



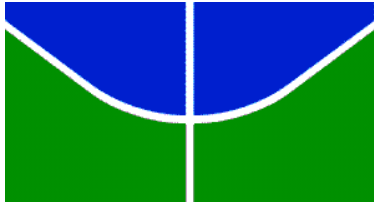
**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE  
MAMONA (*Ricinus communis* L.) – AS BASES PARA O SILENCIAMENTO DA  
RICINA.**

**NATÁLIA LIMA DE SOUSA**

**BRASÍLIA - DF**

**2013**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE  
MAMONA (*Ricinus communis* L.) – AS BASES PARA O SILENCIAMENTO DA  
RICINA.**

**NATÁLIA LIMA DE SOUSA  
ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ LIMA ARAGÃO**

**Dissertação apresentada ao Departamento  
de Botânica do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade de Brasília  
como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Botânica.**

**BRASÍLIA – DF**

**2013**

**NATÁLIA LIMA DE SOUSA**

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS PARA TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE  
MAMONA (*Ricinus communis* L.) – AS BASES PARA O SILENCIAMENTO DA RICINA.**

Dissertação aprovada junto ao programa de pós-graduação em botânica da Universidade de  
Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Botânica.

Banca examinadora:

---

Dr. Francisco José Lima Aragão

---

Dr. Giovanni Rodrigues Vianna

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Laine Penha Tinoco

---

Dra. Glauca Barbosa Cabral

BRASÍLIA-DF

2013

Dedico este trabalho aos meus amados pais  
Ozéias e Vera por sempre me apoiarem.

## **Agradecimentos**

Agradeço à meus pais e meus irmãos por todo o apoio. Aos meus familiares que me incentivaram diante de meus sonhos. E ao meu namorado Tomas Felipe por todo o apoio e ajuda.

À meu orientador, Dr. Francisco J. L. Aragão por toda a ajuda, ensinamentos e oportunidades.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a Agricultura Tropical Elsa, Glaucia, Angélica, Cristiane, Cristiana, Paty, Thaís, Maria Laine, Carolzinha, Francyele, Lídia, Pedro, Leo, Rebeca, Mirella, Felipe, Ana Zotta, Abdul e Pabline pela amizade, ajuda e aprendizado proporcionado. Em especial á Danieli pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Aninha do Laboratório de Microscopia pela amizade, orientação e toda a ajuda nas análises microscópicas.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por disponibilizar o laboratório e equipamentos possibilitando a realização do trabalho, à FUNARBE pelo apoio financeiro e à Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola por disponibilizar o material vegetal.

Por fim agradeço a todos que me ajudaram e possibilitaram a conclusão desse trabalho.

## Resumo

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância na indústria por seu óleo apresentar características únicas como alta viscosidade, densidade e estabilidade. A torta de mamona é o subproduto de maior importância da cultura usada principalmente como adubo, com grande potencial de uso como ração animal. No entanto, a presença de ricina (proteína tóxica) no endosperma das sementes da mamona, inviabiliza a utilização em larga escala do seu principal subproduto, sendo necessário um processo de destoxificação da torta. Porém os vários métodos que têm sido desenvolvidos não são viáveis ao nível industrial por serem caros ou ineficientes. Uma alternativa para a redução do teor de ricina nas sementes de mamona é o silenciamento do gene da ricina por RNA interferente, mas os trabalhos de transformação genética de mamona na literatura são escassos e a cultura de tecidos da mamona precisa ser aperfeiçoada. O objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas de transformação genética de mamona e otimizar a cultura de tecidos para produzir plantas transgênicas. Embriões zigóticos maduros da cultivar EBDA-MPA-34 foram cultivados em meio MS suplementado com diferentes citocininas, BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>; 2,5 mg.L<sup>-1</sup> ou 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) ou TDZ (0,5 mg.L<sup>-1</sup>; 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ou 2,5 mg.L<sup>-1</sup>) e controle (sem fitorregulador). Três explantes por tratamento foram analisados por microscopia eletrônica de varredura após diferentes períodos de cultivo para avaliar a indução de gemas. As cultivares BRS Nordestina, BRS Paraguaçu e EBDA-MPA-34 foram utilizadas para transformação genética usando genes marcadores que conferem tolerância ao IMZ ou higromicina em vetores para bombardeamento ou transformação via agrobactéria, respectivamente. Ambos os vetores contêm uma construção de RNAi onde a região mais conservada do gene da ricina foi clonada de forma repetida e invertida para formar a estrutura de grampo, e está sob domínio do promotor 35SCaMV. Os sistemas de biobalística e *A. tumefaciens* foram utilizados para transformar embriões zigóticos maduros de mamona previamente induzidos na presença de diferentes citocininas. Foram obtidos seis brotos transformados via biobalística, um da variedade BRS Nordestina confirmado por PCR e os outros cinco da variedade EBDA-MPA-34 expressando *gus*. Para promover superbrotação em mamona o melhor fitorregulador foi TDZ e dentre as cultivares testadas a EBDA-MPA-34 foi a melhor opção para transformação genética nas condições testadas.

**Palavras-chave:** RNAi, ricina, cultura de tecidos, biobalística, *A. tumefaciens*, MEV.

## Abstract

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oilseed crop of great importance in the industry because of the oil unique features like the high viscosity, density and stability. The castor meal is the most important byproduct of the culture, being used mainly as a fertilizer, with great potential for use as animal feed. However, the presence of ricin (a toxic protein) in the endosperm of the seeds of castor bean, prevents the large scale use of its main by-product, requiring detoxification process of the meal. However the various methods that have been developed are not viable at industrial level because they are expensive or inefficient. An alternative to reducing the amount of ricin in the seeds of castor beans is the ricin gene silencing by RNA interference, but the genetic transformation of castor literature is scarce and the tissue culture of castor needs to be improved. The aim of this study was to develop genetic transformation systems for castor and optimize tissue culture to produce transgenic plants. Mature zygotic embryos of cultivar EBDA-MPA-34 were cultured on MS medium supplemented with different cytokinins, BAP (0.5 mg L<sup>-1</sup>, 2.5 mg L<sup>-1</sup> or 5.0 mg L<sup>-1</sup>) or TDZ (0.5 mg L<sup>-1</sup>, 1.0 mg L<sup>-1</sup> or 2.5 mg L<sup>-1</sup>) and control (without plant regulator). Three explants per treatment were analyzed by scanning electron microscopy after different periods of cultivation to assess bud induction. Cultivars BRS Nordestina, BRS Paraguaçu and EBDA-MPA-34 were used for genetic transformation using marker genes that confer resistance to hygromycin or imazapyr in vectors for transformation via *Agrobacterium* or biolistic, respectively. Both vectors contain a RNAi construct where the most conserved region of the ricin gene has been cloned and inverted repeatedly to form the clamp structure and is under the control of the promoter 35SCaMV. Biolistic and *A. tumefaciens* systems were used to transform mature zygotic embryos of castor previously induced in the presence of different cytokinins. Six transgenic plants were obtained via biolistic one of the variety BRS Nordestina was positive by PCR and another five of the variety EBDA-MPA-34 expressing *gus*. To promote the best shoots in castor plant regulator TDZ and is among the cultivars tested EBDA-MPA-34 was the best option for genetic transformation in the conditions tested.

**Keywords:** RNAi, ricin, tissue culture, biolistic, *A. tumefaciens*, SEM.

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Mamoneira (*Ricinus communis* L.) evidenciando as folhas com inserção do pecíolo na região central do limbo (A); Inflorescência com flores femininas na parte superior e masculinas na parte inferior (B) e Frutos do tipo tricoca (C). ..... 14
- Figura 2:** Estrutura do alcalóide ricinina (retirado de Ferraz 1999). ..... 17
- Figura 3:** Modo de ação da ricina. A) A Cadeia A da ricina com o sítio enzimático, ligada por ponte dissulfeto à Cadeia B com os sítios de ligação a carboidratos. B) A Cadeia B se liga a carboidratos presentes na superfície da célula fazendo a ricina penetrar por endocitose. A ricina pode seguir então três caminhos distintos: ser exocitada, ir para os lisossomos e ser degradada ou seguir para o complexo de Golgi. C) do Complexo de Golgi a ricina segue para o retículo endoplasmático onde a ponte dissulfeto que liga as cadeias é desfeita e a Cadeia A segue para o citoplasma. D) Livre no citoplasma a Cadeia A ao encontrar um ribossomo remove um resíduo de adenina do laço ribossomal da subunidade 60S, inativando a síntese de proteínas. (Adaptado de Audi *et al.*, 2005). ..... 20
- Figura 4:** Mecanismo do RNAi. A RNase tipo-III Dicer encontra o dsRNA e o cliva em vários siRNAs, estas são associadas a RISC que separa as fitas e usa uma delas para direcioná-las a novos mRNAs os quais serão então clivados. (Adaptado de Waterhouse & Helliwell, 2003). ..... 22
- Figura 5:** Construção do cassete de RNAi da região conservada do gene da ricina nos sentidos senso e antisenso com intron *pdk* entre ambas dirigido pelo promotor CaMV35S e terminador *ocs* (A); que foi inserido no vetor binário pCAMBIA 1303 nos sítios de *Pst*I e *Eco*RI (B) para transformação via *Agrobacterium*; gerando o vetor binário pRICRNAi-Agro (C)..... 30
- Figura 6:** Construção do vetor pRICRNAi. O cassete de RNAi da região conservada do gene da ricina nos sentidos senso e antisenso com intron *pdk* entre ambas dirigido pelo promotor CaMV35S e terminador *ocs* (A) foi clonado no sítio da enzima *Not*I no vetor pAG1 (B) formando o vetor para bombardeamento pRICRNAi (C)..... 36
- Figura 7:** Micrografia Eletrônica de Varredura de embriões cultivados em meio com TDZ (0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ou 2,5 mg.L<sup>-1</sup>) ou BAP (0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 2,5 mg.L<sup>-1</sup> ou 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) por 1, 4 e 8 dias. Barras correspondem aos dias 1, 4 e 8 por 100, 300 e 600 µm, respectivamente..... 38
- Figura 8:** Curva de seleção do herbicida IMZ para embriões de mamona da cultivar EBDA-MPA-34. Concentração do herbicida nas plantas da esquerda para a direita: 0 nM, 100 nM, 200 nM e 300 nM. Barra: 10 mm. .... 40
- Figura 9:** Expressão do gene *gus* em explantes bombardeados com o vetor pRICRNAi. Os pontos azuis indicam os locais onde houve transformação. A e B são embriões de um mesmo



bombardeamento enquanto C e D são de transformação em outro dia. Mostram um grande número de regiões transformadas. Barra 1 mm. .... 40

**Figura 10:** Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de bandas de cerca de 700 pares de bases que correspondem ao fragmento amplificado para o *ahas*. M: Marcador de peso molecular (1kb ladder, Invitrogen), Br: Branco (reação de PCR sem DNA), C-: Controle negativo (reação de PCR com DNA de planta não transformada) 1: ramo 1 da plântula B1, 2: ramo 2 da plântula B1, 3: plântula B2 e C+: Controle positivo (reação de PCR com DNA do vetor de transformação), ambas as plântulas analisadas são da variedade nordestina. .... 43

**Figura 11:** Detecção de *gus* em ensaio histoquímico com X-gluc mostrando pedaços das folhas das plântulas transformadas via biobalística. A: EBDA 1; B: EBDA 2; C: EBDA 3; D: EBDA 4; E: EBDA 5; F: ramo 1 da EBDA 3; G: ramo 2 da EBDA 3; H: ramo 3 da EBDA 3 e I: ramo 4 da EBDA 3. .... 43

**Figura 12:** Etapas do sistema de regeneração de mamona. A: Embriões retirados das sementes cultivados em meio com TDZ 1mg.L<sup>-1</sup>. B: Explantes cultivados por 10 dias após o bombardeamento em meio com TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> e IMZ 100. C: Explantes cultivados por 10 dias após o bombardeamento em meio com BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. D: Explantes positivos para o *gus* em estágio de enraizamento. E: Planta aclimatizada que se desenvolveu e enraizou em meio com seleção. F: Planta em casa de vegetação. .... 44

**Figura 13:** Expressão de *gus* em explantes transformados via *Agrobacterium tumefaciens*. No quinto dia de cocultura, no tratamento com infiltração (A) e no tratamento com sonicação e infiltração (B). Dez dias após a co-cultura em explantes que passaram pelo tratamento de infiltração (C) e pelo tratamento de sonicação e infiltração (D). Barra: 5 mm. .... 45

**Figura 14:** Expressão de *gus* em explantes que não tiveram a ponta da radícula cortada durante a transformação (A) e em explantes que tiveram a ponta da radícula cortada (B). Barra: 2 mm. .... 45

**Figura 15:** Corte manual dos explantes transformados via *Agrobacterium tumefaciens* mostrando a expressão do *gus* dentro do explante que teve a radícula cortada (A) e no explante que não teve a radícula cortada (B). Barra: 0,5 mm. .... 46

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Componentes da torta de mamona em percentual. ....	17
<b>Tabela 2:</b> Resposta morfogênica de embriões zigóticos maduros de mamona cv XXX cultivados na presença de BAP (0; 0,5 mg.L <sup>-1</sup> ; 2,5 mg.L <sup>-1</sup> ou 5,0 mg.L <sup>-1</sup> ) ou TDZ (0; 0,5 mg.L <sup>-1</sup> , 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ou 2,5 mg.L <sup>-1</sup> ). ....	39
<b>Tabela 3:</b> Resumo dos diferentes tratamentos dos bombardeamentos, mostrando os tipos de reguladores de crescimento no MMPré, o tempo que os embriões permaneceram no meio MMPré no escuro, o tipo de regulador no MMPós e a concentração inicial de IMZ no MSA. ....	42
<b>Tabela 4:</b> Resumo dos bombardeamentos mostrando o número de embriões bombardeados para cada cultivar em cada tratamento, suas médias e o número de plantas positivas. ....	42
<b>Tabela 5:</b> Dados completos de bombardeamento no Tratamento 1. ....	47
<b>Tabela 6:</b> Dados completos de bombardeamento no Tratamento 2. ....	49
<b>Tabela 7:</b> Dados completos de bombardeamento no Tratamento 3. ....	49

## Lista de abreviaturas e Siglas

AG<sub>3</sub> = ácido giberélico  
AIA = ácido indolacético  
AIB = ácido indolbutírico  
ANA = ácido 1-naftalenoacético  
AS = acetoseringona  
BAG = banco de germoplasma  
BA = N<sup>6</sup>- benziladenina  
BAP = 6-benzilaminopurina  
CB-1A = alergênicos da mamona (Castor Bean Allergen)  
DNA = ácido desoxirribonucléico  
DO = densidade ótica  
DO<sub>600</sub> = densidade ótica a 600 nanômetros  
dsRNA = RNA fita-dupla  
h = hora(s)  
IMZ = imazapyr  
KDa = kilodalton(s)  
cin = cinetina  
Mb = Megabases  
min = minuto(s)  
mRNA = RNA mensageiro  
pb = pares de bases  
PCR = reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)  
RCA = *Ricinus communis* Aglutinina  
Ri = indutor de raízes (*rooting inducing*)  
RIP = Proteínas inativadoras de ribossomos  
RISC = complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced silencing complexes)  
RNA = Ácido ribonucléico  
RNAi = RNA interferente  
SGPTS = Silenciamento Gênico Pós-Transcricional  
SGT = Silenciamento Gênico Transcricional  
siRNA = pequenos RNAs interferentes  
t = toneladas  
T-DNA = DNA de transferência (*transfer DNA*)  
TDZ = thiadizuron  
Ti = indutor de tumor (*tumour inducing*)  
UV = ultravioleta

## Índice

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	x
Lista de abreviaturas e Siglas.....	xii
1. Revisão bibliográfica.....	14
1.1 A mamona ( <i>Ricinus communis</i> L.) – características botânicas.....	14
1.2 A cultura da mamona.....	15
1.3 O óleo de rícino.....	16
1.4 A torta de mamona.....	17
1.5 Os compostos que causam a toxicidade da mamona.....	18
1.6 Técnica de RNAi.....	22
1.7 As técnicas de transformação de plantas.....	24
1.8 Genes marcadores.....	25
1.9 A cultura <i>in vitro</i> da mamona.....	26
2. Justificativa.....	28
3 Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. Material e Métodos.....	30
4.1 Construção dos vetores.....	30
4.2 Material vegetal para a transformação genética.....	31
4.3 Indução de embriões zigóticos em BAP ou TDZ.....	32
4.4 Curva de seleção.....	33
4.5 Teste de eficiência de biobalística.....	33
4.6 Transformação genética via biobalística.....	33
4.7 Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
4.8 Ensaio histoquímico para avaliar a expressão do gene <i>gus</i> .....	35
4.9 PCR.....	35
5. Resultados e discussão.....	36

5.1 Construção dos vetores.....	36
5.2. Indução de embriões zigóticos em BAP ou TDZ.....	37
5.3 Curva de seleção.....	39
5.4 Teste de eficiência de bombardeamento.....	40
5.5 Transformação via biobalística.....	41
5.6 Transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	44
6. Conclusão .....	47
7. Referências bibliográficas .....	48
8. Apêndice I.....	58
9. Apêndice II .....	60

## 1. Revisão bibliográfica

### 1.1 A mamona (*Ricinus communis* L.) – características botânicas

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa que pertence ao grupo das Angiospermas, Ordem Malpighiales, Família Euphorbiaceae e gênero monoespecífico *Ricinus* L. (APG, 2009; Souza & Lorenzi, 2005). A espécie é polimórfica e possui seis subespécies e 25 variedades botânicas que apresentam uma grande variação em diversas características como tamanho e cor de sementes, cor de folhas, cor de caule e características do óleo (Milani *et al.*, 2009).

A mamoneira foi a primeira espécie da Família Euphorbiaceae a ter o genoma totalmente sequenciado, sendo que este contém 350.6 Mb (Chan *et al.*, 2010). É uma planta diplóide com  $2n = 20$  cromossomos (Savy Filho, 2005).

A mamoneira é um arbusto, às vezes uma árvore, podendo chegar a 15 m de comprimento, sendo que a altura sofre influência genética e ambiental. Seu ciclo varia de anual a semiperene com plantas podendo chegar a viver por dez anos (Milani *et al.*, 2006).

O caule é cilíndrico e pode atingir até 30 cm de diâmetro na base, podendo variar quanto à rugosidade, presença de cera, cor e nós, sendo bem definidos com cicatrizes foliares. Sua cor pode ser verde, vermelha, rosa ou arroxeadada e é nodoso e geralmente fistuloso (Rodrigues *et al.*, 2002; Milani *et al.*, 2009).

As folhas são simples e alternas e medem de 15 a 40 cm (Rodrigues *et al.*, 2002). São palmatiformes podendo ter de sete a onze lobos com lâmina foliar de até 20 cm com margens denticulatas (Milani *et al.*, 2009). Os pecíolos são longos e cilíndricos, podendo chegar a 60 cm de comprimento e até dois cm de diâmetro, providos de glândulas epidérmicas e estípulas grandes, ovais e amareladas unidas em volta das gemas. O pecíolo se insere na região central do limbo (Figura 1A) onde se encontram duas formações de glândulas (Rana *et al.*, 2012; Ghrabi, 2005). As folhas variam em cor, quantidade de glândulas, cerosidade e profundidade dos lóbulos (Milani *et al.*, 2009).

A inflorescência ocorre no ápice do ramo principal e nos ramos laterais de forma gradativa de acordo com o surgimento dos ramos. É uma cima dicásica com as flores femininas na parte superior e as masculinas na parte inferior (Figura 1B), podendo ocorrer também apenas flores femininas ou masculinas (Milani *et al.*, 2009). As flores femininas são sésseis na parte superior, possuem brácteas triangulares e estigmas vermelhos ou

avermelhados tripartidos (Rodrigues *et al.*, 2002). As flores masculinas contêm filetes ramificados em estames indefinidos e as anteras possuem tecas globulares separadas com muitos lóculos de pólen. O pólen é expelido por deiscência das anteras e dispersado pelo vento (Ghrabi, 2005; Rodrigues *et al.*, 2002).

A reprodução é do tipo mista, podendo ocorrer tanto autofecundação, com taxas de 5 a 65%, quanto cruzamento ao acaso, sendo que não existem barreiras que impeçam o cruzamento entre as subespécies, gerando híbridos (Rodrigues *et al.*, 2002).

Os frutos são do tipo cápsula tricoca com aparência globosa (Figura 1C), variando a forma externa de lisa a muito papilosa. A deiscência também varia, podendo ser deiscentes, semideiscentes e indeiscentes. As sementes possuem carúncula, têm forma ovóide achatada e variam muito em tamanho e cor, o tegumento é liso, lustroso, espesso e delicado. A germinação é epígea e os cotilédones são fotossintetizantes (Rodrigues *et al.*, 2002; Milani *et al.*, 2009).

Em 2008, a Embrapa Algodão possuía em seu BAG aproximadamente 1000 acessos de mamona que apresentam grande variabilidade (Milani *et al.*, 2008).



**Figura 1:** Mamoneira (*Ricinus communis* L.) evidenciando as folhas com inserção do pecíolo na região central do limbo (A); Inflorescência com flores femininas na parte superior e masculinas na parte inferior (B) e Frutos do tipo tricoca (C).

## 1.2 A cultura da mamona

A mamona é uma oleaginosa de grande importância econômica e grande aplicação na indústria (Tambascia & Teixeira, 1986). Por séculos foi cultivada no Antigo Egito e Grécia devido às propriedades lubrificantes e laxantes de seu óleo. Não se sabe ao certo seu centro de origem, havendo divergências entre África e Ásia (Olsnes & Kozlov, 2001). Acredita-se que foi introduzida no Brasil no século XVI pelos escravos, e devido à sua ampla adaptação

tornou-se uma planta invasora e atualmente é encontrada em todo o território (Rodrigues *et al.*, 2002).

O Brasil foi o principal país produtor mundial de mamona até 1986, atualmente é o terceiro maior produtor, ficando atrás da Índia e China. A produção mundial de sementes de mamona em 2011 foi de 2,7 milhões de t; sendo que a Índia é o maior produtor com 2,3 milhões de t e o Brasil em terceiro lugar (FAO Statistics, 2013). O que impulsionou o grande crescimento da Índia no mercado da mamona foi o investimento em pesquisas e tecnologias como produção de híbridos com alta produtividade e grande tolerância a doenças (Severino, 2006).

No Brasil, o cultivo da mamona não cresceu muito, sendo que 79% da produção ocorre no semi-árido, principalmente em pequenas propriedades com mão-de-obra familiar (Oliveira *et al.*, 2005). A produção estimada de sementes de mamona no Brasil em 2011 foi de 132 mil t, sendo que 122 mil t foram produzidas no Nordeste, sendo a Bahia o maior estado produtor (100 mil t) (CONAB, 2013).

Dentre os fatores limitantes da cultura de mamona estão as principais pragas que são lagartas, ácaros, percevejos, pulgões e cigarrinhas (Soares & Dias, 2006); e as principais doenças são manchas-foliares causadas por *Alternaria ricini*, *Cercospora ricinella* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *ricini*, mofo-cinzento causado por *Amphobotrys ricini*, podridão-do-tronco causada por *Macrophomina phaseolina* e a podridão-do-caule ou podridão-dos-ramos, causada por *Lasiodiplodia theobromae* (Coutinho & Suassuna, 2006). A incidência de pragas e doenças ocorre dependendo do local de produção e da resistência das variedades cultivadas, afetando a produção (Kiihl, 2006).

### 1.3 O óleo de rícino

O cultivo comercial de mamoneira é muito comum em várias regiões do mundo, principalmente devido às propriedades do óleo que compõe de 35 a 55 % do peso da semente, sendo o produto de maior importância na mamona (Tambascia & Teixeira, 1986). Cerca de 90% do óleo presente na semente da mamona é composto por ácido ricinoléico, um ácido graxo com propriedades singulares, por ser bastante denso, possuir grande viscosidade e estabilidade, além do fato de ser o único óleo na natureza solúvel em álcool (Lima, 2007), sendo muito empregado na indústria cosmética, de medicamentos, lubrificantes e até fluidos aeronáuticos (Olsnes, 2004; Tambascia & Teixeira, 1986). No óleo não há ricina, a proteína



tóxica presente no endosperma das sementes, pois esta não é solúvel em óleo, o que favorece a retenção da ricina no resíduo durante o processo de extração do óleo (Severino, 2005). O óleo de mamona tem efeito laxante e induz trabalho de parto em fêmeas grávidas, devido à ativação de receptores prostanoídes EP<sub>3</sub> pelo ácido ricinoléico (Tunaru *et al.*, 2012), o qual também tem atividade antinociceptiva (Vieira *et al.*, 2000).

A química do óleo de mamona, conhecida como ricinoquímica, pode gerar diversos tipos de produtos sofisticados como próteses humanas, cosméticos e fármacos (Oliveira *et al.*, 2005). A utilização como lubrificante em máquinas é bem expressiva, uma vez que permite a lubrificação de motores que operam em condições extremas, como altas ou muito baixas temperaturas. Além disso, o uso desse óleo reduz a emissão de poluentes (Singh, 2011). O uso do óleo de mamona como biodiesel é restrito devido a algumas de suas propriedades como a alta viscosidade (240 a 300 mm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>) e à grande quantidade de água (0,15 a 0,3 %) (Scholz & Silva, 2008). Além disso, a separação da glicerina do óleo é difícil, o que faz com que o processo de produção de biodiesel a partir do óleo de mamona seja mais caro do que outras alternativas cerca de 1,20 US\$/kg de sementes (Santana *et al.*, 2010; Berman *et al.*, 2011).

#### 1.4 A torta de mamona

O subproduto de maior importância da semente da mamona é a torta de mamona, que é o resíduo obtido após a retirada do óleo. Devido à alta concentração de amido pode ser uma boa alternativa para a produção de etanol (Melo *et al.*, 2008). Tem sido muito utilizada como adubo orgânico de alta qualidade e na recuperação de solos esgotados por apresentar alto teor de nitrogênio; além de sua mineralização ser mais rápida do que a do esterco e mais lenta do que a de fertilizantes químicos (Severino, 2005). Pode ser usada também na alimentação animal devido à presença de grande quantidade de proteínas (Tabela 1) (Hoffman *et al.*, 2007; Severino, 2005), porém uma dificuldade na utilização da torta de mamona para este fim é a sua alta toxicidade devido à presença da ricina, ricinina, CB-1A e RCA.

Há procedimentos que eliminam as toxinas da torta de mamona, e novos protocolos estão sempre sendo desenvolvidos, tais como mistura com carbonato de cálcio, fervura ou autoclavagem, porém esses métodos não são viáveis para a indústria devido ao alto custo energético (Dubois *et al.*, 2012; Madeira Jr. *et al.*, 2011).

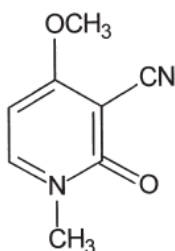
**Tabela 1:** Componentes da torta de mamona em percentual.

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: Severino & Freire, (2006).

### 1.5 Os compostos que causam a toxicidade da mamona

A ricinina (Figura 2) é um alcalóide encontrado em todas as partes da planta, sua toxicidade é baixa, além de estar presente em baixas concentrações na torta, não apresentando grande contribuição na sua toxidez (Holfelder *et al.*, 1998).



**Figura 2:** Estrutura do alcalóide ricinina (retirado de Ferraz 1999).

CB-1A é um complexo de polissacarídeos e proteínas de baixo peso molecular também conhecido como Albuminas 2S, que forma uma fração altamente alergênica que compõe 12,5 % da torta, sendo que apenas um gene codifica para formar as proteínas alergênicas (Chen *et al.*, 2004; Spies & Coulson, 1965). É encontrado nas sementes, no pólen e em parte vegetativas e são compostos que podem desencadear reações alergênicas em pessoas sensibilizadas através da pele ou da inalação. Essas reações alérgicas ainda não foram constatadas em outros animais (Gardner *et al.*, 1960; Severino, 2005).

A RCA<sub>120</sub> é uma proteína tetramérica muito similar à ricina e contém dois dímeros do tipo ricina ligados de forma não covalente. A RCA<sub>120</sub> causa forte aglutinação de hemácias em

mamíferos e é menos tóxica do que a ricina. A cadeia A da ricina e da RCA diferem em apenas 18 aminoácidos de um total de 267 (Chen *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2010).

A ricina (RCA<sub>60</sub>) é uma lectina de 60 a 65 KDa produzida somente na semente da mamona, composta de duas subunidades, a cadeia A pertencente ao grupo de proteínas conhecidas como RIP e a cadeia B, ligadas por ponte dissulfeto (Lima, 2007; Barnes, 2009). O gene que codifica a ricina está presente no genoma em várias cópias com alta similaridade, cerca de 95 % e contém 5,7 kb. Existem 28 genes membros da família da ricina no genoma da mamona, dentre eles prováveis pseudogenes e fragmentos de gene e sete são genes que codificam para proteínas funcionais com atividade inativadora de ribossomos que estão distribuídos entre os cromossomos (Halling *et al.*, 1985; Chan *et al.*, 2010).

O modo de atuação da ricina ocorre quando a cadeia B, que possui um sítio que se liga a carboidratos presentes na membrana celular, penetra na célula por endocitose ligada à cadeia A. A ricina é transportada por vesículas até o complexo de Golgi e então transportada para o retículo endoplasmático onde a ponte dissulfeto é desfeita separando as cadeias A e B. A cadeia A remove um único resíduo de adenina da alça do RNA ribossomal da subunidade 60S, inativando a síntese de proteínas irreversivelmente, o que leva a célula à morte. Apenas uma molécula dessa proteína é capaz de inativar 1.500 ribossomos por min, o que é suficiente para matar uma célula (Figura 3). A dose letal de ricina em humanos por via oral é de 1 a 20 mg de ricina por quilo de peso corpóreo, cerca de 8 sementes (Audi *et al.*, 2005; Hoffman *et al.*, 2007).

A ricina tem grande potencial de uso na medicina e vem sendo bastante usada em pesquisas relacionadas ao câncer (Tyagi & Ghosh, 2011; Bukhari & Dar, 2012), pois devido à sua toxicidade pode ser usada para matar especificamente células cancerígenas. Neste sentido, é preciso que a ela seja integrada um anticorpo, produzido para reconhecer antígenos que estejam presentes apenas em células cancerosas, conhecidos como marcadores de tumor, desse modo a ricina pode matar as células do tumor sem acarretar danos às outras células. (Hoffman *et al.*, 2007; Wawrzynczak, 1991; Woo *et al.*, 1999).

A ricina também pode ser um problema de saúde pública, uma vez que há vários relatos de casos de suicídio ou tentativa de suicídio por ingestão de mamona (Hamelin *et al.*, 2012; Schieltz *et al.*, 2011; Coopman *et al.*, 2009). Também é considerada uma arma biológica, sendo que já foi usada em terrorismo e ataques (Schieltz *et al.*, 2011; Schep *et al.*, 2009), sendo o mais recente uma carta contendo ricina enviada ao Presidente dos Estados

Unidos da América (Williams *et al.*, 2013). Desde então, vacinas contra a ricina vem sendo estudadas (Smallshaw *et al.*, 2007; Neal *et al.*, 2011).

Existem diversos procedimentos para a eliminação das toxinas da torta, como mistura com carbonato de cálcio, fervura ou autoclavagem, porém esses métodos não são muito viáveis para a indústria devido ao alto custo energético (Severino & Freire, 2006). A estratégia mais adequada a ser empregada para a diminuição ou mesmo eliminação da ricina nos grãos envolve o melhoramento genético, tanto usando métodos convencionais quanto a tecnologia do DNA recombinante (Hoffman *et al.*, 2007). No entanto, como existem várias cópias do gene da ricina distribuídas em diversos cromossomos (Halling *et al.*, 1985; Chan *et al.*, 2010), estratégias baseadas em mutações induzidas por agentes químicos e físicos são de difícil aplicação. Uma boa alternativa para a produção de sementes de mamona sem ricina ou com baixos teores dessa proteína seria o silenciamento do gene com o uso da estratégia de RNAi.

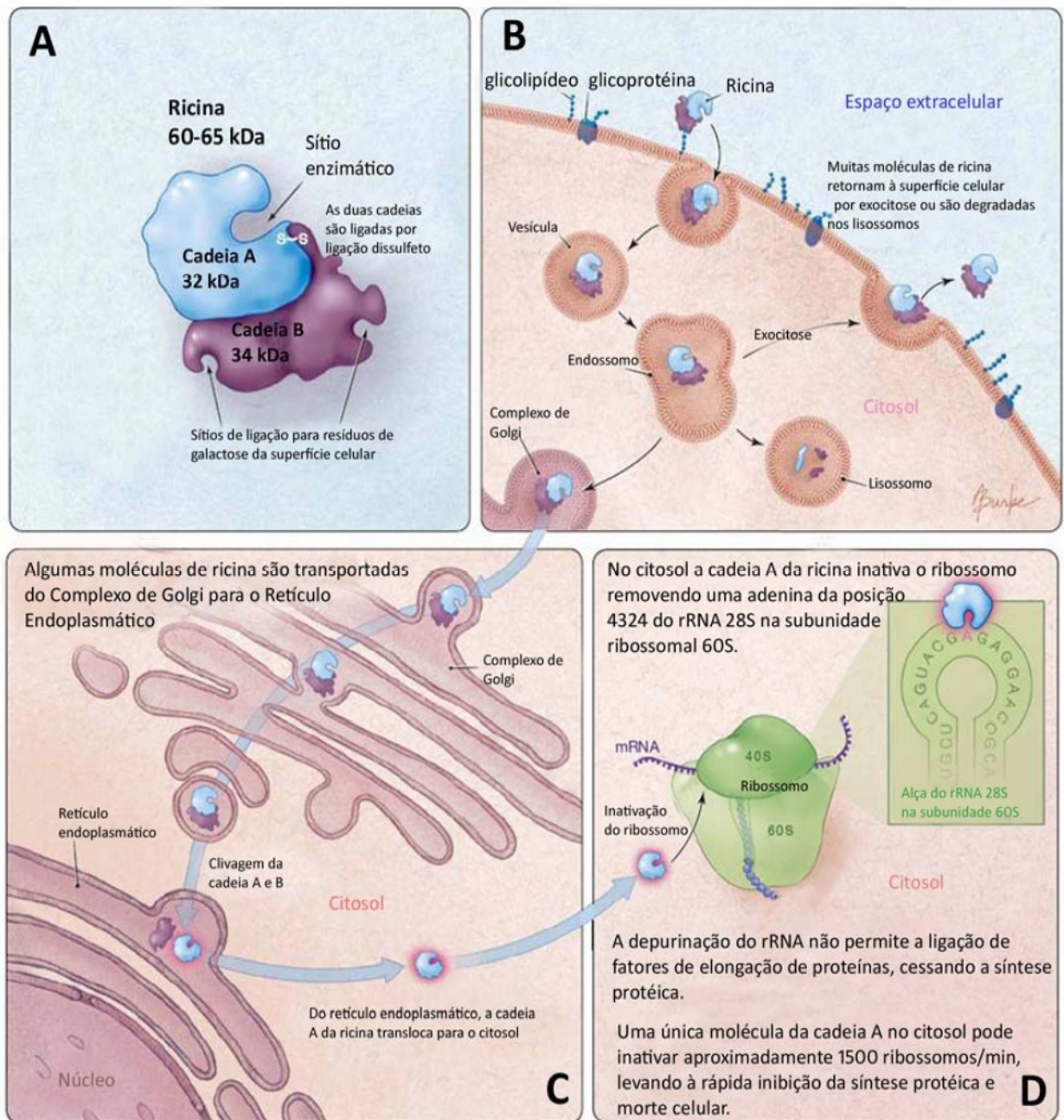


Figura 3: Modo de ação da ricina. A) A Cadeia A da ricina com o sítio enzimático, ligada por ponte dissulfeto à Cadeia B com os sítios de ligação a carboidratos. B) A Cadeia B se liga a carboidratos presentes na superfície da célula fazendo a ricina penetrar por endocitose. A ricina pode seguir então três caminhos distintos: ser exocitada, ir para os lisossomos e ser degradada ou seguir para o complexo de Golgi. C) do Complexo de Golgi a ricina segue para o retículo endoplasmático onde a ponte dissulfeto que liga as cadeias é desfeita e a Cadeia A segue para o citoplasma. D) Livre no citoplasma a Cadeia A ao encontrar um ribossomo remove um resíduo de adenina do laço ribossomal da subunidade 60S, inativando a síntese de proteínas. (Adaptado de Audi *et al.*, 2005).

## 1.6 Técnica de RNAi

O silenciamento gênico pode ser de dois tipos, SGT que acontece ao nível nuclear em regiões específicas do DNA impedindo a transcrição; e SGPTS que é quando ocorre transcrição do mRNA que é degradado no citoplasma, não ocorrendo a tradução do mesmo (Carthew, 2001; Vendruscolo, 2003).

O mecanismo de RNAi, que é um tipo de SGPTS, é um processo bem conservado em eucariotos, possivelmente como uma defesa a vírus (Carthew, 2001). Como exemplificado na Figura 4, a interferência do RNA ocorre quando um dsRNA entra no citossol e é reconhecido por uma RNase tipo-III conhecida como Dicer, que irá clivar o dsRNA em siRNA. Estes siRNAs são associados à RISC, um complexo protéico que separa a dupla-fita e direciona esses siRNAs a outras moléculas complementares de mRNA que serão então clivadas. Por fim, cada siRNA formado servirá como molde para clivar novos mRNAs complementares, levando ao silenciamento do gene (Ortiz-Quintero, 2009).

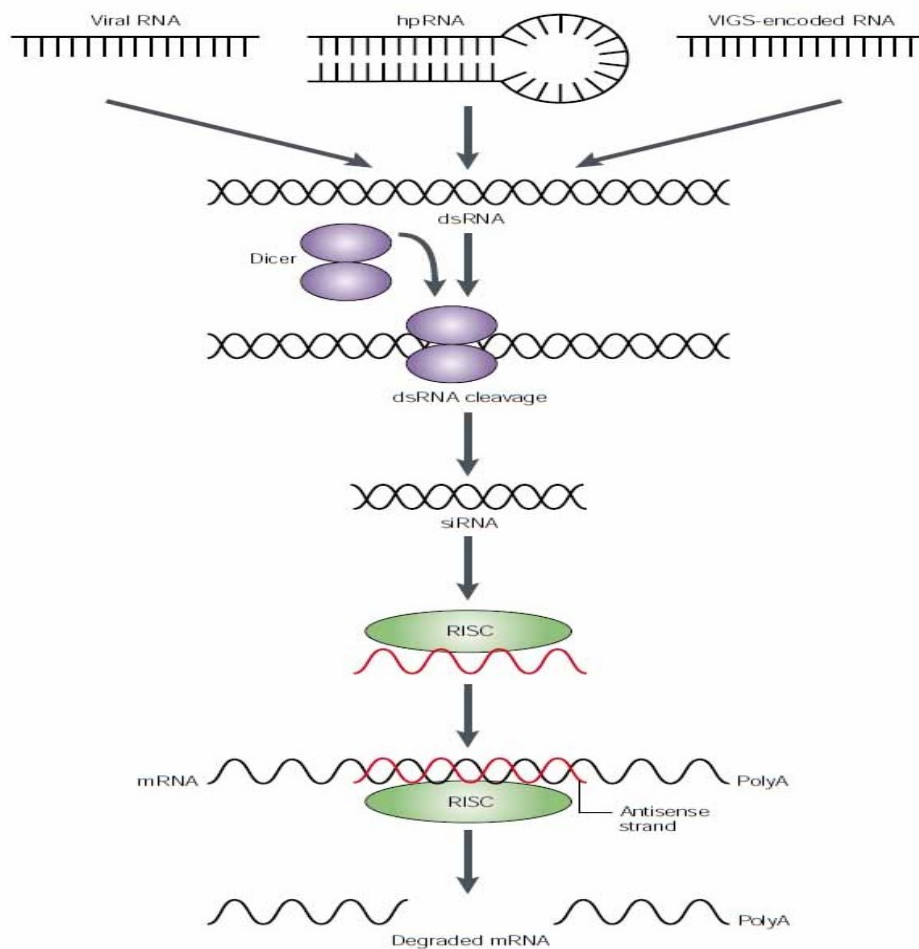
Construções do tipo *intron-hairpin* (grampo) têm sido apontadas como mais eficientes para silenciar genes endógenos em células vegetais (Mansor *et al.*, 2006). Essas construções são feitas com a escolha e clonagem de um fragmento da região mais conservada e codante do gene, nas direções senso e antissenso, intercaladas por um íntron (Bonfim *et al.* 2007; Aragão & Figueiredo, 2008; Frizzi & Huang, 2010).

Um dos primeiros trabalhos envolvendo o silenciamento gênico foi relatado por Napoli *et al.* (1990), onde os autores tentaram superexpressar o gene da chalcona sintase (*chs*) envolvido na pigmentação da flor, inserindo cópias adicionais do gene na planta. O que acabou desencadeando o silenciamento do gene, produzindo flores sem pigmentação e com menos pigmentos. A primeira vez em que foi usado o termo RNAi foi quando ao se injetar separadamente RNA para proteína muscular do nematóide *Caenorhabditis elegans* no sentido senso ou antissenso obteve-se silenciamento não tão eficaz; ao contrário de quando se injetava em conjunto o RNA nos dois sentidos. Nesse caso, os nematóides mostravam características daqueles que não possuíam o gene, tendo sido proposto que o dsRNA está envolvido no silenciamento gênico (Fire *et al.*, 1998).

Vários trabalhos com RNAi vem sendo feitos desde que o método foi demonstrado (Pan *et al.*, 2012). Em 2007, Bonfim *et al.* produziram plantas transgênicas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) com resistência ao vírus do mosaico dourado transmitido pela mosca branca, usando a técnica de RNAi para silenciar o gene viral *aci*, onde obtiveram plantas

transformadas com alta resistência. Yadav *et al.* (2011) desenvolveram uma planta de mandioca resistente ao Cassava brown streak Uganda vírus (CBUV) usando a tecnologia de RNAi com uma construção do tipo hairpin expressa constitutivamente. As plantas transgênicas mostraram 100% de resistência ao vírus. Nosso grupo tem obtido sucesso em obter silenciamento de genes em sementes de soja, a ponto de não ser possível detectar os mRNA transcritos do gene GmMIPS1 que codifica para a mio-inositol 1-fosfato sintase, gerando novos fenótipos (Nunes *et al.* 2006).

O RNAi está revolucionando pesquisas em diversos organismos como protozoários, fungos, mamíferos e plantas (Hannon, 2002). Mas para que seja viável propor a utilização de estratégias baseadas em RNAi para silenciamento do gene da ricina em mamona, é essencial que se tenha um sistema de transformação genética estabelecido.



**Figura 4:** Mecanismo do RNAi. A RNase tipo-III Dicer encontra o dsRNA e o cliva em vários siRNAs, estas são associadas a RISC que separa as fitas e usa uma delas para direcioná-las a novos mRNAs os quais serão então clivados. (Adaptado de Waterhouse & Helliwell, 2003).

### 1.7 As técnicas de transformação de plantas

As técnicas de transformação genética de plantas podem ocorrer de forma direta, pela introdução do DNA exógeno através de métodos físicos ou químicos, ou indiretamente pela introdução do DNA exógeno por meio de vetor. Eletroporação de protoplastos e biobalística são exemplos de métodos de transformação direta, e o método de transformação indireta mais utilizado é via *Agrobacterium tumefaciens* (Andrade, 2003).

Biobalística, também conhecida como bombardeamento de partículas, consiste na aceleração de micropartículas de tungstênio ou ouro (0,2 a 3  $\mu\text{m}$ ) envolvidas pelo DNA exógeno e direcionadas em condição de vácuo para atravessar a parede celular e membrana plasmática da célula vegetal de forma não letal. Uma vez dentro da célula, o DNA exógeno é dissociado das partículas e integrado ao genoma (Andrade, 2003; Rech & Aragão, 1998; Aragão & Brasileiro, 2010). Várias plantas importantes economicamente foram transformadas a partir dessa metodologia, tanto dicotiledôneas como monocotiledôneas (Aragão & Brasileiro, 2010).

A transformação genética de plantas mediada por *Agrobacterium* consiste na utilização de linhagens desarmadas de bactérias do gênero, geralmente da espécie *A. tumefaciens*, contendo o DNA exógeno (Brasileiro & Aragão, 2010). As bactérias do gênero são naturalmente capazes de transferir DNA para algumas espécies de dicotiledôneas causando doenças como a galha-da-coroa, causada por *A. tumefaciens*, e a raiz de cabeleira, causada por *A. rhizogenes* (Brasileiro & Lacorte, 1998; Santarém, 2000). Estudos mostraram que na natureza isso ocorre quando após uma injúria, a planta danificada libera moléculas sinais, tais como compostos fenólicos, açúcares e aminoácidos que atraem as agrobactérias (McCullen & Binns, 2006). A capacidade da bactéria de infectar a planta é devida à presença do plasmídeo conhecido como Ti no caso da *A. tumefaciens* e Ri presente na *A. rhizogenes*. O plasmídeo Ti possui duas importantes regiões que são a de virulência e o T-DNA. A região de virulência é ativada por moléculas-sinais liberadas pela planta e promovem a transferência do T-DNA da agrobactéria para o genoma da planta. Dessa forma, a planta sofre uma manipulação genética e os genes introduzidos da agrobactéria que codificam para fitohormônios, que são responsáveis pela formação do tumor, e que codificam também para a produção de opinas (complexo de aminoácidos com carboidratos). As opinas que serão produzidas pela célula vegetal do tumor servem de fonte de carbono e nitrogênio e apenas a agrobactéria consegue catabolizá-las (revisado por Pitzschke & Hirt, 2010). A partir de



diversos estudos foi possível identificar como ocorre o processo natural de transformação genética da planta pela agrobactéria, e então, foram desenvolvidos vetores desarmados para transformação de plantas com genes de interesse sem a ocorrência de tumores nas plantas (Brasileiro & Aragão, 2010; Pitzschke & Hirt, 2010).

Sujatha & Sailaja (2005) desenvolveram um protocolo de transformação de mamona mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, produzindo plantas transgênicas a partir de embrião zigótico da variedade Jyoti. Usando o gene *hptII* como agente seletivo, que confere tolerância ao antibiótico higromicina, a eficiência de transformação foi de 0,08 %. Em outro trabalho, também utilizando transformação via *Agrobacterium tumefaciens*, Malathi *et al.* (2006) produziram plantas transgênicas de mamona a partir de embriões zigóticos das variedades Jyoti e VP1, usando o gene *cryIAb* que confere resistência ao Lepidóptera *Achaea janata L.*, uma praga da cultura de mamona na Índia. Nesse caso, a eficiência de transformação genética foi de 0,4 %. Já Sailaja *et al.* (2008) produziram mamonas transgênicas a partir de embriões zigóticos da variedade Jyoti, através da técnica de biobalística, usando o gene *gus* como gene repórter e o gene *hptII* como agente seletivo e a eficiência de transformação foi de 1,4 %.

### 1.8 Genes marcadores

Para que o processo de transformação de uma planta seja eficiente é preciso ter um gene marcador eficaz. Genes que conferem tolerância a antibióticos são muito usados, sendo que o gene *neo* (Neomicina fosfotransferase tipo II – NPTII) é o mais utilizado e confere tolerância aos antibióticos aminoglicosilados, tais como canamicina, que inibem a síntese de proteínas. O gene *hph* (Higromicina B fosfotransferase – HPTII) que confere tolerância ao antibiótico higromicina que inibe a síntese de proteínas, também vem sendo muito usado (Miki & McHugh, 2004). Porém, algumas plantas são naturalmente bastante resistentes a antibióticos, um exemplo é o tabaco (Carrer, 2002).

Genes de tolerância a herbicidas também têm sido muito empregados. Dentre os mais utilizados está o gene *bar* (Fosfinotricina acetil transferase – PAT) de tolerância a fosfinotricina, glufosinato ou PPT (Miki & McHugh, 2004).

O gene *Atahas* codifica para a enzima *Acetolactato sintase* (AHAS) e é um gene mutado de *Arabidopsis thaliana* que contém uma mudança de uma serina por uma asparagina na posição 653, o que confere tolerância a herbicidas da classe das imidazolinonas. Os herbicidas da classe atuam inibindo a enzima Acetolactato sintetase – que atua na síntese de

alguns aminoácidos – causando deficiência de aminoácido nas plantas afetadas. Plantas que contêm o gene mutado não sofrem essa ação do herbicida (Kraemer *et al.*, 2009).

A dosagem do agente seletivo deve ser analisada para cada metodologia, espécie e tipo de tecido usado, pois dosagens muito baixas não selecionam as células transformadas porque geralmente existem níveis de tolerância dentro da espécie, e dosagens muito altas podem acabar matando todos os explantes, pois existe um limite de tolerância ao agente seletivo em plantas transformadas (Martinez *et al.* 2005).

Para auxiliar a detecção ou mesmo a seleção de transformantes são bastante utilizados genes repórteres que quando inseridos no genoma da planta expressam um fenótipo diferente, existe uma gama de genes repórteres, entre os mais conhecidos estão o gene *gus* ( $\beta$ -*Glucuronidase*) que através de ensaio histoquímico o tecido transformado apresenta uma coloração azul e o gene *gfp* (*proteína verde fluorescente*, “*Green fluorescent protein*”) que sob luz ultravioleta o tecido transformado apresenta fluorescência (Miki & McHugh, 2004).

### 1.9 A cultura *in vitro* da mamona

Diversos fatores podem influenciar o cultivo *in vitro* como o genótipo, o tipo de explante a ser usado, o processo de desinfestação, a composição dos meios de cultura e os reguladores de crescimento utilizados, a indução de multibrotação e ocorrência de contaminação e/ou oxidação.

Existem vários métodos de desinfestação dos explantes, o mais utilizado é a quebra da tensão superficial com o uso de etanol 70% seguido de hipoclorito de sódio ou de cálcio, peróxido de hidrogênio ou cloreto de mercúrio (Carvalho & Araújo, 2008).

Em outro trabalho Carvalho *et al.* (2007) induziram multibrotação na cultivar BRS Nordeste de *Ricinus communis* L.. As sementes foram desinfestadas por 20 min em hipoclorito de sódio a 2,5%, permanecendo por 24 h embebidas em água da última lavagem. Os eixos embrionários foram cultivados em meio MS suplementado com AG<sub>3</sub> 0,05 mg.L<sup>-1</sup> e com diferentes concentrações de BAP (0; 0,05; 0,1 ou 0,3 mg.L<sup>-1</sup>). Desse trabalho foi possível observar que a combinação 0,30 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,05 mg.L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> promoveu o superbrotamento na região do meristema apical do embrião zigótico, obtendo uma média de 6,13 brotos por explante.

No trabalho realizado por Ahn *et al.* (2007) foi estabelecido um protocolo de regeneração *in vitro* de mamona a partir de embrião zigótico, onde foi observado que o TDZ 1

$\mu\text{M}$  induziu maior número de brotos (um máximo de 24,2 brotos por explante) quando comparado com o tratamento de BAP 20  $\mu\text{M}$  (com máximo de 6,8 brotos por explante). O número de brotos por explante foi aumentado em 82% e 36%, respectivamente, quando embriões zigóticos foram induzidos no escuro por quatro a sete dias. A taxa de formação de raízes dos brotos obtidos foi maior quando a auxina ANA 5  $\mu\text{M}$  (87,4%) foi usada quando comparada com AIB 5  $\mu\text{M}$  (84%). Porém um maior número de plântulas foram estabelecidas no solo quando AIB foi utilizado (93,5%), quando comparada com a taxa de estabelecimento de plântulas obtidas com ANA (39,5%). Ahn & Chen (2008) desenvolveram uma metodologia de regeneração de mamona a partir de cotilédones de plântulas germinadas *in vitro* e retirados direto da semente. Foi produzida uma média de 25 brotos por explante usando 5  $\mu\text{M}$  de TDZ e incubando os explantes no escuro por sete dias. Os brotos alongaram em meio MS sem regulador de crescimento e induziram raízes em meio suplementado com 5  $\mu\text{M}$  de AIB. Aires *et al.* (2008) obtiveram superbrotamento de embriões zigóticos de mamona com 0,30  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP e 0,05  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{GA}_3$  com uma média de 6,13 brotos por explante. Outros trabalhos foram desenvolvidos com cultura da mamona *in vitro*, mostrando avanços nessa área (Molina, 1995; Kumari *et al.*, 2008; Carvalho & Araújo, 2008); mas o sistema de regeneração de mamona *in vitro* ainda precisa ser aperfeiçoado, pois diferentes genótipos respondem de forma distinta.

## 2. Justificativa

A busca por um método para destoxificar a torta de mamona tem sido grande. Várias metodologias já foram testadas tais como cozimento, aquecimento, autoclavagem, tratamentos químicos e outros; muitos tiveram sucesso, alguns foram patenteados, mas a maioria acabou não se tornando viável tanto economicamente quanto por fatores relacionados à eficiência do processo. Para exemplificar, a torta de mamona destoxificada pela empresa SANDRA chegou a ser comercializada na década de 60 no Brasil; sua produção foi suspensa, pois o controle da destoxificação não foi eficiente e alguns lotes ainda tóxicos acabaram sendo liberados, o que poderia ter causado a morte de animais (Severino, 2005; Hoffman *et al.*, 2007).

Acredita-se que o gene que codifica a ricina está presente no genoma em várias cópias com alta similaridade, cerca de 95% segundo Halling *et al.* (1985); então, uma alternativa para o desenvolvimento de sementes sem ricina, ou mesmo com baixa concentração da proteína, seria o silenciamento desse gene pela técnica de RNAi. A RCA tem grande similaridade com a ricina, sendo possível que ela também seja silenciada por essa técnica.

Existem poucos trabalhos sobre a transformação genética da mamoneira, o que torna necessário aprimorar as metodologias publicadas, assim como as de cultura de tecidos e seleção de células e tecidos transformados.

O estabelecimento de um sistema de transformação genética baseado na introdução do gene *ahas* em células meristemáticas apicais de embriões zigóticos será a base para introdução e expressão de construções gênicas do tipo *intron-hairpin* em mamona. Possibilitando o silenciamento da ricina, visando obter novos genótipos de mamona sem ricina ou com concentrações baixas dessa proteína; o que permitirá a produção e comercialização de uma torta de mamona destoxificada que poderá ser utilizada na alimentação animal, provendo uma fonte de proteína abundante e de baixo custo, além de gerar uma fonte de renda a mais para os produtores de mamona.

## 3 Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Desenvolver sistemas de transformação genética de mamona.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o uso de diferentes concentrações de BAP e TDZ na multibrotação de meristema apical de embriões zigóticos maduros de mamona;
- Adaptar a metodologia de cultura de tecidos para a regeneração *in vitro* de plantas transformadas de *Ricinus communis* L.;
- Desenvolver metodologias de transformação genética de mamoneira via biobalística e *Agrobacterium tumefaciens*;
- Produzir plantas de mamoneira geneticamente modificadas através de biobalística ou via *Agrobacterium tumefaciens*.

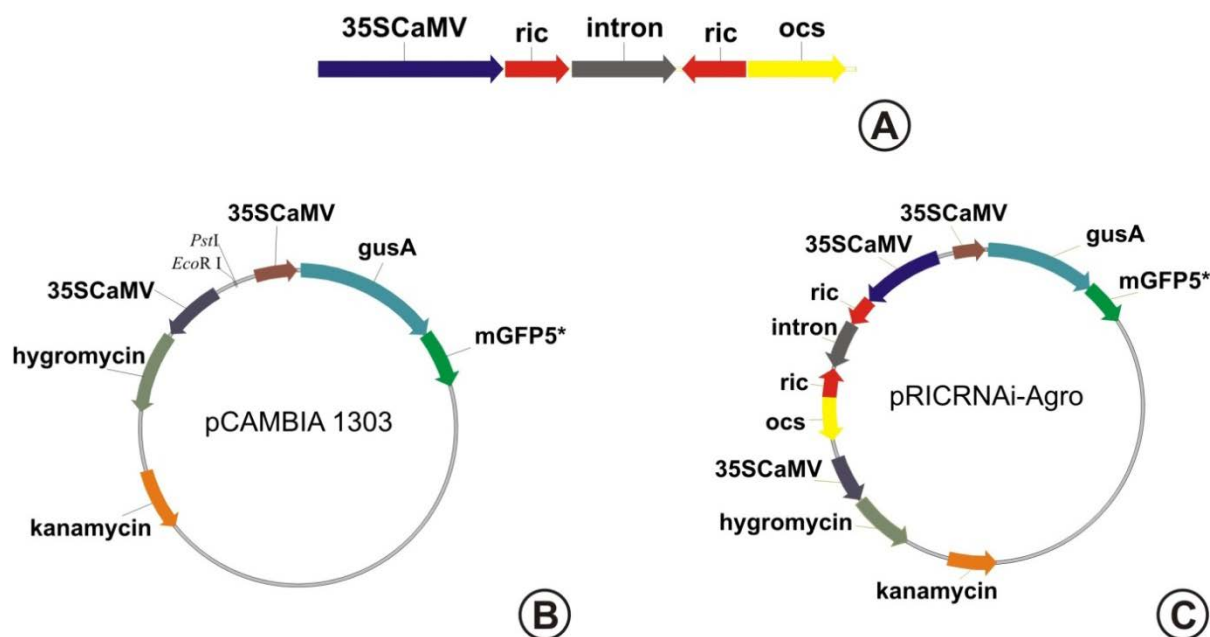
## 4. Material e Métodos

Todo o trabalho foi desenvolvido na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no Laboratório de Engenharia Genética Aplicada a Agricultura Tropical, exceto as análises em microscópio eletrônico de varredura que foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e na Universidade de Brasília. Todos os experimentos foram realizados em condições controladas. As sementes das variedades Nordestina e Paraguaçu foram produzidas por nosso grupo, já as da variedade EBDA-MPA-34 foram disponibilizadas pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola.

### 4.1 Construção dos vetores

Em trabalho anterior desenvolvido por Baldoni (2010) foi feita uma construção de RNAi a partir da região conservada do gene da ricina, cadeia A, e inserida em vetor para transformação genética por bombardeamento e por agrobactéria (Figura 5).

No presente trabalho, o vetor pRICRNAi-Agro foi inserido na linhagem EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* por eletroporação (Lacorte & Romano, 1998), sendo posteriormente usada para cocultura. Para a construção do vetor para transformação por biobalística, o cassete de transformação foi retirado do vetor pKANNIBAL com a enzima *NotI* e inserido no vetor PAGI, que contém o gene *gus* como gene repórter e o gene *ahas* como agente seletivo, formando o vetor pRICRNAi.



**Figura 5:** Construção do cassete de RNAi da região conservada do gene da ricina nos sentidos senso e antisense com intron pdk entre ambas dirigido pelo promotor CaMV35S e terminador ocs (A); que foi inserido no vetor binário pCAMBIA 1303 nos sítios de *Pst*I e *Eco*RI (B) para transformação via *Agrobacterium*; gerando o vetor binário pRICRNAi-Agro (C).

#### 4.2 Material vegetal para a transformação genética

Foram utilizadas as cultivares de mamona BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e EBDA-MPA-34, tendo a escolha sido feita em função da disponibilidade de genótipos. O protocolo de desinfestação de sementes usado foi o descrito por Rech & Aragão (1998), com algumas adaptações. As sementes foram desinfestadas em álcool 70 % por 1 min, e hipoclorito de sódio 2% com uma gota de Tween 20 por 20 min e três lavagens em água destilada autoclavada. Em seguida as sementes foram abertas com o auxílio de um alicate, os embriões foram retirados e desinfestados com hipoclorito 0,5% por 10 min e três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os embriões foram mantidos em papel filtro para retirada do excesso de água e foram plaqueados em meio de multibrotação pré-transformação (MMPré) que consiste de meio MS (Murashige and Skoog Basal Medium - Sigma) suplementado com sacarose 3 %, ágar 0,7 % e pH ajustado para  $5,8 \pm 0,2$  acrescido de TDZ ou BAP. Os embriões foram mantidos por 2 a 4 dias no escuro para induzir o entumescimento e facilitar a exposição do meristema apical. Todo o processo foi realizado com as devidas precauções para evitar contaminação. Os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 min e

todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar com os todos os materiais previamente autoclavados.

#### *4.3 Indução de embriões zigóticos em BAP ou TDZ*

Para avaliar a indução de gemas e desenvolvimento de brotos em meio MS com sacarose 3 %, Agar 0,7 % e pH ajustado para  $5,8 \pm 0,2$  com diferentes concentrações de BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou TDZ ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ); os embriões da variedade EBDA-MPA-34 foram desinfestados e cultivados nos diferentes tratamentos:

- Tratamento 1 (T1): MS sem regulador de crescimento;
- Tratamento 2 (T2): T1 acrescido de BAP  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- Tratamento 3 (T3): T1 acrescido de BAP  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- Tratamento 4 (T4): T1 acrescido de BAP  $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- Tratamento 5 (T5): T1 acrescido de TDZ  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- Tratamento 6 (T6): T1 acrescido de TDZ  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ;
- Tratamento 7 (T7): T1 acrescido de TDZ  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ .

Foram utilizados 50 explantes por tratamento e nos primeiros dois dias foram cultivados no escuro, a partir do segundo dia o meristema foi exposto através do corte dos cotilédones e dos primórdios foliares e passaram a ser cultivados na luz. Após 10 dias de cultura, os explantes foram transferidos para meio MS sem reguladores de crescimento, tendo sido repicados para novo meio a cada 10 dias para o alongamento dos brotos. Após 40 dias os explantes foram avaliados quanto à formação de brotos em cada concentração.

Para avaliar a indução de gemas nos diferentes tratamentos, três embriões de cada tratamento cultivados por um, quatro e oito dias foram fixados em tampão cacodilato de sódio 0,1M e glutaraldeído 2,5% por 24 h para observação por microscopia eletrônica de varredura. Após a fixação foram feitas três lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M e o material foi guardado em geladeira. Os embriões foram pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% por duas h e desidratados numa série de etanol (10, 30, 50, 70, 80, 95 e 100 %) duas vezes por 20 min cada. As amostras passaram pelo processo de secagem ao ponto crítico, foram montadas e metalizadas com liga de ouro paladium e visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



#### 4.4 Curva de seleção

Para avaliar a concentração de herbicida ideal para selecionar brotos de mamona foi realizada uma curva de seleção utilizando a cultivar EBDA-MPA-34. Embriões zigóticos foram extraídos das sementes, cultivados em meio MS com BAP no escuro por 4 dias para exposição dos meristemas e cultivados posteriormente em MS com diferentes concentrações de IMZ (0, 100, 200 ou 300 nM). Foram utilizados 50 explantes para cada concentração do herbicida e foram colocados cinco explantes por frasco.

#### 4.5 Teste de eficiência de biobalística

Em trabalho anterior, Baldoni (2010) verificou que o processo de transformação genética por biobalística da cultivar Nordeste de mamona é eficiente. O vetor usado foi o pBI426, onde foram bombardeados 60 explantes, dentre os quais 42 apresentaram pontos azuis na região do meristema através de teste histoquímico do gene *gus*.

No presente trabalho foram escolhidos explantes ao acaso da cultivar EBDA-MPA-34, 24 h após a realização dos bombardeamentos para verificar a eficiência de transformação e expressão transiente do vetor pRICRNAi por ensaio histoquímico do gene *gus*.

#### 4.6 Transformação genética via biobalística

Embriões zigóticos das cultivares Paraguaçu, Nordeste e EBDA-MPA-34 cultivados no escuro por dois a quatro dias tiveram o meristema apical exposto após excisão dos cotilédones e primórdios foliares. Esses explantes foram bombardeados com o vetor pRICRNAi segundo metodologia descrita por Rech & Aragão (1998).

Após o bombardeamento, os explantes foram transferidos para o meio de multibrotação pós-transformação (MMPós) que consiste de meio MS com sacarose 3 %, ágar 0,7 % e pH  $5,8 \pm 1$ , acrescido de TDZ  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  ou BAP  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  com ou sem IMZ 100 nM. Os explantes permaneceram por oito dias no meio de indução de brotos, após o qual foram transferidos para o meio de seleção e alongamento (MSA) que é composto de meio MS com sacarose 3 %, ágar 0,7 % e pH ajustado para  $5,8 \pm 1$  acrescido de IMZ 200 nM ou 150 nM. Durante o período de alongamento dos brotos foram testados os reguladores de crescimento como AIA e AG<sub>3</sub>. Após o alongamento, os brotos foram cultivados em meio de enraizamento

(ME), que consiste de meio MS sacarose 3 %, ágar 0,7% e pH 5,8 0,6 mg L<sup>-1</sup> e IMZ 200 nM. Os brotos alongados foram analisados por PCR ou por ensaio histoquímico do gene *gus*.

As plântulas obtidas com raízes desenvolvidas foram aclimatizadas em uma mistura de solo e vermiculita em casa de vegetação.

#### 4.7 Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação via *Agrobacterium* foi inicialmente conduzida de acordo com o protocolo desenvolvido por Sujatha & Sailaja (2005). E adaptado de acordo com as necessidades. Para esse experimento apenas a cultivar EBDA-MPA-34 foi utilizada.

O crescimento das bactérias foi feito de acordo com Cabral (2012). As agrobactérias da linhagem EHA105 contendo o vetor de transformação pRICRNAi-Agro foram inoculadas em placas com meio AB contendo os antibióticos canamicina (tolerância do vetor – gene *neo*) e rifampicina (tolerância cromossomal da linhagem) e colocadas para crescer em estufa a 28 °C por 2 a 3 dias.

Após este período o crescimento bacteriano foi coletado das placas e colocado em meio de cocultura líquido MS com sacarose 3 % e pH 4,0 ± 1 acrescido de TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> e AS 200 µM (para ativar os genes de virulência) . A suspensão bacteriana foi homogeneizada em agitador orbital do tipo Vortex e a DO ajustada para DO<sub>600</sub>= 0,5. Embriões zigóticos induzidos após o período no escuro foram imersos na suspensão bacteriana, onde tiveram o meristema apical exposto pela excisão dos cotilédones e primórdios foliares. Em seguida, a região meristemática apical dos embriões zigóticos foi perfurada com agulhas de acupuntura, e a radícula de uma parte dos embriões foi cortada e outra parte permaneceu intacta para verificar o melhor procedimento de cocultura.

Ainda na cocultura líquida alguns embriões foram sonicados por cinco min e em seguida submetidos ao vácuo por 30 min (sempre submersos na suspensão bacteriana), e outros foram apenas submetidos ao vácuo. Foram bem secos em papel filtro autoclavado e inoculados no meio de cocultura sólido MS sacarose 3 %, pH 4,0 ± 1, acrescido de TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> e AS 200 µM. Os explantes foram mantidos no meio de cocultura sólido no escuro a 20 °C de 4 a 5 dias.

Após a cocultura sólida os explantes seguiram um protocolo de cultura de tecidos baseado em Sujatha & Sailaja (2005) com alterações. Foram mantidos em sala de cultura com temperatura de 26 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 16 h.

Após a cocultura os embriões foram cultivados nos mesmos meios que os explantes transformados por biobalística, exceto por algumas modificações:

- O indutor de brotações usado foi o TDZ;
- Todos os meios utilizados tiveram o pH ajustado para 4,0 visando a diminuição de contaminação;
- O agente seletivo foi a higromicina que foi utilizada em concentrações crescentes começando pela concentração de 20 mg.L<sup>-1</sup> até 60 mg.L<sup>-1</sup> (Sujatha & Sailaja, 2005);
- Foram utilizados os antibióticos Cefotaxima 300 mg.L<sup>-1</sup>, Timentim 500 mg.L<sup>-1</sup> e meropeném 12,5 mg.L<sup>-1</sup> para controlar a agrobactéria.

#### 4.8 Ensaio histoquímico para avaliar a expressão do gene *gus*

Foram realizados ensaios histoquímicos para avaliar a expressão do gene *gus* para testar a eficiência de transformação em embriões zigóticos inteiros e pedaços das folhas dos brotos que alongaram no meio de seleção. Os explantes foram incubados em solução de reação de X-Gluc (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 M, X-Gluc 500 mg.L<sup>-1</sup> e Triton X-100 30%) por 12 h a 37 °C, então foi verificado o aparecimento ou não da coloração azul.

#### 4.9 PCR

Para verificar a presença do transgene na planta foram realizadas PCR. As extrações de DNA foram feitas pelo método CTAB adaptado (Silva, 2010) e as reações de PCR foram feitas com kit Taq DNA Polymerase (Invitrogen, California - USA).

Os iniciadores utilizados na reação de PCR para verificar a presença do gene *ahas* foram o AHASP124 (5' – ACTAGAGATTCCAGCGTCAC – 3') e o AHAS500C (5' – GTGGCTATACAGATACCTGG – 3') que amplificam um fragmento de cerca 700 pb.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) com um pré-ciclo (desnaturação inicial) de 95 °C por 5 min; 36 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e alongamento a 72 °C por 2 min; e um ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min.

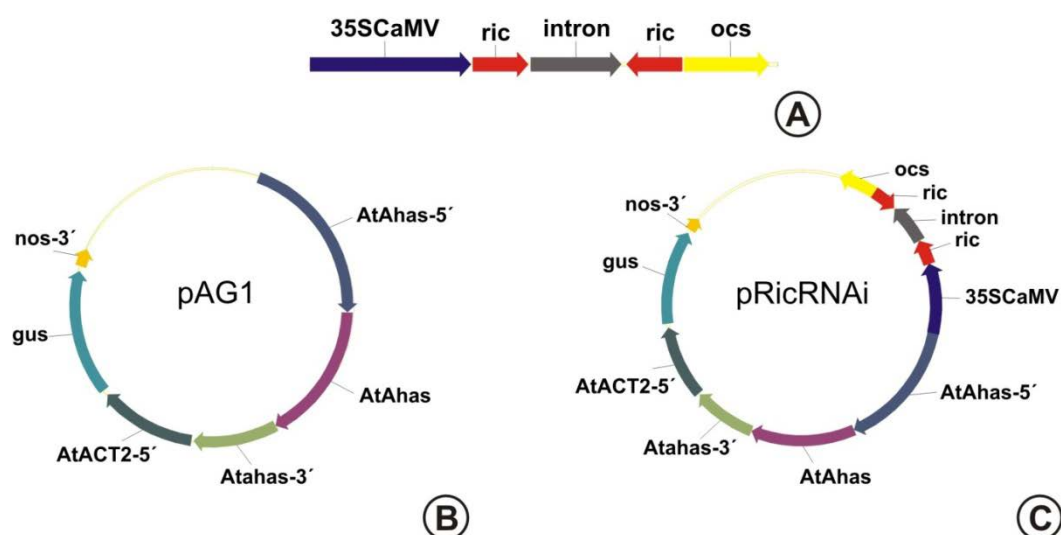
Ao final da reação de PCR as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8 % com brometo de etídio em conjunto com um marcador de peso molecular e migraram no gel através de eletroforese a 80 volts, por 30 min a 1 h. Então o gel foi exposto à luz UV para verificar a amplificação dos fragmentos.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1 Construção dos vetores

O cassete de transformação formado pelo promotor 35SCaMV, o fragmento senso da ricina, íntron, o fragmento antisense da ricina e o terminador *ocs* foi retirado do vetor pKANNIBAL com *NotI* e inserido no vetor pAG1, que contém o gene *gus* como gene repórter e o gene *ahas* como agente seletivo, formando o vetor pRICRNAi (Figura 6) utilizado para transformação via biobalística. Já para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* o vetor pRICRNAi-Agro construído por Baldoni (2010) foi inserido em *Agrobacterium tumefaciens* da linhagem EHA105 e utilizado para transformação.

Construções de RNAi do tipo *intron-hairpin* têm sido a forma mais eficiente de obter o silenciamento de genes endógenos em células vegetais (Wesley *et al.*, 2001). O 35SCaMV é um promotor constitutivo que dirige a expressão gênica em sementes, como relatado por Nunes *et al.* (2006) que usaram uma construção do tipo *intron-hairpin* para silenciar o gene do mio-inositol 1-fosfato sintase (GmMIPS1). Esse gene apresenta papel importante no metabolismo e no desenvolvimento da planta, o silenciamento do mesmo foi bem sucedido a ponto de não ser possível detectar os mRNA, gerando plantas com problemas no desenvolvimento de sementes.



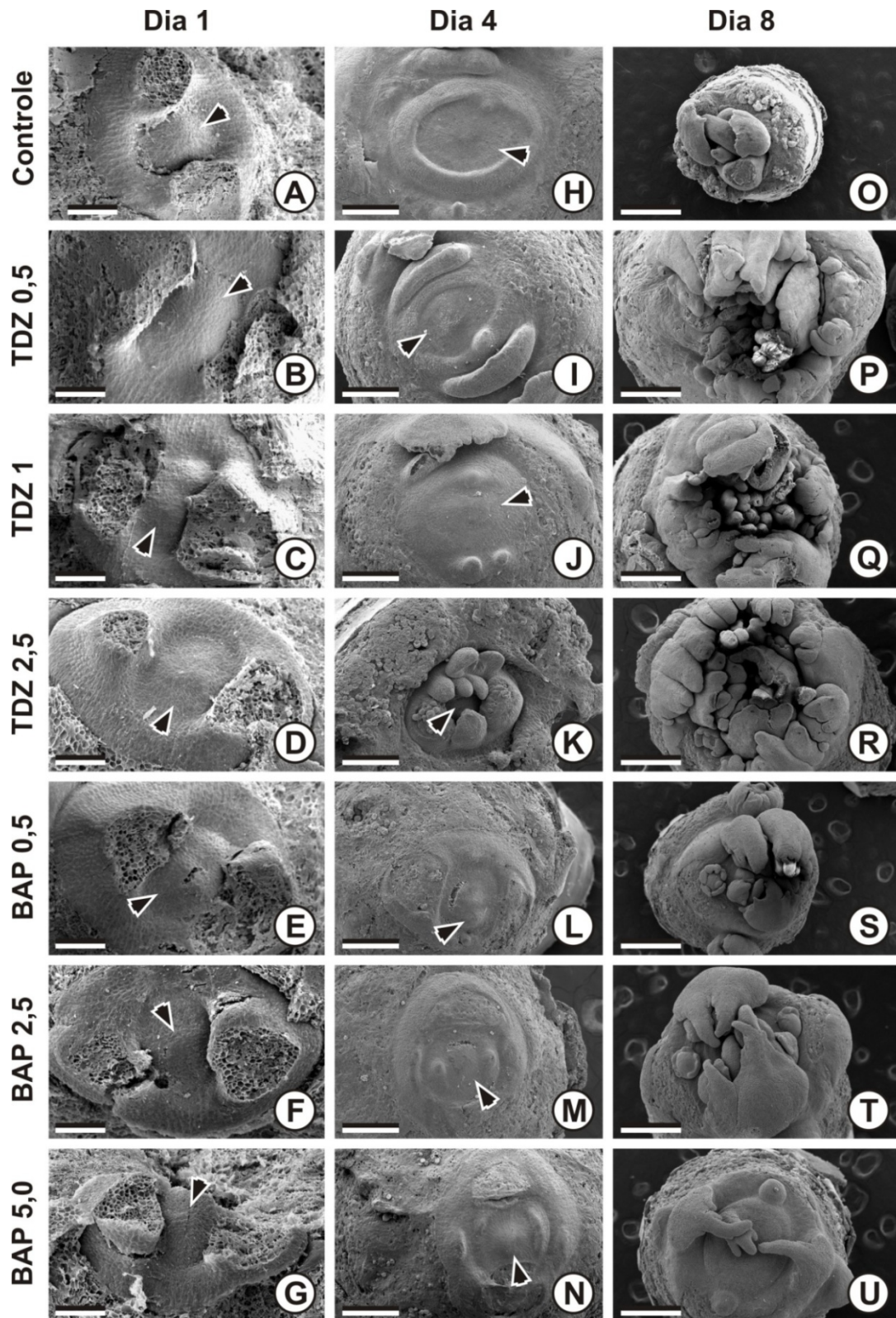
**Figura 6:** Construção do vetor pRICRNAi. O cassete de RNAi da região conservada do gene da ricina nos sentidos senso e antisense com íntron *pdk* entre ambas dirigido pelo promotor CaMV35S e terminador *ocs* (A) foi clonado no sítio da enzima *NotI* no vetor pAG1 (B) formando o vetor para bombardeamento pRICRNAi (C).

## 5.2. Indução de embriões zigóticos em BAP ou TDZ

Análises da indução de gemas no meristema apical de embriões zigóticos de mamona por MEV demonstraram que TDZ apresentou uma resposta morfogênica mais rápida com maior número de brotos. No primeiro dia de cultura foi possível observar que não houve diferença no tamanho e diferenciação dos meristemas (Figura 7 de A a G). No quarto dia de cultura pode-se notar a formação de gemas nos embriões cultivados com TDZ (Figura 7I, J e K), sendo que a indução de gemas foi mais notável quando TDZ foi usado na concentração 2,5 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 7K). Foi possível observar que os embriões cultivados com BAP apresentaram meristema apical pouco desenvolvido (Figura 7L, M e N), enquanto nos outros tratamentos o meristema estava bem desenvolvido, inclusive no controle (Figura 7H). No oitavo dia de cultura foi possível observar diferença no crescimento do embrião, assim como na formação de gemas. Os embriões cultivados em TDZ apresentaram grande expansão em tamanho e no desenvolvimento de gemas (Figura 7P, Q e R); enquanto que os cultivados em BAP (Figura 7S, T e U) também expandiram, além de apresentarem formações de meristemas laterais, exceto o tratamento com BAP 5 mg. L<sup>-1</sup> (Figura 7U), só que proliferaram menos gemas em comparação com TDZ; os embriões do controle apresentaram pouca expansão e crescimento (Figura 7O),

Após 40 dias de cultivo dos explantes induzidos com as diferentes citocininas, foi possível observar que o controle teve apenas crescimento do meristema apical sem formação de brotações; em TDZ houve o maior número de brotações, mais de 16, e não houve diferença entre as concentrações, porém quanto maior a concentração de TDZ maior a dificuldade no alongamento dos explantes. Nos tratamentos com BAP a diferença na resposta morfogênica foi maior, sendo que em BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 28% dos explantes apresentaram dois a cinco brotos; em BAP 2,5 70% dos explantes apresentaram mais de 16 brotos; e em BAP 5 mg. L<sup>-1</sup> 24% dos explantes apresentaram 11 a 15 brotos (Tabela 2).

Nossos resultados corroboraram que o TDZ é a citocinina que promove maior número de brotações em mamona como anteriormente observado, Sujatha & Reddy (1998) testaram BA, Kin ou TDZ para a indução de multibrotação em embriões zigóticos e o TDZ apresentou maior número de brotações; Ahn *et al.*, 2007 testaram a utilização de BA ou TDZ, onde o último se mostrou melhor na formação de multibrotação no embrião zigótico.



**Figura 7:** Micrografia Eletrônica de Varredura de embriões cultivados em meio com TDZ ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) ou BAP ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  ou  $5,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) por 1, 4 e 8 dias. Barras correspondem aos dias 1, 4 e 8 por 100, 300 e 600  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**Tabela 2:** Resposta morfogênica de embriões zigóticos maduros de mamona cv XXX cultivados na presença de BAP (0; 0,5 mg.L<sup>-1</sup>; 2,5 mg.L<sup>-1</sup> ou 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) ou TDZ (0; 0,5 mg.L<sup>-1</sup>, 1,0 mg.L<sup>-1</sup> ou 2,5 mg.L<sup>-1</sup>).

Regulador	Numero de brotos por explante (percentagem)					Mortadidade explantes (percentagem)
	1	02 a 5	06 a 10	11 a 15	16 ou mais	
0	33 (66 %)	-	-	-	-	17 (34 %)
BAP 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	3 (6 %)	28 (56 %)	9 (18 %)	2 (4 %)	-	8 (16 %)
BAP 2,5 mg.L <sup>-1</sup>	-	1 (2 %)	5 (10 %)	4 (8 %)	35 (70 %)	5 (10 %)
BAP 5 mg.L <sup>-1</sup>	-	11 (22 %)	11 (22 %)	12 (24 %)	7 (14 %)	12 (24 %)
TDZ 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	47 (94 %)	3 (6 %)
TDZ 1 mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	40 (80 %)	10 (20 %)
TDZ 2,5 mg.L <sup>-1</sup>	-	-	-	-	40 (80 %)	10 (20 %)

### 5.3 Curva de seleção

A curva de seleção pode ser observada na Figura 8. No meio sem seleção (0 nM de IMZ) os explantes se desenvolveram bem, de modo que após um mês já tinham alongado e apresentavam raízes, na concentração de 100 nM de IMZ apenas 14% dos explantes morreram, os explantes sofreram decréscimo no alongamento. Em 200 nM de IMZ 36% dos explantes morreram e o alongamento dos explantes foi bastante suprimido. Já na concentração de 300 nM de IMZ apenas 30% dos explantes sobreviveram mas o desenvolvimento foi paralisado. Em nenhum caso, exceto no meio sem seleção, houve desenvolvimento de raízes. Dessa forma decidiu-se utilizar uma dosagem inicial de 100 nM de IMZ logo após o bombardeamento, por uma semana e então utilizar nos próximos subcultivos 200 nM de IMZ. De forma que os explantes sofreram restrições de desenvolvimento, mas o alongamento não foi totalmente restringido. Dados similares foram encontrados para a cultivar Nordestina sendo que a concentração ideal para seleção obtida também foi de 200 nM (Baldoni, 2010).

Cada cultura e até cultivares diferentes responde de forma distinta à seleção, para feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Bonfim *et al.* (2007) utilizaram 80 nM de IMZ, já para seleção de soja transformada Aragão *et al.* (2000) usaram 500 nM.

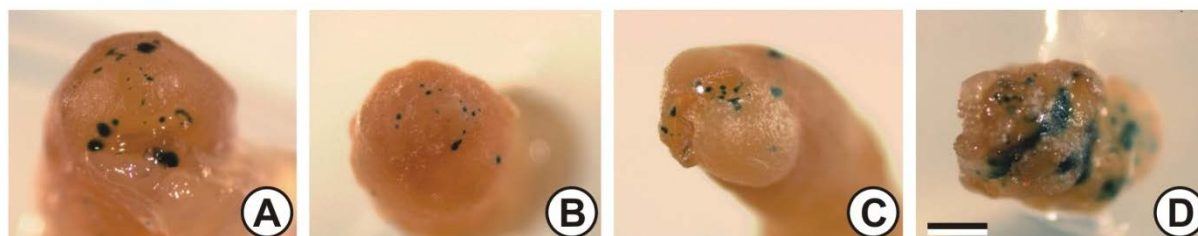


**Figura 8:** Curva de seleção do herbicida IMZ para embriões de mamona da cultivar EBDA-MPA-34. Concentração do herbicida nas plantas da esquerda para a direita: 0 nM, 100 nM, 200 nM e 300 nM. Barra: 1 cm.

#### 5.4 Teste de eficiência de bombardeamento

Foram escolhidos explantes ao acaso das transformações para verificar se o bombardeamento estaria sendo eficiente com o vetor pRICRNAi (Figura 9), ao se avaliar a expressão do *gus*.

Vários fatores podem influenciar na eficiência do bombardeamento como temperatura, umidade do ambiente e manuseio (do ambiente) (Kikkert *et al.*, 2004). Eficiências similares foram obtidas em transformação genética de *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* L. (Aragão *et al.*, 1996; Aragão *et al.*, 2000), o que mostra ser possível a obtenção de plantas de mamona geneticamente modificadas com este protocolo.



**Figura 9:** Expressão do gene *gus* em explantes bombardeados com o vetor pRICRNAi. Os pontos azuis indicam os locais onde houve transformação. A e B são embriões de um mesmo bombardeamento enquanto C e D são de transformação em outro dia. Mostram um grande número de regiões transformadas. Barra 1 mm.



### 5.5 Transformação via biobalística

Foram realizados três tratamentos diferentes na cultura de tecidos para transformação de mamona por biobalística variando os tipos de indutor de brotos (BAP ou TDZ), o tempo de desenvolvimento dos explantes e as concentrações de herbicida (Tabela 3).

Foram bombardeados um total de 4.037 embriões de mamona como mostrado no resumo na Tabela 4. No apêndice I estão disponíveis as tabelas de 5 a 7 contendo os dados completos dos bombardeamentos.

Foram utilizadas três cultivares de mamona: Nordestina, Paraguaçu e EBDA-MPA-34, sendo que apenas não foram observadas plantas transgênicas na cultivar Paraguaçu.

Na cultivar Nordestina foi detectado um explante transgênico que amplificou o gene *ahas* por PCR (Tabela 4) (Figura 10), mas não se desenvolveu e morreu.

Cinco brotos transgênicos foram obtidos com a cultivar EBDA-MPA-34, o que sugere que a mamona é uma planta com transformação genótipo dependente, como foi visto em plantas de algodoeiro, batata e trigo (Iser *et al.*, 1999; Heeres *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2005).

Dos explantes obtidos na cultivar EBDA-MPA-34 dois foram do tratamento 2 e três do tratamento 3 (Tabela 4), todas foram positivas para o gene *gus* em ensaio histoquímico (Figura 11 A à E). A planta EBDA 1 (Figura 11A) parece ser uma quimera, pois parte da folha não apresentou *gus*. A EBDA 3 (Figura 11C) desenvolveu quatro brotos e os quatro também foram positivos para o *gus* (Figura 11 F à H). Destas plantas obtidas apenas três sobreviveram e estão em fase de enraizamento. Ainda há plantas em desenvolvimento que não foram testadas.

Foram obtidas diferentes eficiências para cada tratamento/cultivar. No Tratamento 1 para a cultivar Nordestina foi obtida uma eficiência de 0,08%. No tratamento 2 para EBDA-MPA-34 a eficiência foi de 0,32% enquanto que no Tratamento 3 foi de 0,52%. Comparativamente Sailaja *et al.* (2008) obtiveram eficiência de 1,4% por transformação genética via biobalística em mamona, sendo que a cultivar utilizada já é bem estudada para transformação (Sujatha & Sailaja, 2005, Malathi *et al.*, 2006) sendo que nosso sistema é inteiramente novo utilizando cultivares brasileiras e com as quais não existem trabalhos de transformação, então o sistema ainda pode ser aperfeiçoado e novas cultivares testadas.

O melhor sistema de transformação obtido foi o cultivo dos embriões por dois dias no escuro em meio com TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> seguido do bombardeamento e cultivo por oito dias em meio com TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> e IMZ 100 nM. Após este período os embriões foram transferidos

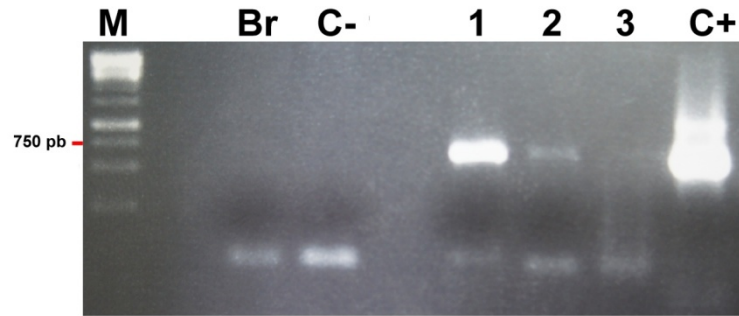
para meio de seleção acrescido de AIA para alongamento. E depois de alongados foram transferidos para o meio de enraizamento. A figura 12 ilustra o processo de regeneração da mamona.

**Tabela 3:** Resumo dos diferentes tratamentos dos bombardeamentos, mostrando os tipos de reguladores de crescimento no MMPré, o tempo que os embriões permaneceram no meio MMPré no escuro, o tipo de regulador no MMPós e a concentração inicial de IMZ no MSA.

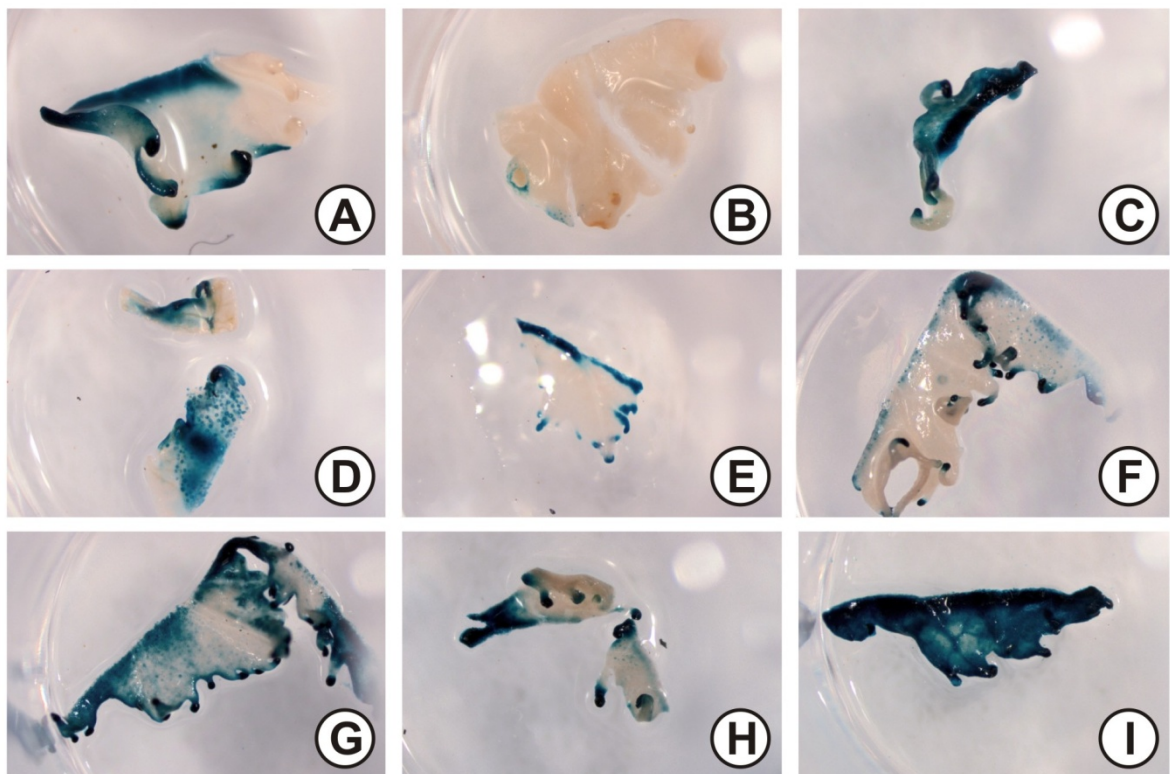
Tratamentos	MMPré	Tempo no meio		MSA
		MMPré no escuro (dias)	MMPós	
Tratamento 1	TDZ 1 mg.L <sup>-1</sup>	4	BAP 0,5 mg.L <sup>-1</sup> <sub>1</sub>	IMZ 150
Tratamento 2	BAP 0,5 mg.L <sup>-1</sup>	3	BAP 0,5 mg.L <sup>-1</sup> <sub>1</sub>	IMZ 150
Tratamento 3	TDZ 1 mg.L <sup>-1</sup>	2	TDZ 1 mg.L <sup>-1</sup> e IMZ 100 nM	IMZ 200

**Tabela 4:** Resumo dos bombardeamentos mostrando o número de embriões bombardeados para cada cultivar em cada tratamento, suas médias e o número de plantas positivas.

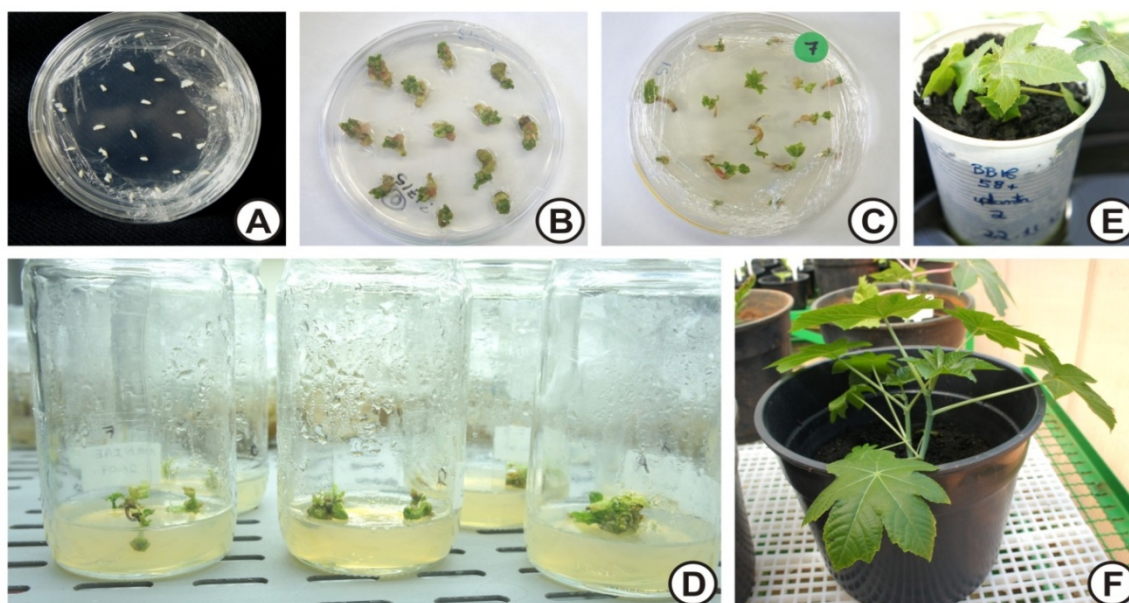
Tratamento	Cultivar	Número de embriões bombardeados	Plantas positivas	Eficiência
Tratamento 1	Nordestina	1245	1	0,08%
	Paraguaçu	348	0	0%
Tratamento 2	Nordestina	1056	0	0%
	Paraguaçu	189	0	0%
Tratamento 3	EBDA-MPA-34	622	2	0,32%
	EBDA-MPA-34	577	3	0,52%
TOTAL	-	4.037	6	-



**Figura 10:** Gel de agarose 1% mostrando a amplificação de bandas de cerca de 700 pares de bases que correspondem ao fragmento amplificado para o *ahas*. M: Marcador de peso molecular (1kb ladder, Invitrogen), Br: Branco (reação de PCR sem DNA), C-: Controle negativo (reação de PCR com DNA de planta não transformada) 1: ramo 1 da plântula B1, 2: ramo 2 da plântula B1, 3: plântula B2 e C+: Controle positivo (reação de PCR com DNA do vetor de transformação), ambas as plântulas analisadas são da variedade nordestina.



**Figura 11:** Detecção de *gus* em ensaio histoquímico com X-gluc mostrando pedaços das folhas das plântulas transformadas via biobalística. A: EBDA 1; B: EBDA 2; C: EBDA 3; D: EBDA 4; E: EBDA 5; F: ramo 1 da EBDA 3; G: ramo 2 da EBDA 3; H: ramo 3 da EBDA 3 e I: ramo 4 da EBDA 3.



**Figura 12:** Etapas do sistema de regeneração de mamona. A: Embriões retirados das sementes cultivados em meio com TDZ 1mg.L<sup>-1</sup>. B: Explantes cultivados por 10 dias após o bombardeamento em meio com TDZ 1 mg.L<sup>-1</sup> e IMZ 100. C: Explantes cultivados por 10 dias após o bombardeamento em meio com BAP 0,5 mg.L<sup>-1</sup>. D: Explantes positivos para o *gus* em estágio de enraizamento. E: Planta aclimatizada que se desenvolveu e enraizou em meio com seleção. F: Planta em casa de vegetação.

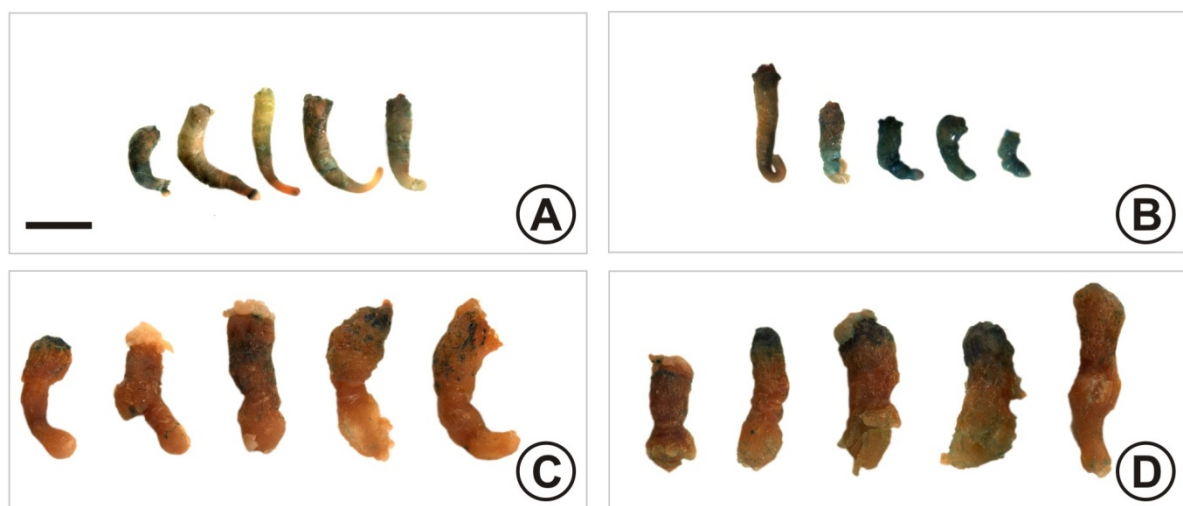
### 5.6 Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

Na transformação com *Agrobacterium* foram feitos vários testes subsequentes. Primeiramente foi avaliado o melhor método de provocar injúria no explante sem levá-los a morte, para isso foram testados dois métodos. Após a exposição do meristema e do ferimento com agulha na região meristemática os embriões foram submetidos aos tratamentos de infiltração por 30 min ou sonicação por 5 min com infiltração por 30 min.

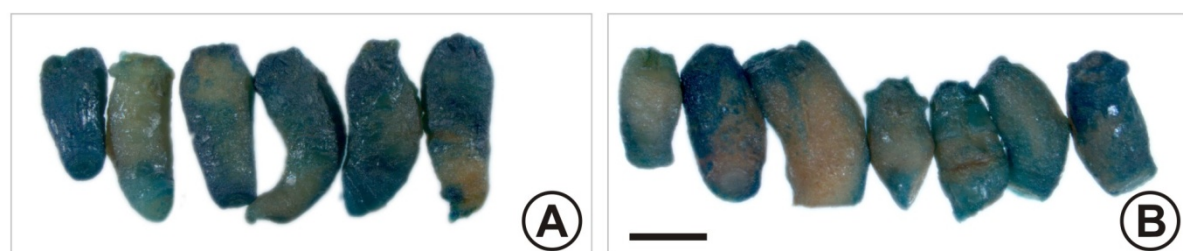
O tratamento de sonicação com infiltração se mostrou mais eficiente e foi adotado para o sistema de transformação, pois, os embriões apresentaram uma maior expressão do gene *gus* (Figura 13) e a maior taxa de sobrevivência de 80% contra 66% de sobrevivência no tratamento só com infiltração. Oliveira *et al.* (2009) viram que a combinação de sonicação e infiltração aumentou a eficiência de transformação via *Agrobacterium* em laranja (*Citrus sinensis*). A eficiência de transformação via *Agrobacterium* também foi melhor com o uso de sonicação e infiltração para feijão caupi (*Vigna unguiculata*) (Bakshi *et al.*, 2011).

A próxima avaliação foi verificar se haveria alguma diferença na eficiência de transformação ao se cortar parte da radícula durante a transformação (antes de sonicar e infiltrar) para que haja transformação no corte e facilite a absorção e transformação do explante. Aparentemente não houve diferença na expressão superficial (Figura 14), mas foram feitos alguns cortes manuais nas plantas analisadas para detectar a expressão do *gus* e foi observada uma maior expressão dentro do explante nas plantas onde a radícula foi cortada (Figura 15). Sarker *et al.* (2003) viram que cortar parte da raiz dos explantes embrionários de lentilha aumentou a eficiência da transformação.

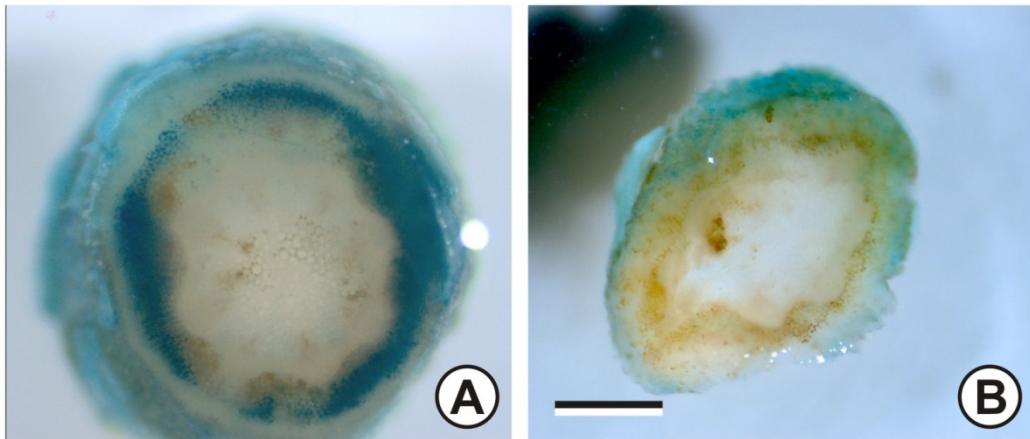
Ainda deverão ser feitos ajustes no método de transformação via *Agrobacterium*, como o tempo ótimo de cocultura, a concentração inicial e quando iniciar o uso de agente seletivo, para gerar um sistema de transformação eficiente.



**Figura 13:** Expressão de *gus* em explantes transformados via *Agrobacterium tumefaciens*. No quinto dia de cocultura, no tratamento com infiltração (A) e no tratamento com sonicação e infiltração (B). Dez dias após a co-cultura em explantes que passaram pelo tratamento de infiltração (C) e pelo tratamento de sonicação e infiltração (D). Barra: 5 mm.



**Figura 14:** Expressão de *gus* em explantes que não tiveram a ponta da radícula cortada durante a transformação (A) e em explantes que tiveram a ponta da radícula cortada (B). Barra: 2 mm.



**Figura 15:** Corte manual dos explantes transformados via *Agrobacterium tumefaciens* mostrando a expressão do *gus* dentro do explante que teve a radícula cortada (A) e no explante que não teve a radícula cortada (B). Barra: 0,5 mm.

## 6. Conclusão

- No presente trabalho o TDZ se mostrou o melhor fitorregulador para induzir brotos em mamona e com resposta mais rápida que o BAP;
- A concentração de IMZ para a curva de seleção para transformação de mamona foi estabelecida em 200 nM.
- O sistema de transformação é eficiente e a cultivar escolhida é importante, no momento a melhor opção é a EBDA-MPA-34.

## 7. Referências bibliográficas

- Aires, P. S. R., Carvalho, J. M. F. C., Silva, H., Pimentel, N.W. (2008). Efeito da citocinina 6-benzilaminopurina na micropropagação *in vitro* da mamona utilizando o genótipo BRS nordestina. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* **8**, 80-85.
- Ahn, H., Chen, G. Q. (2008). *In vitro* regeneration of castor (*Ricinus communis* L.). *Hort. Science* **43**, 215-219.
- Ahn, Y. J., Vang, L., McKeon, T. A., Chen, G. Q. (2007). High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* **43**, 9-15.
- Andrade, S. R. M. de. (2003). Transformação de plantas. In *Documentos 102* (Embrapa Cerrados), pp. 28. Planaltina: Embrapa Cerrados.
- APG III. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**, 105-121.
- Aragão, F. J. L., Figueiredo, S. A. (2008). RNA interference as a tool for plant biochemical and physiological studies. In *A Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology* (Org. M. Rivera-Domínguez; R. Troncoso-Rojas; M.E. Tiznado-Hernandez). Kerala, India: Research Signpost 1, 17-50.
- Aragão, F. J. L., Sarokin, L., Vianna, G. R., Rech, E. L. (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 Gen.* **101**, 1–6.
- Aragão, F. J. L., Barros, L. M. G., Brasileiro, A. C. M., Ribeiro, S. G., Smith, F. D., Sanford, J. C., Faria, J. C., Rech, E. L. (1996). Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **93**,141-150.
- Aragão, F. J. L, Brasileiro, A. C. M. (2010). Introdução de genes em células vegetais mediada pelo processo biobalístico. In *Cultivo in vitro de plantas* (Ed. Cid, L. P. B.), p.247-274. Brasília: Embrapa informação tecnológica.
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J., Osterloh, J. (2005). Ricin poisoning: A comprehensive review. *JAMA* **294**, 2342-2351.



- Bakshi, S., Sadhukhan, A., Mishra, S., Sahoo, L.** (2011). Improved Agrobacterium-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep.* **30**, 2281-2292.
- Baldoni, A. B.** (2010) Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas. *Tese (Doutorado em Biologia Molecular)*-Universidade de Brasília, Brasília.
- Barnes, D. J., Baldwin, B. S., Braasch, D. A.** (2009). Ricin accumulation and degradation during castor seed development and late germination. *Industrial Crops and Products* **30**, 254-258.
- Berman, P., Nizri, S., Wiesman, Z.** (2011). Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. *Biomass and Bioenergy* **35**, 2861-2866.
- Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E., Mendes, E.A., Aragão, F. J. L.** (2007). RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *MPMI* **20**, 717-726.
- Brasileiro, A. C. M., Aragão, F. J. L.** (2010). O sistema Agrobacterium: do solo para o laboratório. In *Cultivo in vitro de plantas* (Ed. Cid, L. P. B.), p.275-303. Brasília: Embrapa informação tecnológica.
- Brasileiro, A. C. M., Lacorte, C.** (1998). Interação Agrobacterium - Hospedeiro. In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), p. 51-64. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Bukhari, M. N. S. S., Dar, A. A.** (2012). Treatment of Cancer on human Melanoma Cell lines by *Ricinus communis* extract. *Asian Journal of Plant Science & Research* **2**, 680-687.
- Cabral, G. B.** (2012). Cultura de tecidos e transformação *genética* de espécies da família Poaceae. Centro de Energia Nuclear na Agricultura. *Tese (Doutorado)*. Piracicaba, Universidade de São Paulo.
- Carrer, H.** (2002). Gene Marcador Seletivo. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **27**, 12-17.
- Carthew, R. W.** (2001). Gene silencing by double-stranded RNA. *Current Opinion in Cell Biology* **13**, 244-248.

- Carvalho, J. M. F. C., Aires, P. S. R., Nara, W. P., Silva, H., Santos, J. W.** (2007). Micropropagação *in vitro* de *Ricinus communis* L. utilizando a citocinina 6-Bencilaminopurina. In *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 84* (Embrapa algodão), pp. 16. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Carvalho, J. M. F. C., Araújo, S. S.** (2008). Técnicas de cultivo *in vitro* aplicadas na mamoneira. In *Documentos 194* (Embrapa Algodão), pp. 23. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Chan, A. P., Crabtree, J., Zhao, Q., Lorenzi, H., Orvis, J., Puiu, D., Melake-Berhan, A., Jones, K. M., Redman, J., Chen, G. et al.** (2010). Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature biotechnology* **28**, 951-959.
- Chen, G. Q., He, X., Liao, L. P., McKeon, T. A.** (2004). 2S Albumin Gene Expression in Castor Plant (*Ricinus communis* L.). *JAOCs* **81**, 867-872.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento.** (2013). Acompanhamento de safra brasileira: grãos, sexto levantamento. Brasília, Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1382&t=2> [Acessado em 10 de março de 2013].
- Coopman, V., De Leeuw, M., Cordonnier, J., Jacobs, W.** (2009). Suicidal death after injection of a castor bean extract (*Ricinus communis* L.). *Forensic Science International* **189**, e13–e20.
- Coutinho, W. M., Suassuna, N. D.** (2006). Doenças da Mamoneira. In *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde* (eds. L. S. Severino, M. Milani, N. E. M. Beltrão), p.108-122. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Dubois, J., Piccirilli, A., Magne, J., He, X.** (2012). Detoxification of castor meal through reactive seed crushing. *Industrial Crops and Products* **43**, 194-199.
- FAO Statistics.** (2013). Production and trade - Castor beans. FAO. Available at: <http://faostat.fao.org> [Acessado em 10 de Março de 2013].
- Ferraz, A. C., Angelucci, M. E. M., Costa, M. L. da, Batista, I. R., Oliveira, B. H. de, Cunha, C. da.** (1999): Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis* L.. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **63**(3), 367-375.

- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Frizzi, A., Huang, S.** (2010) Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnol J.* **8**(6), 655-77.
- Gardner Junior, H. K., D'Aquin, E. L., Koltun, S. P., McCourtney, E. J., Vix, H. L. E.** (1960). Detoxification and deallergenization of castor beans. *The Journal of the American Oil Chemists Society* **37**, 142-148.
- Ghrabi Z.** (2005). *Ricinus communis* L. In: *A Guide to Medicinal Plants in North Africa* (M. Hammouda, S. I., Ismail, N. S., Abdel-Azim, K., A. Shams), pp. 227-228. IUCN (International Union for Conservation of Nature).
- Halling, K. C., Halling, A. C., Murray, E. E., Ladin, B. F., Houston, L. L., Weaver, R. F.** (1985). Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Research* **13**, 8019-8033.
- Hamelin, E. I., Johnson, R. C., Osterloh, J. D., Howard, D. J., Thomas, J. D.** (2012). Evaluation of ricinine, a ricin biomarker, from a non-lethal castor bean ingestion. *Asian Journal of Plant Science and Research* **2**, 680-687.
- Hannon, G. J.** (2002) RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Heeres, P., Schippers-Rozenboom, M., Jacobsen, E., Visser, R. G. F.** (2002). Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability. *Euphytica* **124**, 13-22.
- Hoffman, L. V., Dantas, A. C. A., Medeiros, E. P., Soares, L. S.** (2007). Ricina: um impasse para a utilização da torta de mamona e suas aplicações. In *Documentos 174* (Embrapa Algodão), pp. 25. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Holfelder, M. G. A., Steck, M., Komor, E., Seifert, K.** (1998). Ricinine in phloem sap of *Ricinus communis*. *Phytochemistry* **47**, 1461-1463.
- Kiihl, T. A. M.** (2006). Doenças em mamona (*Ricinus communis* L.) *Pesquisa & Tecnologia* **3**, 11p.

- Iser, M., Fettig, S., Scheyhing, F., Viertel, K., Hess, D.** (1999). Genotype-dependent stable genetic transformation in German spring wheat varieties selected for high regeneration potential. *Journal of plant physiology* **154**, 509-516.
- Kikkert, J. R., Vidal, J. R., Reisch, B.I.** (2004). Stable transformation of plant cell by particle bombardment/biolistics. In *Transgenic plants: methods and protocols* (ed. L. Peña), pp. 61-78. Totowa: Humana Press.
- Kraemer, A. F., Marchesan, E., Avila, L. A., Machado, S. L. O., Grohs, M.** (2009). Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas – revisão. *Planta daninha* **27**, 629-639.
- Kumari, K. G., Ganesan M., Jayabalan N.** (2008). Somatic organogenesis and plant regeneration in *Ricinus communis*. *Biol. Plant* **52**, 17-25.
- Lacorte, C., Romano, E.** (1998). Transferência de vetores para *Agrobacterium*. In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), pp. 93-109. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Lima, E. P.** (2007). Estudo da estrutura e função da ricina e de tecnologia para o uso da torta de mamona como alimento animal. In *Congresso de Pesquisa e inovação da rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica*, 2. João Pessoa: Connepi.
- Madeira Jr., J. V., Macedo, J. A., Macedo, G. A.** (2011). Detoxification of the castor bean residue and concomitant production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology* **102**, 7343-7348.
- Malathi, B., Ramesh, S., Rao, K. V., Reddy, V. D.** (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). *Euphytica* **147**, 441-449.
- Mansoor, S., Amin, I., Hussain, M., Zafar, Y., Briddon, R. W.** (2006). Engineering novel traits in plants through RNA interference. *TRENDS in Plant Science*, 11 (11) 559-565.
- Martinez, C. O., Santen, M. V., Ayub, R. A., Cortez, M. G.** (2005). Glicofosato e glufosinato como agentes seletivos para transformação genética de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). *Revista Brasileira de Herbicidas* **3**, 18-34.

- McCullen, C. A., Binns, A. N.** (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 101-127.
- Melo, W. C., Silva, D. B., Pereira, N.** (2008). Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação de letalidade da torta hidrolisada para camundongos. *Química Nova* **31**, 1104-1106.
- Miki, B., McHugh, S.** (2004). Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology* **107**, 193-232.
- Milani, M., Miguel Júnior, S. R., de Oliveira, E. C. S., Nóbrega, M. B. de M., da Costa, M. N.** (2006). Caracterização Taxonômica de Acessos de Mamona (*Ricinus Communis* L.) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* **67**. pp. 17. Campina Grande: Embrapa algodão.
- Milani, M., Dantas, F. V., Macedo, F. da C. de O.** (2008). In *Documentos 193* (Embrapa Algodão), pp. 66. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Milani, M., Miguel Junior, S. R., Sousa, R. L.** (2009). Sub-espécies de mamona. In *Documentos 230* (Embrapa Algodão), pp. 23. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Molina, S. M.** (1995). Micropropagation of *Ricinus communis*. *Journal of Plant Phisology* **147**, 270-272.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *The plant Cell* **2**, 279-289.
- Neal, L. M., McCarthy, E. A., Morris, C. R., Mantis, N. J.** (2011). Vaccine-induced intestinal immunity to ricin toxin in the absence of secretory IgA. *Vaccine* **29**, 681-689.
- Nunes, A. C. S., Vianna, G. R., Cuneo, F., Amaya-Farfán, J., Capdeville, G., Rech, E. L., Aragão, F. J. L.** (2006). RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (GmMIPS1) in transgenic soybean inhibited seed development and reduces phytate content. *Planta* **224**, 125-132.
- Oliveira, I. P., Santos, K. J. G., Beltrão, N. E. M., Neves, B. P., Araújo, A. A., Oliveira, L.C.** (2005). Potenciais da mamona (*Ricinus communis* L.) na região centro-oeste brasileira. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos* **1**, 104 -130.

- Oliveira, M. L. de, Febres, V. J., Costa, M. G., Moore, G. A., Otoni, W. C.** (2009). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep.* **28**, 387-395.
- Olsnes, S., Kozlov, J. V.** (2001). Ricin. *Toxicon* **39**, 1723-1728.
- Olsnes, S.** (2004). The history of ricin, abrin and related toxins. *Toxicon* **44**, 361-370.
- Ortiz-Quintero, B.** (2009). RNA de interferencia: Origen y aplicación en El silenciamiento de genes. *Revista de Investigación Clínica* **61**, 412-427.
- Pan, Q., van der Laan, L.J.W., Janssen, H. L. A., Peppelenbosch, M. P.** (2012). A dynamic perspective of RNAi library development. *Trends in Biotechnology* **30** (4), 206-215.
- Pitzschke, A., Hirt, H.** (2010). New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* **29**, 1021-1032.
- Rana, M., Dhamija, H., Prashar, B., Sharma, S.** (2012). *Ricinus communis* L. – A Review. *International Journal of PharmTech Research* **4**, 1706-1711.
- Rech, E. L., Aragão, F. J. L.** (1998). Biobalística. In *Manual de transformação genética de plantas* (eds. A. C. M. Brasileiro, V. T. C. Carneiro), p. 51-64. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen.
- Rodrigues, R. F. O., Oliveira, F., Fonseca, A. M.** (2002). As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu: Revisão de conhecimentos. *Revista Lecta* **20**, 183-194.
- 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**, 1509-1519.
- Santana, G. C. S., Martins, P. F., de Lima da Silva, N., Batistella, C.B.; Maciel Filho, R., Wolf Maciel, M. R.** (2010). Simulation and cost estimate for biodiesel production using castor oil. *Chemical Engineering Research & Design* **88**, 626-632.
- Santarém, E. R.** (2000). Métodos eficientes para a transformação genética de plantas. *Revista de ciência e tecnologia* **15**, 81-90.
- Sarker, R. H., Biswas, A., Mustafa, B. M., Mahbub, S., Hoque, M. I.** (2003). *Agrobacterium*-mediated Transformation of Lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Tissue Cult.* **13**, 1-12.

- Savy Filho, A.** (2005). Melhoramento da Mamona. In *Melhoramento de espécies cultivadas* (ed. A. Borém), pp.429-452. Viçosa: Ed. UFV.
- Schep, L. J., Temple, W. A., Butt, G. A., Beasley, M. D.** (2009). Ricin as a weapon of mass terror – separating fact from fiction. *Environment International* **35**, 1267–1271.
- Schieltz, D. M., McGrath, S. C., McWilliams, L. G., Rees, J., Bowen, M. D., Kools, J. J., Dauphin, L. A., Gomez-Saladin, E., Newton, B. N., Stang, R. L. et al.** (2011). Analysis of active ricin and castor bean proteins in a ricin preparation, castor bean extract, and surface swabs from a public health investigation. *Forensic Science International* **209**, 70–79.
- Scholz, V., Silva, J. N. da.** (2008). Prospects and risks of the use of castor oil as a fuel. *Biomass and Bioenergy* **32**, 95–100.
- Severino, L. S.** (2005). O que sabemos sobre a torta de mamona. In *Documentos 134* (Embrapa Algodão), p. 31. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Severino, S. L.** (2006) Como a Índia tornou se líder mundial na produção de mamona. In: *BiodieselBR*. Disponível em: [www.biodieselbr.com/colunistas/liv/india-lider-mundial-producao-mamona.htm](http://www.biodieselbr.com/colunistas/liv/india-lider-mundial-producao-mamona.htm). Acessado em 10/04/2013.
- Severino, L. S., Freire, R. M. M.** (2006). Subprodutos. In *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde* (eds. L. S. Severino, M. Milani, N. E. M. Beltrão), p. 220-231. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Silva, M. N. da.** (2010). Extração de DNA genômico de tecidos foliares maduros de espécies nativas do cerrado. *Rev. Árvore* **34**, 973-978.
- Singh, A. K.** (2011). Castor oil-based lubricant reduces smoke emission in two-stroke engines. *Industrial Crops and Products* **33**, 287–295.
- Smallshaw, J. E., Richardson, J. A., Vitetta, E. S.** (2007). RiVax, a recombinant ricin subunit vaccine, protects mice against ricin delivered by gavage or aerosol. *Vaccine* **25**, 7459-7469.
- Soares, J. J., Dias, J. M.** (2006). Pragas. In *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde* (eds. L. S. Severino, M. Milani, N. E. M. Beltrão), p.100-105. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

- Souza, V. C., Lorenzi, H.** (2005). Euphorbiacea. In *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II* (eds. V. C. Souza, H. Lorenzi), p. 364-374. São Paulo: Instituto Plantarum Ed.
- Spies, J. R., Coulson, E. J.** (1965). Antigenic specificity relationships of castor bean meal, pollen, and allergenic fraction, CB-1A, of *Ricinus communis*. *J. Allergy* **36**, 423-432.
- Sujatha, M.; Reddy, T. P.** (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 Reports* **23**, 803-810.
- Tambascia, M. B., Teixeira, J. P. F.** (1986). Mamona: determinação quantitativa do teor de óleo. *Bragantia* **45**, 23-27.
- Tunaru, S., Althoff, T. F., Nüsing, R. M., Diener, M., Offermanns, S.** (2012). Castor oil induces laxation and uterus contraction via ricinoleic acid activating prostaglandin EP<sub>3</sub> receptors. *PNAS* **109**, 9179–9184.
- Tyagi, N., Ghosh, P.C.** (2011). Folate receptor mediated targeted delivery of ricin entrapped into sterically stabilized liposomes to human epidermoid carcinoma (KB) cells: Effect of monensin intercalated into folate-tagged liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **43**, 343–353.
- Vendruscolo, E. C. G.** (2003). Silenciamento gênico e transgênicos. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* **31**, 8-13.
- Vidal, M. S., Carvalho, J. M. F. C., Santos, J. W. dos, Pinheiro, M. P. N., Jerônimo, J. F.** (2005). Indução de calos a partir de embriões zigóticos imaturos em duas cultivares de algodão. *Comunicado Técnico*, 265 (Embrapa Algodão), 4 p. Campina Grande: Embrapa Algodão.
- Vieira, C., Evangelista, S., Cirillo, R., Terracciano, R., Lippi, A., Maggi, C. A., Manzini, S.** (2000). Antinociceptive activity of ricinoleic acid, a capsaicin-like compound devoid of pungent properties. *European Journal of Pharmacology* **407**, 109–116.



- Waterhouse, P., Helliwell, C. A.** (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Reviews (Genetics)* **4**, 29-38.
- Wawrzynczak, E. J.** (1991). Systemic immunotoxin therapy of cancer: advances and prospects. *Br. J. Cancer* **64**, 624-630.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A. et al.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* **27**, 581-590.
- Williams, P., Welker, K., McClam, E.** (2013). Feds arrest suspect in ricin-positive letters sent to Obama, senator. NBC news. In: [http://usnews.nbcnews.com/\\_news/2013/04/17/17794663-feds-arrest-suspect-in-ricin-positive-letters-sent-to-obama-senator?lite](http://usnews.nbcnews.com/_news/2013/04/17/17794663-feds-arrest-suspect-in-ricin-positive-letters-sent-to-obama-senator?lite)
- Woo, B. H., Lee, J. T., Park, M. O., Lee, K. R., Han, J. H., Park, E. S., Yoo, S. D., Lee, K. C.** (1999). Stability and cytotoxicity of Fab-Ricin A immunotoxins prepared with water soluble long chain heterobifunctional crosslinking agents. *Arch Pharm Res* **22**, 459-463.
- Yadav, J. S.; Ogwok, E.; Wagaba, H.; Patil, B.; Bangewadi, B.; Alicai, T.; Gaitan-Solis, E.; Taylor, N. J.; Fauquet, C.M.** (2011). RNAi-mediated resistance to *Cassava brown streak Uganda virus* in transgenic cassava. *Molecular Plant Pathology* **12**, 677-687.

## 8. Apêndice I

Tabelas completas dos experimentos de bombardeamento.

**Tabela 5:** Dados completos de bombardeamento no Tratamento 1.

Ordem de Bombardeamento	Cultivar	Número de embriões bombardeados	Perdas por contaminação e ensaio <i>gus</i>	Plantas positivas
1	Nordestina	120	0	0
2	Nordestina	130	0	0
3	Nordestina	160	0	0
4	Nordestina	120	8	0
5	Nordestina	140	2	0
6	Nordestina	40	5	0
7	Nordestina	60	0	0
8	Nordestina	120	0	0
9	Nordestina	140	2	0
10	Nordestina	80	0	0
11	Nordestina	90	0	0
12	Nordestina	120	0	0
13	Nordestina	120	0	0
14	Nordestina	140	0	1
15	Nordestina	150	0	0
16	Paraguaçu	120	13	0
17	Paraguaçu	120	9	0
18	Paraguaçu	70	0	0
19	Paraguaçu	60	0	0

**Tabela 6:** Dados completos de bombardeamento no Tratamento 2.

Ordem de Bombardeamento	Cultivar	Número de embriões bormbardeados	Perdas por contaminação e ensaio <i>gus</i>	Plantas positivas
1	Nordestina	120	0	0
2	Nordestina	60	1	0
3	Nordestina	80	0	0
4	Nordestina	60	0	0
5	Nordestina	60	7	0
6	Nordestina	60	6	0
7	Nordestina	130	13	0
8	Nordestina	140	14	0
9	Nordestina	80	8	0
10	Nordestina	60	6	0
11	Nordestina	60	6	0
12	Nordestina	170	17	0
13	Nordestina	60	6	0
14	Paraguaçu	60	0	0
15	Paraguaçu	70	1	0
16	Paraguaçu	60	0	0
17	EBDA-MPA-34	210	21	2
18	EBDA-MPA-34	120	12	0
19	EBDA-MPA-34	240	14	0
20	EBDA-MPA-34	110	11	0

**Tabela 7:** Dados completos de bombardeamento no Tratamento 3.

Ordem de Bombardeamento	Cultivar	Número de embriões bormbardeados	Perdas por contaminação e ensaio <i>gus</i>	Plantas positivas
1	EBDA-MPA-34	110	17	0
2	EBDA-MPA-34	500	16	3

## 9. Apêndice II

Aragão, F. J. L., Sousa, N. L. de, Baldoni, A. B. Engenharia genética da mamoneira: perspectivas para a destoxificação da ricina. In: Destoxificação e Aproveitamento de Tortas de Pinhão-manso e Mamona (ed. Rodrigues, C. M.). Brasília: Embrapa Agroenergia. Impress. No prelo.

### ENGENHARIA GENÉTICA DA MAMONEIRA: PERSPECTIVAS PARA A DESTOXIFICAÇÃO DA RICINA

Francisco José Lima Aragão, Natália Lima de Sousa, Aisy Botega Baldoni

#### RESUMO

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma oleaginosa de grande importância econômica e social. Seu óleo (composto de 91% de ácido ricinoléico) é usado na fabricação de cosméticos, tintas, plásticos, lubrificantes e biodiesel. A torta de mamona pode ser usada como adubo por possuir grande quantidade de nitrogênio e como ração animal por ser rica em proteínas, mas há um problema na utilização da torta na alimentação animal, a ricina, uma proteína tóxica produzida somente nas sementes da mamona. A ricina é uma lectina composta de duas subunidades, cadeias A e B, que inativa ribossomos e impede a síntese de proteínas, levando a célula à morte. Estudou-se a variabilidade genética quanto à presença de ricina nas sementes, o acúmulo de ricina e aglutinina (RCA) durante o desenvolvimento da semente. Os resultados mostram que há uma considerável variabilidade no teor de ricina presente nas sementes, variando de 3,53 ng de ricina/ $\mu$ g de proteína total na cv. BRS Paraguaçu até 32,18 ng de ricina/ $\mu$ g de proteína total no acesso BRA 3271. Outros estudos, realizados nos Estados Unidos também têm demonstrado a existência de variabilidade quanto ao teor de ricina em diversos acessos de mamoneira. Ensaios de imunolocalização de ricina mostraram que o acúmulo dessa proteína se inicia 20 dias após a polinização (DAP), atingindo o máximo aos 60 DAP em que se observa o seu armazenamento tanto na matriz quanto nos cristaloides dos corpos proteicos. Também foram geradas plantas geneticamente modificadas com uma construção baseada em RNAi para silenciamento do gene que codifica para a ricina. Em uma das linhagens foi observado uma redução de 70% no teor de ricina nas sementes maduras.

#### ABSTRACT

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is an oilseed crop of great economic and social importance. Its oil (composed of 91% ricinoleic acid) is used in the manufacture of cosmetics, paints, plastics, lubricants and biodiesel. The castor bean can be used as fertilizer and to feed animals due to its high content of protein. However, there is a problem in the use of the grains in animal feeding, the ricin, a toxic protein produced only in the seeds of castor. Ricin is a lectin composed of two subunits, A and B chains, which inactivates ribosomes preventing protein synthesis and leading to cell death. It was studied the ricin genetic variability in the grains and the accumulation of ricin and agglutinin (RCA) during seed development. The results have shown that there is considerable variability in the amount of ricin present in seeds ranging from 3.53 ricin ng/mg total protein in the cv. BRS Paraguaçu to 32.18 ng/mg total protein in the access BRA 3271. Other studies conducted in the U.S.A. have also observed that there is variability in the content of ricin in several accessions of castor bean. Immunolocalization of ricin showed that protein accumulation begins 20 days after pollination (DAP), peaking at 60 DAP being observed in the matrix and crystalloids of protein bodies. Genetically modified plants have also been generated with a construction based on RNAi to silence the gene encoding ricin. In one of the lines it was observed a 70% reduction in the concentration of ricin in mature seeds.

#### 1. INTRODUÇÃO

A mamona é uma oleaginosa que pertence à família *Euphorbiaceae* (SOUZA; LORENZI, 2005). 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 (OLSNES; KOZLOV, 2001) e introdução no Brasil pelos portugueses para a utilização de seu óleo para a iluminação e lubrificação de eixos de carroças (MOREIRA et al., 1996; PINA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Atualmente a mamona tem grande importância econômica e social, o cultivo comercial das sementes é bastante comum em várias regiões do mundo principalmente devido às propriedades do seu óleo que compõe cerca de 35 a 55% do peso da semente sendo seu produto de maior importância (TAMBASCIA; TEIXEIRA, 1986). Além da mamona ser uma importante opção de renda para o pequeno agricultor, pois é um sistema agrícola que utiliza poucos insumos, necessita de baixo

investimento em mecanização e 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).

O óleo extraído de suas sementes é utilizado para diversos fins, dentre eles 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), podendo gerar diversos tipos de produtos sofisticados como próteses humanas, produtos usados em indústrias farmacêuticas e até aeronáutica (OLIVEIRA et al., 2005). A mamona também se destaca como importante matéria-prima para a produção do biodiesel, por possuir elevada concentração de óleo nas sementes (Ribeiro, 2006).

Os ácidos graxos que compõem o óleo da mamona 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, sendo esta uma importante fonte comercial (FREIRE; SEVERINO, 2006).

A estrutura química do ácido ricinoléico (12-hidroxi oleato) é composta por 18 carbonos com ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento hidroxila ligado ao carbono 12. O grupo hidroxila confere ao composto um maior índice de viscosidade e estabilidade. 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).

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 (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.

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 (HOFFMANN et al., 2007).

A torta de mamona pode ser definida como o resíduo da extração do óleo das sementes e consiste no mais importante subproduto desta cadeia produtiva. A quantidade de torta produzida por tonelada de óleo do teor de óleo da semente e da eficiência do processo de extração (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).

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 e pode ser atraente para a suplementação animal, após ser moída e obtida o farelo (SEVERINO, 2005; CHIERICE; CLARO NETO, 2007).

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 ( $C_8H_{14}N_2O_2$ ), 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 gado (PINA et al., 2005).

A ricina é uma lectina produzida somente na semente da mamona, pertence ao grupo de Proteínas Inativadoras de Ribossomos e é composta de duas subunidades, as cadeias A e B ligadas por ponte dissulfeto (AUDI et al., 2005). 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; TREGGAR; 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 (TREGGAR; ROBERTS, 1992; CHEN et al., 2005).

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 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). 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, 1976; ROBERTS et al., 1992; SHEWRY et al., 1995), é um componente proteico de toxidez elevada, estando presente numa quantidade de 6% a 9% na baga (CHIERICE; CLARO NETO, 2007).

O mecanismo de toxidez da ricina ocorre quando esta entra na célula e impede a produção de proteínas levando a célula à morte. Isso ocorre 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 a subunidade 60S do ribossomo pela depurinação de um resíduo específico de adenina no RNA 28S, inativando a síntese proteica em eucariotos. 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).

De acordo com Olsnes e colaboradores (1975), apenas uma molécula da cadeia A da ricina é capaz de inativar irreversivelmente 2.000 ribossomos/min. Além disso, Eiklid e coautores (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, 2004).

Para uso da torta de mamona na ração animal é necessário o seu processamento visando à eliminação das toxinas, a partir do emprego de processos de fervura, autoclavagem ou mistura com carbonato de cálcio. Porém, esses procedimentos não são viáveis a nível industrial, visto que consomem muita energia, além de não disporem de métodos de controle de qualidade para confirmar a segurança do produto final. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas baratas e confiáveis de destoxicação (SEVERINO; FREIRE, 2006).

Nosso grupo tem estudado a variabilidade genética de um banco de germoplasma quanto à presença de ricina nas sementes, o acúmulo de ricina e aglutinina (RCA) durante o desenvolvimento da semente, bem como sua localização intracelular nos vários tecidos e principalmente, gerar plantas transgênicas de mamona (*Ricinus communis* L.) com redução total ou parcial do teor de ricina nas sementes.

## 2. DIVERSIDADE EM ACESSOS DE MAMONA DO BANCO DE GERMOPLASMA BRASILEIRO QUANTO À CONCENTRAÇÃO DE RICINA NAS SEMENTES

Estudo realizado por Baldoni e colaboradores (2011) comparou 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.

O coeficiente de variação (CV) foi elevado (42,73%) e, mesmo assim, a análise mostrou existência de variabilidade entre genótipos (BALDONI et al., 2011). 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. O alto coeficiente de variação encontrado nas análises de variância foi observado em outros trabalhos (LOWERY et al., 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.

O acesso BRA 3271 apresentou a maior concentração de ricina nas sementes (32,18 ng de ricina/µg de proteína total), com índice nove vezes maior do que a BRS Paraguaçu, de menor valor (3,53 ng de ricina/µg de proteína total (BALDONI et al., 2011). 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 dos melhoristas (PINKERTON et al., 1999).

## 3. ESTUDO DO ACÚMULO DE RICINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA SEMENTE DE MAMONA

Estudo foi conduzido para comparar o conteúdo de ricina em sementes maduras de quatro variedades comerciais brasileiras e investigar 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. 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. 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 (BALDONI et al., 2010).

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. 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 atingiram seu ponto de maturação fisiológica. O acúmulo da ricina em células do endosperma durante o desenvolvimento da semente também pode ser observado utilizando a microscopia de luz. O material passou pelo procedimento de imunomarcagem 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 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 (BALDONI et al., 2010).

Greenwood e Bewley (1982) observaram que a cultivar de mamona Hale, nos estágios de 20 - 40 DAP (fases IV a VIII) armazena lipídios, proteínas e fitina nas células do endosperma. Em Baldoni et al. (2010) também foi observado o acúmulo de proteínas, lipídios e fitinas, principalmente nas fases finais de desenvolvimento do endosperma. As células do endosperma na fase inicial de desenvolvimento (30 DAP) apresentaram grandes vacúolos e outras organelas, como retículo endoplasmático, núcleo e mitocôndrias. Aos 40 DAP também foram observados vacúolos e, em algumas células, organelas de armazenamento em formação, tais como vacúolos de armazenamento de

proteínas e corpos lipídicos. Cavidades globóides de fitina também foram observadas (BALDONI et al., 2010).

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 (BALDONI et al., 2010), confirmando os resultados obtidos por Youle e Huang (1976). Aos 50 DAP cristalóides de proteínas foram observados no interior de vacúolos de armazenamento de proteínas, sendo que em 60 DAP os cristalóides foram mais evidentes (Baldoni et al., 2010). Como esperado, essas observações foram consistentes com as informações obtidas por Greenwood et al. (1984) durante o desenvolvimento da semente de mamona.

A microscopia eletrônica foi utilizada para confirmar os resultados das análises de imunomarcagem anteriores. 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. 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. 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 (BALDONI et al., 2010).

Em uma análise das proteínas do endosperma, Youle e 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 também observaram 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 em Baldoni et al. (2010) 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 (BALDONI et al., 2010). Os 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 (BALDONI et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Kermodé e 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. Estes resultados corroboram a observação de que a expressão do gene da ricina é espacialmente e temporalmente regulada.

#### 4. SILENCIAMENTO DO GENE QUE CODIFICA A RICINA EM MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.)

Foi construído um vetor para silenciamento dos genes de codificação para ricina e RCA. O objetivo do nosso grupo é a obtenção de plantas com baixos teores de ricina presentes nos grãos maduros. Essa redução deve ser significativa para que a torta possa ser utilizada com segurança como ração animal. Entretanto, houve a necessidade de adaptar e melhorar os sistemas de transformação genética existentes, que são de baixa eficiência. Para isso, exploramos um novo sistema de seleção dos transformantes baseado no herbicida da classe das imidazolinonas, imazapir.

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. 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). A dosagem de imazapir selecionada para ser utilizada nos meios de cultura dos explantes após o bombardeamento foi de 200 nM tanto para meio sólido quanto para 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. Em outra análise com o mesmo vetor (pBI426) um número maior de pontos azuis foi observado. 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.

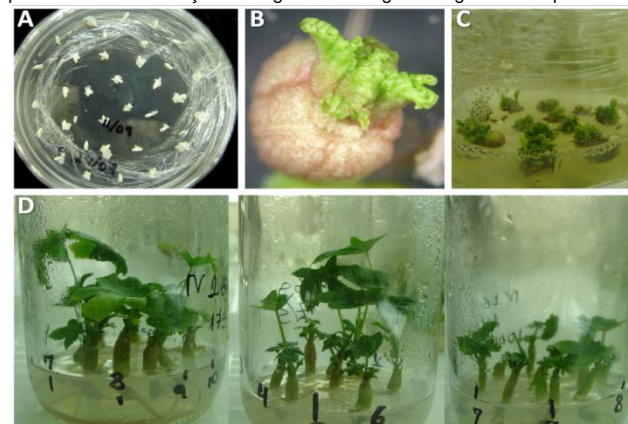
Para avaliar a eficiência do bombardeamento com o vetor construído para o silenciamento do gene da ricina foram selecionados ao acaso 100 explantes que passaram pelo processo de seleção ao imazapir e depois, pelo biorreator para o alongamento das brotações. Foram realizadas análises de PCR desses explantes com *primers* que amplificam um fragmento do gene *AHAS*. Dos 100 explantes analisados, 18 amplificaram o fragmento esperado e um fragmento inespecífico (cerca de 700 pb e 1200 pb, respectivamente) e 28 explantes apresentaram apenas a banda esperada. Dessa forma, dos 100 explantes analisados, 46 amplificaram o fragmento transgene, indicando elevada frequência de transformação. Problemas na regeneração não permitiram o desenvolvimento completo desses explantes, levando-os a morte.

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, 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 (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 foram testados visando uma maior eficiência no processo de regeneração dos explantes. Foi constatado que o meio com IBA, AgNO<sub>3</sub> e imazapir foi mais eficiente, já que os explantes apresentaram 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 aproximadamente 30 dias. Após esse período, ocorreram problemas de hiperhidricidade do explante, 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, 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 1. Os embriões foram retirados da semente e colocados em meio de cultura com 1mg/L de TDZ por quatro dias no escuro (Figura 1A), permitindo o crescimento dos primórdios foliares e facilitando a exposição do meristema apical durante o bombardeamento. Após o bombardeamento foram observados explantes com muitas brotações (Figura 1B), que foram colocados em meio de cultura com imazapir para a seleção dos brotos transgênicos (Figura 1C). Após um período de seleção, os explantes supostamente transgênicos alongaram (Figura 1D), originando plantas alongadas que passaram por análises moleculares para confirmar a inserção do fragmento transgene no genoma da planta.



**Figura 1.** 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 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. Dessas 86 plantas alongadas, 34 apresentaram a reação de PCR positiva para o *primer* que amplifica um fragmento do gene *ahas*, o agente seletivo, indicando que o fragmento transgene foi inserido na planta.

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 35S<sub>CaMV</sub> e o fragmento da ricina do cassete de transformação. Das 34 plantas analisadas, apenas dez mostraram amplificação do fragmento esperado na análise de PCR. Essas plantas foram aclimatadas e analisadas por *Southern blot* para identificação do cassete de silenciamento da ricina.

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*.

Sementes das linhagens transgênicas foram analisadas por ELISA para quantificação do teor de ricina. Os dados mostram que 3 linhagens tiveram a quantidade de ricina significativa diminuída quando comparadas com o controle (Figura 2).

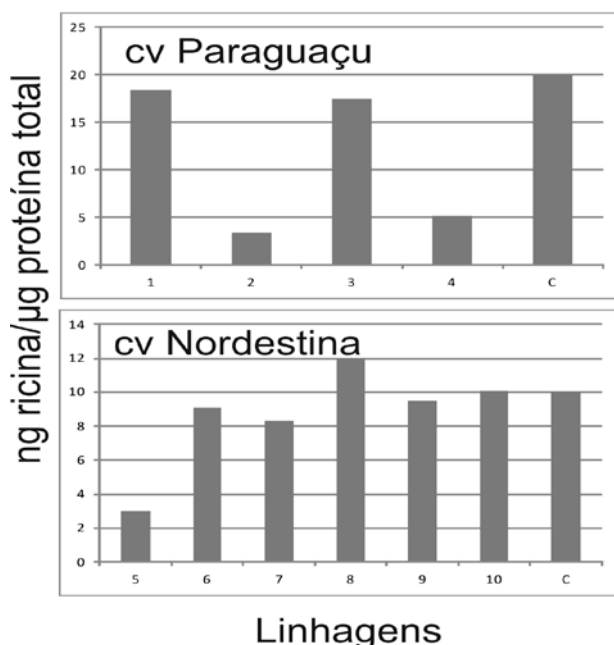


Figura 2. Análise de ELISA para detecção de ricina em sementes de plantas geneticamente modificadas de mamona (1-10) comparadas com o controle (C, plantas não transgênicas), das variedades Paraguaçu e Nordestina.

Esses resultados são extremamente promissores para o desenvolvimento de linhagens com baixos teores de ricina. As gerações devem ser avançadas para que se identifique planta com o transgene  $\Delta$ -ricina esteja em homozigose. Tem-se observado que o fenômeno de silenciamento é mais marcado em linhagens com os transgenes em homozigose.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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 no teor da ricina. Essas plantas deverão, em uma próxima etapa, entrar em um programa de desenvolvimento, em que plantas em homozigose devem ser analisadas e ensaios com animais devem ser realizados. As progênies continuaram a ser avaliadas para confirmar a herança do silenciamento. Adicionalmente, cruzamentos com linhagens/variedades com menores teores de ricina/RCA também podem ser úteis para a geração de novas variedades, em associação com as linhagens transgênicas mostrando silenciamento dos genes da ricina/RCA.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y.-J.; VANG, L.; MCKEON, T. A.; CHEN, G. Q. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). *Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, Columbia, v. 43, n. 1, p. 9-15, 2007.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, New York, v. 101, n. 1-2, p. 1-6, 2000.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning. A comprehensive review. *JAMA*, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AULD, D. L.; PINKERTON, S. D.; LOMBARD, K. A.; MURPHY, C. K.; LOWERY, C. C.; KENWORTHY, K. E.; BECKER, W. D.; ROLFE, R. D.; GHETIE, V. Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. *Crop Science*, Madison, 43, n. 2, p. 746-747, 2003.

BAFOR, M.; SMITH, M. A.; JONSSON, L.; STOBART, K.; STYMNE, S. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. *Biochemical Journal*, London, v. 280, p. 507-514, parte 2, 1991.

BALDONI, A. B.; ARAUJO, A. C. G.; CARVALHO, M. H.; GOMES, A. C. M. M.; ARAGÃO, F. J. L. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. *International Journal of Plant Biology*, Pavia, v. 1, n. 2, p. 61-65, 2010.

BALDONI, A. B.; CARVALHO, M. H. de; SOUSA, N. L.; NOBREGA, M. B. de M.; MILANI, M.; ARAGÃO, F. J. L. Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 7, p. 776-779, 2011.

BELTRÃO, N. E. M.; LIMA, R. L. S. Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). *O Agronegócio da mamona no Brasil*. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 397-416.

CHEN, G. Q.; HE, X.; MCKEON, T. A. A simple and sensitive assay for distinguishing the expression of ricin and *Ricinus communis* agglutinin genes in developing castor seed (*R. communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 53, n. 6, p. 2358-2361, 2005.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). *O Agronegócio da mamona no Brasil*. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 419-447.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (USA). 2004. Disponível em: <<http://www.hhs.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2006.

EIKLID, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modecinn into the cytosol of HeLa cells. *Experimental Cell Research*, San Diego, v. 126, n. 2, p. 321-326, 1980.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. 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. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 262, n. 12, p. 5908-5912, 1987.

FREIRE, R. M. M.; SEVERINO, L. S. Óleo de Mamona. In: SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). *Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. p. 210-218.

FUNATSU, G.; KIMURA, M.; FUNATSU, M. Primary structure Ala chain of ricin D. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokyo, v. 43, n. 10, p. 2221-2224, 1979.

GREENWOOD, J. S.; BEEWLEY, J. D. Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). 1. Descriptive morphology. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v. 60, n. 9, p. 1751-1760, 1982.

- GREENWOOD, J. S.; GIFFORD, D. J.; BEWLEY, J. D. 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. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 2, p. 255-261, 1984.
- GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. V.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, M. G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 44, n. 5, p. 317-322, 2009.
- HALLING, K. C.; HALLING, A. C.; MURRAY, E. E.; LADIN, B. F.; HOUSTON, L. L.; WEAVER, R. F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, n. 22, p. 8019-8033, 1985.
- HOFFMANN, L. V.; DANTAS, A. C. A.; MEDEIROS, E. P. de; SOARES, L. S. **Ricina: um impasse para utilização da torta de mamona e suas aplicações**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 25 p. (Documentos, 174).
- IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; VIEIRA, L. S.; CAMPOS, F. A. P.; ARAGÃO, F. J. L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1475-1483, 2008.
- KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. 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**, Rockville, v. 90, n. 2, p. 702-707, 1989.
- LAMB, F. I.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for prepro-ricin. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 148, n. 2, p. 265-270, 1985.
- LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: Structure, mode of action, and some current applications. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, n. 2, p. 201-208, 1994.
- LOWERY, C. C.; AULD, D. L.; ROLFE, R.; MCKEON, T. A.; GOODRUM, J. Barriers to Commercialization of a Castor Cultivar with Reduced Concentration of Ricin. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Issues in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2007. p. 97-100.
- LU, C.; WALLIS, J. G.; BROWSE, J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, article number 42, 2007.
- MALATHI, B.; RAMESH, S.; RAO, K. V.; REDDY, V. D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semioleifer resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 147, n. 3, p. 441-449, 2006.
- MALTMAN, D. J.; GADD, S. M.; SIMON, W. J.; SLABAS, A. R. 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**, Weinheim, v. 7, n. 9, p. 1513-1528, 2007.
- MOREIRA, J. de A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. de. **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPQ, 1996. 30 p. (EMBRAPA-CNPQ. Documentos, 44).
- OLIVEIRA, I. P. de; SANTOS, K. J. G. dos; BELTRÃO, N. E. de M.; NEVES, B. P. das; ARAÚJO, A. A. de; OLIVEIRA, L. C. Potenciais da mamona (*Ricinus communis* L.) na região Centro-Oeste brasileira. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, São Luís de Montes Belos, v. 1, n. 2, p. 104-130, nov. 2005.
- OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 60, n. 1, p. 281-288, 1975.
- OLSNES, S.; KOZLOV, J. V. Ricin. **Toxicon**, v. 39, n. 11, p. 1723-1728, 2001.
- PINA, M.; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 453-462, 2005.
- PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.
- RAO, P. V.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A. S.; KUMAR, O.; BHATTACHARYA, R.; SAXENA, P.; DASH, P. K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 855-865, 2005.
- RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.
- RIBEIRO, S. K. **Aposta no Biodiesel: Combustível feito à base de grãos pode aliviar a demanda por diesel e diminuir o impacto no efeito estufa**. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 53, p. 60, 2006.
- ROBERTS, L. M.; LAMB, F. I.; PAPPIN, D. J.; LORD, J. M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 260, n. 29, p. 5682-5686, 1985.
- ROBERTS, L. M.; TREGEAR, J. W.; LORD, J. M. Molecular cloning of ricin. **Targeted Diagnosis and Therapy**, New York, v. 7, p. 81-97, 1992.
- SAILAJA, M.; TARAKESWARI, M.; SUJATHA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1509-1519, 2008.
- SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Entry of ricin and *Shiga* toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, n. 22, p. 5943-5950, 2000.
- SANTOS, R. F. dos; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 23-41.
- SAVY FILHO, A. Melhoramento da Mamona. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 429-452.
- SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta da mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 31 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).
- SEVERINO, L. S.; FREIRE, R. M. M. Subprodutos. In: SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. p. 220-231. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).
- SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage protein: structure and biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Euphorbiaceae**. In: SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. p. 364-374, 2005.
- SPHYRIS, N.; LORD, J. M.; WALES, R.; ROBERTS, L. M. Mutational analysis of the *Ricinus* lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2-γ subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 35, p. 20292-20297, 1995.
- SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n. 6-7, p. 561-566, 1998.
- SUJATHA, M.; SAILAJA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 12, p. 803-810, 2005.
- TAMBASCIA, M. B.; TEIXEIRA, J. P. F. Mamona: determinação quantitativa do teor de óleo. **Bragantia**, Campinas, v. 45, n. 1, p. 23-27, 1986.
- TREGEAR, J. W.; ROBERTS, L. M. The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 18, n. 3, p. 515-525, 1992.
- TULLY, R. E.; BEEVERS, H. Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 58, n. 6, p. 710-716, 1976.
- YOSHITAKE, S.; FUNATSU, G.; FUNATSU, M. Isolation and sequences of peptic peptides and the complete sequence of Ile chain of ricin D. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1267-1274, 1978.
- YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Protein bodies from the endosperm of castor bean. Subfractionation protein components: lectins, and changes during germination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 58, n. 6, p. 703-709, 1976.