mais comum a ocorrência de doenças como a podridão-do-tronco, causada por *Macrophomina phaseolina*, e a podridão-do-caule ou podridão-dos-ramos, causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Coutinho & Suassuna, 2006).

3) Propriedades do óleo da mamona

As sementes de mamona contêm cerca de 50% de óleo. Os ácidos graxos que compõem o óleo variam de acordo com a cultivar e fatores ambientais diversos. De

forma geral, o ácido ricinoléico é o principal componente, chegando a 91% do total de óleo da semente (Tabela 1), sendo esta uma importante fonte comercial desse ácido (Freire & Severino, 2006).

Tabela 1: Faixas de variação do percentual de ácidos graxos do óleo de mamona.

Ácidos graxos	%
Ácido ricinoléico (C18:1)	84,0 – 91,0
Ácido oléico (C18:1)	3,1 – 5,9
Ácido linoléico (C18:2)	2,9 – 6,5
Ácido esteárico (C18:0)	1,4 – 2,1
Ácido palmítico (C16:0)	0,9 – 1,5

Fonte: Freire & Severino, (2006).

A estrutura química do ácido ricinoléico (12-hidroxi oleato) é composta por 18 carbonos com uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento hidroxila ligado ao carbono 12 (Figura 1). O grupo hidroxila confere ao composto um maior índice de viscosidade e estabilidade entre os óleos vegetais. Dessa forma, o óleo da mamona mantém suas características numa ampla faixa de temperatura, ao contrário de outros óleos vegetais, que perdem sua viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas. Além disso, outra característica importante do óleo da mamona é ser o único solúvel em álcool em baixas temperaturas, facilitando a produção de biodiesel (Bafor *et al.*, 1991; Savy Filho, 2005 Beltrão & Lima, 2007).

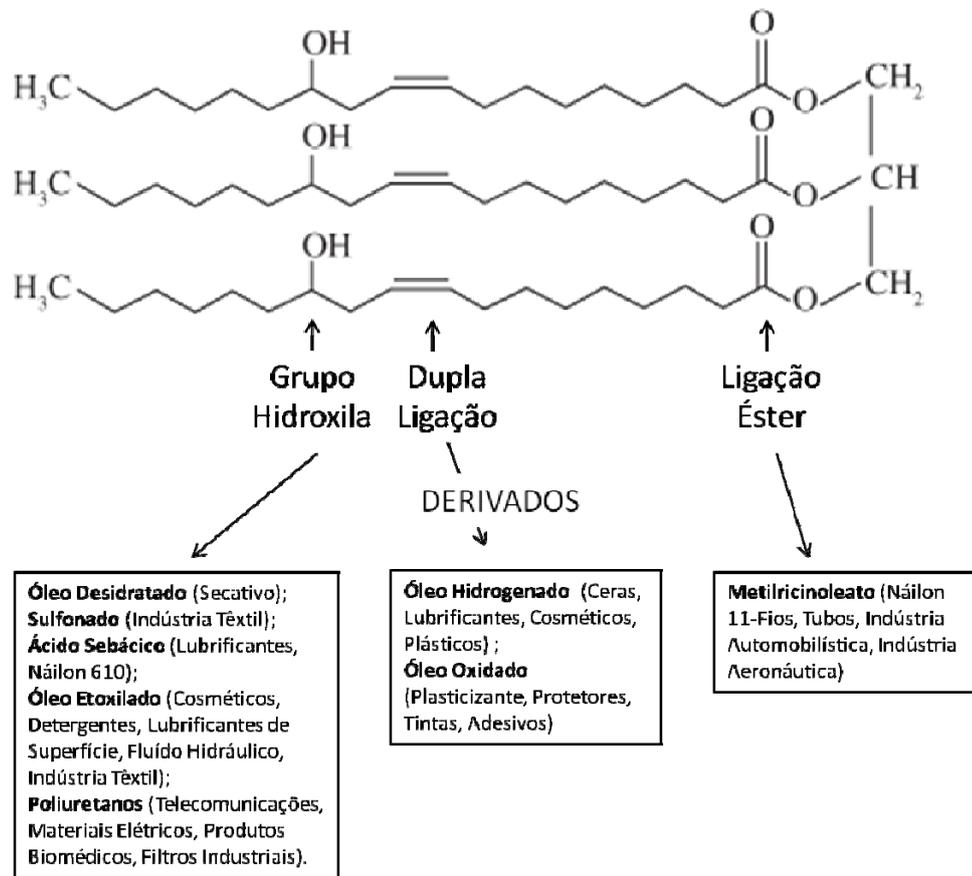


Figura 1: Estrutura molecular do triglicéride do ácido ricinoléico e sua relação com alguns de seus derivados (Adaptado de Azevedo *et al.*, 2009; Savy Filho, 2005).

Os derivados do óleo de mamona são sintetizados pela modificação em três sítios de reação da molécula: o grupo hidroxila, a dupla ligação e a ligação éster. Na Figura 1 são observados alguns exemplos de derivados obtidos pela modificação da estrutura química do ácido ricinoléico, entre eles o metilricinoleato, o óleo hidrogenado, o óleo oxidado, o óleo desidratado, o sulfonado, o ácido sebáico, o óleo etoxilado e os poliuretanos (Savy Filho, 2005).

Assim, o ácido ricinoléico é utilizado na composição de tintas, vernizes, lubrificantes, plásticos, cosméticos, ceras, detergentes, material elétrico, produtos biomédicos, entre outros (Bafor *et al.*, 1991; Godoy *et al.*, 2009), sendo o responsável pelas características físico-químicas do óleo da mamona.

4) Torta de mamona

A torta de mamona pode ser definida como sendo o resíduo da extração do óleo das sementes e consiste no mais tradicional e importante subproduto desta cadeia

produtiva. A quantidade de torta produzida por tonelada de óleo depende do teor de óleo da semente e da eficiência do processo de extração (Tabela 2) (Freire & Severino, 2006).

Tabela 2: Quantidade de torta de mamona produzida de acordo com a eficiência do processo de extração do óleo.

Eficiência de extração	Teor de óleo extraído (%)	Quantidade de torta por tonelada de óleo	Quantidade de óleo por tonelada de torta
Alta	48	1,08	0,93
Média	42	1,38	0,72
Baixa	36	1,78	0,56

Fonte: Freire & Severino, (2006).

Em todo o mundo, o uso predominante da torta de mamona tem sido como adubo orgânico de boa qualidade, podendo ser usada também para alimentação animal. A utilização da torta de mamona como adubo orgânico é uma fonte de renda adicional ao produtor rural, pois o composto é ricamente nitrogenado e eficiente na recuperação de terras esgotadas (Chierice & Claro Neto, 2007). Os principais nutrientes fornecidos pela torta utilizada como adubo orgânico são: nitrogênio, cálcio, fósforo e potássio (Tabela 3) (Freire & Severino, 2006).

Tabela 3: Composição da torta de mamona como adubo orgânico.

Componentes	%
Nitrogênio	4,5
Cálcio	2,5
Fósforo	1,6
Potássio	1,3

Fonte: Freire & Severino, (2006).

O uso da torta de mamona para a alimentação animal ainda é restrito, devido às substâncias alergênicas e tóxicas presentes em sua composição. Entretanto, ela possui um alto teor de proteínas (Tabela 4) e pode ser atraente para o animal, após ser moído e obtido o farelo (Severino, 2005; Chierice & Claro Neto, 2007).

Tabela 4: Composição química da torta de mamona, em percentual.

Componentes	%
Proteínas	43,0
Fibra	35,0
Umidade	10,0
Cinzas	8,0
Óleo	2,0
Fósforo	1,0
Cálcio	0,5
Magnésio	0,5

Fonte: Chierice & Claro Neto, (2007).

O processamento da torta de mamona visando à eliminação das toxinas para uso na ração animal consiste em técnicas como fervura, autoclavagem ou mistura com carbonato de cálcio. Esses procedimentos não são viáveis a nível industrial por consumir muita energia, além de não dispor de métodos de controle de qualidade para confirmar a segurança do produto. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas baratas e confiáveis de destoxicação (Severino & Freire, 2006).

As toxinas presentes na torta apresentam diversos níveis de toxidez. A ricina, composto tóxico, é considerada uma das proteínas mais tóxicas conhecidas pelo homem. Já a ricinina, CB-1 e RCA aglutinina, são compostos alergênicos, ou seja, com nível de toxidez menor (Chierice & Claro Neto, 2007).

A ricinina é um alcalóide tóxico conhecido como 1,2-diidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila ($C_8H_8N_2O_2$), encontrado na torta em menor quantidade, apresentando uma toxidez menor em relação à ricina (Chierice & Claro Neto, 2007). A ricinina pode provocar reações cutâneas e irritações no sistema respiratório de animais, mas como está presente em quantidade muito pequena, não constitui problema de toxicidade, considerando que a torta de mamona seria usada em baixa quantidade na formulação de alimentos para o gado (Pina *et al.*, 2005).

Já o CB-1 é um composto protéico-sacarídico, não-tóxico, porém com ação altamente alergênica (Chierice & Claro Neto, 2007).

A ricina é um componente protéico de toxidez elevada, estando presente numa quantidade de 6% a 9% na baga (Chierice & Claro Neto, 2007), o que torna o principal entrave quanto ao uso da torta de mamona na composição de ração animal.

Por sua vez, a RCA aglutinina (aglutinina de *R. communis*) é uma proteína tetramérica constituída de dois dímeros tipo ricina, ligados de forma não-covalente. A RCA é menos tóxica que a ricina e causa aglutinação de hemácias em mamíferos (Roberts *et al.*, 1992; Lord *et al.*, 1994).

Tanto o gene da ricina quanto da RCA codificam uma proteína precursora contendo um sinal N-terminal, uma cadeia A, um peptídeo de ligação com 12 aminoácidos e uma cadeia B (Yoshitake *et al.*, 1978; Funatsu *et al.*, 1979; Halling *et al.*, 1985; Lamb *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1985; Tregear & Roberts, 1992). A cadeia A da ricina e da RCA difere em apenas 18 aminoácidos (de um total de 267), enquanto a cadeia B dessas proteínas difere em 41 aminoácidos (de um total de 262). Análises de *Northern* e RT-PCR mostraram que tanto o gene da ricina quanto da RCA tem expressão detectável apenas nas sementes (entre 26 e 54 dias após a germinação), não tendo sido observada expressão em folhas ou raízes (Tregear & Roberts, 1992; Chen *et al.*, 2005).

5) Ricina

- **Características estruturais**

A ricina se classifica como uma lectina, ou seja, uma proteína que tem um sítio receptor específico para um açúcar ou uma unidade de oligossacarídeo. Pertence à família das lectinas A-B, ou seja, é composta por duas subunidades conhecidas como cadeias A e B, sendo a primeira delas com atividade enzimática e a outra com um sítio de ligação específico ao açúcar galactose (Figura 2). O gene da ricina codifica um precursor de 64 kDa, sendo formado por um peptídeo sinal (24 a 35 aminoácidos) na extremidade, a cadeia A (30kDa), um peptídeo de ligação (12 aminoácidos) e a cadeia B (34kDa) (Halling *et al.*, 1985).

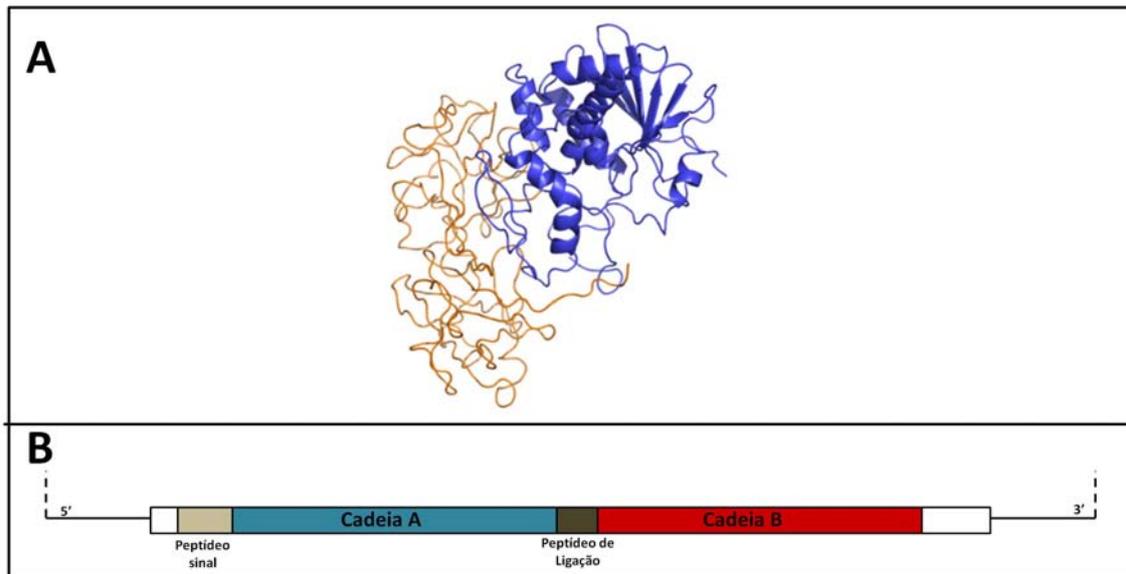


Figura 2: Proteína ricina; **A:** estrutura tridimensional da ricina, sendo em azul a cadeia A e, em vermelho, a cadeia B; **B:** estrutura da ricina mostrando na seqüência: o peptídeo sinal, a cadeia A, o peptídeo de ligação e a cadeia B (Adaptado de Halling *et al.*, 1985).

O gene da ricina não contém íntrons e há evidências que ele seja membro de uma família multigênica. Estima-se que seis genes que codificam a ricina estejam presentes no genoma da mamona (Halling *et al.*, 1985) e isso dificulta o desenvolvimento de variedades com baixo teor de ricina, que é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento, uma vez que é muito difícil mutagenizar vários desses genes, simultaneamente, sem causar grandes alterações fenotípicas indesejáveis.

A ricina é sintetizada como preproricina (64,1 kDa) no desenvolvimento de sementes de mamona e inserida no lúmen do retículo endoplasmático (RE), quando o sinal peptídico é removido formando a proricina (61,6 kDa) (Figura 4). No RE é formada uma ligação dissulfeto intramolecular entre as subunidades A e B, juntando o heterodímero maduro para posterior remoção do propeptídeo por uma protease vacuolar, gerando o dímero maduro de 58,8 kDa (Maltman *et al.*, 2007). A ricina funciona como proteína de armazenamento das sementes, fornecendo nutrientes durante a germinação e também pode agir como proteína de defesa (Youle & Huang, 1978; Roberts *et al.*, 1992; Shewry *et al.*, 1995).

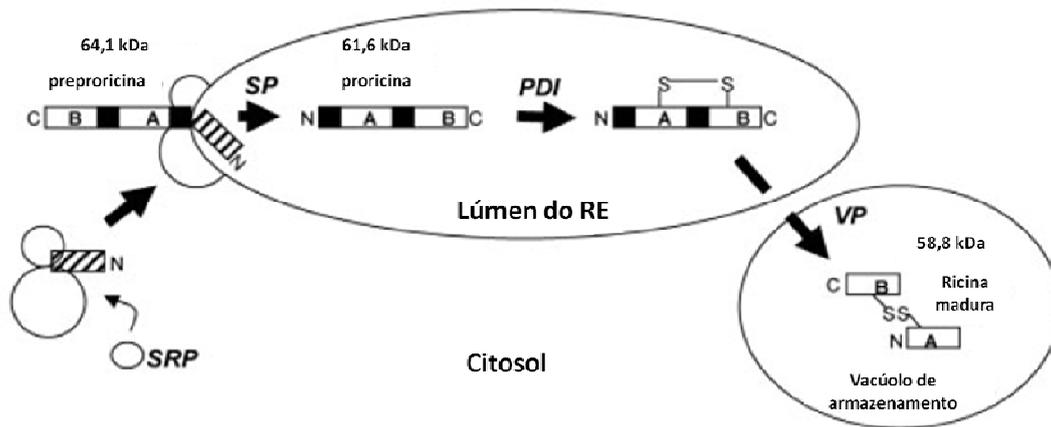


Figura 3: Tráfego intracelular da ricina nas células do endosperma da mamona. A partícula de reconhecimento de sinal (SRP) se liga ao peptídeo sinal da preproricina permitindo a inserção no lúmen do retículo endoplasmático (RE). Ocorre a remoção do sinal pela peptidase sinal (SP), originando a proricina e formação da ligação dissulfeto intramolecular entre as subunidades A e B pela PDI catalase. Em seguida, a protease vacuolar (VP) remove o propeptídeo formando a ricina madura (Adaptado de Maltman *et al.*, 2007).

- **Modo de ação e toxicidade**

A ricina penetra na célula e impede a produção de proteínas levando a célula à morte. Isso acontece porque a cadeia B desta proteína liga-se à galactose na superfície celular, fazendo com que esta penetre na célula e seja transportada de uma célula a outra (Sphyris *et al.*, 1995). Uma vez no interior da célula, a ação catalítica da cadeia A inativa enzimaticamente a subunidade 60S do ribossomo, pela depuração de um resíduo específico de adenina no RNA 28S, inativando a síntese protéica em eucariotos (Figura 5). Essa inativação é tão eficiente que uma única molécula desta proteína é suficiente para matar uma célula (Endo *et al.*, 1987; Audi *et al.*, 2005).

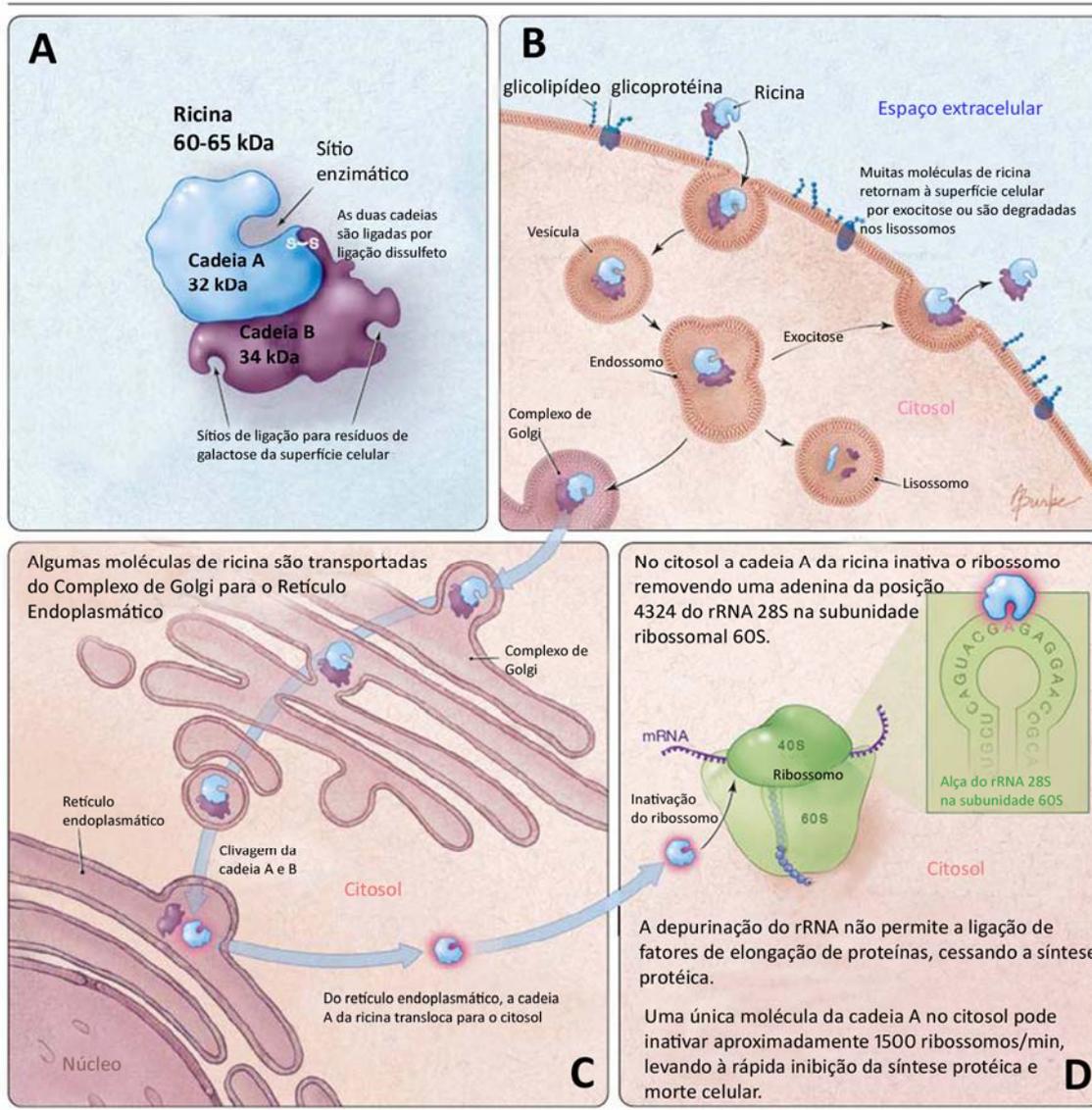


Figura 4: Mecanismo de toxicidade da ricina. **A)** Proteína ricina mostrando a cadeia A, com o sítio enzimático e a cadeia B, com os sítios para ligação para a galactose da superfície celular, ambas ligadas por uma ligação dissulfeto; **B)** A cadeia B liga-se à galactose na superfície celular e a ricina penetra na célula. Ela é transportada em vesículas para o Complexo de Golgi, ou pode retornar a superfície celular por exocitose ou ser degradada em lisossomos. **C)** Do Complexo de Golgi, algumas moléculas são transportadas para o Retículo Endoplasmático onde ocorre a clivagem das cadeias A e B e apenas a cadeia A se encaminha para o citosol da célula. **D)** A cadeia A inativa os ribossomos pela remoção da adenina no rRNA 28S, na subunidade ribossomal 60S inativando a síntese protéica em eucariotos (Adaptado de Audi *et al.*, 2005).

De acordo com Olsnes *et al.* (1975) apenas uma molécula da cadeia A da ricina é capaz de inativar irreversivelmente 2.000 ribossomos/min. Além disso, Eiklid *et al.* (1980) concluíram que a penetração de uma única molécula de ricina no citosol é o

suficiente para matar uma célula de mamífero. A dose letal de ricina estimada para humanos é de 1 - 10µg de ricina/kg corporal (Audi *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2005).

A maioria dos sintomas da intoxicação em animais pela ricina depende da exposição e dose recebida. Os sintomas iniciais causados pela inalação dessa proteína podem ocorrer dentro de oito horas de exposição; já quando ingeridas, ocorrem em menos de seis horas. Os sintomas da intoxicação pela ricina em animais são febre, náuseas, insuficiência respiratória, dentre outros, podendo levar a morte (Department of Health and Human Services of the USA, 2004).

- **Aplicações na medicina**

A ricina tem sido muito estudada do ponto de vista biofísico, bioquímico e toxicológico. Vários estudos foram realizados envolvendo mecanismos moleculares no tráfico intracelular e seu potencial para uso terapêutico contra o câncer, como as imunotoxinas (Sandvig & van Deurs, 2000; Audi *et al.*, 2005).

A imunotoxina é uma macromolécula que consiste na ligação entre um anticorpo monoclonal e uma toxina protéica. O anticorpo transportando a toxina se liga a um antígeno na superfície da célula alvo, permitindo sua entrada e bloqueando o processo metabólico essencial da célula (Wawrzynczak, 1991).

A combinação de três propriedades distingue imunotoxinas de outras formas de terapia com anticorpos direcionados. Dentre as propriedades, pode-se citar a sua potente ação tóxica; elas não são prejudiciais para as células não-malignas, a menos que se liguem, podendo inadvertidamente ser internalizadas de forma eficiente; e os mecanismos pelos quais imunotoxinas intoxicam células são bastante distintos daqueles explorados pelos quimioterápicos ou radioterapia convencional (Wawrzynczak, 1991).

A utilização da ricina, ligada quimicamente a anticorpos específicos, funciona como moléculas imunotóxicas, já que o anticorpo reconhece a célula alvo e a ricina, dentro da célula, inibe sua síntese protéica, inativando os ribossomos da célula e levando-a a morte (Spitler *et al.*, 1987; Amlot *et al.*, 1993; Pastan *et al.*, 2006).

Apesar de vários estudos com aplicabilidade na área médica, ainda há limitada informação sobre a diversidade genética para a concentração de ricina e o acúmulo dessa proteína nas sementes de mamona. O conhecimento desses processos poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias para o estudo dessa proteína.

OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar a existência de variabilidade genética na concentração de ricina em sementes de mamona de acessos do banco de germoplasma da Embrapa. Essa informação é importante para direcionar o desenvolvimento de estratégias em futuros programas de melhoramento e auxiliar na seleção de cultivares comerciais. Além disso, a determinação dos teores de ricina nas sementes das variedades/linhagens poderá direcionar os cruzamentos entre linhagens geneticamente modificadas para o silenciamento do gene codificante para a ricina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a variabilidade da concentração de ricina nas cultivares comerciais brasileiras e nos acessos disponíveis do banco de germoplasma da Embrapa Algodão visando auxiliar nos programas de melhoramento genético.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Foram analisados vinte acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) do banco de germoplasma da Embrapa Algodão em Campina Grande, PB: BRA 3000, BRA 10723B, BRA 10863B, BRA 10391B, BRA 2551, BRA 10341A, BRA 4987, BRA5916, BRA 6548, BRA 3271, BRA 5908, BRA 3361, BRA 3182, BRA 5894, IAC 2028, IAC 80, IAC Guarani, BRS Energia, BRS Paraguaçu e BRS Nordeste (Figura 7).

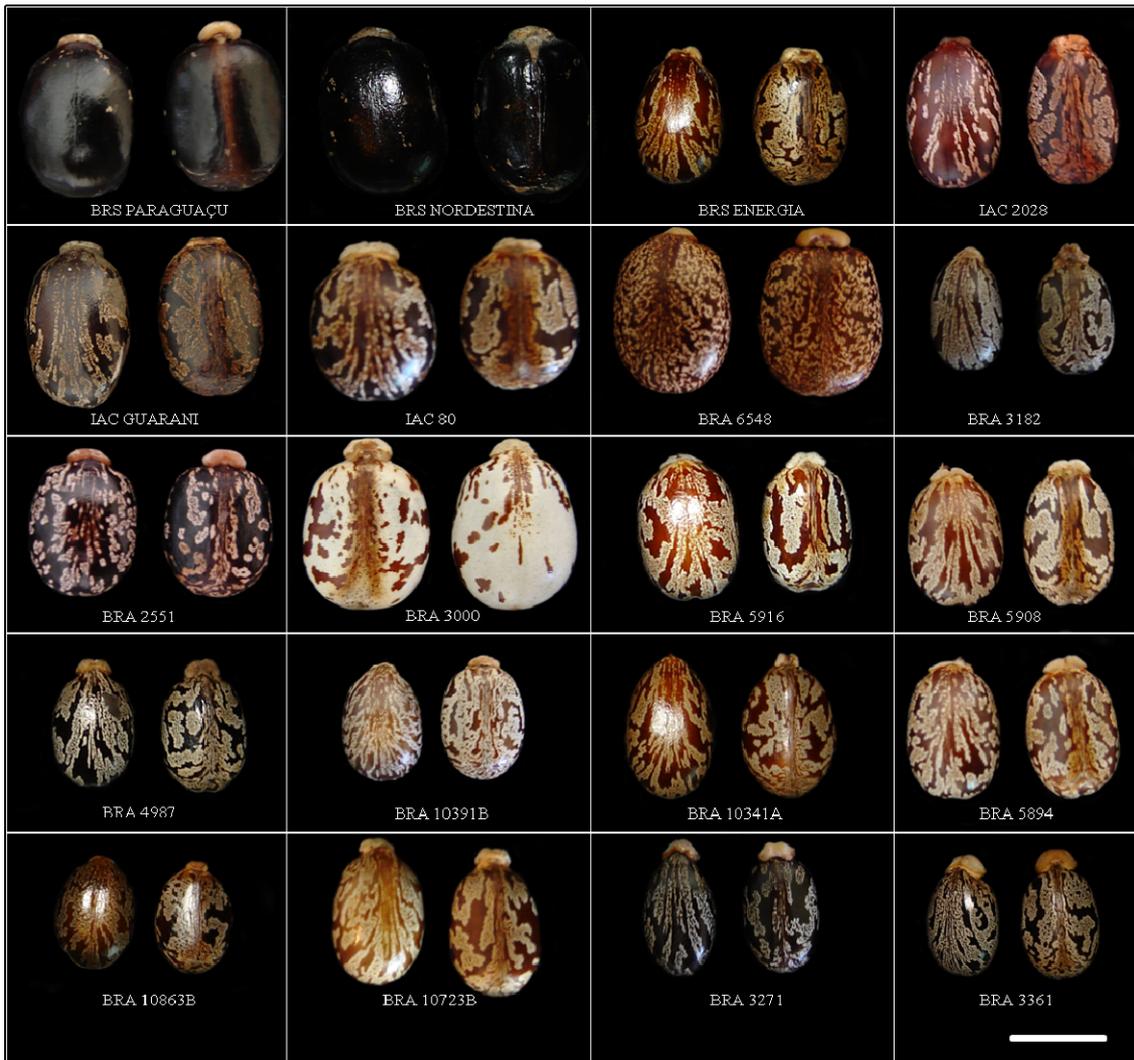


Figura 5: Padrão fenotípico das sementes de mamona dos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. Barra = 15,9mm.

Os genótipos foram avaliados em um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições biológicas, sendo cada amostra constituída de duas sementes, de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = m + G_i + e_{ij};$$

onde:

Y_{ij} = observação da concentração de ricina avaliada na j-ésima repetição, no i-ésimo genótipo;

m = média geral;

G_i = efeito do i-ésimo genótipo considerado aleatório;

e_{ij} = efeito do erro experimental associado à observação de ordem ij, considerado aleatório.

Na Tabela 5, a seguir, é apresentado o esquema da análise de variância, com as respectivas esperanças de quadrados médios, sendo as fontes de variação consideradas aleatórias.

Tabela 5 – Esquema da análise de variância com as respectivas fontes de variação (FV), graus de liberdade (GL), quadrados médios (QM), estatística F e esperanças de quadrados médios [E(QM)].

FV	GL ^{1/}	QM	F	E(QM)
GENÓTIPOS	g-1	QMG	QMG/QMR	$\sigma^2 + r\sigma_g^2$
RESÍDUO	g(r-1)	QMR		σ^2

^{1/}g = número de genótipos avaliados; r = número de repetições.

As médias dos genótipos foram agrupadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade.

Extração de proteínas das sementes de mamona

Para cada amostra, foram utilizadas duas sementes sem o tegumento. As sementes foram maceradas em nitrogênio líquido e pesadas. Em seguida, foram adicionados três vezes o peso em volume de tampão de extração de proteína (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 20 mM, PMSF 2 mM e DTT 10 mM, pH 7.0). As amostras foram agitadas moderadamente por 30 min à temperatura de 4 °C e, em seguida, centrifugadas por 40 min, a uma velocidade de 12.000 rpm, mantendo a temperatura constante de 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o extrato protéico armazenado à temperatura de -80 °C.

Para a quantificação do extrato protéico, foi estabelecida uma curva-padrão baseada no método desenvolvido por Bradford (1976). Em uma placa de ELISA, foram adicionados 159 µl de água milliQ, 40 µl de Biorad Protein Assay (Bio-Rad Dye) e 1 µl do extrato protéico. Foram realizadas três repetições experimentais para cada amostra, além do controle negativo (sem proteína). A leitura no espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad) foi realizada no comprimento de onda de 595 nm. Os valores de absorbância foram aplicados na equação da curva-padrão ($Y = 0,0413X - 10,398$; $R^2 = 0,989$) e obtidas as concentrações das proteínas em µg de proteína por µl de extrato protéico.

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

De cada acesso foram realizadas cinco repetições biológicas, com duas sementes cada. Além disso, foi feito o controle negativo (sem extrato protéico) e usadas três repetições experimentais para cada amostra. Em uma placa de ELISA foram adicionadas 3 µg de proteína total em cada poço, diluídas em 50 µl de PBS 1X (Na₂HPO₄ 0,58 M, NaH₂PO₄.H₂O 0,17 M e NaCl 0,68 M). Em seguida, a placa foi lacrada e permaneceu por 4 h à 37 °C. Após esse período, foram realizadas três lavagens com PBS 1X por 5 min cada e adicionados em cada poço da placa 200 µl de solução de bloqueio (PBS 1X, Tween 20 - 0,05% e leite em pó 2%). A placa foi lacrada novamente e colocada a 4°C por 14-16 h. Três novas lavagens foram realizadas com solução de bloqueio por cinco min cada. Foi adicionado o anticorpo primário para a ricina, Ricin A (*goat*, Rcg-20 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na concentração de 1 : 2.000, por 2 h, a 37 °C. Sete lavagens foram realizadas com a solução de bloqueio, por 5 min cada. O anticorpo secundário *rabbit* anti-*goat* conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) foi adicionado na concentração de 1 : 3.000, por 2 h, a 37 °C. Após esse processo, foram realizadas cinco lavagens, de 5 min cada, com PBS 1X. Depois da retirada total do líquido residual, foi adicionado o substrato para a reação com a fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase Substrate Kit – Bio-Rad). As leituras foram realizadas no espectrofotômetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad) com comprimento de onda de 405 nm, após 60 min.

Curva-padrão da concentração de ricina

Simultaneamente à ELISA dos extratos protéicos dos acessos do banco de germoplasma, foram realizados os mesmos procedimentos para a construção de uma curva-padrão que permitiu a quantificação da ricina dos acessos. Para isso, foi utilizada a cadeia A da ricina purificada (*Ricin A chain from Ricinus communis* - Sigma) nas concentrações de 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng e 500 ng dessa proteína. Com a construção da curva-padrão ($Y = -0,006x^2 + 4,7977x - 1,6342$; $R^2 = 0,9924$) nas mesmas condições das análises para os acessos, permitiu a quantificação em ng de ricina por µg de proteína total.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um ensaio imunoenzimático foi realizado para comparar o conteúdo de ricina em sementes maduras de vinte cultivares de mamona, sendo seis destas cultivares comerciais brasileiras e quatorze acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. Os resultados da análise de variância mostraram que os genótipos apresentaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade, para a concentração de ricina nas sementes (Tabela 6).

Tabela 6: Análise de variância com as fontes de variação (FV), seus respectivos graus de liberdade (GL), quadrado médio (QM) e estatística F para a concentração de ricina (ng/μg de proteína total) avaliadas em 20 genótipos pertencentes ao banco de germoplasma de mamona da Embrapa Algodão, num delineamento inteiramente ao acaso.

FV	GL	QM
Genótipos	19	331,4788 *
Resíduo	80	41,64681
Média		15,1
CV(%)		42,73

* Significativo, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade

O coeficiente de variação (CV) foi elevado (42,73%) e, mesmo assim, a análise mostrou existência de variabilidade entre genótipos. Este resultado pode sugerir a hipótese de possível existência de variabilidade genética para concentração de ricina dentro do genótipo, já que a mamona possui cruzamento ao acaso e que, para realização desta análise, cada repetição biológica foi representada por duas sementes. Assim, um CV elevado, demonstraria existência de diferenças entre plantas dentro de um mesmo genótipo, enfatizando a variabilidade dentro do genótipo. O alto coeficiente de variação encontrado nas análises de variância foi observado em outros trabalhos (Lowery, 2007). Ainda, é estimado que seis genes distribuídos no genoma da mamona são responsáveis pela produção de ricina (Halling *et al.*, 1985). Assim, por se tratar de uma característica quantitativa é esperada uma maior influência do ambiente sobre esta característica o que normalmente acarreta um maior valor do CV.

As quantificações do teor de ricina em cultivares e acessos do banco de germoplasma visam à caracterização desses acessos para melhor utilização nos programas de melhoramento genético. Pelo teste de médias de Scott & Knott foi encontrado quatro grupos distintos (Tabela 7). O primeiro grupo apresentou as maiores concentrações de ricina, formado pelos genótipos BRA 3271, BRA 5916 e BRA 4987, com concentração média de 29,44 ng de ricina/ μ g de proteína total. No segundo grupo, formado pelos genótipos BRA 10341A, BRA 10391B e BRA 3182, foi observada uma média de 22,02 ng de ricina/ μ g de proteína total. O terceiro grupo, com o maior número de genótipos (BRA 10723B, BRS Energia, BRA 5908, BRA 10863B, BRA 5894, BRA 3361, BRA 2551, IAC 80 e IAC 2028) apresentou uma média de 12,95 ng de ricina/ μ g de proteína total. O grupo inclui três cultivares comerciais, sendo uma desenvolvida pela Embrapa Algodão e duas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Finalmente, no grupo com níveis mais baixos de ricina, cuja média foi 6,23 ng/ μ g, foi encontrado as cultivares comerciais IAC Guarani, BRA3000, BRA 6548, BRS Nordestina e BRS Paraguaçu.

Tabela 7: Concentração de ricina (ng de ricina/ μ g de proteína total) em variedades nacionais e genótipos de mamona do Banco de Germoplasma da Embrapa Algodão.

Genótipo	Ricina ^{A/}
BRA 3271	32,18 \pm 11,21 a
BRA 5916	29,01 \pm 11,80 a
BRA 4987	27,14 \pm 5,58 a
BRA 10341A	24,65 \pm 6,47 b
BRA 10391B	21,27 \pm 8,61 b
BRA 3182	20,14 \pm 11,71 b
BRA 10723B	15,09 \pm 6,39 c
BRS Energia	14,61 \pm 5,65 c
BRA 5908	13,81 \pm 5,84 c
BRA 10863B	13,66 \pm 5,69 c
BRA 5894	13,38 \pm 6,52 c
BRA 3361	13,36 \pm 3,60 c
BRA 2551	12,19 \pm 8,52 c
IAC 80	10,23 \pm 1,23 c
IAC 2028	10,19 \pm 1,16 c
IAC Guarani	8,80 \pm 1,91 d
BRA3000	7,11 \pm 1,76 d
BRA 6548	6,40 \pm 2,25 d
BRS Nordestina	5,33 \pm 0,82 d
BRS Paraguauçu	3,53 \pm 0,95 d

^{A/}Médias (\pm desvio padrão) seguidas de uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Scott & Knott, ao nível de 5% de probabilidade

O acesso BRA 3271 apresentou a maior concentração de ricina nas sementes (32,18 ng de ricina/ μ g de proteína total), com índice nove vezes maior do que a BRS Paraguauçu, de menor valor (3,53 ng de ricina/ μ g de proteína total). Diante da grande variabilidade para a concentração da ricina nos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, grandes interesses estão em: 1) cultivares com baixos níveis de ricina, visando o aproveitamento do resíduo da extração do óleo das sementes na alimentação animal (alta concentração de proteínas) e adubo orgânico (rico em nitrogênio) (Severino, 2005; Chierice & Claro Neto, 2007); e 2) cultivares com alta concentração de ricina, a fim de estudar o seu potencial para uso na medicina (Sandvig & van Deurs, 2000; Audi *et al.*, 2005).

Alguns estudos foram realizados visando à quantificação do teor de ricina em outros genótipos. Pinkerton *et al.* (1999), avaliaram sementes da cultivar Hale, sendo encontrado valor médio de 12,2 mg de ricina e RCA (*R. communis* aglutinina) / g de

semente. Sementes dos acessos PI 257654 e PI 258368 apresentaram a média de 1,5 e 2,9 mg de ricina e RCA / g de semente, respectivamente (Pinkerton *et al.*, 1999). Em algumas populações de mamona com polinização aberta foram observados conteúdos de ricina e RCA reduzidos, variando de 0,10 a 5,60 mg de ricina/g de semente, dando a média de 1,86 mg / g (Auld *et al.*, 2003). Um trabalho realizado na coleção de germoplasma de mamona dos Estados Unidos revelou a concentração de ricina + RCA variando de 1,9 a 16 mg de ricina / g de semente, ou seja, o genótipo com a maior concentração da proteína é 8,4 vezes maior que o genótipo com a menor concentração. Dessa forma, a grande variabilidade permite a seleção de acessos de acordo com o interesse do melhorista (Pinkerton *et al.*, 1999).

CONCLUSÕES

- Existe variabilidade quanto à concentração de ricina nos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, sendo possível a seleção de genótipos com alto e baixo teor de ricina;
- Os acessos podem ser separados em quatro grupos distintos quanto à concentração dessa proteína;
- Os acessos do grupo que apresentou maior concentração de ricina são os mais indicados para trabalhos de melhoramento com fins medicinais;
- A cultivar BRS Paraguaçu apresentou o menor valor absoluto para concentração de ricina, porém não diferindo estatisticamente dos acessos IAC Guarani, BRA 3000, BRA 6548 e BRS Nordestina;
- As cultivares comerciais IAC Guarani, BRS Nordestina e BRS Paraguaçu pertencem ao grupo de genótipos com menores concentrações de ricina, sendo, juntamente com as demais cultivares deste grupo, as mais indicadas para trabalhos de melhoramento visando à utilização da torta como ração animal.

CAPÍTULO II

*Estudo do acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona
(Ricinus communis L.)*

1) Desenvolvimento da semente de mamona e imunolocalização da ricina

Para a maioria das espécies de plantas dicotiledôneas, o desenvolvimento da semente pode ser dividido em três fases. A primeira delas corresponde a um crescimento inicial com extensivas divisões mitóticas e aumento rápido de peso fresco, levando a histodiferenciação e morfogênese. A segunda fase é caracterizada pela maturação, em que a semente aumenta de tamanho devido, principalmente, à expansão das células e à deposição de reservas. Durante essa fase os vacúolos diminuem de tamanho à medida que os compostos de armazenamento se acumulam e o peso seco aumenta. Na última fase de desenvolvimento é observado um rápido declínio no conteúdo de água, resultando na redução gradual do metabolismo da semente até um estado de metabolismo mínimo ou estado quiescente (Castro *et al.*, 2004).

A disponibilidade de informações sobre alterações morfológicas ocorridas com a semente de mamona durante seu desenvolvimento é altamente vantajosa em estudos fisiológicos e bioquímicos. Greenwood & Beewley (1982), realizaram um dos primeiros trabalhos onde estudaram a morfologia do desenvolvimento da mamona da cultivar *Hale*, durante um período de 60 dias. Esses estudos permitiram a classificação do desenvolvimento da semente de mamona em dez estágios, de aproximadamente igual duração. Os estágios I, II e III (respectivamente 5, 10 e 15 dias após a polinização - DAP) foram considerados períodos de rápido ganho de peso fresco, com considerável aumento na dimensão da semente. Nos estágios IV a VIII (respectivamente 20, 25, 30, 35 e 40 DAP) foi observado ganho de peso seco e os estágios IX e X (respectivamente 50 e 60 DAP), foram considerados como os períodos de maturação da semente.

No desenvolvimento da semente de mamona há o acúmulo de proteínas de reserva e ácidos graxos, sendo a ricina, a proteína do endosperma com função de reserva e defesa contra predadores. Nos vacúolos de armazenamento das células do endosperma da semente são encontradas, além das lectinas 7S (ricina e sua proteína homóloga *Ricinus communis* aglutinina- RCA - que possuem alta similaridade), as albuminas 2S e globulinas (Roberts & Lord, 1981; Jolliffe *et al.*, 2004).

A expressão do gene da ricina foi identificada durante o desenvolvimento da semente, analisando seu RNA mensageiro (mRNA). Realizando técnicas de RT-PCR e *Northern blot* foi possível observar níveis abundantes de mRNA desta proteína durante o desenvolvimento do endosperma da semente. Nos estágios iniciais, 12 e 19 DAP, não foi constatada a expressão da ricina, mas sua expressão foi observada em sementes com

26 DAP e continuou crescendo até 54 DAP. A partir de 61 DAP, mRNAs não foram detectados nas sementes (Tregear & Roberts, 1992; Chen *et al.*, 2005).

A imunolocalização é uma ferramenta importante no estudo de proteínas em diversas espécies vegetais. Esta técnica permite identificar e localizar peptídeos ou proteínas utilizando anticorpos específicos. Para isso, esses anticorpos são conjugados com moléculas que possibilitam sua visualização, como por exemplo, o ouro coloidal. De forma semelhante, a detecção da ricina por meio de anticorpos monoclonais anti-cadeia A e anti-cadeia B, conjugados com partículas de ouro coloidal, foi observada em estudos que utilizaram outras técnicas, como a imunocromatografia (Shyu *et al.*, 2002).

Em mamona, poucos trabalhos foram realizados visando à localização da ricina na semente. Jolliffe *et al.* (2004) estudaram o transporte da pro-ricina (precursor da ricina) nos vacúolos de armazenamento de proteínas (PSV) durante o desenvolvimento do endosperma da semente de mamona. A utilização da imunomarcção e da microscopia eletrônica permitiu observar que a ricina é transportada pelo complexo de Golgi, em vacúolos/vesículas de armazenamento.

OBJETIVO GERAL

O objetivo foi avaliar a distribuição e acúmulo de ricina nas células do endosperma durante o desenvolvimento da semente de mamona por meio de análises imunocitoquímicas, utilizando microscopia de luz e eletrônica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a concentração de ricina nas cultivares comerciais de mamona BRS Energia, BRS Paraguaçu, BRS Pioneira e BRS Nordestina;
- Estudar o acúmulo de ricina nas células do endosperma durante o desenvolvimento da semente de mamona;
- Estudar a formação da estrutura celular durante o desenvolvimento da semente de mamona.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais vegetais e estágios de desenvolvimento

Foram utilizadas sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) de quatro cultivares comerciais, BRS Energia, BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Pioneira, desenvolvidas pela Embrapa Algodão em Campina Grande, PB. Para o estudo do acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente foi utilizada a cultivar que apresentou a maior concentração de ricina nas sementes, BRS Energia, cultivada em casa de vegetação na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Com o desenvolvimento da inflorescência, as flores receptivas foram marcadas e polinizadas. Foram coletados e fotografados frutos e sementes com idades de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias após a polinização (DAP). Na Figura 6 podem-se observar as fases de desenvolvimento do fruto e da semente nos diferentes estágios em que foram coletados. A fase 0 DAP representa a flor após sua abertura, ou seja, com os estigmas receptivos. Nessa fase foi realizada a polinização artificial para garantir a fecundação do óvulo. Com 10 a 30 DAP pôde-se observar o desenvolvimento do fruto e semente, sendo nessa fase, imperceptível o tegumento a olho nu. Nas fases de 40 a 60 DAP foram observados o desenvolvimento final e maturação do fruto e da semente. Nessas fases, o tegumento já é perceptível e foi retirado para melhor visualização do endosperma.

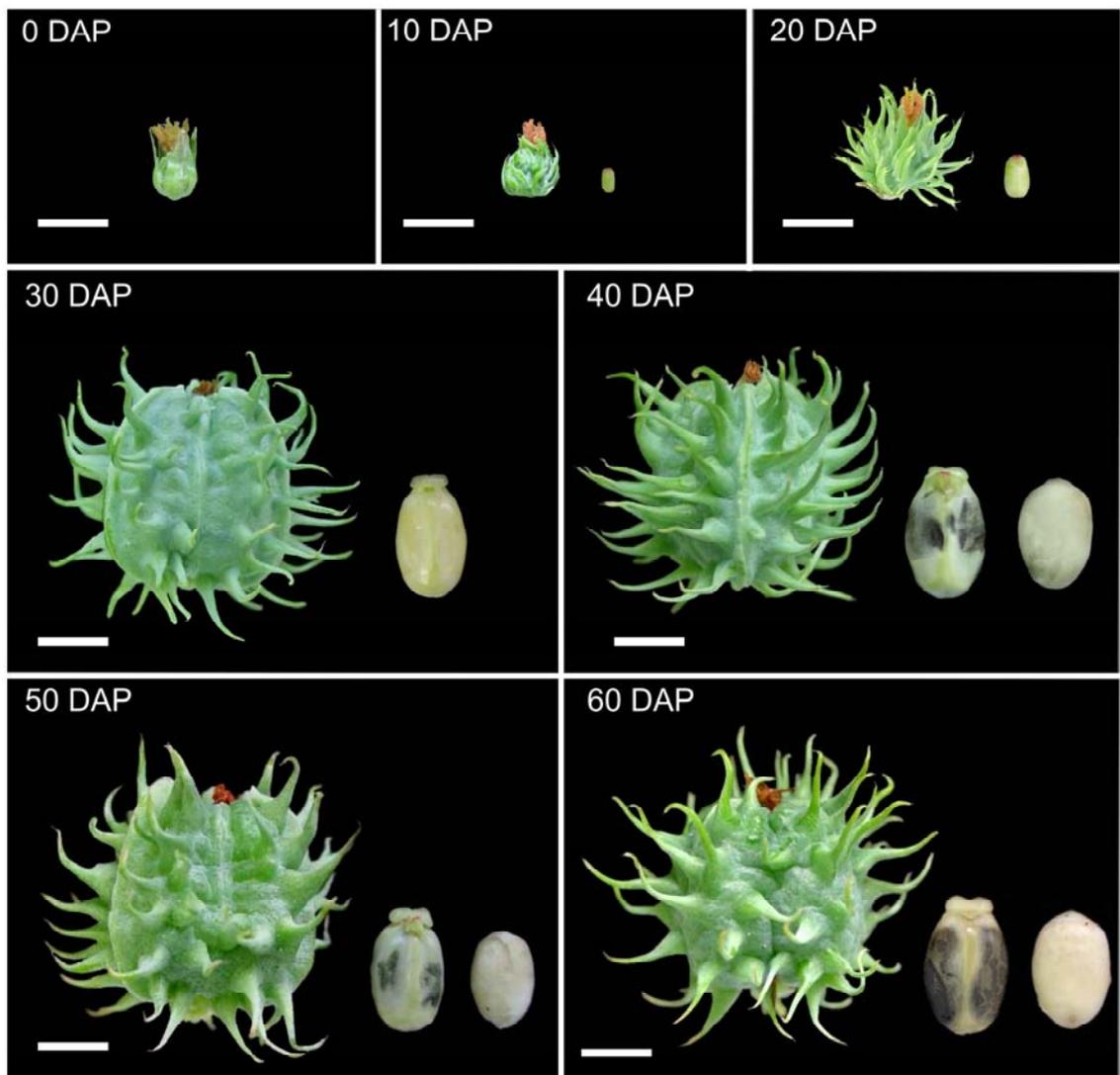


Figura 6: Alterações morfológicas durante o desenvolvimento de frutos e sementes de mamona da cv. BRS Energia. Flor (0 DAP); frutos (à esquerda, 10-60 DAP); sementes com tegumento (à direita, 10-30 DAP, no meio em 40 a 60 DAP) e sementes sem tegumento (a direita, 40-60 DAP). DAP, dias após a polinização. Barras de escala representam 10 mm.

Extração de proteínas e ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

A extração de proteínas das sementes nos diferentes estágios de desenvolvimento avaliados foi realizada adicionando 600 μ L do tampão de extração (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 20 mM, PMSF 2 mM e DTT 10 mM; pH 7,0) em 200 mg de extrato da semente, macerado com nitrogênio líquido, por 30 min a 4 °C. A mistura foi centrifugada (12.000 rpm) por 40 min a 4 °C e o sobrenadante coletado. O extrato protéico total foi quantificado usando o Quick Start Protein Assay de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Em uma placa de ELISA (placa de poliestireno de 96 poços) foram adicionadas quatro diferentes concentrações de proteína total (100 ng, 1 µg, 3 µg e 30 µg), extraídas das sementes maduras de quatro cultivares comerciais (BRS Energia, BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Pioneira), em três repetições. Foi realizado também outro experimento com a técnica de ELISA para a cultivar com maior teor de ricina (BRS Energia) com o objetivo de estudar a ricina durante o desenvolvimento da semente. Para tanto, foram coletadas e avaliadas sementes com idades de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 DAP.

As amostras protéicas nas concentrações determinadas foram adicionadas em 50 µl de PBS 1X (Na₂HPO₄ 0,58 M, NaH₂PO₄.H₂O 0,17 M e NaCl 0,68 M) e aplicadas à placa de ELISA. Em seguida, a placa foi lacrada e permaneceu por 4 h à 37°C. Cada poço da placa foi lavado três vezes com PBS 1X e bloqueado com 200 µL de solução de bloqueio (PBS 1X, Tween 20 - 0,05% e leite em pó desnatado 2%) por 16 h a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo específico Ricin A (cabra, rcG-20, Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluído em 50 µL de solução de bloqueio (concentração de 1:2.000) por 2h a 37 ° C. As placas foram lavadas sete vezes com a solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário diluído em 50 µL de solução de bloqueio (1:3.000, IgG de coelho anti-cabra conjugado com fosfatase alcalina, Santa Cruz Biotechnology Inc.) por 2 h a 37 ° C. As placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1X e depois da retirada total do líquido residual, foi adicionado o substrato para a reação com a fosfatase alcalina (Alkaline Phosphatase Substrate Kit – Bio-Rad). A absorbância foi medida em um leitor iMark Microplate Reader (Bio-Rad) com comprimento de onda de 405nm.

Simultaneamente à ELISA dos extratos protéicos das cultivares foram realizados os mesmos procedimentos para a construção de uma curva-padrão que permitiu a quantificação da ricina. Para isso, foi utilizada a cadeia A da ricina purificada (*Ricin A chain from Ricinus communis* - Sigma) nas concentrações de 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng e 500 ng dessa proteína. A construção da curva-padrão, nas mesmas condições, permitiu a quantificação da ricina nas sementes em ng de ricina /µg de proteína total.

Processamento das sementes

Em cada fase de desenvolvimento, as sementes foram coletadas e, posteriormente, seccionadas horizontal e transversalmente. Os fragmentos foram imediatamente submersos em tampão Cacodilato de Sódio 0,05 M, pH 7,0 contendo

0,2% de paraformaldeído e 2% de glutaraldeído. As amostras foram desidratadas gradativamente em soluções com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 15 minutos cada.

Processamento para microscopia de luz

As amostras destinadas à microscopia de luz foram processadas para imunomarcção. Para tal, os fragmentos desidratados foram infiltrados gradativamente utilizando primeiro o xilol a temperatura ambiente por dois dias e, depois, o Paraplast® X-Tra Tissue Embedding Medium (McCormick Scientific) a 58 °C por três dias. Secções semi-finas com 8-10 µm de espessura foram obtidas em micrótomo Leitz 1512 e montadas em lâminas histológicas cobertas com silano (Sigma), a 42 °C por 12 h. As secções foram desparafinadas com xilol e hidratadas em soluções de etanol [100%, 90%, 70%, 50% 30% e 0% (apenas água destilada)] por 15 min cada.

Imunomarcção para microscopia de luz

As lâminas histológicas foram organizadas horizontalmente e receberam uma solução de bloqueio (PBS 1X, Tween 20 - 0,5% e BSA 2,5%) por 1 h. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para a ricina, goat Ricin A (rcG-20 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na concentração de 1:200, por 1h30min. Após a incubação, foram realizadas lavagens com PBS 1X e incubação com o anticorpo secundário *rabbit anti-goat* conjugado com fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), na concentração de 1:50, por 1 h, em PBS 1X. Outras lavagens foram feitas e, em seguida, utilizou-se uma solução de MgCl₂ e Tris pH 9,8 por aproximadamente 2 min. O reagente BCIP/NBT solution premixed (Sigma) (substrato para fosfatase alcalina) foi adicionado e mantido por 1h, na ausência de luz. Algumas lâminas foram utilizadas como controle negativo, sendo nesse caso, utilizados os mesmos procedimentos, com exceção da incubação com o anticorpo primário. As lâminas foram abrigadas em caixas apropriadas depois de secas e observadas em microscópio Axiophot (Zeiss).

Processamento para microscopia eletrônica

O material destinado à microscopia eletrônica foi cortado em fragmentos de aproximadamente 2 mm² e, após o processo de fixação e desidratação, foi infiltrado gradualmente com a resina LRWhite (London Resin), à temperatura de 4°C, em rotação

constante e lenta, durante três dias. Após a infiltração, o material foi posicionado na extremidade de um suporte e submetido à luz UV para a polimerização da resina. Depois de polimerizado, foram realizados cortes ultrafinos (60nm) do material em micrótomo Leica Ultracut UCT. Os cortes foram coletados em telas de 300 mesh recobertas por filme Formvar, secados e armazenados.

Imunomarcção para microscopia eletrônica

Alguns cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila por uma hora, para permitir melhor visualização das estruturas celulares. Após a secagem, foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011).

O restante dos cortes ultrafinos foram imunomarcados. O procedimento consistiu em submeter os cortes a uma solução de bloqueio (PBS 1X, Tween 20 - 0,5% e BSA 2,5%) por 1 h, em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para a ricina, Ricin A (rcG-20 - Santa Cruz Biotechnology, Inc.) na concentração de 1:200, por 1 h, em câmara úmida. Após a incubação, foram realizadas lavagens com PBS 1X e incubação com o anticorpo secundário Proteína A conjugado com ouro coloidal (20nm) (SPI Supplies), na concentração de 1:50, por 1 h, também em câmara úmida. Depois desse procedimento mais lavagens foram realizadas com PBS 1X e, em seguida, com água Milli-Q. Alguns cortes foram utilizados como controle negativo, sendo nesse caso, executado os mesmos procedimentos, exceto a incubação com o anticorpo primário. As telinhas foram abrigadas para total secagem e depois submetidas à observação no microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um ensaio imunoenzimático foi realizado para comparar o conteúdo de ricina em sementes maduras de quatro variedades comerciais brasileiras e estudar o acúmulo dessa proteína durante o desenvolvimento de sementes de 10 a 60 dias após a polinização (DAP). Os resultados mostraram que as cultivares BRS Paraguaçu e BRS Pioneira apresentaram cerca de 24% do teor de ricina das cultivares BRS Nordestina e BRS Energia (Figura 7A). Pode-se observar também, pelos desvios padrões da média, que as cultivares BRS Nordestina e BRS Energia apresentaram estatisticamente valores semelhantes da concentração de ricina nas sementes, bem como a BRS Paraguaçu e a

BRS Pioneira (Figura 7A). Por ter apresentado o maior valor absoluto para concentração de ricina, a cv. BRS Energia foi escolhida para estudos de localização dessa proteína durante o desenvolvimento de sementes de mamona (Figura 7B).

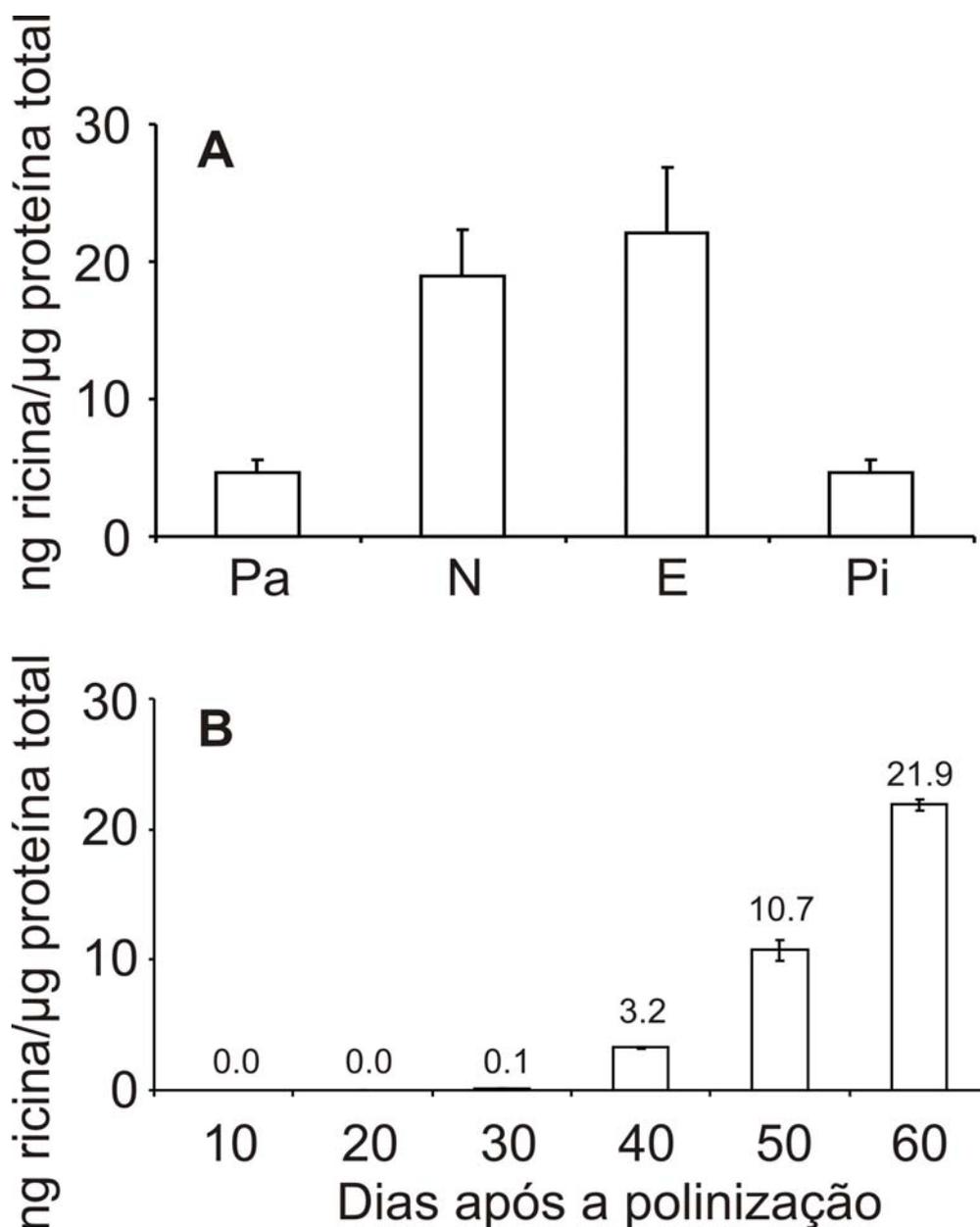


Figura 7: Concentração média de ricina em sementes maduras das cultivares BRS Paraguaçu (Pa), BRS Nordestina (N), BRS Energia (E) e BRS Pioneira (Pi) (A), e acúmulo de ricina durante o desenvolvimento das sementes da cv. BRS Energia (B). As barras de erro representam o desvio padrão da média (n = 3).

A análise de ELISA revelou que a ricina pode ser detectada nas sementes (cv. BRS Energia), apenas em 30 DAP, sendo sua concentração ainda muito baixa neste estágio (Figura 7B). Um aumento significativo foi observado de 30-40 DAP (32,0

vezes), de 40-50 DAP (3,3 vezes) e de 50-60 (2,0 vezes), quando as sementes já atingiram seu ponto de maturação fisiológica (Figura 7B).

O acúmulo da ricina em células do endosperma durante o desenvolvimento da semente também pode ser observado na Figura 8 (coluna da direita), utilizando a microscopia de luz. O material passou pelo procedimento de imunomarcção com anticorpo específico para a ricina e foi observado um crescente aumento na marcação (reação entre a fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo secundário e o substrato, resultando em coloração escura) que é pequeno na fase inicial de desenvolvimento (10 DAP) e grande na fase final (60 DAP), onde a semente se encontra madura. Dessa forma, pode-se concluir que o acúmulo dessa proteína aumenta com o desenvolvimento da semente. Podem-se observar também nos cortes semifinos (Figura 8, esquerda) que há modificações na estrutura e composição celular à medida que as células do endosperma da semente se desenvolvem, sendo o acúmulo de reservas mais expressivo.

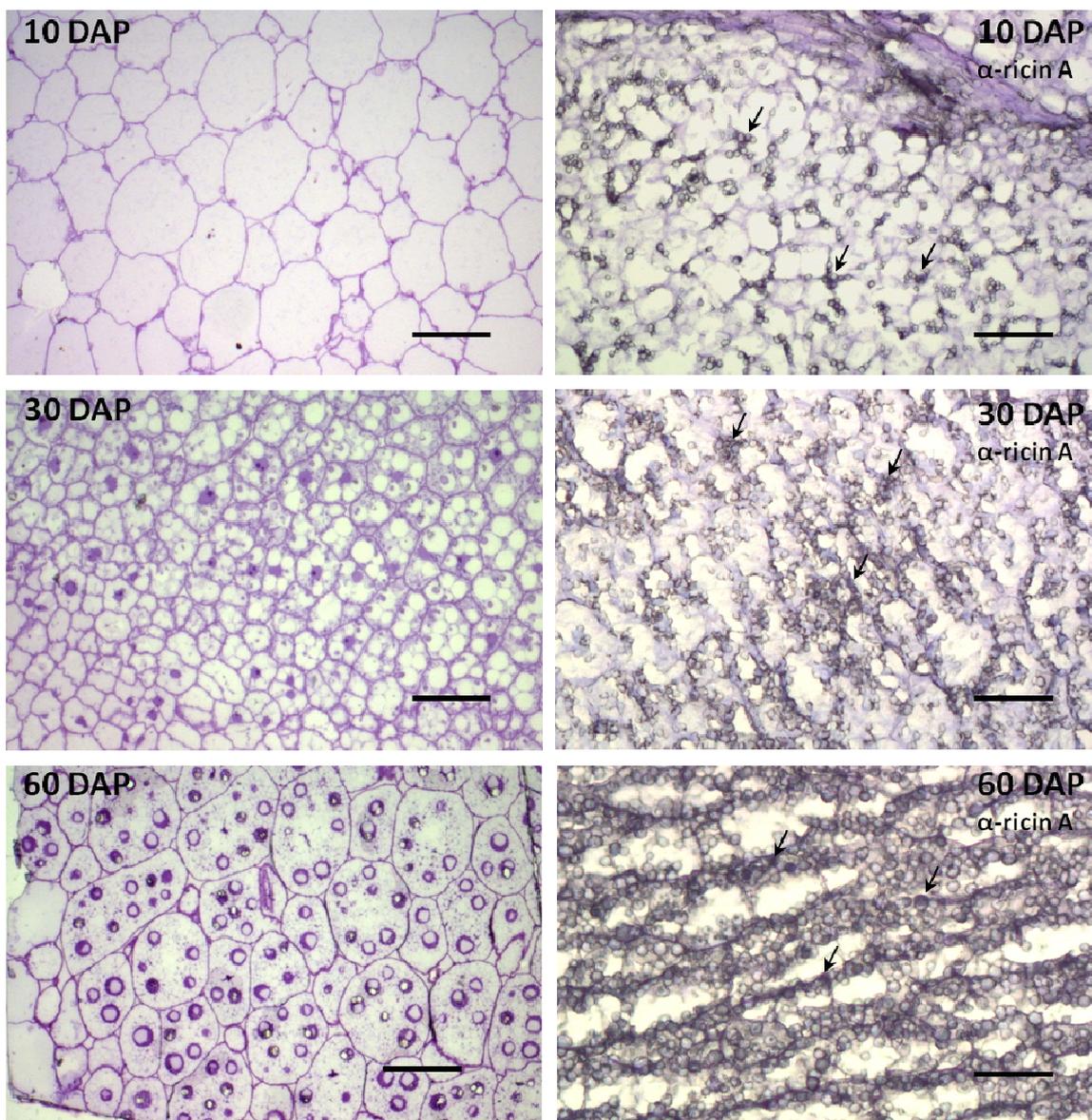


Figura 8: Estrutura celular (esquerda) e imunomarcação (direita) do endosperma de sementes de mamona da cv. BRS Energia com 10DAP, 30DAP e 60DAP (dias após a polinização). A coluna da esquerda mostra as modificações na estrutura e composição celular com o desenvolvimento do endosperma da semente. Na coluna da direita, observa-se o aumento na marcação (seta) da proteína ricina com o desenvolvimento da semente de mamona. Barra = 50 μ m.

Greenwood & Bewley (1982) observaram que a cultivar de mamona *Hale*, nos estágios de 20 - 40DAP (fases IV a VIII) armazena lipídios, proteínas e fitina nas células do endosperma. Em nosso trabalho, também foi observado o acúmulo de proteínas, lipídeos e fitinas, principalmente nas fases finais de desenvolvimento do endosperma (Figura 9). As células do endosperma na fase inicial de desenvolvimento (30 DAP) apresentaram grandes vacúolos e outras organelas, como retículo

endoplasmático, núcleo e mitocôndrias (Figura 9A). Aos 40 DAP também foram observados vacúolos (Figura 9B) e, em algumas células, organelas de armazenamento em formação, tais como vacúolos de armazenamento de proteínas e corpos lipídicos (Figura 9C). Cavidades globóides de fitina também foram observadas (Figura 9B-C).

Nos estágios de 50 a 60 DAP o citosol não se apresentava evidente e o espaço celular foi basicamente preenchido por vacúolos de armazenamento de proteínas (formado pela matriz e cristalóide) e corpos lipídicos (Figura 9D-E), confirmando os resultados obtidos por Youle & Huang, (1976). Aos 50 DAP cristalóides de proteínas foram observados no interior de vacúolos de armazenamento de proteínas (Figura 9D), sendo que em 60 DAP os cristalóides foram mais evidentes (Figura 9E e detalhe). Como esperado, essas observações foram consistentes com as informações obtidas por Greenwood *et al.* (1984) durante o desenvolvimento da semente de mamona.

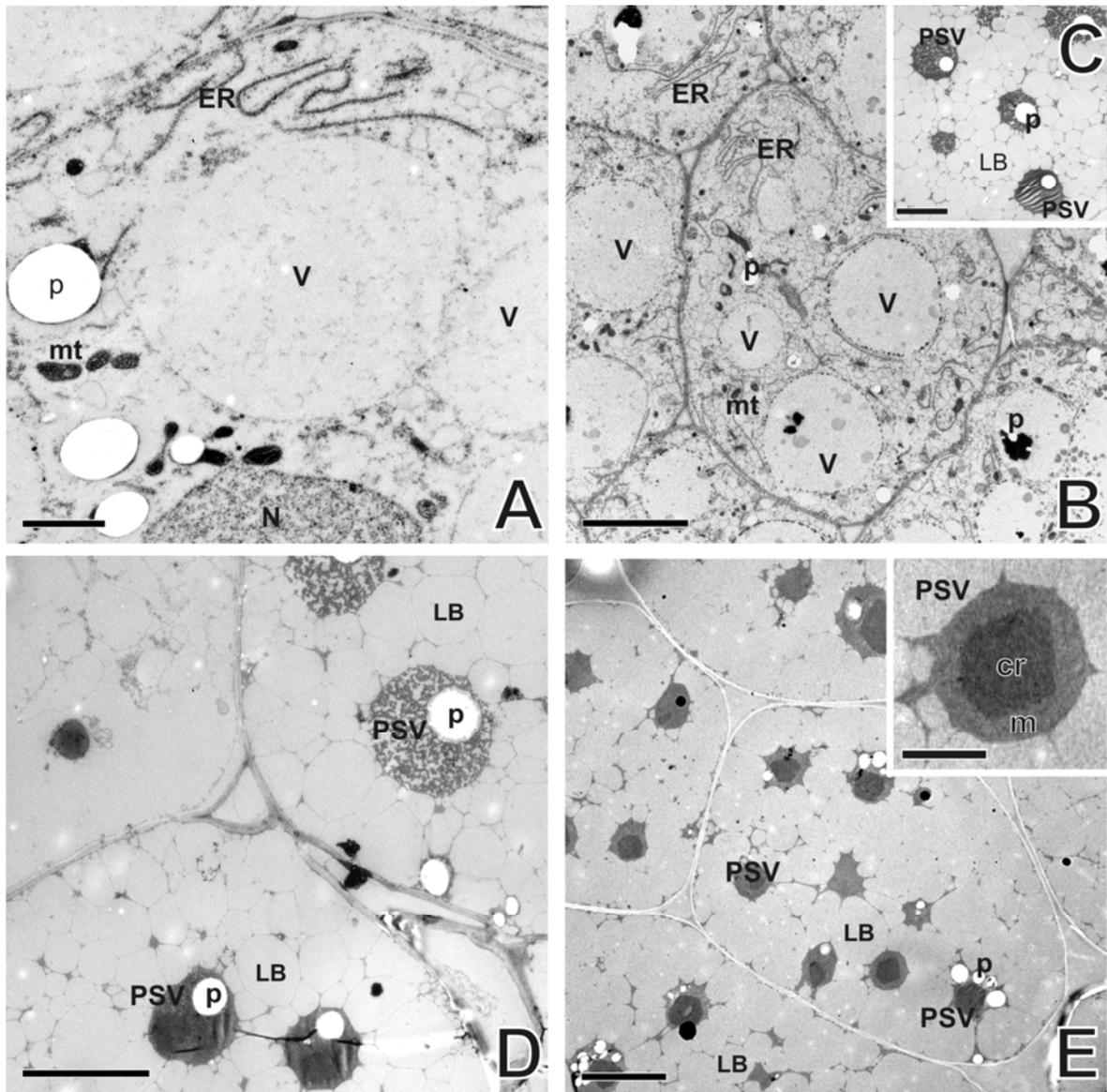


Figura 9: Estrutura celular do endosperma nos diferentes estágios de desenvolvimento: 30 DAP (A), 40 DAP (B e C), 50 DAP (D) e 60 DAP (E). ER: retículo endoplasmático; V: vacúolos; mt: mitocôndrias, N: núcleo; PSV: vacúolos de armazenamento de proteínas; LB: corpos lipídicos, p: cavidades globóides de fitina; cr: cristalóides; m: matriz. DAP, dias após a polinização. Barras representam 2 μm (em A e C), 10 μm (em B, D e E) e 2,5 μm (no detalhe de E).

A microscopia eletrônica foi utilizada para confirmar os resultados das análises de imunomarcação anteriores (Figura 10). A ricina não foi localizada nas células do endosperma nos estágios iniciais de desenvolvimento (antes dos 20 DAP) e apenas algumas marcações (ouro coloidal) puderam ser observadas aos 30 DAP. Sinal de marcação significativo para a ricina foi observado em 40 DAP, localizado na matriz do vacúolo de armazenamento de proteína (Figura 10A). Um aumento significativo da marcação foi observado em 50-60 DAP, sendo a ricina encontrada tanto na matriz

quanto nos cristalóides dos vacúolos de armazenamento (Figura 10B-D). Nenhuma marcação foi observada em cortes histológicos representando o controle negativo, os quais foram incubados apenas com o anticorpo secundário. A marcação foi homogênea em todas as células analisadas e não foram observadas marcações inespecíficas na membrana nuclear e membrana plasmática das células, confirmando a confiabilidade dos resultados.

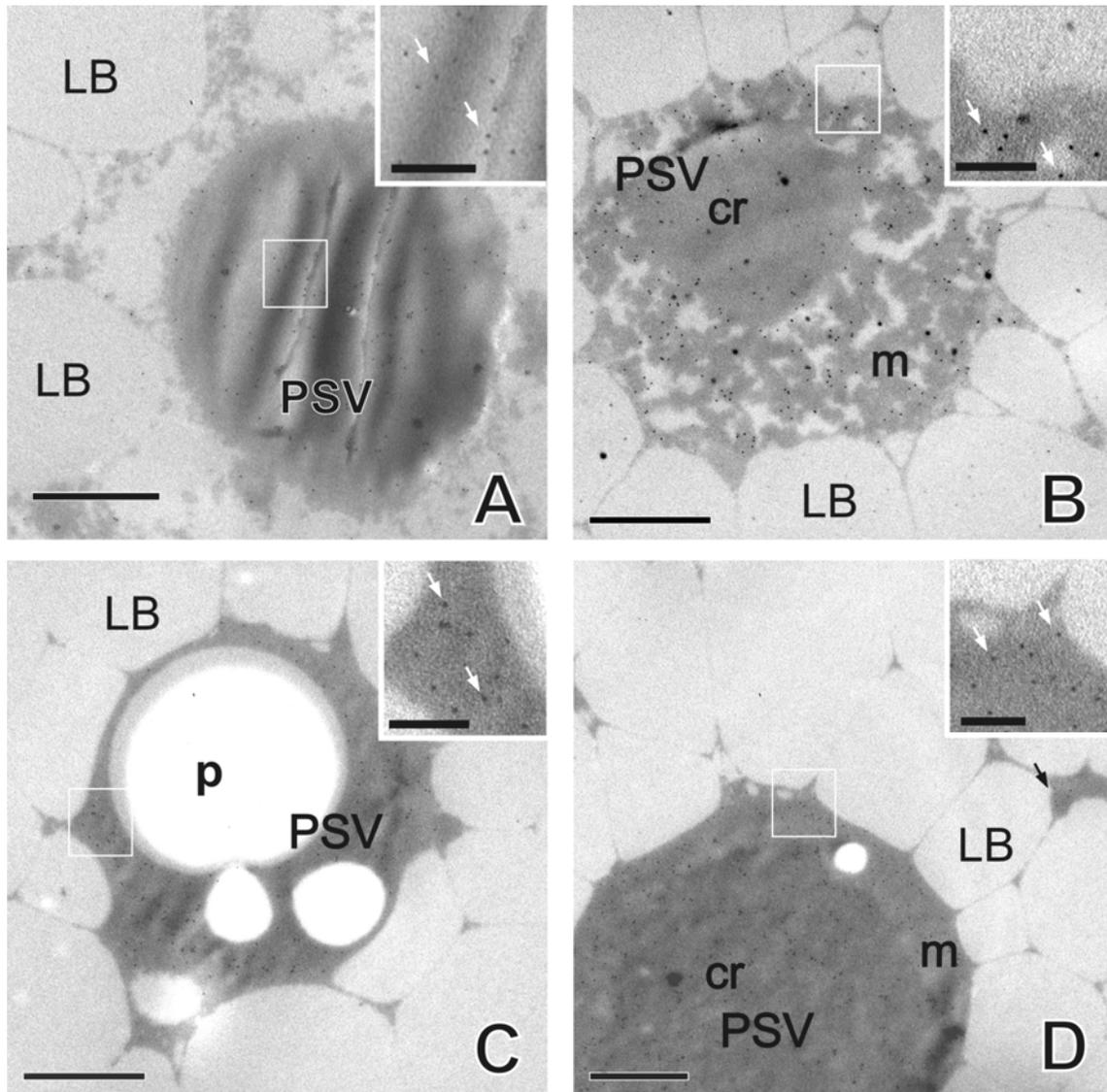


Figura 10: Imunolocalização da ricina durante o desenvolvimento de células do endosperma da semente de mamona em 40 DAP (A), 50 DAP (B) e 60 DAP (C e D). PSV: vacúolos de armazenamento de proteínas; LB: corpos lipídicos; p: cavidades globóides de fítina; cr: cristalóides; m: matriz. DAP, dias após a polinização. Setas nas inserções mostram partículas de ouro coloidal (20 nm) localizando a ricina. Barras representam 2,0 μm (em A, B, C e D) e 0,5 μm (nas inserções). Inserções mostram detalhes da área marcada com as setas brancas.

Em uma análise das proteínas do endosperma, Youle & Huang (1976) mostraram a não sobreposição de componentes protéicos na matriz e nos cristalóides, sugerindo uma clara compartimentalização das proteínas dentro dos corpos protéicos. Além disso, eles observaram também que os cristalóides são compostos por proteínas de armazenamento do tipo globulina, enquanto a matriz contém proteínas albuminas de não armazenamento, incluindo a ricina e a fitohemaglutinina (Tully & Beevers, 1976; Youle & Huang, 1976). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que, após 50 DAP, a ricina pode ser encontrada também nos cristalóides dos vacúolos de armazenamento e não apenas na matriz, como observado pelos autores acima.

O sinal de imunolocalização da ricina nas células endospermáticas foi correlacionado com as fases de desenvolvimento da semente, onde foi observado um aumento no acúmulo da proteína à medida que a semente se desenvolvia. Nossos resultados foram consistentes com os resultados obtidos por Chen *et al.* (2005) sobre a transcrição do gene da ricina. Usando técnicas de RT-PCR e *Northern blot* esses autores observaram a ausência de mRNA/cDNA nas fases iniciais do desenvolvimento do endosperma (12 e 19 DAP). No entanto, a expressão desse gene aumentou de forma significativa nas sementes com 26 DAP, e a tendência de crescimento continuou nas fases posteriores, até 54 DAP. Resultados semelhantes foram obtidos por Kermode & Bewley (1989), analisando a expressão do gene da ricina no desenvolvimento do endosperma em 30-60 DAP. Além disso, Lu *et al.* (2007) mostraram que 1,5% dos ESTs de uma biblioteca de cDNA, feita a partir do endosperma em desenvolvimento corresponde ao gene da ricina. Em conjunto, estes resultados corroboram a observação de que a expressão do gene da ricina é espacialmente e temporalmente regulada.

CONCLUSÕES

- As cultivares comerciais desenvolvidas pela Embrapa Algodão apresentam diferentes concentrações de ricina nas sementes, sendo a cultivar BRS Energia e BRS Nordestina com valores mais elevados e a BRS Paraguaçu e BRS Pioneira com valores menores.
- Durante o desenvolvimento das células do endosperma da semente de mamona ocorre um aumento no número de vesículas de reserva (vacúolos de

armazenamento de proteínas e corpos lipídicos) e diminuição do volume citoplasmático celular.

- O acúmulo de ricina na cultivar BRS Energia aumenta com o desenvolvimento da semente, sendo que na semente madura (60DAP) essa concentração é máxima.
- A ricina pode ser encontrada também nos cristalóides dos vacúolos de armazenamento de proteínas (PSV) e não só na matriz, contrariando observações bioquímicas anteriores em que os componentes protéicos são compartimentalizados dentro dos corpos protéicos.
- A expressão do gene da ricina é espacialmente e temporalmente regulada, ou seja, essa proteína se encontra em vacúolos de armazenamento de proteínas, no endosperma, e começa a ser produzida a partir da metade do período de desenvolvimento da semente de mamona.

Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development

Aisy Botega Baldoni,^{1,2}

Ana Cláudia G. Araújo,¹ Mayara Holanda de Carvalho,¹ Ana Cristina M. M. Gomes,¹ Francisco J.L. Aragão^{1,2}

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília;

²Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Brasília, DF, Brazil

Abstract

Ricin is a dimeric glycoprotein that accumulates in protein storage vacuoles of endosperm cells of *Ricinus communis* L. (castor bean). The proricin travels through the Golgi apparatus and co-localizes throughout its route to the storage vacuoles of developing castor bean endosperm. We report here the pattern of seed morphological and ultrastructural changes during various stages of seed development, associated with ricin accumulation. ELISA was used to compare the ricin content in mature seeds of four Brazilian commercial cultivars. ELISA and immunoelectron microscopy analysis were used to study ricin accumulation during seed development from 10 to 60 days after pollination (DAP). Results have shown that no ricin could be localized in the endosperm cells in the early development stages (before 20 DAP) and only a few localization points could be observed at 30 DAP. However, a significant ricin localization signal was observed at 40 DAP in the matrix of the protein storage vacuoles. The signal increased significantly from 50 to 60 DAP, when ricin was observed in both the matrix and crystalloids of the protein storage vacuoles. Understanding ricin expression at the cellular level is fundamental for the development of strategies for gene suppression using molecular breeding approaches.

Introduction

Castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds contain approximately 50% of an oil with unique characteristics such as high viscosity, heat and pressure stability, low freezing point, and the ability to form waxy substances after chemical treatments. Consequently, this oil has many important industrial applications, such as in the production of lubricants,

bio-diesel, and plastics.¹ Developing castor bean seeds accumulate lipids and storage proteins in their endosperm. In developing endosperm cells, the major storage proteins 7S lectins [ricin and its homologue *R. communis* agglutinin (RCA), which share a high similarity], 2S albumins, and 11S globulins are accumulated in protein storage vacuoles.^{2,3} Castor bean cultivation and processing result in exposure to the potent toxin ricin, which is a dimeric glycoprotein composed of a toxic A-chain (RTA) and a lectin B-chain (RTB) that are linked via disulfide bonds.⁴ The A-chain is a ribosome-inactivating enzyme that depurinates a specific adenine residue on the 28S ribosomal RNA from animal cells. This activity prevents the formation of a critical stem-loop configuration, to which elongation factor 2 is known to bind during the translocation step of translation. It provokes cell death by inhibiting protein synthesis.^{5,6} The β -chain, which contains two galactose binding sites, binds specifically to cell surface glycoproteins or glycolipids and facilitates the movement of the A-chain into cells.⁷ Extremely low levels of ricin are able to inhibit protein synthesis. According to Olsnes *et al.*,⁸ only one A-chain molecule of ricin is able to irreversibly inactivate 2000 ribosomes/min. In addition, Eiklid *et al.*⁹ concluded that penetration of a single ricin molecule into the cytosol is enough to kill a mammalian (HeLa) cell. The estimated lethal ricin dose in humans is 1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.^{6,10}

Ricin is synthesized as preproprotein (64.1 kDa) in developing castor bean seeds.⁴ It is inserted into the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), when the signal peptide is removed forming the proricin (61.6 kDa). In the ER an intramolecular disulfide bond between the A and B subunits is formed, holding together the mature heterodimer. After a subsequent removal of the propeptides by a vacuolar protease, the mature dimer of 58.8 kDa is generated.⁴ Ricin is assumed to serve as a seed storage protein providing nutrients for seed germination and also may act as a defense protein.^{2,11,12} However, the environmental role and evolutionary aspects of ricin accumulation in castor bean seeds still are not completely clarified.

Immunoelectron microscopy and cell fractionation reveal that proricin travels through the Golgi apparatus and co-localizes throughout its route to the storage vacuoles of developing castor bean endosperm.³ The ricin gene (coding for the ricin preproprotein) expression studied by RT-PCR and Northern analysis revealed that its expression increased significantly in seeds at 26-30 DAP, and the upward trend continued into later stages until 54-60 DAP.^{13,14} Using a radial immunodiffusion assay based on ricin-specific antibodies, ricin amount was quantified in accessions from the USDA castor collections, showing an extreme-

Correspondence: Francisco J. L. Aragão, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-917, Brasília, DF, Brazil.
E-mail: aragao@cenargen.embrapa.br

Key words: electron microscopy, endosperm, immunolocalization, protein bodies, seed development.

Acknowledgements: the authors wish to thank Dr. Máira Milani (Embrapa Algodão) for providing castor bean germplasm, and Prof. Sônia Bão (University of Brasília) for providing the facilities for electron microscopy. The research was supported by a grant from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). ABB was supported by a fellowship from CNPq.

Contributions: ABB carried out the practical work and wrote the paper; ACGA and ACCMMG carried out the electron microscopic work; MHC helped in collecting the plant material, and with electron microscopy; FJLA the research group leader, analyzed the data and finalized the manuscript.

Conflict of interest: the authors report no conflicts of interest.

Received for publication: 30 April 2010.

Revision received: 14 June 2010.

Accepted for publication: 15 June 2010.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright A.B. Baldoni *et al.*, 2010
Licensee PAGEPress, Italy
International Journal of Plant Biology 2010; 1:e12
doi:10.4081/pb.2010.e12

ly wide range and differing significantly in ricin plus *Ricinus communis* agglutinin (RCA) concentrations.¹⁵

Ricin has been studied extensively in both medical and basic research since its discovery in the 1880s. It has been used to investigate molecular mechanisms involved in intracellular trafficking and studied for its potential for therapeutic use in cancer chemotherapy.^{6,16} However, there is still limited information on ricin accumulation and genetic diversity in castor beans. There are studies on cell ultrastructure of mature and germinating seeds but detailed analysis during endosperm cell development is rare. In order to characterize ricin further, immunological techniques were used to localize protein expression in endosperm cells from developing castor bean seeds. Sections of developing castor bean seeds from six stages of development were used to characterize early ricin expression. We report here the pattern of seed morphological and ultrastructural changes during various stages of seed development, associated with ricin accu-

mulation. This information could contribute to the genetic manipulation of ricin gene expression in castor bean seeds.

Materials and Methods

Plant material

Seeds from castor bean plant cvs. Energia, Nordestina, Pioneira, and Paraguaçu were used for ricin content determination. Plants from cv. Energia were grown from seed in a greenhouse at Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brazil) under ambient conditions. Initial flowering occurred approximately 60 days after sowing. Fully opened female flowers were tagged individually and hand pollinated, and the tagging dates recorded as days after pollination (DAP). Capsules were harvested at 10-day intervals to a maximum of 60 DAP. All collected capsules were analyzed anatomically. Seed coat, caruncle, nucellus, and endosperm were separated using a scalpel and razor blade.

Quantification of ricin content

Quantification of ricin content was carried out in the cvs. Energia, Nordestina, Pioneira, and Paraguaçu using ELISA. The cv. Energia was chosen for the analyses of ricin accumulation during seed development. Protein extraction was performed by mixing the seed powder (0.2 g) and 600 μ L of sample buffer (50 mM NaH_2PO_4 , 20 mM NaCl, 2 mM PMSF, 10 mM DTT, pH 7.0) for 30 min at 4°C. The mixture was centrifuged (18,500 g) for 40 min at 4°C and the supernatant collected. Total protein was quantified using the Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Polystyrene 96-well plates were coated with 3 μ g total protein (diluted in PBS) and incubated for 4 hr at 37°C. The plates were washed three times with PBS, blocked with 200 μ L/well of block solution (PBS, Tween (0.05%), and 2% defatted powdered milk) for 16 hr at 4°C. The plates were washed three times with block solution and incubated with specific goat anti-RTA antiserum (rcG-20; Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluted in block solution (1:2,000) for 2 hr at 37°C. The rcG-20 is an affinity purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the N terminus of the ricin precursor of *R. communis* origin. Although Western blot analysis showed that proricin precursor and glycoforms of ricin A-chain were recognized specifically, we could not exclude the possibility that the antibody would also detect the homologous RCA A-chain, GenBank accession number P06750. The plates were washed seven times with block solution and incubated with 50 μ L/well of diluted secondary antibody (1:3000, rabbit anti-goat

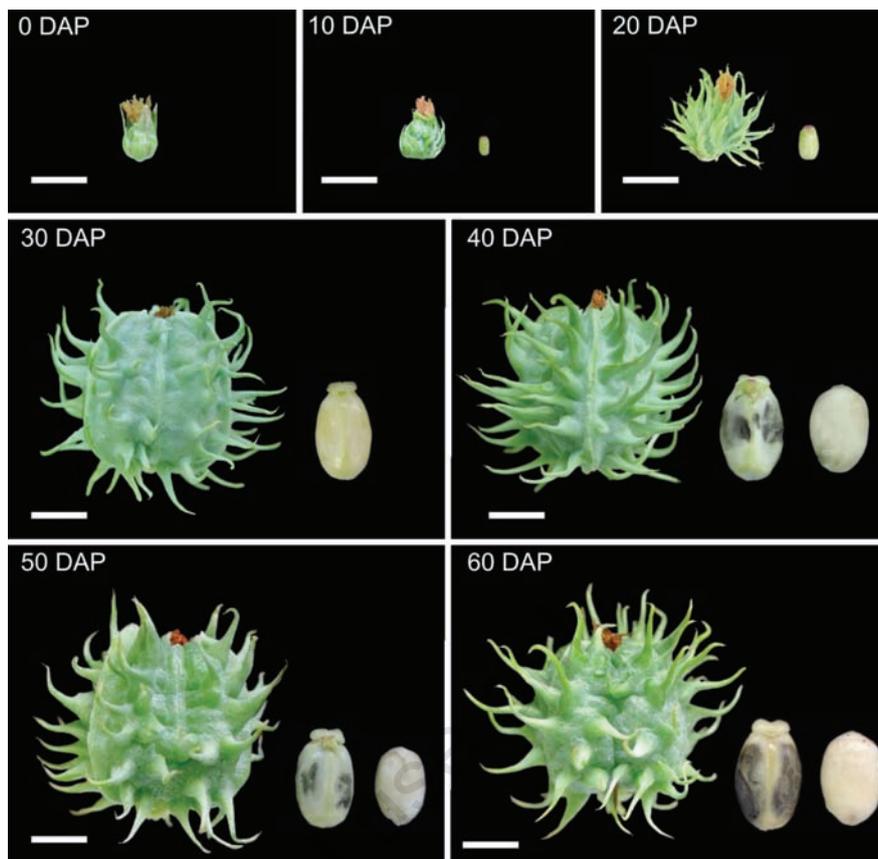


Figure 1. The morphological changes in castor bean seeds cv. Energia during development from: flower (0 DAP), fruits (on the left, 10 to 60 DAP), coated seeds (on the right, 10 to 30 DAP; in the middle, 40 to 60 DAP), and seeds without a coat (on the right, 40 to 60 DAP). DAP, days after pollination. Scale bars represent 1 cm.

IgG conjugated with alkaline phosphatase, Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 2 hr at 37°C. The plates were washed five times with PBS and the reaction was performed using the Alkaline Phosphatase Substrate Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. A standard curve was prepared using the purified ricin A (Sigma). Absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Rad) at 405 nm. Experiments were repeated with three biological and three technical replicates.

Morphological and ultrastructural immunocytochemistry analyses

Flowers were collected at each stage of seed development (10, 20, 30, 40, 50, and 60 DAP; Figure 1) and images of developing fruits were obtained. Samples were dissected and sectioned transversally and longitudinally. The fragments were immersed in the fixative solution of cacodylate buffer 0.05M, pH 7.0 containing 2% paraformaldehyde and 0.2% glutaraldehyde for 24 hr at 4°C, and subsequently dehydrated in an increasing series of ethanol solutions (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), for 15 min in each solution. Samples were displaced in transparent microtubes containing the acrylic

resin LR White (London Resin) for 6 days at 4°C and then cured at 4°C under UV light for 3 days. Ultra-thin sections (60 nm thick) were obtained using the ultramicrotome Leica Ultracut UCT and collected on 300 mesh copper grids recovered with Formvar film. Grids were incubated with a solution 1% of uranyl acetate and examined in a Jeol 1011 transmission electron microscope, operated at 60 kV.

For ultrastructural immunocytochemistry, grids containing ultra-thin sections were incubated with blocking solution (PBS 1X, 0.5% Tween 20, 2.5% bovine serum albumin) and primary antibody (Ricin A, rcG-20; Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluted 1:200 for 1 hr. After incubation with primary antibody, sections were washed with PBS 1X solution and then incubated with Protein A coupled with 20 nm gold particles (SPI Supplies) diluted 1:50. Sections, with no counterstaining, were examined in the transmission electron microscope. As a control, the incubation with primary antibody was omitted. Only representative images that were consistently observed in sections of three or more individual seeds from each developmental stage were selected for presentation.

Results

An enzyme-linked immunosorbent assay was carried out to compare the ricin content in mature seeds of four Brazilian commercial varieties and to study ricin accumulation during seed development from 10 to 60 days after pollination (DAP). Figure 1 illustrates the morphology of a developing seed. Our results showed that the cvs. Paraguaçu and Pioneira exhibit about 24% of the ricin content of the cvs. Nordestina and Energia (Figure 2A). Thus, the cv. Energia was chosen for further studies of ricin localization during seed development. ELISA analysis revealed that ricin could be detected in the seeds (cv. Energia) only at 30 DAP, and a significant increase was observed from 30 to 40 DAP (4.2 fold), from 40 to 50 DAP (5.8 fold), and from 50-60 (1.4 fold) (Figure 2B).

Endosperm cells at the early developing stage (30 DAP) presented large vacuoles and other organelles such as ER, nuclei, and mitochondria (Figure 3A). At 40 DAP cells were still vacuolated (Figure 3B) and the development of other storage organelles, such as protein storage vacuoles and lipid bodies, was first observed in some cells (Figure 3C). At 50 to 60 DAP the cytosol was not evident and the cellular space was filled by protein storage vacuoles and lipid bodies (Figure 3D-F). At 50 DAP protein crystalloids could be observed inside the protein storage vacuoles, while in some cells the structure of the protein storage vacuoles still was not mature (Figure 3D). At 60 DAP the protein crystalloids were more evident (Figure 3E and F).

No ricin could be localized in the endosperm cells in the early developing stages (before 20 DAP) and only a few points could be observed at 30 DAP (*data not shown*). A significant ricin localization signal was observed at 40 DAP in the matrix of the protein storage vacuoles (Figure 4A). A significant increase in the ricin localization signal was observed from 50 to 60 DAP, and ricin could be observed both in the matrix and crystalloids of the protein storage vacuoles (Figure 4B-D). No background localization was observed in the control sections incubated with only the secondary antibody.

Discussion

Using ultrastructural immunocytochemistry techniques, the presence and accumulation of ricin in the endospermatic cells of castor bean were characterized during seed development. Castor beans store lipids and proteins in a living endosperm, which is attached laterally to the cotyledons. The endosperm is essentially

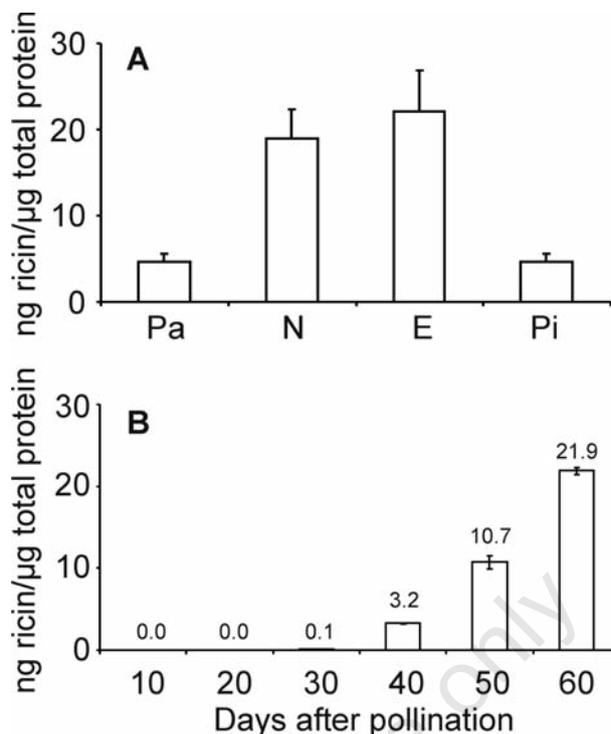


Figure 2. Ricin quantification in mature seeds of the cvs. Paraguaçu (Pa), Nordestina (N), Energia (E), and Pioneira (Pi) (A), and ricin accumulation in the cv. Energia during seed development (B). The numbers above each bar in (B) represent the mean. Error bars represent the standard deviation from the mean (n=3).

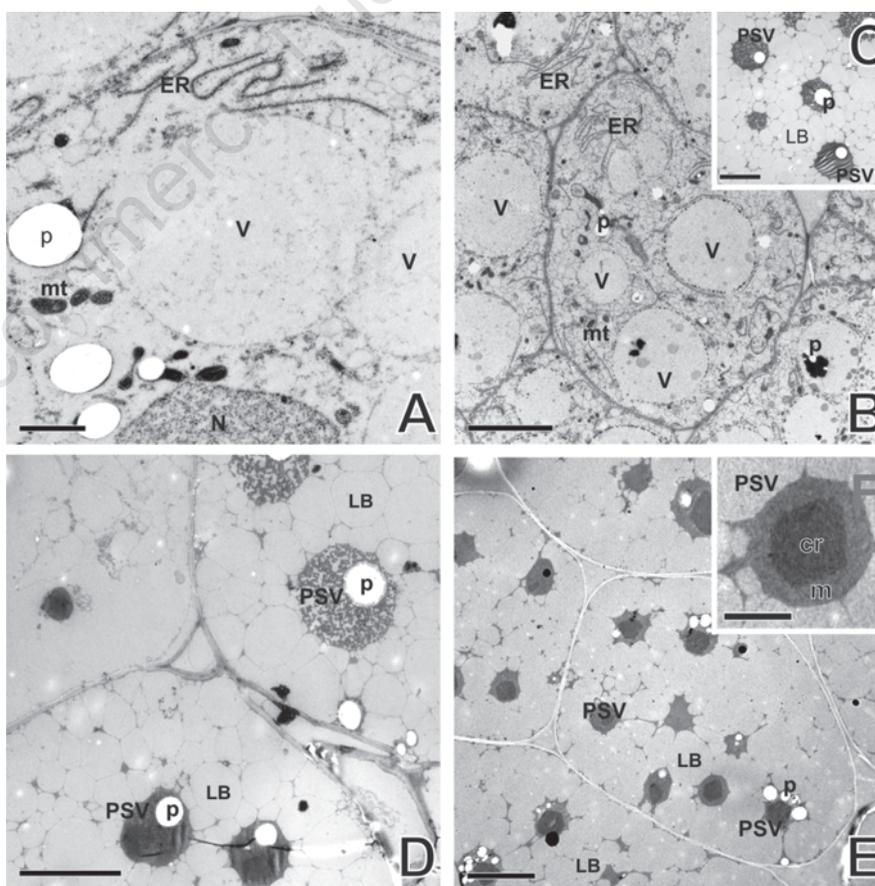


Figure 3. Endosperm cell development at 30 DAP (A), 40 DAP (B and C), 50 DAP (D), and 60 DAP (E). RE, endoplasmic reticulum; V, vacuoles; mt, mitochondria; N, nucleus; PSV, protein storage vacuoles; LB, lipid bodies; p, phytin globoid cavities; cr, crystalloids; m, matrix. DAP, days after pollination. Bars represent 2 μm (in A and C), 10 μm (in B, D, and E) and 2.5 μm (in the insert F).

free-nuclear in the early stages, at 5 to 10 DAP (stages I and II according to Greenwood and Bewley¹⁷), and it becomes primarily cellular by stage III (15 DAP). The transition from free-nuclear to cellular endosperm (15 to 20 DAP) proceeds from the micropylar to the chalazal end of the seed.¹⁷ Our analyses confirmed previous observations: in the endosperm cells of mature castor bean most of the cell volume is filled with protein bodies and lipid bodies.¹⁸ In addition, we confirmed that formation of protein storage vacuoles started at about 40 DAP and only a number of cells exhibited that pattern, while others still presented an evident cytosol with ER and mitochondria (Figure 3). As expected, observations of protein and lipid bodies, and the pattern of phytin globoid formation, were consistent with the previous determinations of the amount of proteins, lipids, phytic acid, and phosphorous during the development of castor bean seeds.¹⁹

Previous analysis of proteins of endosperm sub-organelle fractions demonstrated that there was no overlapping of the protein components between the matrix and the crystalloids, suggesting a clear compartmentalization of the protein components within the protein bodies.¹⁸ In addition, it was established that the crystalloids are composed of storage protein of the globulin type, whereas the matrix contains non-storage albumin proteins, including ricin and phytohemagglutinin.^{18,20} In contrast, our results showed that ricin could be found in both matrix and crystalloid after 50 DAP (Figure 4B-D).

Ricin immunolocalization signal and accumulations during endosperm cell development were correlated with the development of endosperm. Our results were consistent with the previous observations on ricin gene transcription. Chen *et al.*¹⁴ used RT-PCR and Northern analysis to examine the transcription of the ricin gene during seed development and stated that no ricin mRNA/cDNA was detected before the endosperm begins to develop (12 and 19 DAP). However, the expression increased significantly in 26-DAP seeds, and the upward trend continued into later stages until 54 DAP. Similar results were obtained by Kermode and Bewley,¹³ analyzing a ricin gene expression in developing endosperm at 30 to 60 DAP. In addition, Lu *et al.*²¹ have shown that 1.5% of the ESTs derived from a full-length cDNA library of castor developing endosperm corresponded to the ricin gene. Taken together, these results corroborate the observation that ricin gene expression is spatially and temporally regulated.

Owing to its importance for industry and the possibility of using the remaining processed material as fertilizer or animal foodstuffs, there is considerable interest in reducing the ricin content in castor bean seeds using both classical and molecular breeding approaches.

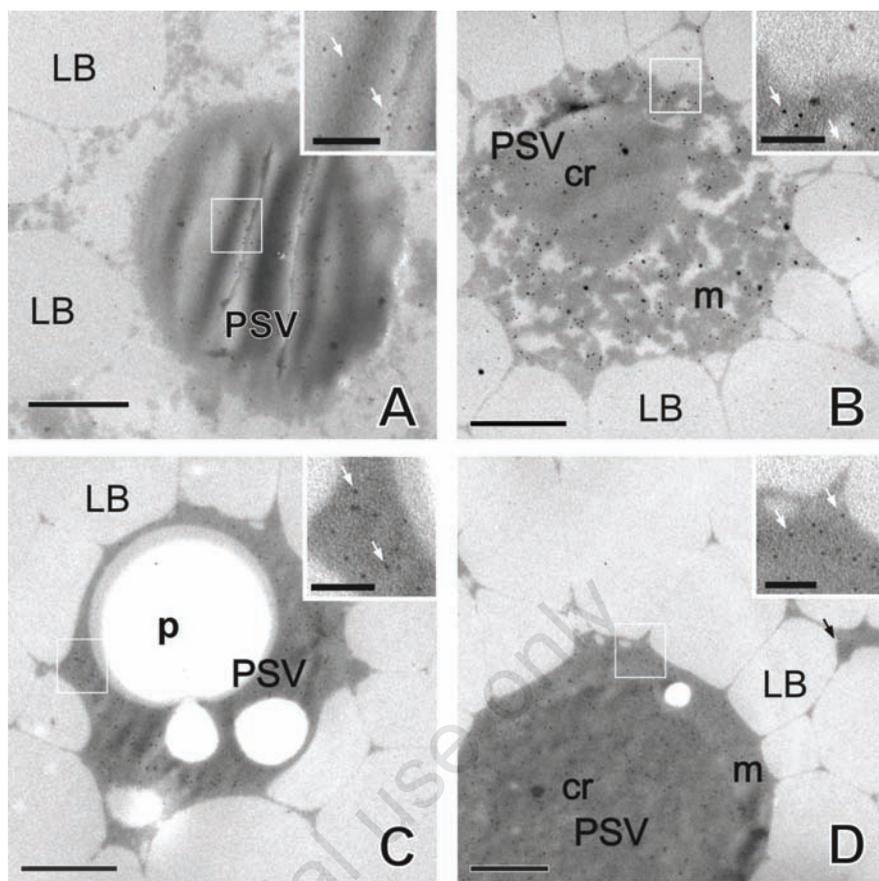


Figure 4. Immunolocalization of ricin in the endosperm cells during seed development at 40 DAP (A), 50 DAP (B), and 60 DAP (C and D). PSV, protein storage vacuoles; LB, lipid bodies; p, phytin globoid cavities; cr, crystalloids; m, matrix. DAP, days after pollination. Inserts show details of the area marked with the white boxes. Arrows in the inserts indicate the 20 nm gold particles localizing ricin. Bars represent 2.0 μm (in A, B, C, and D) and 0.5 μm (in the inserts).

Indeed, there are some recent examples in which expressing genes were knocked out.^{22,24} However, the understanding of protein expression at cellular level is fundamental for: i) development of constructs with regulatory sequences involving adequate temporal and spatial expression; ii) an effective method of screening individual mutants/transformants to block expression of ricin genes successfully; iii) biosafety analysis of transgenic events.

References

1. Godoy MG, Gutarra MLE, Maciel FM, et al. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. *Enzyme Microb Technol* 2009;44:317-22.
2. Roberts LM, Lord JM. Protein biosynthetic capacity in the endosperm tissue of ripening castor bean seeds. *Planta* 1981;152: 420-7.
3. Jolliffe NA, Brown JC, Neumann U, et al. Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *Plant J* 2004;39: 821-33.
4. Maltman DJ, Gadd SM, Simon WJ, et al. Differential proteomic analysis of the endoplasmic reticulum from developing and germinating seeds of castor (*Ricinus communis*) identifies seed protein precursors as significant components of the endoplasmic reticulum. *Proteomics* 2007; 7:1-16.
5. Endo Y, Mitsui K, Motizuki M, et al. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 1987;262:5908-12.
6. Audi J, Belson M, Patel M, et al. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA* 2005;294:2342-51.
7. Sphyrin N, Lord JM, Wales R, et al.

- Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2 gamma subdomain of Ricinus communis agglutinin B-chain. *J Biol Chem* 1995;270:20292-7.
8. Olsnes S, Fernandez-Puentes C, Carrasco L, et al. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. *Eur J Biochem* 1975;60:281-8.
 9. Eiklid K, Olsnes S, Pihl A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res* 1980;126:321-6.
 10. Rao PV, Jayaraj R, Bhaskar AS, et al. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:855-65.
 11. Youle RJ, Huang AHC. Evidence that castor bean allergens are storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiol* 1978;61:1040-2.
 12. Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage protein: structure and biosynthesis. *Plant Cell* 1995;7:945-56.
 13. Kermode AR, Bewley JD. Developing seeds of *Ricinus communis* L., when detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiol* 1989;90:702-7.
 14. Chen GQ, He X, Mckee TA. A simple and sensitive assay for distinguishing the expression of ricin and Ricinus communis agglutinin genes in developing castor seed (*R. communis* L.) *J Agric Food Chem* 2005;53:2358-61.
 15. Pinkerton SD, Rolfe R, Auld DL, et al. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and Ricinus communis agglutinin. *Crop Sci* 1999;39:353-7.
 16. Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J* 2000;19:5943-50.
 17. Greenwood JS, Bewley JD. Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. *Can J Bot* 1982;60:1751-60.
 18. Youle RJ, Huang AHC. Protein bodies from the endosperm of castor bean. Sub-fractionation, protein components, lectins, and changes during germination. *Plant Physiol* 1976;58:703-9.
 19. Greenwood JS, Gifford DJ, Bewley JD. Seed development in *Ricinus communis* cv. Hale (castor bean). II. Accumulation of phytic acid in the developing endosperm and embryo in relation to the deposition of lipid, protein, and phosphorus. *Can J Bot* 1984;62:255-61.
 20. Tully RE, Beevers H. Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components. *Plant Physiol* 1976;58:710-6.
 21. Lu C, Wallis JG, Browse J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library. *BMC Plant Biol* 2007;7:42.
 22. Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, et al. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for efficient biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol* 2004;54:931-41.
 23. Sunilkumar G, Campbell L, Puckhaber L, et al. Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:18054-9.
 24. Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, et al. RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduces phytate content. *Planta* 2006;224:125-32.

CAPÍTULO III

Silenciamento do gene que codifica a ricina em mamona (Ricinus communis L.)

1) Cultura de tecidos e transformação genética da mamona

O sucesso dos programas de melhoramento visando à transformação genética de plantas depende de protocolos eficientes de cultura de tecidos *in vitro*. Em mamona, os primeiros estudos realizados com regeneração de tecidos mostraram resultados ineficientes e de difícil reprodutibilidade (Reddy *et al.*, 1987; Reddy & Bahadur, 1989). Entretanto, a utilização de tecidos meristemáticos aumentou a eficiência da regeneração de explantes na cultura da mamona (Ahn *et al.*, 2007).

Alguns protocolos de regeneração de mamona são encontrados na literatura e a eficiência da regeneração está relacionada ao explante e aos reguladores de crescimento utilizados. Sujatha & Reddy (1998) cultivaram eixos embrionários em meio de cultura suplementados com adenina, BA (N6-benziladenina), cinetina, TDZ (tidiazuron) e zeatina. Dentre os reguladores utilizados, o TDZ apresentou um maior número de brotações, sendo o mais indicado.

Outro protocolo de regeneração de mamona foi desenvolvido utilizando tecidos do hipocótilo do embrião zigótico, cultivados em meio com os reguladores de crescimento TDZ e BAP (6-benzilaminopurina). Os resultados mostraram que a formação de brotações adventícias foi maior em embriões submetidos ao TDZ. Além disso, o pré-tratamento dos explantes na ausência de luz aumentou o número de brotações. Para estimular o enraizamento dos explantes foi adicionado ao meio de cultura IBA (ácido indol-3-butírico) e NAA (ácido naftaleneacético), separadamente, sendo que o IBA apresentou melhores resultados (Ahn *et al.*, 2007).

Os trabalhos de transformação genética da mamoneira visam o desenvolvimento de plantas transgênicas com reduzida toxicidade, resistência a insetos, aumento na concentração e qualidade do óleo (Auld *et al.*, 2001; Malathi *et al.*, 2006). Em um deles, foi desenvolvido um protocolo de transformação de eixos embrionários de mamona utilizando *Agrobacterium tumefaciens* e, como agente seletivo, a higromicina. No meio de cultura de tecidos foram utilizados os reguladores de crescimento TDZ e BA e, para a alongação dos brotos foi utilizado NAA. Foi confirmada a presença do transgene (integração do gene *hpt*, que confere resistência à higromicina) por PCR, RT-PCR, PCR-Southern blot, seqüenciamento e análise das progênies por PCR, sendo a eficiência de transformação de 0,08% (Sujatha & Sailaja, 2005).

Em outro trabalho, foi utilizado *A. tumefaciens* para a transformação genética de eixos embrionários de mamona. Um vetor contendo o gene *gus* e o gene *hpt* (que confere resistência à higromicina) foi inserido em plantas de mamona geneticamente

modificadas. Análises moleculares de Southern blot confirmaram a presença do gene *gus*, com eficiência de transformação de 0,42% (Malathi *et al.*, 2006).

Foi descrito também um protocolo para transformação de eixos embrionários de sementes maduras de mamona utilizando biobalística. O vetor utilizado continha o gene *gus* e o gene repórter *hptII* (higromicina-fosfotransferase), que confere à planta resistência à higromicina. Os explantes foram pré-incubados em meio com TDZ por 5 a 7 dias. A seleção das plantas transformadas foi realizada em meio de cultura com BA 0,5mg/l e 3 ciclos de seleção com higromicina (20, 40 e 60 mg/l). Análises de PCR e Southern blot confirmaram a eficiência de transformação de 1,4% (Sailaja *et al.*, 2008).

2) RNA interferente (RNAi)

Existem dois níveis de silenciamento gênico em plantas, um operando na transcrição e outro, na pós-transcrição. O silenciamento gênico transcricional (TGS – *transcriptional gene silence*) está associado com a metilação de seqüências específicas de DNA e a conseqüente supressão da transcrição (Mansoor *et al.*, 2006). O silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS – *posttranscriptional gene silencing*) está relacionado à degradação de RNA de seqüências específicas (Agrawal *et al.*, 2003) e tem sido mais estudado, possivelmente por ser a resposta celular mais comum à invasão de genes repetitivos (Carthew, 2001).

Dentre os processos de silenciamento gênico pós-transcricional encontra-se o mecanismo de RNA interferente (RNAi) que tem como base a homologia de seqüências de nucleotídeos. Este mecanismo é desencadeado por RNA de fita dupla (dsRNA – *double-stranded RNA*), o qual leva a supressão da expressão de genes (Mansoor *et al.*, 2006).

O mecanismo de RNAi foi descoberto em plantas funcionando, provavelmente, como parte de um mecanismo de defesa contra vírus e para regular a expressão anormal de genes (Morel *et al.*, 2000). Posteriormente, demonstrou ser um mecanismo de silenciamento que está presente em todos os eucariotos, incluindo protozoários, plantas e animais (Mansoor *et al.*, 2006).

O processo de silenciamento gênico por meio do mecanismo de RNAi ganhou destaque na comunidade científica mundial quando foi observado no nematóide *Caenorhabditis elegans*. O estudo mostrou que, injetando RNA para um gene de síntese protéica muscular do nematóide, no sentido sense ou antisense separadamente, o efeito

do silenciamento gênico era muito inferior ao observado quando foi injetada a fita de RNA nos dois sentidos. Nesse último caso, os nematóides apresentaram movimentos peculiares que só haviam sido observados em outros nematóides com esse gene ausente. Dessa forma, foi proposto o envolvimento de dsRNA no silenciamento gênico (Fire, 2007). Esse trabalho rendeu aos pesquisadores o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2006.

O processo de RNAi consiste basicamente em se obter, a partir da transcrição do DNA da planta, um RNA de dupla fita. A construção do tipo *intron-hairpin* (hpRNA) tem-se mostrado a forma mais eficiente para o silenciamento de genes em plantas, como mostra a figura 11 (Wesley *et al.*, 2001).

Construção	Estrutura RNA prevista	PTGS	n
Adj-hp RNA		25%	8
hpRNA		85%	14
sRNA		30%	10

Figura 11: Estrutura do RNA e a eficácia das construções para o silenciamento gênico. PTGS indica a porcentagem de plantas silenciadas para o gene *gus*; **n** = número de plantas em cada tratamento (Adaptado de Wesley *et al.*, 2001).

Após a inserção do RNA de fita dupla na célula, este será localizado por um complexo protéico dependente de RNA de fita dupla, denominado DICER que, então, cliva esse RNA em pequenos fragmentos (de 21 a 23 nucleotídeos) (Figura 12). Estes fragmentos chamados de pequenos RNAs de interferência, em inglês '*small interfering RNA*' (siRNA), se associam então a outro complexo enzimático chamado RISC, que os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, que podem ser fitas simples ou duplas, e quando houver homologia total clivará também esta fita complementar. Cada novo RNA clivado torna-se, então, um novo pequeno RNA interferente em potencial. Esse mecanismo permite que a interferência de RNA continue mesmo após todo o RNA de fita dupla inicial ter sido degradado. Isso faz com que as

células das progênes continuem realizando a interferência de RNA que foi iniciada nas células parentais. Essa característica pode também ser espalhada pela transferência de fragmentos de RNA de célula para célula, o que permite a uma planta inteira tornar-se resistente a um vírus de RNA, ou silenciar determinado gene endógeno, mesmo quando algumas de suas células foram infectadas (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2004; Fire, 2007; Aragão & Figueiredo, 2008).

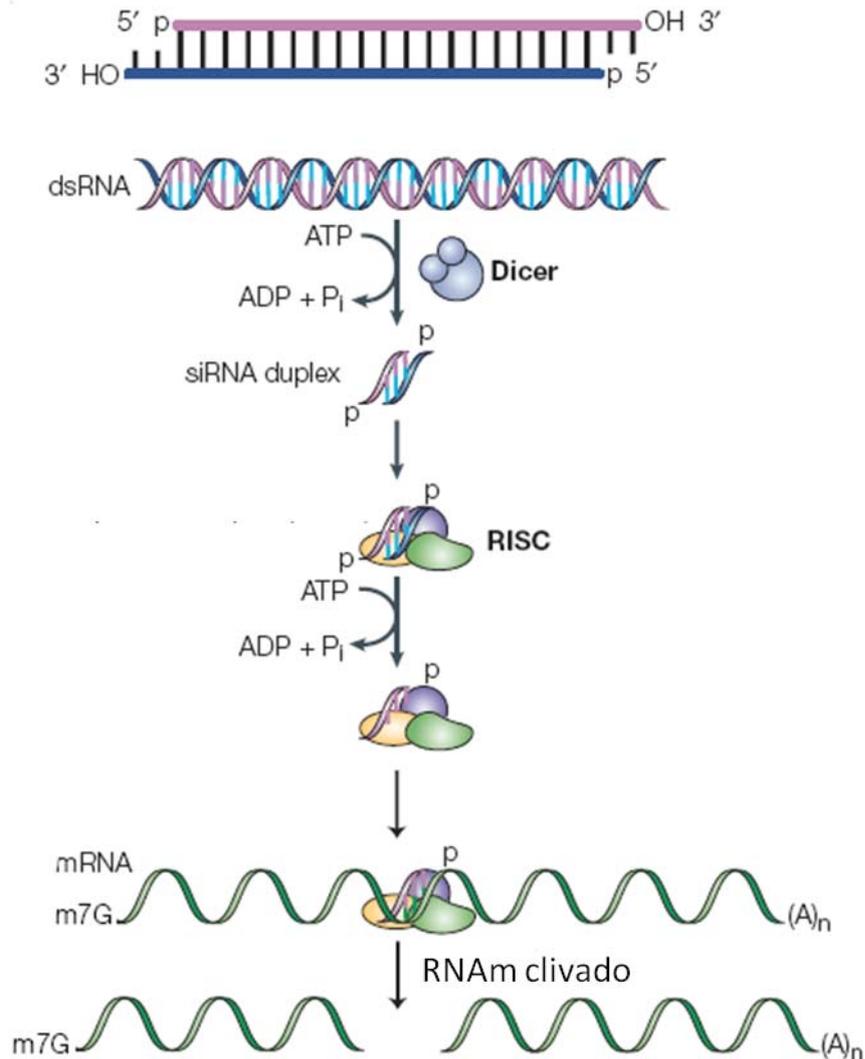


Figura 12: Modelo do mecanismo de RNAinterferente. A presença de RNA de fita dupla (dsRNA) na célula ativa o complexo protéico DICER que cliva-o em pequenos fragmentos (*small interfering* RNA - siRNA). Esses fragmentos se associam a outro complexo enzimático (RISC) que os direcionam para outras moléculas de RNA complementares, e quando houver homologia total clivará também esta fita complementar (Adaptado de Dykxhoorn *et al.*, 2003).

O RNAi tem revolucionado as pesquisas de análises funcionais do genoma, contribuindo para a investigação das funções gênicas e dos mecanismos internos das células (Hannon, 2002).

Vários trabalhos foram realizados desde a sua descoberta. Em um deles, cientistas japoneses, com o objetivo de produzir sementes de café (*Coffea canephora*) com redução do teor de cafeína, silenciaram o gene que codifica a enzima CaMXMT1, importante na rota metabólica. As plantas transgênicas foram analisadas, observando um teor de cafeína de 50 a 70% menor que o da planta convencional (Ogita *et al.*, 2003). O grupo do Laboratório de Expressão de Genes da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia gerou plantas de soja (*Glycine max*) com redução total (níveis indetectáveis) e parcial (redução de 93%) de fitato em sementes maduras por meio do silenciamento do gene da enzima *mio*-inositol 1-fosfato sintase (Nunes *et al.*, 2006). Outro trabalho teve o objetivo de gerar plantas transgênicas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com resistência ao *Bean golden mosaic virus* (BGMV). Para isso foi realizada uma construção para silenciar uma região do gene viral *ACI* e foram obtidas plantas com alta resistência (Bonfim *et al.*, 2007).

Para reduzir o teor de ricina em mamona, uma alternativa seria o silenciamento do gene que codifica essa toxina. Como se acredita que este gene está em várias cópias e em diferentes localizações no genoma da mamona, a melhor opção seria o uso do RNA interferente para silenciar simultaneamente a expressão de vários desses genes nas suas sementes. Isso é possível porque todos esses genes têm alta similaridade (acima de 95%) (Halling *et al.*, 1985). Dessa forma, foi utilizada a construção do tipo intron-hairpin (hpRNA) para a transformação genética por biobalística, onde um sistema de transformação de mamona já está disponível na literatura (Sailaja *et al.*, 2008).

OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi silenciar os genes que codificam a ricina em sementes de mamona geneticamente modificadas e, dessa forma, gerar plantas com redução total ou parcial dessa proteína nas sementes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ajustar a metodologia de cultura de tecidos *in vitro* para a regeneração de plantas geneticamente transformadas de mamona;
- Desenvolver um sistema de introdução de genes por biobalística em *R. communis* L., utilizando como agente seletivo o gene *ahas*, que confere à planta resistência ao herbicida imazapir;
- Obter plantas com redução total ou parcial na concentração de ricina em suas sementes visando o desenvolvimento de uma nova cultivar.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção do vetor para transformação de mamona

Foi utilizado um fragmento do gene *RcRCAI* que codifica a cadeia A da ricina, visto que esta cadeia apresenta a função enzimática responsável pela inativação da subunidade 60S do ribossomo, ou seja, pela toxidez. Assim, a estratégia de RNA interferente (RNAi) foi utilizada para o bloqueio da expressão desse gene.

O DNA total de tecidos frescos foi isolado utilizando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Para a clonagem dos fragmentos do gene *RcRCAI* foram usadas reações de PCR, segundo Nunes *et al.* (2006). Foram adicionados sítios das enzimas *KpnI/XhoI* e *HindIII/XbaI* na extremidade de cada primer. Um fragmento de aproximadamente 480 pb foi amplificado por PCR e clonado no vetor pGEM-TEasy.

Os fragmentos amplificados do gene *RcRCAI* foram inseridos no vetor pKANNIBAL (Wesley *et al.*, 2001) tanto no sentido sense como no antisense para permitir a expressão de um RNA de fita dupla que será a fonte para geração de RNAs interferentes. Desse modo, o novo vetor conteve o cassete, constituído pelo promotor 35SCaMV, o fragmento sense e o fragmento antisense, ambos separados por um íntron, e o terminador. Em seguida, esse cassete de interferência foi transferido para o vetor pAC321, que contém o gene de resistência ao imazapir (*ahas*), utilizado como marcador de seleção. Essa construção foi utilizada para a transformação genética de plantas de mamona por meio de biobalística.

Preparo do material vegetal para a transformação genética

Foram utilizadas as cultivares BRS Paraguaçu e BRS Nordestina, ambas desenvolvidas pela Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.

Sementes de mamona foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 2% e duas gotas de Tween 20 por 20 min. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada estéril e os embriões foram retirados e colocados em meio de cultura MS (*Murashige and Skoog Basal Medium* - Sigma) 4,4 g/L, sacarose 3%, Agar 0,8% e TDZ (tidiazuron) 1 mg/L, no escuro, por quatro dias para facilitar a exposição do meristema apical do caule. Após esse processo, os primórdios foliares foram retirados e o embrião utilizado para a transformação genética.

Curva de seleção para o imazapir

Foi preparada uma curva de seleção para o herbicida imazapir em meio sólido, onde os embriões passaram pelos mesmos processos relacionados ao bombardeamento, exceto na introdução do transgene. Dessa forma, os explantes não foram transformados e foram submetidos a dosagens de 0, 200, 400, 600 e 800 nM de imazapir. Depois de um mês, foi selecionada a dosagem do herbicida que não matou todos os explantes, mas que inibiu o alongamento de brotações.

Para os biorreatores também foi realizada uma curva de seleção em meio líquido, submetendo os embriões às concentrações de 0, 100, 200 e 300 nM de imazapir. Os resultados foram observados após um mês de cultivo nos biorreatores.

Transformação genética e cultura de tecidos

O processo de biobalística foi utilizado na transformação genética dos embriões de mamona, segundo protocolo desenvolvido por Rech & Aragão (1998).

Inicialmente, foi realizado um teste para constatar a eficiência do bombardeamento, com seis repetições. Cada bombardeamento utilizou 10 embriões. Para isso, foram utilizados 60 embriões que passaram pelos procedimentos iniciais de cultura de tecidos *in vitro* e foram bombardeados com o vetor pBI426, segundo Rech & Aragão (1998). Esse vetor contém o gene *gus* e, na presença do substrato específico X-glu (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucoside*), as células transformadas apresentam coloração azul. Vinte e quatro horas após o bombardeamento, os embriões foram colocados nesse substrato por 12 h, a 37 °C e foi verificado o aparecimento dos pontos azuis.

Depois de constatada a presença de células transformadas, iniciou-se os bombardeamentos com o vetor construído para o silenciamento dos genes que codificam a ricina.

Após cada bombardeamento, os explantes foram colocados em meios de cultura com as seguintes constituições:

- *Tratamento 1*: meio de cultura MS 4,4 g/L, sacarose 3%, ágar 0,8% e imazapir 200 nM por aproximadamente 90 dias, até o desenvolvimento das brotações.
- *Tratamento 2*: meio de cultura MS 4,4 g/L, sacarose 3%, ágar 0,8% por uma semana. Em seguida, foram transferidos para meio MS 4,4 g/L, sacarose 3%, ágar 0,8%, imazapir 200 nM, IBA (ácido indol-3-butírico) 1 mg/L, AgNO₃ 0,6 mg/L por aproximadamente 90 dias, até o desenvolvimento das brotações.

Os explantes que sobreviveram à seleção ao imazapir e não alongaram foram transplantados para biorreatores com meio de cultura contendo MS 4,4 g/L, sacarose 3%, benomyl 0,2 g/L e imazapir 200 nM, onde os explantes permaneceram por aproximadamente 30 dias, até ocorrer o alongamento das brotações. Após esse período, foram transplantados para meio sólido contendo MS 4,4 g/L, sacarose 3%, ágar 0,8%, imazapir 200 nM, IBA 1 mg/L, AgNO₃ 0,6 mg/L até a emissão de radícula. Com as raízes desenvolvidas, os explantes foram transplantados para substrato contendo uma mistura de solo e vermiculita e aclimatados em casa de vegetação sob condições controladas de irrigação.

Análises moleculares

A extração de DNA das plantas foi realizada segundo Edwards *et al.* (1991). Análises de PCR (*Polymerase chain reaction*) foram utilizadas para detectar a inserção do fragmento transgene na planta.

Para tanto, foram realizadas reações com os *primers* para o gene *ahas* (AHAS) - AHASP124 (5' -ACTAGAGATTCCAGCGTCAC- 3') e AHAS500C (5' -GTGGCTATACAGATACCTGG- 3') que amplifica um fragmento de aproximadamente 700 pb do gene de resistência ao herbicida imazapir - e para o fragmento Δ RIC - 35SKAN2F (5' - CTACAAATGCCATCATTGCG - 3') e RICREV (5' - CGCTATTTCCAGCTCGGTAG - 3') que amplifica um fragmento de aproximadamente 400 pb entre o promotor 35SCaMV e o fragmento do gene da ricina do cassete de transformação.

Na reação de PCR foram utilizados 0,4 μM do primer, 250 μM de dNTP's, 1,5 μM de MgCl_2 , 1,0 U de Taq DNA polimerase (5 U/ μL) e aproximadamente 20 ng de DNA genômico. Foi utilizado o termociclador MyCyclerTM (Bio-Rad) com temperatura de desnaturação inicial de 95°C por cinco min; 36 ciclos correspondendo à temperatura de desnaturação de 95 °C por um min, temperatura de anelamento do *primer* de 55 °C por um min e temperatura de extensão de 72 °C por um min; e temperatura final de extensão de 72 °C por cinco min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de construção do vetor pode ser observado na Figura 13, onde o fragmento amplificado da ricina foi inserido no vetor pGEM-T Easy. Após esse processo, esses fragmentos foram inseridos no vetor pKANNIBAL com os sítios enzimáticos de *XhoI/KpnI* e *HindIII/XbaI*, no sentido sense e antisense. Assim, o cassete de transformação foi retirado desse vetor e inserido no vetor pAC321 que possui o gene *ahas* (confere resistência ao herbicida imazapir) e atuou como agente seletivo das plantas geneticamente modificadas.

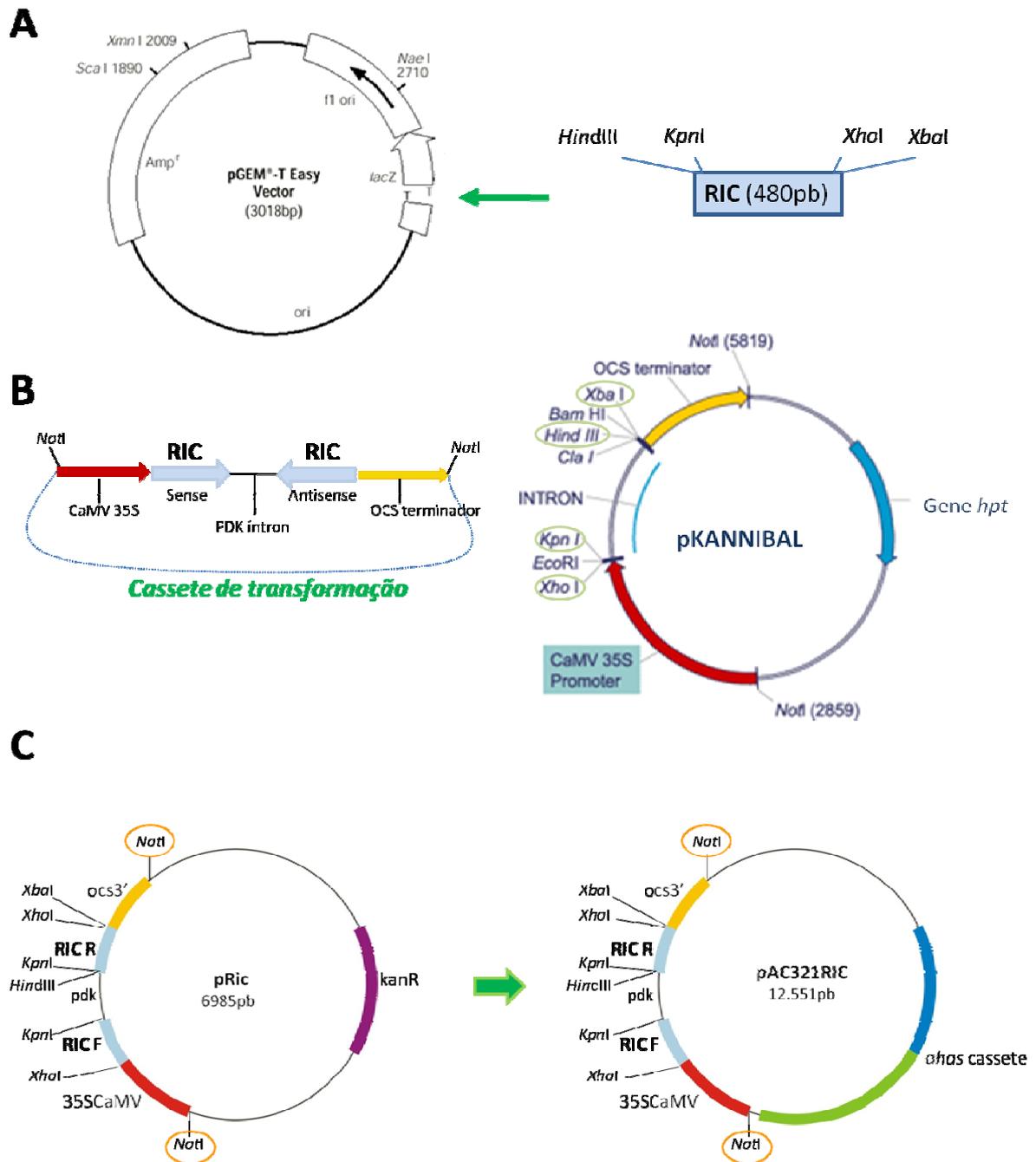


Figura 13: Construção do vetor de transformação. **A)** Fragmento da ricina (480pb) com sítios enzimáticos de *HindIII/KpnI/XhoI/XbaI* inserido no vetor pGEM-T Easy. **B)** Construção do cassete de transformação inserindo no vetor pKANNIBAL o fragmento do gene da ricina (RIC) no sentido sense e anti-sense, retirado do vetor pGEM-T Easy. **C)** O cassete de transformação é retirado do vetor pKANNIBAL com o sítio de *NotI* e inserido no vetor pAC321, gerando o vetor de transformação (pAC321RIC). Esse vetor possui o gene *ahas*, que funcionará como agente seletivo para as plantas transgênicas.

Para determinar a melhor dosagem do herbicida imazapir na seleção de plantas de mamona, inicialmente foi realizada uma curva de seleção em meio de cultura sólido

e uma para meio líquido (Figura 14A e B). O imazapir é um herbicida que se concentra na região do meristema apical da planta. Ele age na inibição da atividade enzimática do ácido acetohidroxi sintase, que catalisa o estágio inicial da biossíntese de isoleucina, leucina e valina. O gene *ahas* foi isolado de *Arabidopsis thaliana* e contém uma mutação na posição 653pb, sendo um agente seletivo de células meristemáticas transgênicas (Aragão *et al.*, 2000; Ivo *et al.*, 2008; Rech *et al.*, 2008).

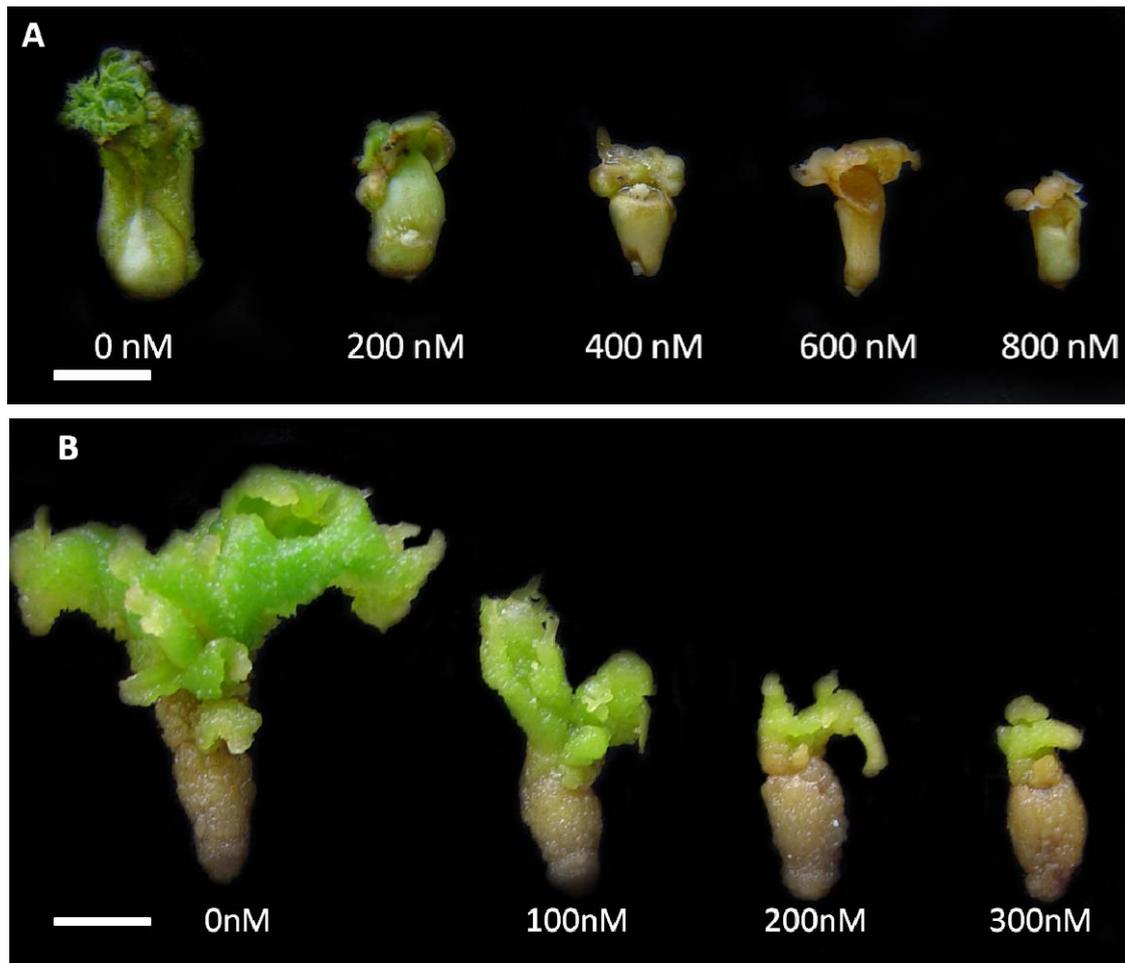


Figura 14: Curva de seleção dos explantes de mamona para o herbicida imazapir em meio de cultura sólido, nas dosagens de 0 nM, 200 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM (A) e em meio de cultura líquido, nas dosagens de 0 nM, 100 nM, 200 nM e 300 nM (B). Barra: 10 mm.

Para o meio de cultura sólido foram usadas as concentrações de 0, 200, 400, 600 e 800 nM (Figura 14A). Foi observado que na dosagem de 0 nM os embriões se desenvolveram normalmente, como esperado. Nas dosagens acima de 400 nM todos os explantes analisados morreram e não se desenvolveram. Na dosagem de 200 nM muitos explantes morreram, mas alguns (aproximadamente 40%) sobreviveram e começaram a

se desenvolver. Dessa forma, a dosagem de 200 nM foi selecionada para ser utilizada nos meios de cultura dos explantes após o bombardeamento. Já para o meio líquido foram testadas as dosagens de 0, 100, 200 e 300 nM (Figura 14B). Foi observado que nas concentrações de 0 nM e 100nM os embriões alongaram, sendo que em 100 nM ocorreu um decréscimo no desenvolvimento. Já em 300 nM não ocorreu alongamento, sendo a dosagem de 200 nM a mais indicada para a seleção dos explantes transformados em meio líquido, uma vez que nesta concentração os embriões sofreram restrições no alongamento, porém não paralisaram seu desenvolvimento.

Antes de iniciar os procedimentos de bombardeamento foram realizados testes para verificar a viabilidade na transformação genética de células por biobalística da região meristemática apical. Em um deles foi observado que de 60 explantes bombardeados com o vetor pBI426 (possuidor do gene *gus*), 42 apresentaram pontos azuis nas regiões meristemáticas, indicando que as células foram transformadas (Figura 15A). Em outra análise com o mesmo vetor (pBI426) um número maior de pontos azuis foi observado (Figura 15B). Alguns fatores podem afetar a eficiência do bombardeamento, dentre eles variações ambientais, como a umidade do ar, que provavelmente influenciou no processo, já que os experimentos ocorreram em épocas diferentes. Em trabalhos com a cultura da soja (*Glycine max*) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), bombardeados com o mesmo vetor, a quantidade de pontos azuis, ou seja, células transformadas expressando o gene *gus* foi similar aos resultados obtidos, indicando a possibilidade de obtenção de plantas geneticamente modificadas (Aragão *et al.*, 1996; Aragão *et al.*, 2000).

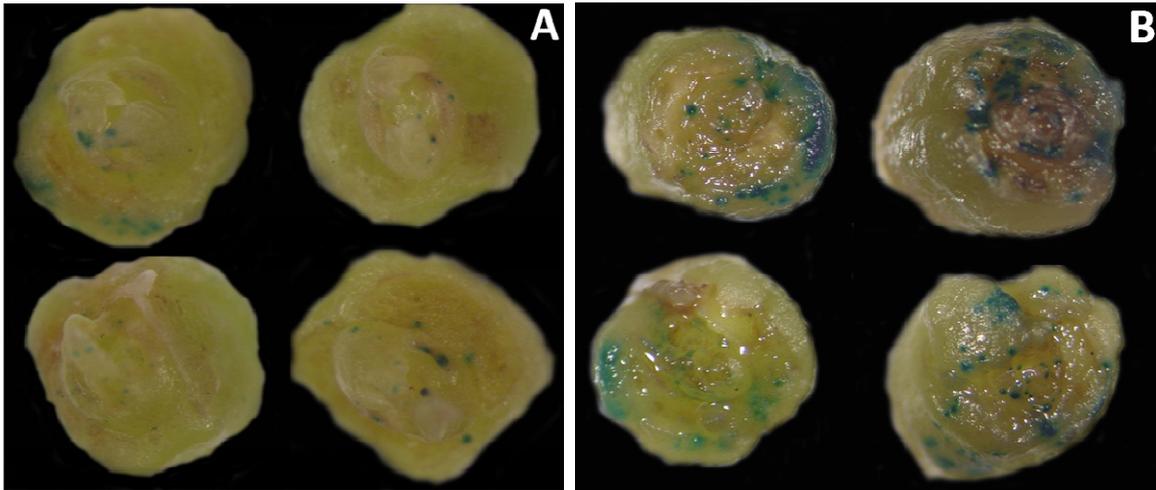


Figura 15: Expressão do gene *gus* em embriões bombardeados com o vetor pBI 426. Os pontos azuis indicam a reação das células transformadas com o substrato X-glu. **A e B:** dois experimentos bombardeados com o mesmo vetor mostrando um grande número de pontos azuis, ou seja, células transformadas.

Para avaliar a eficiência do bombardeamento com o vetor construído para o silenciamento do gene da ricina foram selecionadas ao acaso 100 explantes que passaram pelo processo de seleção ao imazapir e após essa fase, pelo biorreator para o alongamento das brotações. Foram realizadas análises de PCR desses explantes com os *primers* que amplificam um fragmento do gene AHAS e parte dos resultados podem ser observadas na figura 16. Dos 100 explantes analisados, 18 amplificaram o fragmento esperado e um fragmento inespecífico (aproximadamente 700 pb e 1200 pb, respectivamente) e 28 explantes apresentaram apenas a banda esperada. Dessa forma, dos 100 explantes analisados ao acaso, 46 amplificaram o fragmento transgene, indicando elevada frequência de transformação. Problemas na regeneração não permitiram o desenvolvimento completo desses explantes, levando-os a morte. O branco (Br), reação de PCR sem a adição de DNA, e o controle negativo (C-), reação de PCR com DNA de planta não transformada, não amplificaram bandas, como esperado (Figura 16).

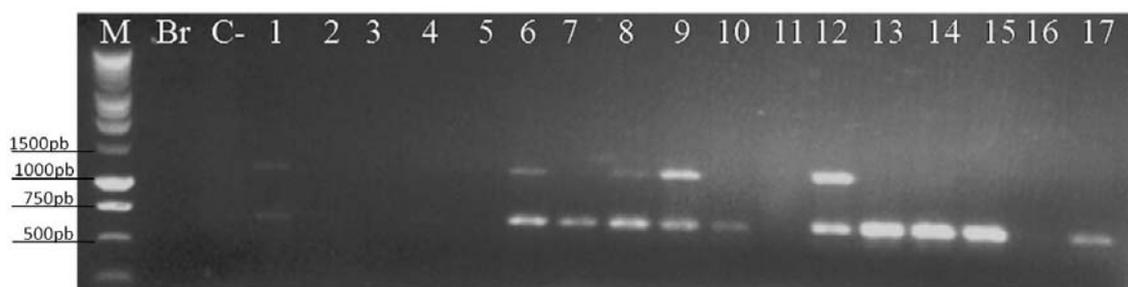


Figura 16: Gel de agarose 1% mostrando as bandas amplificadas na reação de PCR de algumas das plantas analisadas com os *primers* do gene *ahas*, que amplificam um fragmento esperado de aproximadamente 700pb. M: marcador molecular 1Kb DNA ladder (Promega); Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada).

Foi estudado o desenvolvimento dos explantes de mamona em cultura de tecidos *in vitro* com diferentes concentrações de fitorreguladores. No início do processo de bombardeamento, os embriões foram retirados da semente e colocados em meio de cultura por quatro dias, no escuro. Nesse período é importante a adição de reguladores de crescimento que favorecerão o desenvolvimento das brotações posteriormente. Um teste foi realizado visando comparar os reguladores TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina), adicionados ao meio de cultura separadamente. Foi observado em um período após o bombardeamento, um maior número de brotações nos explantes submetidos ao meio com TDZ. Alguns estudos realizados comprovam esses resultados, onde a utilização do TDZ nas fases iniciais resultou no maior número de brotações, se comparado com outros fitorreguladores, como BAP, zeatina, kinetina e adenina (Sujatha & Reddy, 1998; Ahn *et al.*, 2007).

As plantas que passaram pelo processo de transformação por biobalística foram analisadas após um período de quatro meses em contato com o agente seletivo imazapir. Os meios de cultura utilizados (tratamentos 1 e 2) foram testados visando uma maior eficiência no processo de regeneração dos explantes. Foi constatado que o tratamento 2 (meio com IBA, AgNO₃ e imazapir) foi mais eficiente, já que os explantes apresentaram um maior número de brotações e raízes. Nesse caso, o período em que os explantes foram submetidos ao meio de cultura sem o agente seletivo (imazapir) por uma semana propiciou um maior desenvolvimento das brotações, facilitando posteriormente o desenvolvimento dos brotos transgênicos. A adição de nitrato de prata no meio de cultura, associado à auxina IBA estimulou significativamente o enraizamento dos explantes.

O uso de biorreatores foi uma importante ferramenta visando o alongamento dos explantes de mamona em cultivo líquido, na presença do agente seletivo imazapir. Em plantas onde as brotações não alongavam, o uso de biorreatores promoveu o desenvolvimento da parte aérea em um período curto de tempo, de aproximadamente 30 dias. Após esse período, ocorreram problemas de hiperhidricidade do explante, mais conhecida como vitrificação. A hiperhidricidade é definida como o estado fisiológico que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido. Esse estado pode ser consequência da difusão passiva de água dentro dos tecidos ou um distúrbio metabólico da planta (Santos *et al.*, 2001).

O processo de cultura de tecidos em que foram submetidos os embriões que originaram plantas transformadas está exemplificado na figura 17. Os embriões foram retirados da semente e colocados em meio de cultura suplementado com o regulador de crescimento TDZ na concentração de 1mg/L, por quatro dias, no escuro (Figura 17A), permitindo o crescimento dos primórdios foliares e facilitando a exposição do meristema apical durante o processo de bombardeamento. Após o bombardeamento foram observados explantes com muitas brotações (Figura 17B), que foram colocados em meio de cultura com o herbicida imazapir para a seleção dos brotos transgênicos (Figura 17C). Após um período de seleção, os explantes supostamente transgênicos se desenvolveram (Figura 17D), originando plantas alongadas que passaram por análises moleculares para a confirmação da inserção do fragmento transgene no genoma da planta.

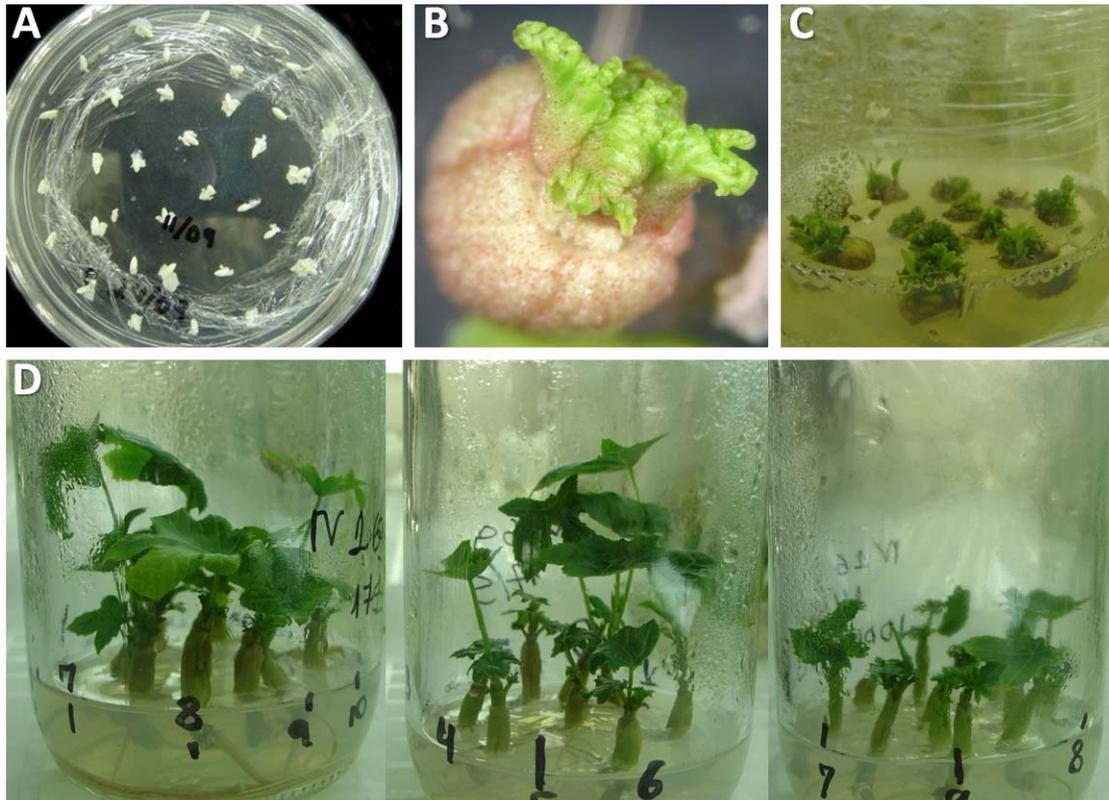


Figura 17: Etapas do processo de cultura de tecidos dos explantes de mamona que passaram pelo processo de bombardeamento. **A)** embriões retirados das sementes e submetidos ao meio com TDZ 1mg/L, no escuro, por 4 dias; **B)** explante após o bombardeamento, depois de uma semana no meio de cultura sem regulador de crescimento; **C)** explantes em meio de cultura com seleção (imazapir); **D)** explantes com brotações alongadas e raízes.

Foram realizados 21 bombardeamentos, totalizando 4.280 embriões bombardeados. O resumo dos bombardeamentos e plantas analisadas por PCR podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8: Resumo dos bombardeamentos mostrando o número de embriões bombardeados, plantas alongadas sob seleção e número de plantas com reação positiva para PCR.

Bombardeamento n°	Cultivar ¹	N° de embriões bombardeados	Plantas alongadas sob seleção	Plantas positivas ²	
				AHAS	ΔRIC
1	PAR	220	2	1	1
2	PAR	190	5	4	2
3	PAR	220	0	0	0
4	PAR	230	0	0	0
5	PAR	240	0	0	0
6	PAR	240	0	0	0
7	PAR	240	0	0	0
8	PAR	200	2	1	0
9	PAR	230	8	1	0
10	PAR	210	6	1	0
11	PAR	200	0	0	0
12	PAR	260	2	1	0
13	PAR	230	0	0	0
14	PAR	240	0	0	0
15	PAR	220	31	3	0
16	PAR	230	0	0	0
17	PAR	150	12	2	1
18	NOR	80	18	4	2
19	NOR	150	0	0	0
20	NOR	150	0	0	0
21	PAR	150	0	0	0
TOTAL		4.280	86	18	6

¹PAR:cultivar BRS Paraguaçu, NOR: cultivar BRS Nordestina; ² plantas positivas em análise de PCR com os *primers* que amplificam um fragmento do gene *ahas* (AHAS) e um fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação (ΔRIC).

Foram realizados bombardeamentos em duas cultivares comerciais, BRS Paraguaçu e BRS Nordestina, sendo em ambas a ocorrência de plantas transformadas.

Dos 4.280 explantes bombardeados, apenas 86 alongaram, sendo que na maioria iniciou-se o processo formação de raízes (Tabela 8). Dessas 86 plantas alongadas, 18 apresentaram a reação de PCR positiva para o *primer* que amplifica um fragmento do gene *ahas*, o agente seletivo (Figura 18), indicando que o fragmento transgene foi inserido na planta.

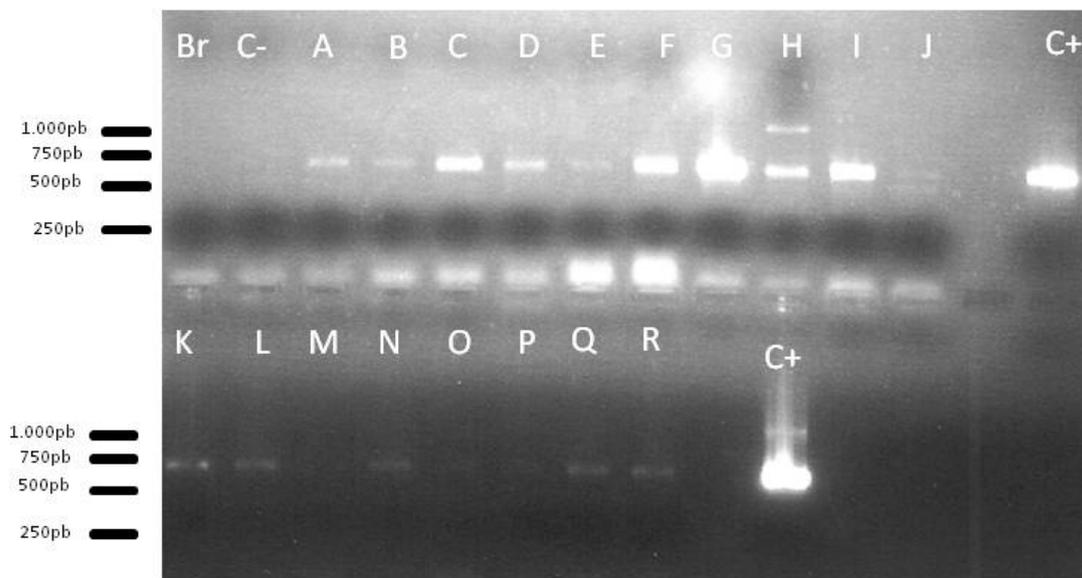


Figura 18: Gel de eletroforese 1% mostrando a amplificação de uma banda de aproximadamente 700pb, correspondente ao fragmento do gene *ahas*. Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada); C+: controle positivo (reação de PCR com o vetor de transformação).

As mesmas plantas que foram positivas na reação de PCR para o gene *ahas* foram submetidas à outra análise de PCR com *primers* que amplificam um fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação. Os resultados podem ser observados na figura 19.

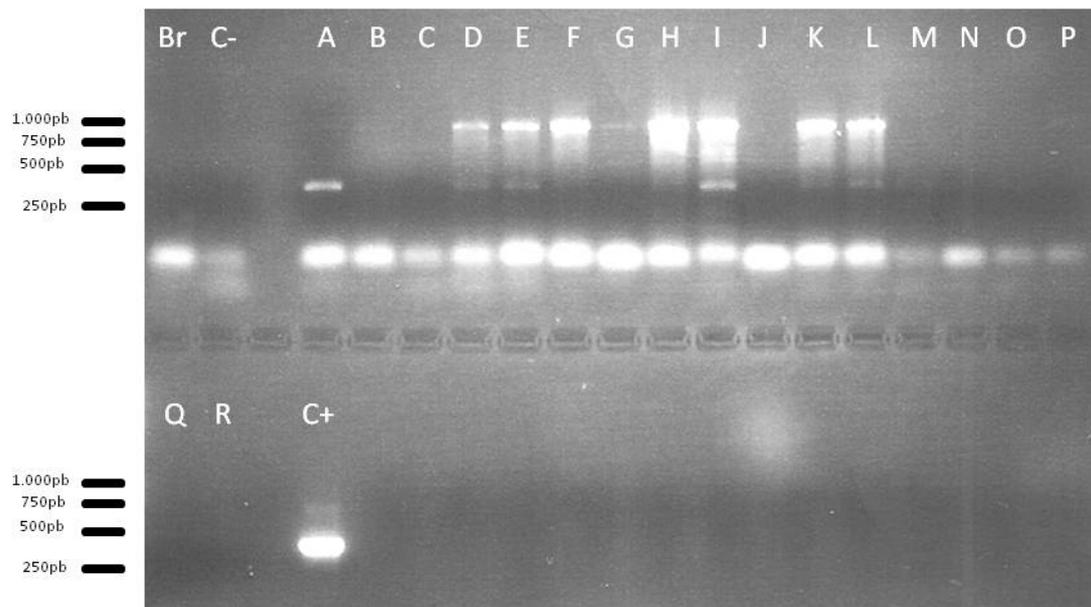


Figura 19: Gel de eletroforese 1% mostrando a amplificação de uma banda de aproximadamente 400pb, correspondente ao fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação. Br: branco (reação de PCR sem DNA); C-: controle negativo (reação de PCR com o DNA de planta não transformada); C+: controle positivo (reação de PCR com o vetor de transformação).

Das 18 plantas analisadas, apenas seis (A, D, E, I, K, L) amplificaram o fragmento esperado na reação de PCR. Além disso, amplificou também um fragmento inespecífico de aproximadamente 1.000pb, que não ocorreu na planta A. Por meio do seqüenciamento desse fragmento inespecífico chegou-se a conclusão que ele não corresponde ao gene da ricina em mamona (Figura 19).

As plantas analisadas para o gene seletivo (*ahas*) e para o fragmento dentro do cassete de transformação (Δ RIC) estão distribuídas na tabela 9. Das 18 plantas positivas para o gene *ahas*, apenas 6 apresentaram reações positivas para os *primers* Δ RIC (A, D, E, I, K, L). Essas plantas estão em processo de aclimação e serão necessárias outras análises moleculares para confirmar a transformação. Plantas com o gene da ricina silenciado serão úteis no processo produtivo da mamoneira, já que essa proteína se encontra na torta de mamona e impede a destinação do resíduo para a alimentação animal (Chierice & Claro Neto, 2007).

Tabela 9: Plantas analisadas por PCR com os *primers* para um fragmento do gene *ahas* (AHAS) e para um fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação (Δ RIC).

Planta	AHAS¹	ΔRIC¹
A	+	+
B	+	-
C	+	-
D	+	+
E	+	+
F	+	-
G	+	-
H	+	-
I	+	+
J	+	-
K	+	+
L	+	+
M	+	-
N	+	-
O	+	-
P	+	-
Q	+	-
R	+	-

¹ +: plantas com PCR positivo; -: plantas com PCR negativo.

A frequência de transformação foi de 0,35% (baseado no número de plântulas geneticamente modificadas, analisadas por PCR, em relação ao número total de embriões zigóticos bombardeados), valor dentro do encontrado na literatura. Em trabalhos com transformação de mamona mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram encontrados valores de frequência de transformação de 0,08% (baseado em análises de PCR, RT-PCR, PCR-Southern blot e análise das progênies para detecção do gene *hpt*) e 0,42% (baseado em análises de Southern blot para detecção do gene *gus*) (Sujatha & Sailaja, 2005; Malathi *et al.*, 2006). Sailaja *et al.* (2008) trabalhando com transformação de mamona por biobalística conseguiu valores de eficiência de transformação de 1,4%, baseado em análises de PCR e Southern blot para detecção do gene *hpt*.

CONCLUSÕES

- A curva de seleção para o herbicida imazapir foi estabelecida para a mamona, sendo a dosagem de 200nM a recomendada tanto para meio sólido quanto para meio líquido;
- O sistema de transformação é eficiente, sendo possível a obtenção de tecidos transformados;
- Em cultura de tecidos, o regulador TDZ foi mais eficiente na indução de brotações que o BAP. A adição de IBA e AgNO₃ ao meio de cultura foi importante para o alongamento das brotações e enraizamento dos explantes. O uso de biorreatores visando o alongamento dos explantes foi eficiente por curtos períodos;
- É possível obter plantas geneticamente modificadas de mamona usando imazapir como agente seletivo. O sistema de transformação genética por biobalística apresentou uma eficiência similar a outros sistemas de transformação de mamona, embora tenha mostrado uma frequência inferior ao sistema descrito por Sailaja *et al.* (2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Devido à importância da mamona para a indústria e a possibilidade de utilizar o material residual da extração do óleo como fertilizante ou alimento para animais, há considerável interesse em reduzir o teor de ricina nas sementes usando pesquisas de melhoramento clássico e molecular. No entanto, a compreensão da expressão da proteína a nível celular é fundamental para: (1) o desenvolvimento de construções com seqüências regulatórias envolvendo a adequada expressão temporal e espacial; (2) um método efetivo de rastreamento individual de mutantes/transformantes com sucesso no bloqueio da expressão do gene da ricina e (3) a análise de biossegurança dos eventos transgênicos.

Dessa forma, o presente trabalho buscou estudar a proteína ricina, permitindo identificar seu acúmulo durante o desenvolvimento da semente de mamona. Além disso, foram obtidas plantas transgênicas com redução total ou parcial da ricina, e que agora serão analisadas em ensaios com animais, além de análises moleculares como ELISA, Southern blot, *Northern blot*, *Western blot* e imunoenaios visando a localização da ricina nas células do endosperma da semente. As descendências serão avaliadas para confirmar a herança do silenciamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003) RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p.657-685.
- Ahn Y-J, Vang L, McKeon TA, Chen GQ (2007) High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43(1): 9-15.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2004) *Biologia molecular da célula*. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga, et al. – 4. ed. – Porto Alegre: Artmed. p. 451-452.
- Amlot PL, Stone MJ, Cunningham D, Fay J, Newman J, Collins R, May R, McCarthy M, Richardson J, Ghetie V, Ramilo, Thorpe PE, Uhr JW, Vitetta ES (1993). A Phase I Study of an Anti-CD22-Deglycosylated Ricin A Chain Immunotoxin in the Treatment of B-Cell Lymphomas Resistant to Conventional Therapy. *Blood*, 82(9): 2624-2633.
- Aragão FJL, Figueiredo SA (2008) RNA interference as a tool for plant biochemical and physiological studies. *A Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology*, 17-50.
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet*, 101: 1–6.
- Aragão FJL, Barros LMG, Brasileiro ACM, Ribeiro SG, Smith FD, Sanford JC, Faria JC, Rech EL (1996) Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 93(1-2):141-150.
- Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005) Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA*, 294(18).
- Auld, DL, Rolfe RD, McKeon TA (2001) Development of castor with reduced toxicity. *Journal of New Seeds* 3(3):61-69.
- Auld DL, Pinkerton SD, Lombard KA, Murphy CK, Lowery CC, Kenworthy KE, Becker WD, Rolfe RD, Ghetie V (2003) Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. *Crop Sci*, 43:746–747.
- Azevedo EC, Neto SC, Chierice GO, Lepienski CM (2009) Aplicação de indentação instrumentada na caracterização mecânica de poliuretana derivada de óleo de mamona. *Polímeros*, 19(4).
- Bafor M, Smith MA, Jonsson L, Stobart K, Stymne S (1991) Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochem. J.*, 280: 507-514.
- Beltrão NEM & Azevedo DMP (2007) Fitologia In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, pag 119-137.
- Beltrão NEM & Lima RLS (2007) Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, pag 397-416.

- Beltrão NEM, Azevedo DMP, Lima RLS, Queiroz WN, Queiroz WC (2007) Ecofisiologia In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, pag 45-72.
- Beltrão NEM & Severino LS (2006) Ecofisiologia. In: Severino LS, Milani M, Beltrão NEM (editores técnicos) *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.172-179.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira E, Mendes EA, Aragão FJL (2007) RNAimediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *MPMI*, 20: 717–726.
- Carthew RW (2001) Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:244–248.
- Castro RD, Bradford KJ, Hilhorst HWM (2004) Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In Ferreira AG & Borghetti F (eds) *Germinação - Do básico ao aplicado* Porto Alegre: Artmed Editora.
- Chen GQ, He X & Mckee TA (2005) A simple and sensitive assay for distinguishing the expression of ricin and *Ricinus communis* agglutinin genes in developing castor seed (*R. communis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 53: 2358-2361.
- Chierice GO, Claro Neto S (2007) Aplicação industrial do óleo In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, pag 419-447.
- Coutinho WM & Suassuna ND (2006) Doenças da Mamoneira. In: Severino LS, Milani M, Beltrão NEM (editores técnicos) *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.108-122.
- Department of Health and Human Services, USA (2004) Disponível em: <<http://www.hhs.gov/>>. Acesso em: 10 de outubro de 2006.
- Dyxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews – Molecular Cell Biology*, 4: 457-467.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genome DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*, 19: 1349.
- Eiklid K, Olsnes S, Pihl A (1980) Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res*, 126: 321-326.
- Endo Y, Mitsui K, Motizuki M & Tsurugi K (1987) The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.*, 262: 5908-5912.
- Fire AZ (2007) Gene Silencing by Double-Stranded RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 6966 –6984.
- Freire RMM & Severino LS (2006) Óleo de Mamona. In: Severino LS, Milani M, Beltrão NEM (editores técnicos) *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.210-218.
- Funatsu G, Kimura M, Funatsu M (1979) Primary structure Ala chain of ricin D. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2221-2224.
- Greenwood JS & Bewley JD (1982) Seed development in *Ricinus communis* (castor bean) L. Descriptive morphology. *Can. J. Bot.*, 60: 1751-1760.
- Greenwood JS, Gifford DJ, Bewley JD (1984) Seed development in *Ricinus communis* cv. Hale (castor bean). II. Accumulation of phytic acid in the developing endosperm and embryo in relation to the deposition of lipid, protein, and phosphorus. *Can J Bot*, 62: 255-261.

- Godoy MG, Gutarra MLE, Maciel FM, Felix SP, Bevilaqua JV, Machado OLT, *et al.* (2009) Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 317-322.
- Halling KC, Halling AC, Murray EE, Ladin BF, Houston LL & Weaver RF (1985) Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis* *Nucleic Acids Research*, 13(22): 8019-8033.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature*, 418: 244-251.
- Ivo NL, Nascimento CP, Vieira LS, Campos FAP & Aragão FJL (2008) Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Reports*, 27(9): 1475-1483.
- Jolliffe NA, Brown JC, Neumann UN, Vicre M, Bachi A, Hawes C, Ceriotti A, Roberts LM & Frigerio L (2004) Transport of ricin and 2S albumin precursors to the storage vacuoles of *Ricinus communis* endosperm involves the Golgi and VSR-like receptors. *The Plant Journal*, 39: 821-833.
- Kermode AR, Bewley JD (1989) Developing seeds of *Ricinus communis* L., when detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. *Plant Physiology*, 90: 702-707.
- Knothe G. (2006) A história dos combustíveis derivados de óleos vegetais In: Knothe G, Gerpen JV, Krahl J, Ramos LP *Manual do Biodiesel*, editora Blucher, p. 5-18.
- Lamb FI, Roberts LM, Lord JM (1985) Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preprorin. *Eur. J. Biochem.*, 148: 265-270.
- Lord JM, Roberts LM, Robertus JD (1994) Ricin: Structure, mode of action, and some current applications. *FASEB*, 8: 201-208.
- Lu C, Wallis JG, Browse J (2007) An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library. *BMC Plant Biology*, 7: 42.
- Malathi B, Ramesh S, Rao, KV & Reddy VD (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). *Euphytica*, 147: 441-449.
- Maltman DJ, Gadd SM, Simon WJ, Slabas AR (2007) Differential proteomic analysis of the endoplasmic reticulum from developing and germinating seeds of castor (*Ricinus communis*) identifies seed protein precursors as significant components of the endoplasmic reticulum. *Proteomics*, 7: 1-16.
- Mansoor S, Amin I, Hussain M, Zafar Y, Briddon RW (2006) Engineering novel traits in plants through RNA interference. *TRENDS in Plant Science*, 11(11).
- Maria IC & Ramos NP (2007) Conservação e Manejo do Solo. In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, p. 97-115.
- Moreira JAN, Lima EF, Farias FJC & Azevedo DMP (1996) Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.). Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, *Documentos*, 44: 30p.
- Morel J, Mourrain P, Beclin C & Vaucheret H (2000) DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.*, 10:1591-1594.
- Nunes ACS, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfán J, Capdeville G; Rech EL & Aragão FJL (2006) RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduces phytate content. *Planta*, 224:125-132.
- Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 423: 823-823.

- Olsnes S, Fernandez-Puentes C, Carrasco L, Vazquez D (1975) Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. *Eur J Biochem*, 60: 281-288.
- Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ (2006) Immunotoxin therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6: 559-565.
- Pina M, Severino LS, Beltrão NEM, Villeneuve P, Lago R (2005) Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no Brasil. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, 22(2): 453-462.
- Pinkerton SD, Rolfe R, Auld DL, Ghetie V, Lauterbach BF (1999) Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. *Crop Science*, 39: 53-357.
- Rao PV, Jayaraj R, Bhaskar AS, Kumar O, Bhattacharya R, Saxena P, Dash PK, Vijayaraghavan R (2005) Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 69: 855-865.
- Rech EL, Aragão FJL (1998) Biobalística. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. de C.(ed). *Manual de transformação genética de plantas*, Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 309p.
- Rech EL, Vianna IGR & Aragão FJL (2008) High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nature Protocols*, 3:410 – 418.
- Reddy KRK, Bahadur B (1989) Adventitious bud formation from leaf cultures of castor (*Ricinus communis* L.). *Curr. Sci.* 58:152–154.
- Reddy KRK, Rao GP, Bahadur B (2001) In vitro morphogenesis from seedling explants and callus cultures of castor (*Ricinus communis* L.). *Phytomorphology* 37:337–340.
- Ribeiro SK (2006) Aposta no Biodiesel. *Scientific American Brasil*, 53.
- Roberts LM, Lamb FI, Pappin DJ, Lord JM (1985) The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. *J. Biol. Chem.*, 260:15682-15686.
- Roberts LM, Tregear JW, Lord JM (1992) Molecular cloning of ricin. *Targeted Diagn. Ther.*, 7: 81-97.
- Roberts LM & Lord JM (1981) Protein biosynthetic capacity in the endosperm tissue of ripening castor bean seeds. *Planta*, 152: 420-427.
- Sailaja M, Tarakeswari M, Sujatha M (2008) Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell Reports*, 27(9): 1509-1519.
- Sandvig K, van Deurs B (2000) Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J.*, 19: 5943-5950.
- Santos RB, Paiva R, Paiva PDO, Santana JRF (2001) *Problemas no cultivo in vitro: cultura de tecidos*. UFLA, Lavras, MG, 9:73-79.
- Santos RF dos, Kouri J, Barros MAL, Marques FM, Firmino PT, Requião LEG (2007) Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona. In: Azevedo DMP, Beltrão NEM. *O agronegócio da mamona no Brasil*. Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) 2 ed., Brasília, DF, p. 23-41.
- Savy Filho A (2005) Melhoramento da Mamona. In: Borém A. *Melhoramento de espécies cultivadas*. Viçosa: Ed. UFV, p.429-452.
- Severino LS (2005) O que sabemos sobre a torta de mamona. Embrapa Algodão, Campina Grande (*Documentos* 134), 25 p.
- Severino LS & Freire RMM (2006) Subprodutos. In: Severino LS, Milani M, Beltrão NEM (editores técnicos) *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.220-231.

- Shewry PR, Napier JA, Tatham AS (1995) Seed storage protein: structure and biosynthesis. *Plant Cell*, 7: 945-956.
- Shyu R-H, Shyu H-F, Liu H-W & Tang S-S (2002) Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon*, 40: 255-258.
- Soares JJ & Dias JM (2006) Pragas. In: Severino LS, Milani M, Beltrão NEM (editores técnicos) *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.100-105.
- Sphyris N, Lord JM, Wales R & Roberts LM (1995) Mutational analysis of the Ricinus lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2- γ subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain. *J. Biol. Chem.*, 270: 20292-20297.
- Spitler LE, del Rio M, Khentigan A, Wedel NI, Brophy NA, Miller LL, Harkonen WS, Rosendorf LL, Lee HM, Mischak RP, Kaaliata RT, Stoudemire JB, Fradkin LB, Bautista EE, Scannon PJ (1987) Therapy of patients with malignant melanoma using a monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain immunotoxin. *Cancer Research*, 47: 1717-1723.
- Sujatha M & Reddy TP (1998). Differential cytokinin effects on the stimulation of in vitro shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). *Plant Cell Reports*, 17(6-7): 561-566.
- Sujatha M & Sailaja M (2005) Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell Rep*, 23: 803-810.
- Tregear JW & Roberts LM (1992) The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. *Plant Mol. Biol*, 18: 515-525.
- Tully RE, Beevers H (1976) Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components. *Plant Physiol*, 58: 710-716.
- Yoshitake S, Funatsu G, Funatsu M (1978) Isolation and sequences of peptic peptides and the complete sequene of Ile chain of ricin *D. Agric. Biol. Chem.*, 42:1267-1274.
- Youle RJ, Huang AHC (1976) Protein bodies from the endosperm of castor bean. Subfractionation, protein components. lectins, and changes during germination. *Plant Physiol*, 58: 703-709.
- Youle RJ & Huang AHC (1978) Evidence that castor bean allergens are storage proteins in the proteins bodies of castor bean. *Plant Physiol*, 61: 1040-1042.
- Wawrzynczak EJ (1991) Systemic immunotoxin therapy of cancer: advances and prospects. *Br. J. Cancer*, 64, 624-630.
- Wesley SV, Heliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 27(6): 581-590.