



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA UFBA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
PPG-BIOTEC**

**Felipe Vieira de Souza**

**EXPRESSÃO DE GENES EM RESPOSTA A ESTRESSE  
POR RESTRIÇÃO HÍDRICA EM SEMENTES DE *Ricinus  
communis* L. (EUPHORBIACEAE)**

Salvador - BA

2012

**FELIPE VIEIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DE GENES EM RESPOSTA A ESTRESSE  
POR RESTRIÇÃO HÍDRICA EM SEMENTES DE *Ricinus  
communis* L. (EUPHORBIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pesquisa e Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro  
Co-orientadora: Profa. Dra. Luzimar G. Fernandez.

Salvador - BA

2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de  
Saúde, SIBI - UFBA.

S731 Souza, Felipe Vieira de

Expressão de genes em resposta a estresse por restrição  
hídrica em sementes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae) /  
Felipe Vieira de Souza. – Salvador, 2012.

76 f.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luzimar Gonzaga Fernandez

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Instituto de Ciências da Saúde, 2012.

1. Biologia Molecular. 2. Estresse Hídrico. 3. Mamona. 4.  
Expressão Gênica. I. Castro, Renato Delmondez de. II  
Fernandez, Luzimar Gonzaga. III. Universidade Federal da  
Bahia. IV. Título.

CDU 576.32



## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação:

**Expressão de genes em resposta a estresse hídrico em sementes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)**

Elaborada por:

**FELIPE VIEIRA DE SOUZA**

e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora foi aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia como requisito parcial à obtenção do título de

**MESTRE EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador, Bahia, 17 de dezembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

**Dr. Renato Delmondez de Castro**  
 Orientador  
 Universidade Federal da Bahia

**Dra. Daniele Takahashi**  
 Examinadora Interna  
 Universidade Federal da Bahia

**PhD. Henk W. M. Hilhorst**  
 Examinador Externo  
 Wageningen University (Holanda)

**PhD. Wilco Ligterink**  
 Examinador Externo  
 Wageningen University (Holanda)

A

Clarissa Vieira Nunes, irmã querida, que tanto me apoiou e aconselhou até o final desta caminhada.

Anderson Coelho Nunes, querido amigo e cunhado, por ter me ajudado e protegido como a um irmão.

“O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento  
mais rapidamente que a sociedade em sabedoria.”  
Isaac Asimov

## RESUMO

A região do semiárido é caracterizada pelo seu clima seco, altas temperaturas e baixos índices pluviométricos, apresentando um ambiente de estresse para a vegetação. No entanto, as espécies presentes nesta região apresentam características adaptativas que lhes permitem sobreviver a estas condições, como mamona. Indicada pelo PNPB, a mamona possui um elevado teor de óleo em suas sementes, o qual possui diversas aplicações, dentre elas a produção de Biodiesel. Apesar do grande interesse nesta espécie, ainda há poucos estudos publicados quanto à biologia molecular em sementes relacionadas a estresses abióticos. No presente estudo foi realizado um *screening* hídrico utilizando PEG 8000 nos potenciais -0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1,0; -1,2 e -1,4 MPa para verificar a tolerância de suas sementes à seca, em seguida foram conduzidos testes moleculares com RT-qPCR para análise da expressão dos genes *DREB*, *MAPK*, Aquaporina, Ciclofilina, *CDPK* e *HDA*. Os dados obtidos demonstraram que as sementes da mamona não são tolerantes ao estresse hídrico, durante a sua germinação, sendo afetadas fortemente nos potenciais mais baixos como -0,2 MPa. Os genes *MAPK*, Ciclofilina, *DREB1A* e *CDPK* se mostraram responsivos ao estresse hídrico, o *HDA* apresentou uma expressão significativa durante a embebição em água por 36 horas, entretanto uma supressão quando primariamente tratado com PEG e reidratado em água.

**Palavras-chave:** Biologia Molecular. Estresse hídrico. Mamona. Expressão Gênica.

## ABSTRACT

Semiarid region is characterized by its dry climate, high temperatures and low rainfall indexes, what means a harmful environment to the local vegetation. However, the species located in that region show adaptive characteristics which allow them to survive to its conditions, as castor beans. Indicated by National Program to Biofuel Program, castor bean has high oil content in its seeds, with several applications as Biofuel production. Despite a great interest in this species, there have been few studies about the relation between its seeds and abiotic stress at molecular level. In this study was realized an hydric screening with the potentials -0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1,0; -1,2 and -1,4 MPa to verify some possible tolerance of its seeds to drought environment, after molecular tests by RT-qPCR were conducted to analyze the expression of drought responsive genes as *DREB*, *MAPK*, Aquaporin, Cyclophilin, *CDPK*, *HDA*. Obtained data show that castor bean seeds are not tolerant to drought stress during germination and are strongly affected by low potentials as -0,2 MPa. *MAPK*, Cyclophilin, *DREB1A* and *CDPK* were upregulated by drought stress, and *HDA* had a high expression during water imbibition meanwhile was suppressed when imbibed in water after treated with PEG.

**Keywords:** Molecular biology. Drought stress. Castor beans. Genic expression.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Mapa da região nordeste brasileira com o Semiárido em destaque	16
<b>Figura 2.</b>	Frutos da mamona verdes e maduros.	17
<b>Figura 3.</b>	Inflorescência da mamoneira com flores femininas e masculinas.	18
<b>Figura 4.</b>	Estrutura do ácido ricinoléico.	19
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática das 3 fases da germinação	21
<b>Figura 6.</b>	Sementes da variedade de mamona EBDA MPA-11	36
<b>Figura 7.</b>	Semente de mamona contaminada com fungo na região da carúncula	49
<b>Figura 8.</b>	Curva de embebição em água de sementes de mamona.	50
<b>Figura 9.</b>	Curva de germinação das sementes embebidas em diferentes potenciais de PEG 8000 e reidratadas em água	51
<b>Figura 10.</b>	Curva de germinação das sementes embebidas em diferentes potenciais de PEG 8000 e reidratadas em água, com tratamento fresco e seco.	53
<b>Figura 11.</b>	Gel de agarose da extração de RNA das amostras de semente seca	56
<b>Figura 12.</b>	Gel de agarose da extração de RNA dos tratamentos: A36; P4; P7 e PA36	56
<b>Figura 13.</b>	Gel de agarose para verificação da especificidade dos primers utilizados.	58
<b>Figura 14.</b>	Gráfico da expressão da Aquaporina PIP1;1 nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36.	59
<b>Figura 15.</b>	Gráfico da expressão do CDPK nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36.	61
<b>Figura 16.</b>	Gráfico da expressão da Ciclofilina nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36	62
<b>Figura 17.</b>	Gráfico da expressão do <i>DREB1A</i> nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36	63

- Figura 18.** Gráfico da expressão da MAPK nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36 64
- Figura 19.** Gráfico da expressão do HDA nos tratamentos: SS; A36; P4; P7 e PA36. 64

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Qualidade fisiológica de sementes de mamona submetidas a diferentes métodos de desinfestação.	48
<b>Tabela 2.</b>	Sementes da variedade EBDA MPA-11 embebidas com PEG em diferentes potenciais por 7 dias e reidratadas em água até o 14º dia, com avaliações diárias.	50
<b>Tabela 3.</b>	Germinação das sementes embebidas em diferentes potenciais de PEG 8000 e reidratadas em água, com tratamento fresco e seco.	52
<b>Tabela 4.</b>	Tabela de genes elaborada a partir da busca na base de dados do NCBI.	54
<b>Tabela 5.</b>	Genes utilizados, primers dos respectivos genes, tamanhos dos <i>amplicons</i> e seus registros no NCBI.	55
<b>Tabela 6.</b>	Valores do BLAST (NCBI) na busca dos genes similares aos normalizadores sugeridos pela literatura.	55
<b>Tabela 7.</b>	Quantificação por espectrofotometria UV de amostras de RNA total dos diferentes tratamentos	57
<b>Tabela 8.</b>	Genes utilizados, eficiência e valores de R <sup>2</sup>	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
ABI	<i>Absisic acid-insensitive</i>
ABRE	ABA responsive-elements
ACT	Actin
CDC2a	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
CDPK	Calcium-dependent protein kinase
CTS	Comatose
DRE	Dehydration Responsive element
DREB	Dehydration Responsive element Binding
EM6	<i>Early methionine 6</i>
GA	Giberelina
HDA	Histone desacetilases
HSF	Heat shock factor
IVG	Índice de velocidade de germinação
JCVI	<i>J. Craig Venter Institute</i>
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i>
LEC1	<i>Leafy cotyledon</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NIPS	<i>Nodulin-26-like Intrinsic Proteins</i>
PCR	Polymerase Reaction Chain
PEG	Polietilenoglicol
PER1	<i>1-Cys peroxiredoxin</i>
PIPs	<i>Plasma membrane Intrinsic Proteins</i>
PKABA	<i>ABA-induced protein kinase</i>
PNPB	Programa Nacional para Uso e Produção de Biodiesel
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase PCR</i>
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i>

sHSP18	<i>Small Heat-shock protein</i>
SIPs	Small basic Intrinsic Proteins
TIGR	<i>The Institute of Genomic Research</i>
TIPs	<i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i>
TMG	Tempo médio de germinação
TUB	<i>Tubulin</i>
VMG	Velocidade Média de Germinação
XIPs	<i>X Intrinsic Proteins</i>

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	14
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	SEMIÁRIDO .....	15
2.2	MAMONA .....	16
2.3	EMBEBIÇÃO E GERMINAÇÃO DE SEMENTES.....	20
2.4	O ESTRESSE AMBIENTAL.....	23
2.5	TOLERÂNCIA A RESTRIÇÃO HÍDRICA .....	24
2.6	ESTRESSE HÍDRICO EM SEMENTES .....	26
2.7	GENES RESPONSIVOS A ESTRESSES .....	28
2.7.1	Aquaporinas .....	28
2.7.2	CDPK .....	30
2.7.3	Ciclofilina .....	30
2.7.4	DREB .....	31
2.7.5	Proteínas LEA.....	32
2.7.6	MAPK.....	33
2.7.7	Histona Deacetilases .....	34
3.	OBJETIVOS.....	35
3.1	GERAL.....	35
3.2	ESPECÍFICOS .....	35
4.	METODOLOGIA.....	36
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
4.1.1	CARACTERIZAÇÃO DAS SEMENTES.....	36
4.2	CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE SEMENTES SOB ESTRESSE. ....	37
4.2.1	TESTE DE DESINFESTAÇÃO DAS SEMENTES .....	37
4.2.2	DESINFESTAÇÃO DE SEMENTES .....	38
4.2.3	SCREENING HÍDRICO .....	39
4.3	CURVA DE EMBEBIÇÃO .....	41
4.4	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO PARA OS TESTES MOLECULARES .....	41
4.5	BUSCA POR GENES EM BASES DE DADOS .....	42
4.6	DESENHO DE <i>PRIMERS</i> .....	43
4.7	EXTRAÇÃO DE RNA .....	44
4.8	TRANSCRIPTASE REVERSA .....	45

4.9	RT-qPCR.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
5.1	FISIOLÓGICO.....	48
5.1.1	DESINFESTAÇÃO .....	48
5.1.2	CURVA DE EMBEBIÇÃO .....	49
5.1.3	SCREENING HÍDRICO .....	50
5.2	MOLECULAR .....	53
5.2.1	BUSCA POR GENES E DESENHO DE <i>PRIMERS</i> .....	53
5.2.2	EXTRAÇÃO DE RNA.....	56
5.2.3	RT-qPCR.....	57
	Aquaporina PIP1;1.....	59
	CDPK.....	60
	Ciclofilina.....	61
	DREB1A.....	62
	MAPK.....	63
	HDA .....	64
6.	CONCLUSÃO .....	66
7.	REFERÊNCIAS.....	67

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil vive um momento de destaque no cenário mundial quanto à produção de biocombustíveis, e conseqüente aumento na demanda de investimentos em pesquisa, produção de etanol e biodiesel, dentre outras fontes alternativas de energia. Dentre as metas do Programa Nacional para Produção e uso de Biodiesel (PNPB), o aumento na produção de biodiesel possibilitou atingir em 2010 a meta de 5% da mistura de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil, o chamado diesel B5 (De CARVALHO, 2010).

Destaca-se o fato de que o biodiesel hoje produzido no Brasil é essencialmente oriundo do óleo de soja, sendo que o objetivo principal do PNPD é a diversificação da matriz de matérias-primas e inclusão social. A mamona (*Ricinus communis* L.) foi definida como a principal espécie oleaginosa para produção de biodiesel no semiárido nordestino, tendo em vista a importância socioeconômica desta espécie já estabelecida na região por meio da agricultura familiar (BRASIL, 2004)

A mamona é amplamente difundida no Brasil, algumas vezes confundida como nativa devido a sua distribuição. Tal espécie possui valor comercial para a indústria rícino-química, podendo dar origem a mais de 400 produtos: de cosméticos a próteses utilizadas em cirurgias. É cultivada em mais de 15 países, sendo o Brasil o 5º maior produtor mundial, onde o estado da Bahia é o maior produtor responsável por 75% da produção nacional, (SANTOS et al., 2007; CONAB, 2010).

Apesar da significativa produção e importância socioeconômica, a produtividade da mamona no semiárido é baixa e longe do ideal. O semiárido brasileiro é caracterizado pelos períodos prolongados de seca devido à má distribuição do regime de chuvas durante o ano, dificultando a vida das populações e a agricultura familiar típica da região (SUDENE, 2012). A deficiência hídrica do semiárido é a principal causa de estresse e da baixa produtividade das plantas, alterando a taxa fotossintética e o crescimento em decorrência da diminuição do teor relativo de água, pressão de turgor e o potencial hídrico celular (PIMENTEL 1999; PIMENTEL et al. 2002). Tais fatores desencadeiam uma série de mecanismos bioquímicos e metabólicos em

resposta ao estresse e reestabelecimento da homeostase, dentre os quais as respostas à seca em plantas superiores são as mais estudadas. As respostas desencadeadas pelo estresse podem ser divididas em dois grupos: (1) as de proteção ao estresse ambiental e (2) de regulação da expressão gênica em resposta ao estresse (HASEGAWA et al, 2000).

O conhecimento acerca dos mecanismos de resposta ao estresse em nível molecular torna-se de extrema importância para o melhor entendimento da fisiologia da planta, assim como torna possível intervir ou melhorar a tolerância e o cultivo da mamona sob as condições de estresse hídrico do semiárido.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 SEMIÁRIDO

O Semiárido brasileiro é conhecido principalmente devido a seca que atinge a região, seja devido à ausência ou escassez de chuvas. Possui um clima semiárido tropical e uma grande diversidade biológica, com espécies adaptadas a condições edafoclimáticas locais, onde há a restrição hídrica (ALQUERQUE & ANDRADE, 2002).

Segundo dados da SUDENE (2012), as precipitações médias anuais da região são iguais ou inferiores a 800 mm, com insolação média anual de 2.800 h/ano e temperaturas médias anuais de 23 a 27°C, com regime de chuvas irregular. O principal ecossistema encontrado é o da Caatinga, em grande parte com solo areno-argiloso, e com presença de rios temporários. O semiárido ocupa 57,5% da área do nordeste, presente em 9 estados (Figura 1), e contém 40,5% da população da região, é responsável ainda por 21,6% do Produto Interno Bruto da região. Na Bahia, o semiárido ocupa 68,7% do território, da região norte e centro-sul (De CARVALHO et al, 2010).



**Figura 1.** Mapa da região nordeste brasileira com o Semiárido em destaque.  
Fonte: [www.bnb.gov.br](http://www.bnb.gov.br)

Uma das regiões mais pobres do país, o semiárido possui altos índices de analfabetismo, e com a agricultura e pecuária como principal fonte de renda, sobretudo da agricultura familiar (IBGE, 2012). De todo o território baiano, somente em Barreiras e São Desidério produzem a mamona em escala industrial, com aplicação de tecnologia do preparo do solo à colheita, chegando a produção de 3 toneladas por hectare. Todo o restante do estado se embasa na agricultura familiar, o qual varia a sua produtividade entre 1 t a menos de 700 kg/ha. Alguns fatores podem contribuir para esse baixo rendimento, a exemplo da não aplicação de práticas corretas de manejo agrônômico como: recomposição do solo, adubação, tratos culturais, dentre outros, nos quais inclui-se a não utilização de sementes fiscalizadas, certificadas ou recomendadas por órgãos especializados (De CARVALHO et al., 2010).

## 2.2 MAMONA

Conhecida como carrapateira, enxerida, rícino, palma-de-cristo ou mamona a *Ricinus communis* L. é pertencente à família Euphorbiaceae. O nome *Ricinus*, de origem latina, significa carrapato, devido à forma das suas sementes que remetem ao ácaro (Figura 2). Sua origem ainda é desconhecida

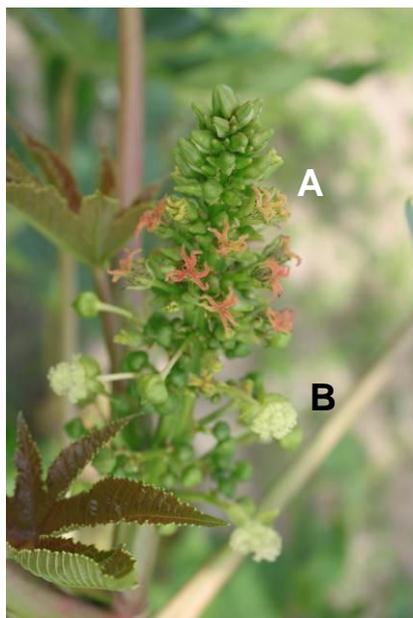
e estima-se que tenha sido do continente africano ou asiático (EMBRAPA, 2010).



**Figura 2.** Frutos da mamona maduros à esquerda e verdes à direita.

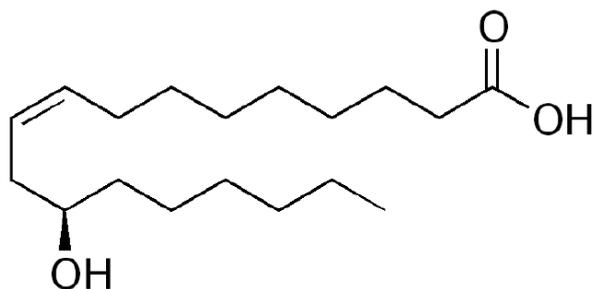
A mamona é amplamente difundida pelo mundo, em regiões temperadas, subtropicais e principalmente tropicais (OLSNES, 2004), e foi introduzida no Brasil pelos portugueses, para utilização do óleo de suas sementes nas lamparinas utilizadas para iluminação de ruas (MORAIS, 2010). Atualmente a mamona pode ser encontrada em todo o território nacional e por muitas vezes é confundida com uma espécie nativa, devido a sua plena adaptação em regiões e solos brasileiros (BIODIESELBR, 2012).

Caracterizada por ser uma planta xerófila, a mamoneira possui sistema radicular pivotante profundo, folhas simples, grandes, do tipo digitolobadas e denticuladas, com grandes variações quanto ao hábito de crescimento, deiscência, cor das folhas, caules, ramos, frutos, tamanho das sementes, teor de óleo e altura das plantas (CATANHEDE, 2009; MORAIS, 2010). Suas inflorescências (Figura 3) apresentam flores masculinas na base e femininas na porção distal do racemo monóico (EMBRAPA, 2012). A proporção de flores masculinas e femininas pode ser afetada pela temperatura, idade da planta, duração do dia e pela variedade utilizada, sendo que a deficiência hídrica e altas temperaturas induzem a formação de flores masculinas, enquanto que condições balanceadas induzem a formação de flores femininas (SAVY FILHO, 2005).



**Figura 3.** Inflorescência da mamoneira, com as flores femininas na extremidade (A) e as masculinas na base (B).

A flor feminina possui ovário tricarpelar, com um óvulo em cada carpelo, o qual originará a futura semente. As sementes da mamona são ricas em óleo, com o teor variando de 45 a 50%. O principal componente deste óleo é o ácido ricinoléico, responsável por 90,8% da sua constituição, 1% de ácido palmítico, 3,5% de ácido linoleico e 4,6% de ácido oleico (EMBRAPA, 2011). Devido a essa grande quantidade de ácido ricinoléico (ácido 12 - hidróxi-9-cis-octadecenóico – Figura 4), e em decorrência da grande quantidade de hidróxidos contidos em tal componente, são conferidas características únicas desejáveis para utilização em produtos industriais como alta viscosidade, estabilidade oxidativa, solubilidade em álcool e baixo ponto de solidificação (COSTA, 2006). O óleo da mamona pode originar mais de 400 produtos industrializados, como: cosméticos, próteses utilizadas em cirurgias ortopédicas, lubrificantes para turbinas de avião, fabricação de corantes, germicidas, desinfetantes, etc. (BDMG, 2000; SANTOS et al., 2007).



**Figura 4.** Estrutura do ácido ricinoléico. Fonte: Morais, 2010.

Alguns fatores bióticos e abióticos têm sido alvos frequentes de estudos quanto ao desenvolvimento da mamona sob tais estresses. A altitude, por exemplo, é considerada de grande importância para a fisiologia da espécie em questão, visto que interfere no crescimento da planta através de alterações no ambiente como temperatura do ar, insolação, taxa de irradiação e etc., ocasionando mudanças bioquímicas e fisiológicas. Um fator de destaque é a temperatura, o qual interfere na fotossíntese e na respiração da mamoneira. Temperaturas diurnas muito elevadas, acima de 40°C, interferem na sexualidade da planta aumentando o número de flores masculinas e reduzindo a produtividade da planta; porém com temperaturas médias próximas a 10°C, a planta não produz sementes (EMBRAPA, 2012).

Atualmente existe diversas cultivares disponíveis no mercado, tendo como fontes a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) ou o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). São desenvolvidas pesquisas no intuito do melhoramento genético da espécie, obtendo variedades com características de interesse agrônomo como indeiscência de frutos, precocidade da planta, maior produção, teor de óleo da semente, tolerância a estresse, dentre outras características agronomicamente desejáveis. As sementes da mamona possuem uma grande variabilidade em cor do tegumento, formas e tamanhos, presença e ausência de carúncula, e teores de componentes químicos (EMBRAPA, 2011). A EBDA lançou variedades adaptadas ao clima do estado da Bahia, como EBDA MPA-11, EBDA MPB-01 e a EBDA MPA-34.

A EBDA MPA-11 é uma mamoneira de porte alto (MPA), que se destacou principalmente quanto à precocidade, indeiscência no campo, teor de

óleo nas sementes, produtividade e resistência a doenças, em um estudo onde foi comparada com a variedade Amarela de Irecê como testemunha (SANTIAGO et al., 2008b). A EBDA MPB-01 é uma mamoneira de porte baixo, lançada também em 2008, a qual se destaca pela indeiscência, tolerância a pragas e doenças, boa produção e alto teor de óleo nas sementes, além de ter se adaptado bem ao ambiente do estado (SANTIAGO et al., 2008a). A mais recentemente lançada, no segundo semestre de 2011, foi a EBDA MPA-34.

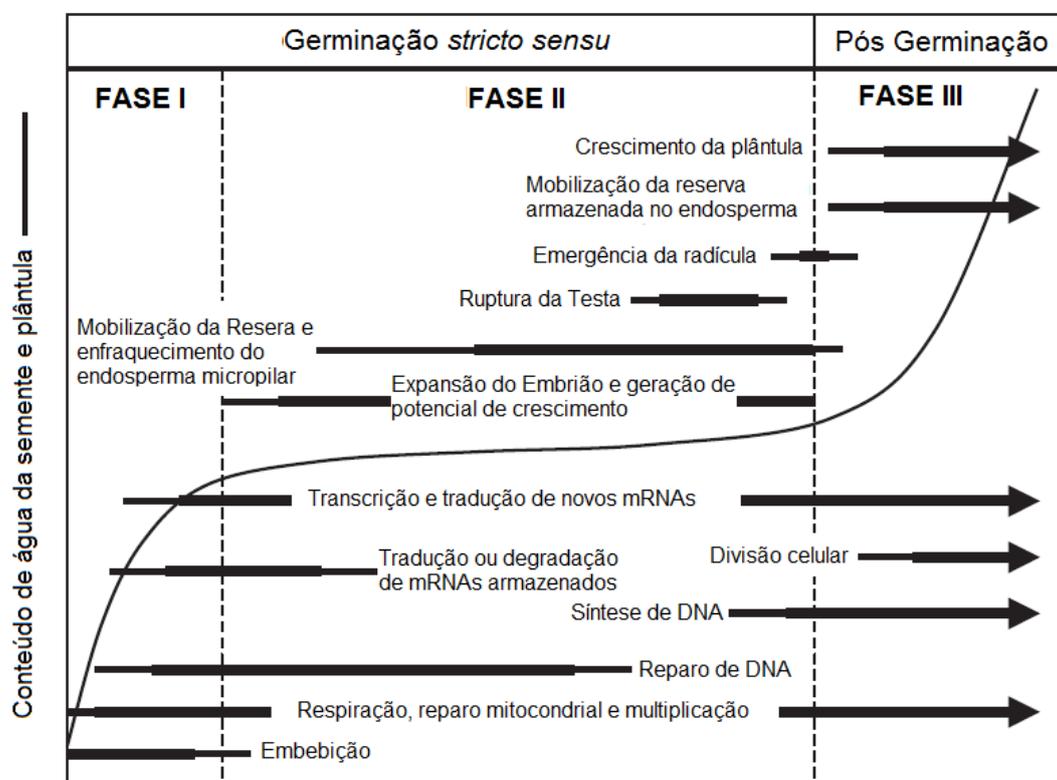
Apesar das diversas possibilidades de sementes melhoradas e adaptadas ao ambiente do nordeste, ainda há uma grande quantidade de agricultores que não utilizam sementes certificadas (De CARVALHO et al., 2010). No ano de 2004, o estado da Bahia produziu 82 mil toneladas de bagas de mamona, uma média de 657 kg/ha (IBGE, 2004). Com a utilização de sementes melhoradas, espera-se um aumento do rendimento médio e conseqüentemente do valor total produzido no ano. Atualmente a região nordeste tem cerca de 500 municípios zoneados para o cultivo da mamona em regime de sequeiro (sem irrigação). De forma geral para o cultivo da espécie, não há maiores investimentos nas plantações, utilizando métodos rudimentares, com mão de obra familiar, os quais representam 90% da área total cultivada no estado e apenas 10% com foco empresarial (SANTIAGO et al., 2008b).

O fator abiótico predominante no nordeste e alvo de muitos estudos é o estresse hídrico. A deficiência hídrica proveniente das condições ambientais do semiárido é considerada como a maior causadora da baixa produtividade das plantas, altera a taxa fotossintética e o crescimento em decorrência da diminuição do teor relativo de água, pressão de turgor e o potencial hídrico celular (PIMENTEL, 1999; PIMENTEL et al., 2002).

### 2.3 Embebição e germinação de sementes

As sementes em geral, são compostas pelo embrião, endosperma, perisperma, testa e tegumento. Transcorrida todas as fases do desenvolvimento das sementes, a dessecação característica (no caso das

sementes ortodoxas) e a conseqüente maturação, estas estão preparadas para a germinação quando em ambiente favorável. A germinação pode ser dividida em 3 Fases (Figura 5), sendo a primeira fase (Fase I) relativa à embebição por absorção física de água, devido ao gradiente de potencial matricial causado pelas células e tecidos desidratados da semente, implicando na rápida absorção e aumento do teor de água. Na segunda fase (Fase II), a semente absorve menos água e de modo mais lento, estabelecendo um platô de hidratação, durante o qual há reativação plena do metabolismo pré-germinativo. A terceira e última fase de embebição (Fase III) tem como característica a retomada de maior absorção de água pela semente, aumentando consideravelmente a curva de embebição, que por sua vez está associada ao alongamento e crescimento do embrião. Todo o processo culmina com a protrusão da radícula embrionária, e assim completa a germinação *strictu sensu*, o que permite o subsequente crescimento das estruturas de raiz e parte aérea que darão origem à plântula e o desenvolvimento em planta adulta (De CASTRO, 2004, NONOGAKI et al, 2007).



**Figura 5.** Representação esquemática das 3 fases de embebição por água e germinação de sementes. Fonte: NONOGAKI et al, 2007 modificado.

A técnica ou pré-tratamento de restrição hídrica, conhecida como condicionamento osmótico, osmocondicionamento ou *priming*, implica em condicionar a hidratação de sementes secas, restringindo a absorção de água por meio da embebição controlada das sementes em soluções osmóticas, sob tempo e temperatura determinados, (ANWAR et al., 1978). Desta forma, o pré-tratamento possibilita iniciar a Fase I e completar a Fase II, com a reativação dos eventos metabólicos pré-germinativos, entretanto restringindo a Fase III e a protrusão da radícula comuns ao padrão trifásico (BEWLEY & BLACK, 1994).

A reativação e o avanço do metabolismo sem que ocorra protrusão da radícula possibilita sincronizar a capacidade germinativa dentre sementes de um mesmo lote. Diversos benefícios têm sido relatados com o emprego do condicionamento osmótico ou osmocondicionamento como pré-tratamento germinativo: a uniformização da germinação de um lote de sementes, e sementes com melhor vigor ou envigoradas (*priming*). Este último resulta em melhores parâmetros germinabilidade e vigor, refletidos na emergência e desenvolvimento de plântulas também vigorosas, particularmente em condições de estresse abióticos (BORGES et al., 1994). Com isso, o domínio da técnica de osmocondicionamento dentre outras técnicas de embebição sob restrição hídrica controlada permitiu o desenvolvimento de tecnologias adotadas em larga escala comercial, denominada 'envigoramento' ou '*priming*', com o objetivo de aprimorar a qualidade e aumentar do valor agregado de lotes de sementes.

Dentre as técnicas de *priming*, o condicionamento osmótico constitui um sistema modelo laboratorial adequado para os estudos de restrição hídrica em sementes e plântulas. Entretanto as respostas a este tratamento variam entre espécies, e até mesmo entre lotes de sementes de uma mesma espécie, dependendo das condições destas, como: qualidade das sementes, período de embebição, armazenamento, etc. (NASCIMENTO et al, 1998).

A solução de polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente utilizada como meio osmótico para simular o estresse por restrição hídrica ou osmocondicionamento, entretanto não permite a aeração das amostras. Essa substância tem como principal característica ser um produto inerte, que não penetra nas sementes. A partir do osmocondicionamento é possível determinar

as condições osmóticas e de restrição hídrica, o tempo e a temperatura ideal, para que as sementes alcancem determinado nível de umidade e reativação do metabolismo de modo a se obter o efeito de *priming*, parâmetros estes variáveis entre e dentre espécies (BORGES et al., 2002).

## 2.4 O ESTRESSE AMBIENTAL

Estresses abióticos como estresse hídrico, salino, térmico e oxidativo são ameaças à germinação e desenvolvimento de plantas, tornando-se uma ameaça à agricultura. Tais estresses são considerados a primeira causa de perda de plantações por todo o mundo, e o entendimento dos mecanismos de resposta das plantas aos estresses abióticos é de extrema importância para maiores avanços na área (WANG et al., 2004). Segundo Boyer (1992), um grande percentual das plantas no mundo está sujeita a situações extremas, como estresse hídrico, devido a períodos de seca, crônicos ou esporádicos.

A seca é um fenômeno frequente no Brasil, por estiagem ou ausência de chuvas por um longo período. Como na região nordeste, que apresenta baixos valores pluviométricos durante boa parte do ano, além de elevados valores de temperatura média anual (MENESES et al., 2006; SUDENE, 2012). Dentre os estresses ambientais que as plantas estão sujeitas, o estresse hídrico é o de maior relevância na região nordeste, tal estresse reduz a produtividade e crescimento da planta mais do que todos os outros estresses combinados (WANG et al., 2003).

A ausência ou pouca de disponibilidade de água é considerada uma das mais importantes causas dentre os diversos fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo e o desenvolvimento pós-germinativos de plântulas (PIMENTEL, 1999). Esta condição é vista como um fator limitante à iniciação da germinação de sementes e estabelecimento de plântulas no campo. Isto ocorre porque as relações hídricas em sementes e subsequente desenvolvimento em plântulas são afetados diretamente, implicando em todas as demais etapas do metabolismo, incluindo ativação do ciclo celular e crescimento (De CASTRO et al., 2000). Quando sob estresse hídrico a planta

responde ao mesmo com diversos mecanismos, os quais podem ser: resposta em nível molecular, percepção de sinais e respostas morfofisiológicas resultando em uma possível tolerância a determinado fator (MENESES et al., 2006).

A tolerância ao estresse osmótico e iônico induzido pela restrição de água constitui processos complexos e geralmente interligados, envolvendo a interação de várias propriedades (VERLUES et al., 2006). Tal estresse induz respostas envolvendo genes que codificam enzimas de detoxificação, como ascorbato, peroxidase, superóxido dismutase etc (INGRAM e BARTELS, 1996). O estresse térmico induz resposta para tais genes igualmente, assim como o aumento na oxidação de determinados componentes ou a indução pelo toque mecânico podem ativar a resposta ao estresse hídrico, demonstrando uma interligação entre processos. A resposta induzida pelo toque mecânico é decorrente da liberação de  $Ca^{++}$  no citoplasma assim como da ativação de outros genes como proteínas que se ligam ao  $Ca^{++}$ , proteínas quinases envolvidas na cascata das *Mitogen activated protein kinases* (MAPK), entretanto envolvidas igualmente no estresse hídrico (MENESES et al., 2006).

## 2.5 TOLERÂNCIA A RESTRIÇÃO HÍDRICA

Diante as adversidades ambientais, as plantas podem suportar e sobreviver em condições de estresse, como a da restrição hídrica. Tal restrição é causada por condições de estresse hídrico relativo ao déficit de água ou seca, estresse salino e/ou osmótico, induzindo de uma série de processos fisiológicos, celulares e moleculares que culminam com a tolerância ao estresse ou restrição hídrica (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Tais mecanismos de tolerância à seca são oriundos da capacidade da planta em manter o potencial hídrico em níveis aceitáveis mesmo com a falta de água no solo. Em situações de escassez de água a planta mantém o turgor com o ajuste osmótico, induzindo o aumento de soluto, aumentando a elasticidade e diminuindo o tamanho da célula (MITRA, 2001).

O estresse hídrico é causado pela relação entre evapotranspiração e déficit de água disponível no substrato, o que induz uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas nas plantas, como: o fechamento dos estômatos, a repressão do crescimento celular e da fotossíntese, e ativação da respiração. As plantas respondem e adaptam-se ao déficit hídrico também a nível celular e molecular, como por do acúmulo de osmólitos e proteínas especificamente envolvidas na tolerância ao estresse. Uma variedade de genes com diversas funções são induzidos ou reprimidos por esses estresses (YAMAGUCHI-SHINOZAKI & SHINOZAKI, 2007), e seus produtos podem funcionar em resposta ao estresse e tolerância a nível celular. O estresse salino, entretanto, ocorre quando há o excesso de sais solúveis no solo, reduzindo o seu potencial de água e, conseqüentemente, impedindo a absorção de água pelas sementes e plantas em geral (CAVALCANTE e PEREZ, 1995).

Diversos fatores ambientais como a seca, alta salinidade e frio induzem ao estresse osmótico em plantas, em razão da demanda pela água para respostas bioquímicas. O estresse osmótico é, mais precisamente, causado pela alta concentração de solutos em torno de uma célula, resultando em uma rápida inversão do movimento da água através da membrana celular (De CASTRO, 2000).

Respostas fisiológicas específicas ao estresse hídrico e salino envolvem uma combinação de eventos moleculares que são ativados e desativados em resposta ao estresse (BRAY, 1993). Compreender como esses eventos interagem será um passo importante no desenvolvimento de maior tolerância a estresses abióticos. A exemplo de genes tem-se proteínas ativadas por mitose (MAP) (SHOU et al., 2004), quinases e fosfolipases (THIERY et al, 2004), choque térmico (HSF), fator elemento ABA-vinculativo responsivo / elementos ABA-responsivos (ABF / ABRE) (ZHANG et al., 2004), onde estas possuem atividade sob condições normais, ou somente quando submetidos ao estresse. Como no caso das proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA) que estão envolvidas na tolerância planta a estresses abióticos (WANG et al., 2004), e espera-se que tais proteínas possam ajudar na proteção contra estresses, auxiliando principalmente no controle do dobramento e conformação de proteínas estruturais quanto de proteínas funcionais.

Genes e proteínas envolvidos em respostas induzidas pelo déficit hídrico podem promover a tolerância à desidratação: proteção do citoplasma; alterações no potencial osmótico da célula para aumentar a absorção de água; metabolização de compostos degradados pelo estresse; controle no acúmulo de íons e regulação adicional de expressão gênica (NEPOMUCENO et al., 2000). Entretanto, a expressão de alguns genes e seus produtos durante o estresse não garante que a planta possa sobreviver a essa condição (BRAY, 1993).

## 2.6 ESTRESSE HÍDRICO EM SEMENTES

Durante os últimos anos, com os avanços das técnicas moleculares, tornou-se possível uma melhor compreensão da fisiologia vegetal. Esses avanços são especialmente notáveis para o desenvolvimento de sementes e para o efeito do Ácido Abscísico (ABA) e Giberelinas (GA) na expressão de genes e alguns aspectos dos mecanismos de germinação e dormência (BEWLEY & BLACK, 1994). Técnicas como PCR (Reação da Cadeia da Polimerase), RT-qPCR (PCR em Tempo Real), *Northern Blotting* e *Microarray* estão sendo amplamente utilizadas.

Em sementes, os programas de desenvolvimento e germinação são independentes e, estima-se que milhares de genes estão relacionados a esses processos (MCCARTY, 1995). Durante o desenvolvimento, genes específicos para codificação de enzimas de atividade constitutiva e mobilização de reservas, proteínas estruturais de membrana, proteínas de reserva dentre outras de funções específicas na regulação do desenvolvimento do embrião estão ativos (NAKABAYASHI et al., 2005) sendo que suas sequências expressas podem ser encontradas no citoplasma celular, na forma de RNA mensageiro. Desta maneira, o isolamento de transcritos e sua quantificação temporal caracterizam-se como uma boa metodologia para a descoberta de genes que possivelmente possam estar regendo os mecanismos de tolerância/sensibilidade ao estresse osmótico.

Alguns genes relacionados ao desenvolvimento de sementes-plântulas, citoesqueleto, ciclo celular e estresse osmótico são: *Absisic acid* (ABA)-*insensitive* (ABI3), *Actin* (ACT), *Cyclin-dependent Kinase* (CDC2a), *Comatose* (CTS), *Early methionine 6* (EM6), *Leafy cotyledon* (LEC1), *ABA-induced protein kinase* (PKABA1), *1-Cys peroxiredoxin* (PER1), *Small Heat-shock protein* (sHSP18.2) e *Tubulin* (TUB). Tais genes servem de base para a compreensão dos processos do programa de tolerância ao estresse durante a germinação (JOSÉ, 2008).

Vários genes relacionados ao estresse têm sido associados com a tolerância à restrição hídrica em sementes, tais como aqueles que codificam proteínas abundantes na embriogênese tardia (LEA), Aquaporinas, proteínas quinases dependentes de cálcio (*Calcium Dependent Protein kinases* - CDPK), Ciclofilina, proteínas elementos de ligação responsivos à desidratação (*Dehydration-Responsive Element Binding protein* - DREB), desacetilases de histonas (Histones deacetylase - HD), proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinase* – MAPK) e proteínas de choque térmico (*Heatshock Proteins* – HSPs) dentre outras (LIU et al, 1998; MAUREL e CHRISPEELS, 2001; WRZACZEK e HIRT, 2001; LUDWIG et al, 2003; ROMANO et al, 2004; WANG et al, 2004, MENESES et al 2006; TSUJI et al, 2006).

Dos diversos tipos de resposta das plantas à salinidade e ao estresse hídrico, os mecanismos de tolerância resultam principalmente de alterações morfológicas e fisiológicas na planta inteira. Estes são menos propícios à prática de manipulações, porém, mecanismos de tolerância são causados por alterações bioquímicas celulares e moleculares, que se prestam à manipulação biotecnológica. Todos os tipos de estresses abióticos induzem uma cascata de eventos fisiológicos e moleculares, sendo que alguns destes podem resultar em respostas similares; como salinidade e seca, que a nível celular causam desidratação fisiológica (NEPOMUCENO et al., 2001).

A biologia molecular assume papel central na identificação dos genes envolvidos na resposta ao estresse. A indução ou a inibição destes genes leva a ativação de vias biossintéticas de compostos químicos e de complexos proteicos, cuja função é auxiliar ou mediar os mecanismos de defesa da planta. A identificação de genes envolvidos nas respostas a estresses abióticos irá

permitir a elaboração de novas estratégias de melhoramento genético e de transgenia direcionada intra e interespecífica, uma vez que serão identificadas rotas metabólicas envolvidas nas respostas fisiológicas aos estresses.

Estudos relacionados à expressão de genes associados a estresses abióticos com espécies vegetais da região do semiárido nordestino ainda são escassos. Como exemplo da mamoneira, a qual ainda é uma espécie carente de estudos quanto a sua resposta à privação de água e os seus efeitos. Os trabalhos relacionados à mamona até então publicados estão restritos às condições de campo, além de poucas publicações em relação aos genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico e sobre a sua expressão (MORAIS, 2008; FARIA, 2010).

Dois trabalhos publicados recentemente abrem portas para o estudo aprofundado de duas espécies ocorrentes no semiárido, um referindo-se ao genoma de *Ricinus communis* (CHAN et al., 2010) e outro ao transcriptoma de *Jatropha curcas* (COSTA et al., 2010). A mamona foi à primeira espécie da família Euphorbiaceae a ter seu genoma completamente sequenciado e o sequenciamento do genoma da mandioca (*Manihot esculenta*) está em fase de conclusão. Além das possibilidades de aplicações de técnicas para melhoramento, que estes trabalhos permitiram para estas duas espécies, foi criada uma nova oportunidade de estudos comparativos com outras espécies da família Euphorbiaceae.

## 2.7 GENES RESPONSIVOS A ESTRESSES

### 2.7.1 Aquaporinas

Descoberta durante a década de 90, as aquaporinas são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de moléculas de água, formando um verdadeiro canal proteico com esta função (MAUREL e CHRISPEELS, 2001). Durante a germinação as aquaporinas possuem uma atividade fundamental, onde o tecido é embebido para o posterior crescimento do embrião, e nesta

fase tais proteínas atuam como mediadores no transporte da água (MAUREL et al., 2008).

As aquaporinas estão ainda relacionadas às respostas a diversos tipos de estresse como salino, hídrico, térmico e de luminosidade, onde são responsáveis pelo controle a nível celular. Quando submetida a tais estresses, as plantas devem se adequar em resposta ao ambiente por meio de alterações do seu fluxo de água, permitindo adaptação das células e tecidos a tais situações. Desta forma, o papel das aquaporinas é extremamente relevante neste aspecto, uma vez que são vistas como componentes centrais nas relações hídricas das plantas e como uma alternativa para difusão facilitada da água pela membrana plasmática, aumentando a permeabilidade da mesma (JAVOT e MAUREL, 2002; TYERMAN et al, 2002; MENESES et al, 2006).

Encontradas em vários seres vivos como animais e fungos, a expressão dos genes das aquaporinas é regulada diferentemente. Alguns destes genes são constitutivos e têm a sua expressão contínua, outros são acionadas apenas em determinados momentos, como quando submetidas a um determinado estresse (PARK et al., 2010).

As aquaporinas são representadas pela superfamília das MIPs (*Major Intrinsic Proteins*), a qual é dividida em 5 grupos: PIPs (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*) são proteínas intrínsecas de membrana plasmática; TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*) proteínas intrínsecas do tonoplasto, são mais frequentemente encontradas na membrana plasmática e na membrana dos vacúolos; NIPs (*Nodulin-26-like Intrinsic Proteins*) expressa na membrana de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio na raiz, também são presentes em plantas não leguminosas; SIPs (*Small basic Intrinsic Proteins*) são proteínas pequenas intrínsecas; e XIPs (*X Intrinsic Proteins*) ou proteínas intrínsecas desconhecidas, que foram recentemente descobertas e são encontradas principalmente em musgos, fungos e plantas dicotiledôneas (MAUREL et al., 2008; PARK et al., 2010).

Apesar de terem sido descobertas inicialmente em raízes de soja, as Aquaporinas estão presentes por todos os tipos de tecidos vegetais. Sabe-se que os grupos PIPs, TIPs, NIPs e SIPs são conservados em plantas, entretanto quando comparados com base em suas homologias as sequências e funções podem ser divergentes. Como exemplo o subgrupo PIP1 e PIP2, os quais são

independentes e agem de maneira individual, porém podem interagir também em conjunto, como heterodímero para facilitar o transporte subcelular através de membranas (MENESES et al, 2006; MAUREL et al, 2008). Segundo GAO (1999), na *Brassica napus*, durante a germinação de suas sementes que tiveram tratamentos de *priming* obtiveram altas expressões da aquaporina PIP2 e em tabaco e arroz a PIP1 foi relacionada com a velocidade da germinação em sementes normais e sob estresse (YU et al., 2005; LIU et al., 2007).

### 2.7.2 CDPK

Diversos estresses bióticos e abióticos induzem a flutuação da concentração de cálcio livre no citoplasma celular, onde o  $\text{Ca}^{2+}$  é um importante indicador que pode ser observado entre ligações de vias metabólicas. Desta forma genes relacionados a proteínas quinases dependentes de cálcio (*Calcium-Dependent Protein Kinase*) são candidatos para estudos quanto a respostas a estresses abióticos. As *CDPKs* são sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  e o maior grupo da família das proteínas ligantes de cálcio, sendo que essa não depende de uma calmodulina exógena, podendo ser ativada diretamente ao se ligar com o  $\text{Ca}^{2+}$  (LUDWIG et al, 2003). Tal grupo de genes é encontrado em plantas avasculares e vasculares, algas verdes e alguns protozoários. Alguns genes deste grupo podem ser expressos em todos os tecidos, enquanto outros são tecido-específicos, podem ser localizados ainda em várias partes da célula como membrana plasmática, retículo endoplasmático, peroxissomos, membrana mitocondrial e etc. (ZOU et al, 2010). Estudos evidenciam a *CDPK* sob diversos tipos de estresse, como hídrico, salino e ao frio (SAIJO et al, 2000; SAIJO et al, 2001).

### 2.7.3 Ciclofilina

Ciclofilinas são proteínas presentes em todas as partes da célula, que tem como função principalmente a habilidade de catalisar a isomerização *cis-trans* de proteínas recém-criadas, além de auxiliar no transporte e maturação de proteínas, apoptose, processamento de RNA, recuperação de células após serem submetidas ao estresse térmico e etc. (ROMANO et al, 2004). Tais proteínas podem ser encontradas em todos os organismos, de bactérias a plantas e animais.

As ciclofilinas também podem ser chamadas de PIPases (Peptidyl Prolyl *cis-trans* Isomerases), devido a sua atividade ao catalisar isomerizações *cis-trans* de ligações peptídicas entre a prolina e o aminoácido anterior a esta. Este grupo de proteínas é extremamente importante para a sobrevivência das plantas, com diversas funções e encontradas em diversos tecidos do organismo. Desta forma sua fisiologia e respostas moleculares ainda não estão plenamente elucidadas (KUMARI et al, 2009).

Segundo Sharma & Kaur (2009), este grupo de proteínas esta relacionado a diversos estresses, e no trabalho publicado pelos referidos autores, as plantas submetidas ao estresse hídrico e ao estresse térmico apresentam um determinado perfil de resposta ao estresse a qual foi submetida. Em condições ambientais os estresses não ocorrem individualmente e sim associados, desta forma foi possível perceber um padrão distinto em análises de *western blot* entre as ciclofilinas quando a planta é submetida a estresses individuais e em ambos os estresses de maneira conjugada.

#### 2.7.4 DREB

Proteínas de elementos de ligação responsivos a desidratação (*Dehydration-Responsive Element Binding* - DREB), são um subgrupo dos fatores de transcrição AP2/EREBP, e tem por função responder e adaptar a planta a estresses abióticos. Tal subgrupo pode ser subdividido em *DREB1* e *DREB2*, os quais são relacionados às vias metabólicas de formas diferenciadas: a baixas temperaturas e a seca. Em *Arabidopsis* o *DREB1* é

responsável pela resposta da planta ao frio, e o *DREB2* aos estresses hídrico e salino, de forma independente ao ácido abscísico (ZHAO et al., 2010). Os primeiros DREBs foram isolados da *Arabidopsis thaliana*, sendo o *DREB1A* e o *DREB2A* (LIU et al., 1998), desde então diversos DREBs e seus genes similares têm sido identificados e outras espécies vegetais. A expressão de tais genes não foi observada até o momento em tecidos específicos, *AtDREB2A* e *AtDREB1* foram observados em raízes, folhas e caule menos expressos, porém sob estresse suas expressões aumentaram (AGARWAL et al., 2006).

#### 2.7.5 Proteínas LEA

As proteínas abundantes na embriogênese tardia (*Late Embryogenesis Abundant* - LEA) são encontradas nas fases mais tardias, ou seja, últimos estágios do desenvolvimento das sementes, pouco antes de iniciar a dissecação (MENESES et al., 2006). São proteínas de baixo peso molecular, em sua maioria variando de 10 a 30 kDa, foi inicialmente estudada no desenvolvimento de sementes de algodão. Proteínas LEA podem ser encontradas geralmente em sementes de plantas superiores, prioritariamente no citoplasma e regiões nucleares, entretanto já foram descritas em plântulas e raízes e outros tecidos (CHEN et al., 2002).

Tal família de proteínas pode ser dividida em 5 subgrupos, de 1 a 5. No grupo 1 as proteínas são compostas de mais de 20 aminoácidos de maneira repetitiva, este grupo possui importante função no desenvolvimento do endosperma e proteção osmótica, como exemplo tem-se a D19. O grupo 2 é composto por proteínas com estrutura conservada com 15 aminoácidos e um C-terminal, tem um importante papel na resistência à seca, além da função de chaperona molecular auxiliando na defesa da estrutura proteica, como exemplo a D11. O grupo 3 tem por característica proteínas com 11 aminoácidos (TAQAAKEKAGE) em 13 repetições, o que culmina em uma estrutura em  $\alpha$ -hélice anfipática, este subgrupo está envolvido na desidratação de plantas superiores, no enriquecimento de íons, como exemplo a D7. O grupo 4 consiste de proteínas mais conhecidas como a LEA14 e a D113, possui uma região N-

terminal e uma estrutura anfipática em  $\alpha$ -hélice, sua função é de proteger a membrana, promovendo estabilidade e integração durante a desidratação. O grupo 5 é composto por proteínas que possuem papel importante na maturação da semente e desidratação (HONG-BO et al., 2005).

#### 2.7.6 MAPK

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen activated protein kinases* - MAPK) são proteínas importantes na percepção celular, onde atuam como mediadoras na transmissão de sinal, conexão e percepção de estímulos externos à célula. Tais proteínas estão envolvidas em diversas cascatas de sinalização em resposta a diversos estresses como por infecção de patógenos, estresse térmico, hídrico e a alguns hormônios vegetais como auxina e etileno (WRZACZEK e HIRT, 2001). O grupo das *MAPKs* é composto basicamente por *MAPKKKs*, *MAPKKs* e *MAPKs*, onde são sequencialmente ativadas da seguinte forma: a *MAPKKK* ativa a *MAPKK* pela fosforilação de dois resíduos de serina/treonina; assim a *MAPKK* ativada pode fosforilar a treonina e tirosina no *loop* de ativação TXY da *MAPK* (JOSHI et al., 2011).

Sabe-se que a partir do sequenciamento da *Arabidopsis* já foram identificadas 23 *MAPKs*, 10 *MAPKKs*, e 80 *MAPKKKs*, o que implica em uma via complexa. Tais proteínas possuem regiões conservadas, estas necessárias para função catalítica e que devido as suas estruturas podem ser divididas em 2 subgrupos: o qual possui o motivo TEY (treonina-ácido glutâmico-tirosina) de fosforilação e o subgrupo contendo o motivo TDY (treonina-ácido aspártico-tirosina), as quais conferem estruturas similares entre as proteínas deste grupo (ICHIMURA et al, 2002; TAJ et al, 2010). Responsivas a diferentes tipos de estresse, as cascatas da *MAPK* envolvem diferentes *MAPKs* em momentos distintos, conferindo a planta diferentes tipos de tolerância, como no caso da resposta ao estresse hídrico, onde já foi comprovado o envolvimento das *MAPK4*, *MAPK6* e *MAPKK1* (TAJ et al., 2010).

### 2.7.7 Histona Deacetilases

A atividade gênica pode ser ativada ou inativada não somente devido à sequência de DNA, mas também por modificações estruturais, epigenéticas, que podem alterar a expressão, como nas modificações da cromatina que ativam ou inativam determinado gene. Através da acetilação, ocasionada pelas histonas é possível estimular a atividade de genes, entretanto a desacetilação é comumente referenciada com a repressão destes (CHEN et al., 2010). No entanto, estudos com arroz sugeriram que, devido ao aumento da acetilação, a H3 está envolvida na resposta a estresses abióticos, visto que sua expressão foi aumentada (TSUJI et al., 2006). As *HDA*s podem ser divididas em 4 grupos, sendo elas: *RDP3*, *HDA1* e *SIR2*, que tem homologia com *HDA*s de leveduras; e o último grupo é o HD2, específico de plantas.

Diversos estudos com tabaco e *Arabidopsis* demonstraram a participação de outras *HDA*s (Histonas Deacetilases) na resposta a estresses abióticos e ao ABA, como as histonas H4 e, novamente, H3 (SOKOL et al., 2007). Segundo HU (2009) em um estudo realizado com arroz, utilizando a técnica de microarranjo, onde de 11 genes testados, 2 genes (*HDA703* e *HDA710*) tiveram sua expressão induzida pelos estresses hídrico, salino e frio, enquanto 9 genes (*HDA701*, *HDA702*, *HDA704*, *HDA705*, *HDA706*, *HDA712*, *HDA714*, *HDA716*, *HDT701* e *HDT702*) tiveram sua expressão reprimida.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Estudar a expressão de genes responsivos a restrição hídrica em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)

#### 3.2 Específicos

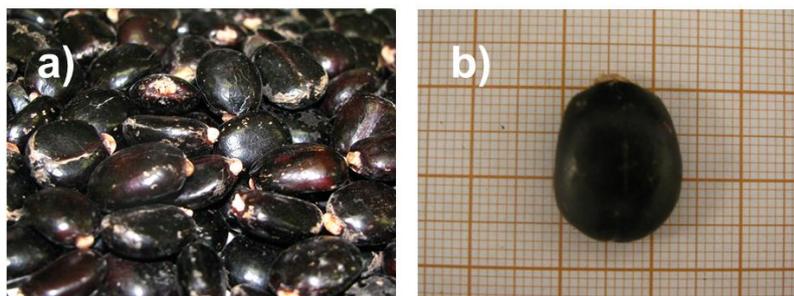
1. Testar e identificar o melhor dentre os diferentes tratamentos para desinfestação das sementes.
2. Determinar os níveis de tolerância de sementes de mamona à restrição hídrica por meio de osmocondicionamento e possível efeito de *priming*;
3. Selecionar genes responsivos a restrição hídrica em mamona;
4. Estudar expressão relativa dos referidos genes por meio de RT-qPCR em sementes de mamona submetidas à restrição hídrica.

## 4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos da Universidade Federal da Bahia.

### 4.1 Material Biológico

As sementes da variedade EBDA MPA-11 (Figura 6) de mamona (*Ricinus communis* L) foram cedidas pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrário (EBDA) em dezembro de 2010, e em 2011 foi cedido mais um lote da mesma variedade. Foi realizado o beneficiamento das mesmas para separar as sementes ocas, deterioradas e deformadas das sementes saudáveis, as quais foram armazenadas em geladeira a 4°C.



**Figura 6.** Sementes da variedade de mamona fornecidas pela EBDA em dezembro de 2010. a) Sementes da variedade EBDA MPA-11; b) Semente única da variedade EBDA MPA-11.

#### 4.1.1 Caracterização das sementes

Para caracterização das sementes, foi realizado o peso de mil (BRASIL, 2009) para cada variedade, onde foram separadas 8 repetições de 100 sementes cada, em seguida foi realizado o cálculo para estimativa do peso de mil sementes. Em seguida foi realizada a biometria utilizando um paquímetro digital (Eletric Digital Caliper 6" – LEE TOOLS) para mensuração do comprimento, largura e espessura das sementes, sendo mensuradas amostras de 10 repetições com 50 sementes cada e os dados registrados em planilha.

## 4.2 Caracterização fisiológica de sementes sob estresse.

### 4.2.1 Teste de Desinfestação das Sementes

Devido à grande quantidade de fungos presente nas sementes durante os testes de germinação, foi conduzido um experimento comparativo entre métodos de desinfestação de sementes utilizando Hipoclorito (Q-boa), Tween 20 (Amersham) e dois diferentes fungicidas: Captan (Milenia) e Carbomax (Agripec). As sementes da variedade EBDA MPA-11 (lote 2011) foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) Captan em solução, preparado segundo a recomendação do fabricante (2,5 mL para 1 L de água) e aplicados no diretamente no papel Germitest para embeber a semente; 2) Carbomax em associação com Captan em solução, preparado na proporção de 1,25 mL de Captan e 0,20 mL de Carbomax para o preparo de 500 mL de solução, embebendo as sementes diretamente no papel (KOBORI, 2011); 3) Captan aplicado de forma homogênea diretamente na semente, seguindo a recomendação do fabricante de 180 uL de Captan para cada 60 g de semente, para posteriormente ser montado o teste com embebição em água destilada; 4) Captan em associação com Carbomax aplicados diretamente na semente, segundo Kobori (2011), foi utilizado 120 uL de Captan e 42 uL de Carbomax para cada 60 g de sementes, e em seguida colocando as mesmas para embeber em água destilada; 5) Hipoclorito e Tween 20, as sementes foram desinfestadas em solução 20 mL de hipoclorito de sódio (2% de Cloro ativo) e 1 gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução, para um volume final de 100 mL, em que sementes foram agitadas por 20 minutos e em seguida foram realizadas 3 lavagens com água destilada, as sementes foram montadas em papel germitest e embebidas com água destilada; 6) Hipoclorito de Sódio e Tween 20 com retirada da carúncula, foi repetido o tratamento anterior, entretanto foram retiradas as carúnculas das sementes ao ser montado o teste, região aonde se dava início a infecção; 7) Testemunha, as sementes foram colocadas diretamente para germinar no papel germitest e embebidas em água sem tratamento algum.

Cem sementes foram divididas em quatro repetições e submetidas ao teste de germinação, seguindo as regras para análise de sementes (BRASIL, 2009), em rolos de papel germitest, acondicionados em germinador tipo BOD, a temperatura de 25°C sem fotoperíodo, por 14 dias. Nesse teste o rolo de germinação foi embebido com água destilada, com exceção dos tratamentos CAPSOL e CAPCORSOL que foram embebidas com as respectivas soluções.

Foram avaliados os seguintes parâmetros fisiológicos: porcentagem de germinação (BRASIL, 2009), índice de velocidade de germinação (VIEIRA e CARVALHO, 1994), tempo médio de germinação (LABOURIAU, 1983) e velocidade média de germinação.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro repetições. Para análise estatística, foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). As médias foram comparadas entre si pelo teste Scott-Knott a 5% (Scott & Knott, 1974) de probabilidade.

#### 4.2.2 Desinfestação de sementes

Após obtido resultado do teste comparativo entre métodos de desinfestação, ficou estabelecido como tratamento utilizado a aplicação do hipoclorito 20% associado ao Tween 20.

Previamente aos testes de *screening* as sementes foram desinfestadas a partir da utilização da solução de hipoclorito comercial (Q-boa®), com percentual de cloro ativo entre 2 e 2,5%, diluído em 20 vezes com água destilada, para obtenção de uma solução com 0,5% de cloro ativo. Foi acrescida ainda 1 gota, aplicada com pipeta pasteur, de Tween 20 (Plus One) para cada 100 mL de solução preparada para desinfestação. As sementes foram imersas na solução preparada e agitadas por 20 minutos, com o auxílio de uma placa agitadora (IKA® C-MAG HS 4). Em seguida as sementes foram lavadas com água destilada por 4 vezes e secas na bancada, onde estão prontas para montar os testes.

#### 4.2.3 Screening osmótico.

O screening osmótico foi realizado utilizando vasilhas plásticas transparentes com tampa (14 cm x 21 cm), papel germitest e Polietilenoglicol 8000 (PEG 8000 – Sigma-Aldrich) e sementes da variedade EBDA MPA-11. O papel germitest foi cortado nas dimensões das caixas plásticas, enrolado em papel alumínio e em papel Kraft, para em seguida ser autoclavado. Foram preparadas as soluções de PEG para os potenciais -0,2 MPa, -0,4 MPa, -0,6 MPa, -0,8 MPa, -1,0 MPa, -1,2 MPa e -1,4 MPa, segundo Villela et al (2001), sendo utilizado: 17,84 g; 26,25 g; 32,72 g; 38,18 g para 150 mL de água destilada para os potenciais -0,2 MPa, -0,4 MPa, -0,6 MPa, e -0,8 MPa respectivamente, para os potenciais -1,0 MPa, -1,2 MPa, -1,4 MPa foram utilizados 57,32 g; 63,13 g e 68,47 g para 200 mL de água destilada respectivamente. Três folhas de papel germitest cortadas foram pesadas para se calcular o valor a ser adicionado posteriormente com PEG ou água. As sementes foram desinfestadas e acondicionadas no papel germitest, onde foram aplicadas as soluções preparadas previamente na proporção de 3x o peso do papel germitest. Para cada potencial osmótico e seu respectivo controle (embebido em água) foram feitas 4 repetições, sendo utilizadas 32 caixas plásticas no total. As caixas foram acondicionadas em germinadores do tipo B.O.D. a 25°C, sem fotoperíodo por 14 dias, sendo realizadas 2 contagens, com 7 dias e com 14 dias após iniciado o teste, realizando a troca do papel germitest na primeira contagem.

Um segundo experimento de avaliação fisiológica sob restrição hídrica foi conduzido utilizando sementes da variedade EBDA MPA-11 (safra 2011), as quais foram desinfestadas com hipoclorito comercial (Q-boa) diluída em 20% com água destilada e 1 gota de Tween 20 para cada 100 mL de solução. As sementes foram colocadas na solução de hipoclorito em agitação por 20 minutos, em seguida foram lavadas com água destilada 4 vezes e secadas na bancada. Foram separadas 100 caixas plásticas (23cm x 14,5 cm x 7 cm) sendo 32 caixas para utilização para cada potencial: -0,3 MPa; -0,6 MPa e -0,9 MPa e 4 caixas para a testemunha (água). O papel germitest foi cortado na medida: 23 cm x 14,3 cm, sendo 3 folhas para cada caixa, totalizando 300

folhas. Foram preparadas as soluções de PEG para cada potencial: (-0,3 MPa) 149,328 g de PEG 8000 para 600 mL de água destilada; (-0,6 MPa) 218,143 g para 600 mL de água e (-0,9 MPa) 271,044 g para 600 mL de água destilada. Duas folhas de papel germitest foram dispostas em cada caixa plástica e 25 sementes foram colocadas sobre as mesmas, em seguida 1 folha foi colocada sobre as sementes. Trinta e duas caixas foram embebidas com 18,702 mL de solução de PEG 8000 a -0,3 MPa, 32 caixas com solução a -0,6 MPa, 32 caixas com solução a -0,9 MPa e 4 caixas com água destilada, sendo 280,53 mL de solução para cada caixa, foram utilizadas 2500 sementes. As 100 caixas foram dispostas em 3 germinadores do tipo B.O.D. a 25°C, sem fotoperíodo por 7 dias. Após uma semana as 2400 sementes embebidas em PEG foram lavadas com água destilada 4 vezes e as 96 caixas lavadas, evitando que fossem misturadas. Das 800 sementes embebidas em solução de PEG 8000 a -0,3 MPa, 100 foram embebidas novamente em PEG 8000 a -0,3 MPa, 100 em PEG a -0,6 MPa, 100 em PEG -0,9 e 100 em água, e colocadas novamente no germinador do tipo B.O.D. a 25°C, sem fotoperíodo, por 7 dias. As outras 400 foram deixadas na bancada para secar até retornar ao peso inicial. Tal processo foi feito com as 800 sementes embebidas inicialmente em solução de PEG -0,6 MPa e as 800 embebidas inicialmente em PEG a -0,9 MPa, totalizando 1200 sementes embebidas em potenciais de PEG a -0,3; -0,6 e -0,9 MPa e 1200 sementes colocadas para secar até o peso inicial. As sementes embebidas retornaram ao germinador tipo B.O.D.s a 25°C sem fotoperíodo. As sementes ficaram na bancada por 4 dias, sendo pesadas 2 vezes por dia, as 9 horas e as 14 horas. Após 4 dias, das 400 sementes que embebidas em solução de PEG 8000 a -0,3 MPa e secadas, 100 foram embebidas novamente em PEG 8000 a -0,3 MPa, 100 em PEG a -0,6 MPa, 100 em PEG -0,9 e 100 em água, e colocadas nos germinadores tipo B.O.D. a 25°C sem fotoperíodo por 7 dias. O mesmo processo foi feito com as sementes que foram embebidas inicialmente com potenciais -0,6 e -0,9 MPa e colocadas para secar. Após o término do experimento, os dados foram tabulados e foi feita análise estatística utilizando o teste Scott-Knott.

#### 4.3 Curva de Embebição

Sementes de mamona foram inicialmente desinfestadas e em seguida submetidas a quatro lavagens com água destilada, posteriormente essas foram colocadas para germinar em caixas tipo gerbox. Foi utilizado papel do tipo germitest com substrato umedecido com água destilada, na proporção de três vezes a massa do papel seco e colocados em germinador tipo B.O.D. com a temperatura constante de 25°C sem fotoperíodo (Brasil, 2009). Após o início do teste nos intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60 e 72 horas, foram retiradas as sementes da caixa gerbox, retirado o excesso de água de cada semente com papel toalha, e o conjunto de semente de cada repetição foi pesado em balança de precisão Com o resultado expresso em gramas. Concomitante, foi avaliado o potencial germinativo das sementes, considerando sementes germinadas as que apresentavam emissão de radícula com 2 mm de comprimento.

#### 4.4 Coleta de material biológico para os testes moleculares

Foram utilizadas 500 sementes da variedade EBDA MPA-11 (lote 2011), divididas em 5 tratamentos: a) Semente seca (SS), as sementes não passaram por nenhum tratamento específico e foram utilizadas como calibrador; b) Sementes Embebidas em água por 36 horas (A36); c) Embebidas em PEG -1,0 MPa por 4 dias (P4); d) Embebidas em PEG -1,0 MPa por 7 dias (P7) e e) Embebidas em PEG -1,0 MPa por 7 dias e reidratadas em água por 36 horas (PA36). Todas as sementes, com exceção das sementes secas, foram desinfestadas pelo método previamente descrito e incubadas em germinadores do tipo B.O.D. a 25°C, sem fotoperíodo.

Os embriões foram isolados das sementes com auxílio de lâminas do tipo “razor” e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, acondicionados

em microtubos e armazenados em ultrafreezer a -80 °C, ou macerados com cadinho e pistilo na presença de nitrogênio líquido para extração de RNA.

#### 4.5 Busca por genes em bases de dados

Após a revisão de literatura e definição dos genes alvo, foi realizada uma busca na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e na base de dados do *J. Craig Venter Institute* – JCVI (<http://plantta.jcvi.org/search.shtml>).

Uma tabela preliminar foi elaborada com a classe dos genes alvo, função, sigla, acesso no NCBI e o tamanho em pares de base.

Posteriormente uma nova pesquisa na literatura foi realizada e uma nova busca conduzida na base de dados do NCBI e do JCVI. Os genes indicados na literatura foram buscados nas suas respectivas espécies, em seguida foi realizada uma busca do gene na *Ricinus communis* L., com o seguinte comando: (nome do gene) AND "Ricinus communis" [porgn:\_\_txid3988]; por exemplo: (HVA22) AND "Ricinus communis" [porgn:\_\_txid3988]. Por fim, foi utilizada a ferramenta *BLAST* para encontrar os genes similares, da espécie estudada na literatura, na mamona. O megablast foi realizado preferencialmente e no caso de não obtenção de resultados foi realizado então o *blastn*.

Uma tabela de genes tecido-específicos foi elaborada com os dados obtidos: grupo do gene, nome do gene, espécie em que o gene foi localizado na base de dados, sigla do gene, ID do NCBI, o FASTA da espécie utilizada na literatura, o ID do gene e o FASTA na *Ricinus communis* L., e os resultados fornecidos pelo BLAST.

Foram selecionados genes com atividade relacionada à resposta ao estresse hídrico e com informações bem definidas nas bases de dados utilizadas. Por ter o seu genoma sequenciado recentemente, muitas das anotações encontradas dos genes da mamona ainda estão incompletas.

#### 4.6 Desenho de *Primers*

Após a definição dos genes a serem estudados no presente trabalho, cada sequência foi submetida ao *megaBLAST* separadamente, para obtenção de sequências homólogas àquela aplicada nesta ferramenta, em seguida os 5 primeiros resultados com os melhores valores de *e-value* e identidade tiveram seus dados anotados. Posteriormente todas as sequências foram alinhadas utilizando o CLUSTALW (versão 1.4 – THOMPSON et al, 1994), este contido como ferramenta acessória do BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.0.9.0 – HALL, 1999). Após o alinhamento, foram observadas as regiões com maior similaridade entre todas as sequências das espécies obtidas no *megaBLAST* e daquela alvo, onde foi selecionada a região com maior similaridade e maior extensão dentro da sequência alvo utilizada como matriz. Os critérios para ser considerada maior similaridade foram a menor quantidade de maus pareamentos, sem gaps e a maior extensão dentre as opções.

A partir da sequência similar obtida com a utilização do programa BioEdit, esta foi inserida na ferramenta para desenho de *primers* do site do Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), seguindo SciTools>qPCR>RealTime PCR. Alguns parâmetros para o desenho de *primers* foram modificados, como a temperatura de *melting*, para 58°C para mínima, 59°C para ótima e 60°C para máxima; o tamanho do amplicon foi alterado, sendo o mínimo para 120pb (pares de bases), o ótimo para 150pb e o máximo para 170pb, os demais parâmetros foram mantidos inalterados. Para os *primers* com maior dificuldade de desenho, foi alterado o tamanho do amplicon máximo para 200pb.

Com a obtenção dos *primers* nos padrões desejados, estes foram conferidos no alinhamento feito no CLUSTALW e verificado se os *primers* foram desenhados sobrepostos às regiões com bom alinhamento. Posteriormente, os *primers* foram submetidos à ferramenta *PrimerBLAST*, contida no site do NCBI e submetida para ser confrontada contra todas as espécies contidas na base de dados. Como resultado, foram selecionados apenas os *primers* que alinhavam com as sequências que estão relacionadas ao mesmo gene da sequência alvo, e nos casos onde houve alinhamento em

outras espécies, porém de genes similares, apenas foi comprovado a eficácia dos *primers* para com outras espécies vegetais. Foram excluídos *primers* que alinharam com regiões díspares às sequências alvo.

#### 4.7 Extração de RNA

Foi utilizado o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega) para realizar as extrações de RNA. Foi pesado 30 mg do material biológico de cada uma das quatro repetições, de cada tratamento (SS; A36; P4; P7; PA36). Adicionou-se 175 uL do *RNA lysis buffer* (fornecido pelo kit) e 350 uL do *Dilution buffer* (fornecido pelo kit) e os microtubos foram levados ao vórtex rapidamente. Em seguida as amostras foram colocadas no banho-maria a 70°C por 3 minutos e colocadas na centrífuga (Universal 320 R – Hettich Zentrifugen) a 14.000 x g por 10 min a 4°C. A fase intermediária foi transferida para um novo microtubo, foi adicionado 200 uL de etanol 95% (Merck) às amostras, e estas foram transferidas para as colunas/tubos de coleta (fornecidos pelo kit). As colunas foram colocadas na centrífuga a 14.000 x g por 1 minuto a 4°C e o líquido dos tubos de coleta foi descartado. Foi adicionado 600 uL de *RNA Wash Solution* (fornecido pelo kit) às colunas e estas foram levadas mais uma vez para a centrífuga, na mesma configuração anterior, o líquido remanescente foi descartado do tubo coletor. Foi então preparado o mix da DNase: 40 uL de *Yellow Core Buffer*, 5 uL de 0.09 M MnCl<sub>2</sub>, 5 uL de *DNase I enzyme* (fornecido pelo kit), o líquido foi misturado por inversão. O mix da DNase foi adicionado diretamente nas membranas da coluna e estas foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, 200 uL de *DNase stop solution* (fornecido pelo kit) foi adicionado às colunas, que foram centrifugadas a 14.000 x g por 1 minuto a 4°C. Em seguida, 600 uL de *RNA Wash Solution* foi adicionado às colunas, que foram levadas a centrífuga, seguindo a mesma programação anterior; mais 250 uL de *RNA Wash Solution* e levadas a centrífuga mais uma vez, a 14.000 x g por 2 minutos a 4°C. Por fim, as colunas foram transferidas para novos microtubos, onde foi adicionado 50 uL de água,

e estes foram levados a centrífuga a 14.000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.

Ao final da extração, alíquotas para a espectrofotometria e para a eletroforese foram preparadas com 98 µL de água ultrapura e 2 µL de amostra, na proporção 50:1, e 4 µL de amostra para 2 µL de tampão de carregamento para eletroforese, respectivamente. O restante da amostra foi armazenado no ultrafreezer.

Em seguida foi preparado um gel de agarose 1%, onde 0,6 g de agarose ultra pura (Invitrogen) foi diluída em 60 mL de tampão TBE 0,5X e aquecido até a total diluição. O Brometo de Etídio (Promega) foi aplicado, 2 µL, diretamente no gel, e após a solidificação deste o mesmo foi colocado na cuba horizontal imerso em tampão TBE 0,5X para aplicação das amostras. A corrida de eletroforese foi realizada por 40 min a 100 mA e 100 W. Para o preparo do tampão TBE 5X foi pesado 27 g de Tris (USB), 13,75 g de ácido bórico (USB) e 10 mL de 0,5M EDTA pH 8.0 para um volume final de 500 mL, este foi preparado a partir de 3,72 g de EDTA (Invitrogen) em 20 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado.

#### 4.8 Transcriptase Reversa

Para a obtenção do cDNA foi utilizado o kit *Improm-IT<sup>tm</sup> Reverse Transcription System* (Promega) seguindo o protocolo do respectivo kit. Foi preparado um mix com as amostras: 1 µL de OligoT; 1 µg de RNA e completando com água ultrapura autoclavada para um volume final de 10 µL, o tubo foi incubado a 70°C por 5 minutos (termociclador Veriti – Applied Biosystems) e em seguida resfriado a 4°C por 5 minutos, posteriormente sendo mantido no gelo. Em seguida foi preparado o mix da transcriptase reversa: 1.6 µL de água livre de nucleases; 4 µL de *ImProm-IT<sup>tm</sup> 5x Buffer*; 2.4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM e 1 µL de dNTPs – o material foi levado ao vórtex – e em seguida adicionou-se 1 µL de *ImProm-IT<sup>tm</sup> Reverse Transcriptase*. Misturou-se 10 µL do mix da amostra à 10 µL do mix da transcriptase reversa e o tubo foi levado ao

termociclador Veriti (Applied Biosystems) com a configuração de um ciclo a 25°C por 5 minutos; um segundo ciclo de 42°C por 60 minutos e o terceiro ciclo a 70°C por 15 minutos. O tubo deve ser armazenado no Ultrafreezer.

#### 4.9 RT-qPCR

As amostras oriundas do RT-PCR foram diluídas 5x em água ultrapura autoclavada e armazenadas como solução “estoque”. Ao realizar os testes com RT-qPCR, tais amostras estoque foram diluídas 5x novamente em água ultrapura autoclavada e nomeadas “solução de trabalho”. Para realização da análise por RT-qPCR foi utilizado o kit *Sybr Green qPCR Master Mix* (Applied Biosystems). Foi preparado um mix: 10 uL de *Sybr Green qPCR Master Mix*; 0,5 uL de *primer forward* 10 uM; 0,5 uL de *primer reverse* 10uM e 4uL de água ultrapura autoclavada. Foi aplicado 5 uL da amostra de cDNA de trabalho e 15 uL do mix em cada poço da placa de RT-qPCR e esta foi levada ao 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Em seguida o equipamento foi configurado para 3 estágios, sendo o primeiro com 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, o segundo estágio com 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e o terceiro estágio com 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi adicionada a etapa da curva de dissociação, como quarto estágio, com 3 ciclos, onde o primeiro a 95°C por 15 segundos, o segundo a 60°C por 1 minuto e o terceiro a 95°C por 15 segundos.

Foram realizados testes de eficiências dos *primers* desenhados onde as amostras de trabalho foram diluídas de forma seriadas em 1x; 2x; 4x; 8x e 16x e aplicado o protocolo citado acima.

As análises foram feitas segundo o modelo matemático para expressão relativa (PFAFFL et al, 2001) e para confirmação e determinação da estabilidade dos genes normalizadores foi utilizado o a ferramenta GeNorm (VANDESOMPELE et al, 2002). Para análise estatística dos dados moleculares foi utilizado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000) com utilização do teste T de probabilidade. Os genes POB e GTP foram selecionados como

normalizadores, porém o primeiro apresentou um fator M acima de 0,5. O gene da proteína LEA14 apresentou uma grande estabilidade e foi sugerido pelo GeNorm como normalizador, com um fator M de 0,413. Desta forma os genes LEA e GTP foram utilizados como normalizadores e para o controle interno foi utilizado o tratamento Semente Seca (SS), tendo como valor padrão 1.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fisiológico

Durante a caracterização inicial, na biometria as sementes apresentaram valores médios de 17,09 cm para altura, 13,13 cm para largura e 7,44 cm para espessura; com peso de 73,2 g para 100 sementes.

#### 5.1.1 Desinfestação

Dentre os tratamentos testados o do Hipoclorito associado ao Tween 20 sem carúncula que obteve melhores resultados em todos os itens observados (Tabela 1).

**Tabela 01.** Qualidade fisiológica (GERM - germinação, IVG - índice de velocidade de germinação, TMG - tempo médio de germinação, VMG - velocidade média de germinação) de sementes de mamona submetidas a diferentes métodos de desinfestação.

Tratamentos	GERM (%)	IVG (plântula/dia)	TMG (dias)	VMG (dia <sup>-1</sup> )
Testemunha	94 a	5,38 b	3,72 b	0,27 b
Captan + Carbomax Solução	94 a	4,55 b	4,45 c	0,23 c
Captan + Carbomax Semente	73 b	-	5,85 d	0,18 c
Captan Solução	96 a	5,65 b	3,66 b	0,27 b
Captan Semente	94 a	5,30 b	3,84 b	0,26 b
Hipoclorito + Tween 20 s/carúncula	99 a	8,72 a	2,44 a	0,42 a
Hipoclorito + Tween 20	96 a	8,27 a	2,50 a	0,40 a
CV(%)	13,31	15,96	18,42	12,62

Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Foi possível observar que as sementes submetidas aos tratamentos com hipoclorito germinaram com boas taxas de germinação, assim como velocidade e tempo, enquanto as submetidas a tratamentos com fungicida tiveram sua germinação afetada. Segundo Silva (1989) é possível que os fungicidas tenham exercido um efeito considerado tóxico, visto que as doses recomendadas são oriundas de testes realizados em campo, onde parte do fungicida é assimilada pela semente, parte adsorvida pelo solo e o restante é

lixiviado. Em condições de laboratório o fungicida se concentra ao redor da semente, podendo prejudicá-la, ocasionando um efeito fitotóxico.

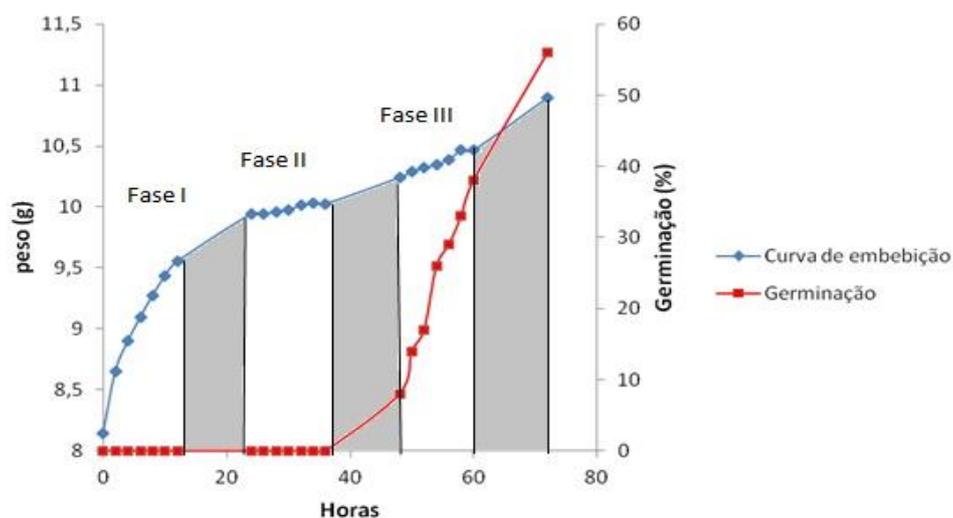
Foi observado ainda que os fungos que infestam as sementes, de forma geral iniciam a infestação pela carúncula (Figura 7), sendo uma possibilidade para a ligeira vantagem do Hipoclorito + Tween 20 s/carúncula sobre o Hipoclorito + Tween 20 em valores absolutos como observado na tabela.



**Figura 7:** Semente de mamona da variedade EBDA MPA-11 contaminada, com um dos tipos de fungos não identificados, na região da carúncula.

### 5.1.2 Curva de Embebição

A partir dos dados obtidos pela curva (Figura 8), foi possível identificar as etapas do padrão trifásico (BEWLEY & BLACK, 1994), onde a fase 2 se inicia entre as 12 e 24 horas. Entre as 36 e 48 horas iniciou-se a fase 3, dando início a germinação.



**Figura 8:** Curva de embebição em água de sementes de mamona. Marcados em cinza - períodos de 12 horas em que as sementes não foram pesadas; Marcados em branco - períodos de 12 horas nos quais as sementes foram pesadas de hora em hora; Linha azul - a embebição da água pelas sementes; Linha vermelha - taxa de germinação.

### 5.1.3 Screening hídrico

Os testes osmóticos apresentaram resultados indicando que a variedade EBDA MPA-11 (lote 2011) inicia a restrição hídrica anteriormente ao potencial - 0,2 Mpa, entretanto ao reidratar as sementes foram observados bons resultados de germinação com bom desempenho com relação ao tempo e à velocidade média (tabela 2).

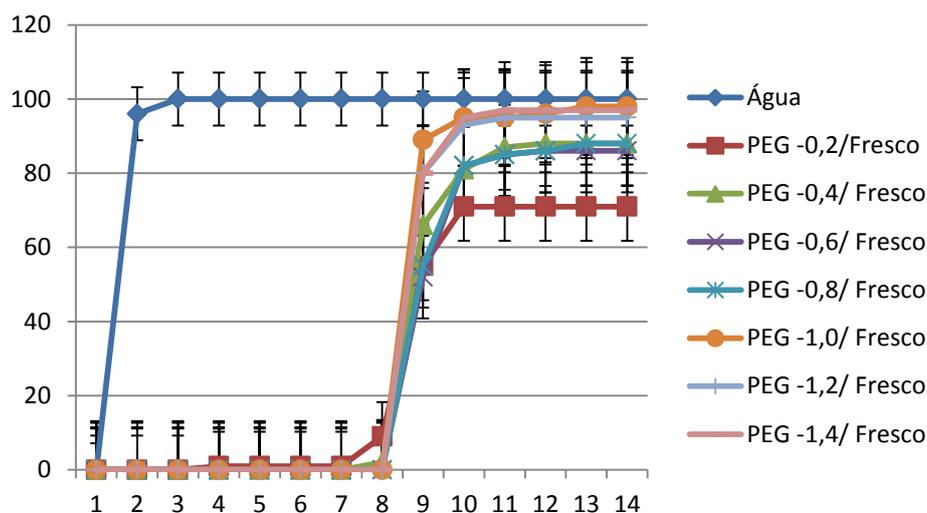
**Tabela 02.** Sementes da variedade EBDA MPA-11 embebidas com PEG em diferentes potenciais por 7 dias e reidratadas em água até o 14º dia, com avaliações diárias. GERM – taxa de germinação, REID – taxa de germinação durante a Reidratação, IVG – Índice de Velocidade de Germinação, TMG - tempo médio de germinação, VMG - velocidade média de germinação.

Tratamento (MPa)	Germinação (%)	REID (%)	IVG (plântula/dia)	TMG (dias)	VMG (dia <sup>-1</sup> )
0,0	100 a	-	12,33 a	2,04 a	0,49 a
-0,2	3 b	71 b	9,31 a	2,14 a	0,47 a
-0,4	2 b	88 a	10,17 a	2,32 a	0,43 a
-0,6	2 b	86 a	9,23 a	2,46 a	0,41 a
-0,8	2 b	88 a	9,44 a	2,54 a	0,4 a
-1	0 b	98 a	11,76 a	2,18 a	0,46 a
-1,2	0 b	95 a	11,19 a	2,19 a	0,45 a
-1,4	0 b	97 a	11,37 a	2,19 a	0,46 a

<b>CV(%)</b>	15,24	11,4	17,37	12	10,09
<b>Erro padrão</b>	1,04	5,15	0,92	0,14	0,02

Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A partir dos dados obtidos, estes foram plotados em um gráfico (Figura 9) o que permitiu observar o padrão das curvas de germinação durante a reidratação nos diferentes potenciais testados.



**Figura 9.** Curva de germinação das sementes embebedas por 7 dias em diferentes potenciais de PEG 8000 e reidratadas em água por mais 7 dias.

O segundo teste hídrico, com a utilização dos potenciais -0,3; -0,6 e -0,9 MPa, demonstrou que não houve diferença estatística entre os tratamentos de sementes secas e frescas, com exceção da -0,3 MPa (Tabela 3). O resultado demonstrado no experimento anterior foi validado, uma vez que houve uma redução na taxa de germinação das sementes submetidas ao estresse de -0,3 MPa após serem reidratadas.

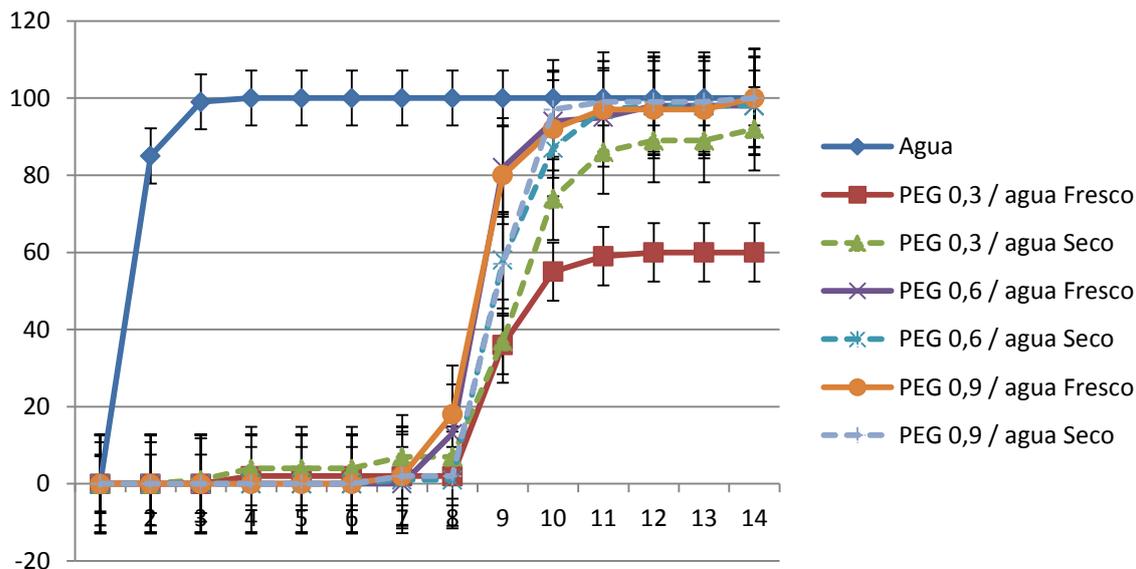
**Tabela 03.** Sementes da variedade EBDA MPA-11 embebidas com PEG -0,3; -0,6 e -0,9 MPa por 7 dias e reidratadas em água até o 14º dia, com avaliações diárias. As sementes “frescas” foram retiradas do PEG e reidratadas imediatamente; as sementes “secas” foram deixadas na bancada por 4 dias, até o retorno do peso inicial e então reidratadas. GERM – taxa de germinação, REID – taxa de germinação durante a Reidratação, IVG – Índice de Velocidade de Germinação, TMG - tempo médio de germinação, VMG - velocidade média de germinação.

Tratamento	GERM (%)	REID (%)	IVG (plântula/dia)	VMG (dias)	TMG (dia <sup>-1</sup> )
Água	100 a	100 a	12 a	0,46 a	2,2 a
PEG -0,3/água fresco	2 c	60 b	2 c	0,11 b	9,4 b
PEG -0,3/água Seco	7 b	92 a	3 b	0,10 b	9,7 b
PEG -0,6/água fresco	0 c	98 a	3 b	0,11 b	9,1 b
PEG -0,6/água Seco	1 c	98 a	3 b	0,10 b	9,5 b
PEG -0,9/água fresco	2 c	100 a	3 b	0,11 b	9,2 b
PEG -0,9/água Seco	2 c	100 a	3 b	0,11 b	9,5 b
CV(%)	39,08	7,54	7,1	3,92	3,91
Erro Padrão	0,39	2,6	0,14	0,00	0,16

Scott-Knott a 5% de probabilidade

Um segundo gráfico foi gerado (Figura 10), a partir dos dados da tabela acima. É possível notar mais claramente o efeito do tratamento de secagem prévia a reidratação nos potenciais -0,3 MPa, onde houve uma diferença de mais de 20% na taxa de germinação. Os demais tratamentos não obtiveram diferença estatística.

Através da análise dos dados em ambos os testes hídricos é possível notar que não foi observado nenhum possível efeito de *priming* ou envigoramento das sementes devido ao estresse hídrico o qual foram submetidas. Da Silva et al (2009), em um estudo com sementes de mamona, registraram um possível efeito de *priming*, onde foi realizado um tratamento de osmocondicionamento em um sistema com aeração das sementes previamente aos testes de germinação. Os resultados do trabalho citado mostraram que quando as sementes de mamona são osmocondicionadas, no potencial -0,5 MPa, melhoram os valores de IVG e as suas taxas de germinação. O potencial de -1,0 MPa foi danoso para as sementes no estudo em questão.



**Figura 10.** Curva de germinação das sementes embebedas por 7 dias em diferentes potenciais de PEG 8000 e reidratadas em água por mais 7 dias. Foram usados dois tratamentos: Secas – sementes colocadas para secar até o peso inicial antes de serem reembebedas; Frescas – reembebedas imediatamente após o período de 7 dias.

Os resultados obtidos foram similares aos encontrados por Pereira e Lopes (2011) em pinhão manso, espécie da mesma família da mamona, onde o potencial  $-0,2$  MPa afetou drasticamente a germinação e ocorreu a inibição da germinação no potencial  $-0,6$ MPa. O estágio 3, do padrão trifásico da germinação (BEWLEY & BLACK, 1994), é crítico, pois para haver a protrusão da radícula é necessário uma quantidade relativa de água. A situação de estresse hídrico atinge fortemente as sementes durante essa fase, o que com a falta de água, reduz a velocidade da emissão das raízes nas fases superficiais do solo, podendo aumentar o crescimento quando alcançar as fases mais profundas e úmidas (GODOY et al, 2008).

A mamona é conhecida por ser uma planta tolerante à seca, porém os resultados obtidos indicam que as sementes de mamona não são tolerantes quando submetidas ao estresse durante a fase da germinação.

## 5.2 Molecular

### 5.2.1 Busca por genes e desenho de *Primers*

Após a realizada a busca dos genes, definidos pela pesquisa na literatura, foi elaborada uma tabela (Tabela 4), onde é possível perceber diversos genes com a mesma nomenclatura, entretanto com tamanhos e ascensões diferentes na base de dados do NCBI.

**Tabela 4.** Tabela elaborada a partir da primeira busca por genes na base de dados do NCBI, encontrando diversos genes com informações semelhantes ou incompletas.

GENE	SIGLA	FUNÇÃO	NCBI ACCENSSION	Tamanho			
<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>	MAPK	cascata de transdução de sinal	XM_002534120	1842 pb			
			XM_002530191	1119pb			
			XM_002528501	2351pb			
			XM_002528431	1821pb			
			XM_002525977	1512pb			
			XM_002524807	1557pb			
			XM_002521476	1107pb			
			XM_002516750	2303pb			
			XM_002511858	1887pb			
<i>Calcium-Dependent Protein Kinases</i>	CDPK	cascata de transdução de sinal	XM_002510388	1119pb			
			XM_002509805	1164pb			
			XM_002529917	1990 pb			
			<i>Dehydration Responsive Element Binding protein 1A</i>	DREB1A	fatores de transcrição envolvidos na proteção das estruturas celulares durante a desidratação celular	XM_002510801	1233 bp
						<i>Heat-Shock Proteins</i>	HSPs
			<i>Late Embryogenesis Abundant</i>	LEA	tolerância à dessecação	XM_002533299	1228 pb
			<i>Isocitrato desidrogenase</i>	ICDH	Relacionado ao estresse térmico altas	XM_002528471	1242pb
						XM_002527162	1379pb
						XM_002524626	1413pb
<i>Histonas deacetilase 2A</i>	HD2	Hiperacetilação e relacionado a resposta ao estresse hídrico	XM_002527403	1007pb			
			XM_002528536	864pb			
<i>Dehydration Responsive Element Binding protein 2C</i>	DREB2C	fator de transcrição ligado ao estresse hídrico	XM_002520748	1161pb			
			XM_002525601	766pb			
<i>Cyclophilin</i>	CYP	Relacionado a diversos estresses	XM_002533602	597pb			
			XM_002521915	525pb			
			XM_002510497	703pb			
			XM_002520909	2297pb			
			XM_002510497	703pb			
<i>Aquaporina</i>		Relacionado a canais de água	XM_002531303.1	867pb			

A partir da realização de uma segunda pesquisa na literatura, foi identificado um grupo de genes tecido-específicos os quais foram utilizados para o desenho de *primers* e seguimento com o presente estudo (tabela 5)

**Tabela 5.** Genes utilizados no presente estudo, *primers* dos respectivos genes, tamanhos dos amplicons gerados e seus registros no NCBI.

GENE	Primer Forward	Amplicon	NCBI
	Primer Reverse		
<i>CDPK7</i>	ATCGCGATCTCAAACCAGAG CTCCAGCACTCCAGACATCA	198pb	<a href="#">XM_002513450.1</a>
LEA 14	CTTCGTGGCCGAGAAGATAG GTAGGAGACCTCGCAAATGG	157pb	<a href="#">XM_002511881.1</a>
<i>HDA 710</i>	TGCGGTGCTGACTCATTATC TGCGAATGGTATAACCACCA	139pb	<a href="#">XM_002531750.1</a>
<i>DREB</i>	GGTCTGCTTGTTTGAATTTTG AACCTTCTGTCTCCATTG	136pb	<a href="#">XM_002510801.1</a>
Aquaporina PIP1.1	GTTCTTGTTTCTTTACATTACGG CAGTGCAGTAGACCAGAG	134pb	<a href="#">XM_002531303.1</a>
Ciclofilina	CCACAGGATTATACCCAGC TCCAGTATGCTTCAGCTTG	124pb	<a href="#">XM_002525601.1</a>
MAPK	TTGCGACTTTGGGTTAGCTC CAACCCACAGACCACACATC	141bp	<a href="#">XM_002532220.1</a>
GTP	GCCTACCCAATATCCTACATC ATCATAGGCATCAACCAGG	151pb	XM_002519153.1
POB	ACTCTGACGTTTGCCTG GGAAATACCATGAACGACTAC	157pb	XM_002520511.1

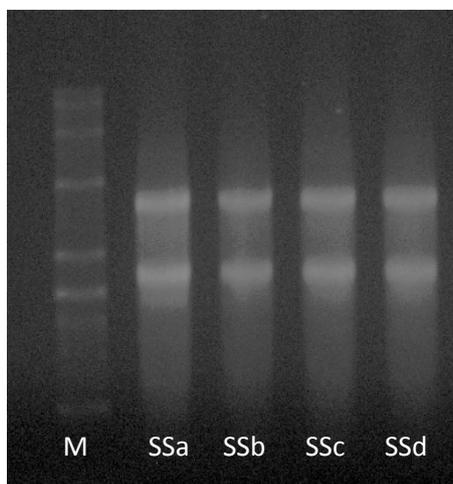
Os genes GTP e POB foram obtidos a partir da utilização da ferramenta BLAST confrontando os genes At4g02080 e At4g12590 (tabela 6), apresentados por Dekkers et al (2011) como genes mais estáveis para função de normalizadores.

**Tabela 06.** Valores retornados pela ferramenta BLAST (NCBI) para a busca dos genes similares na mamona dos normalizadores sugeridos pela literatura.

Gene	Query coverage	e-value	identity
POB	99%	0.0	80%
GTP	61%	4,00 <sup>-120</sup>	81%

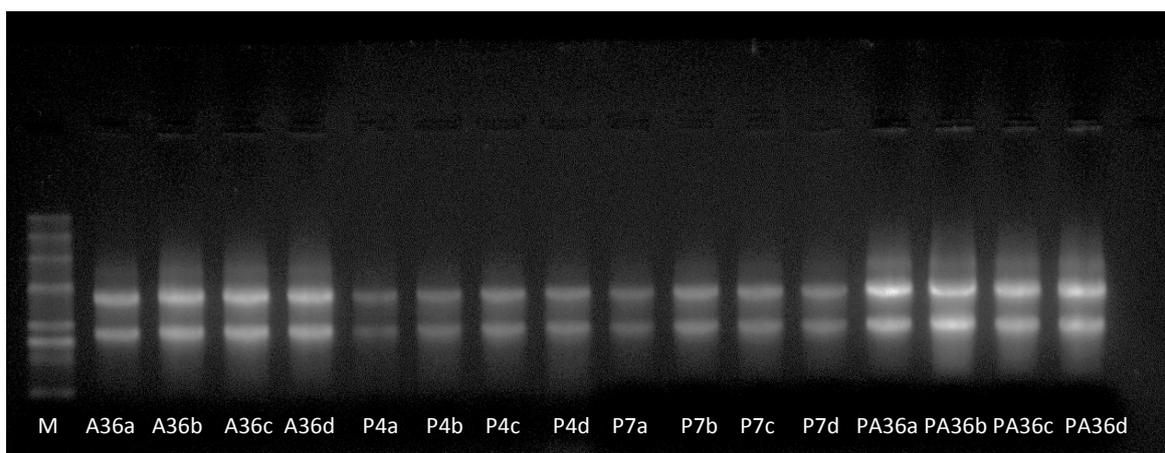
### 5.2.2 Extração de RNA

As extrações foram bem sucedidas, primeiramente foram extraídas as amostras do tratamento controle: Semente Seca (SS) e feito um gel de agarose para verificação da qualidade das amostras (Figura 11).



**Figura 11.** Gel de agarose 1% realizado após a extração de RNA das amostras de semente seca SSa; SSb; SSc; SSd. M – Marcador de peso molecular.

Em seguida foi realizada a extração das demais amostras (Figura 12) com obtenção de bons padrões de banda em gel de agarose, sem presença de DNA genômico ou degradação da amostra.



**Figura 12.** Gel de agarose 1% realizado após a extração de RNA dos tratamentos e suas replicatas biológicas: Água por 36 horas (A36a, b, c, d); PEG -1,0 por 4 dias (P4a, b, c, d); PEG -1,0 por 7 dias (P7a, b, c, d) e PEG -1,0 por 7 dias reidratado por 36 horas (PA36a, b, c d).

A quantificação por espectrofotometria UV demonstrou que as amostras tiveram boas concentrações de RNA total para seguir com os testes moleculares e boas razões 260/280 (tabela 7)

**Tabela 07.** Resultados da quantificação por espectrofotometria UV de amostras de RNA total extraídos de embriões de sementes da variedade EBDA MPA-11. Repetições do tratamento com Semente Seca: SSa; SSb; SSc e SSd. Tratamento com água por 36 horas: A36a; A36b; A36c e A36d. PEG -1,0 MPa por 4 dias: P4a; P4b; P4c e P4d. PEG -1,0 MPa por 7 dias: P7a; P7b; P7c e P7d. Tratamento de PEG -1,0 MPa reidratadas em água por 36 horas: PA36a; PA36b; PA36c e PA36d.

<u>Amostra</u>	<u>Concentração (ng)</u>	<u>260/280</u>
SSa	138,7157	2,05
SSb	108,4895	2,3264
SSc	138,4214	2,1709
SSd	129,6384	2,0909
A36a	152,175	1,833
A36b	298,9457	1,8254
A36c	306,8159	1,8946
A36d	299,3019	1,8756
P4a	101,9265	1,7398
P4b	132,2543	1,6385
P4c	128,1488	2,199
P4d	151,2731	1,8089
P7a	113,4993	1,7745
P7b	151,8742	2,1713
P7c	145,2849	2,0023
P7d	137,2657	1,9552
PA36a	398,4508	1,8797
PA36b	883,7286	1,9337
PA36c	408,0885	1,8379
PA36d	488,6357	1,9877

### 5.2.3 RT-qPCR

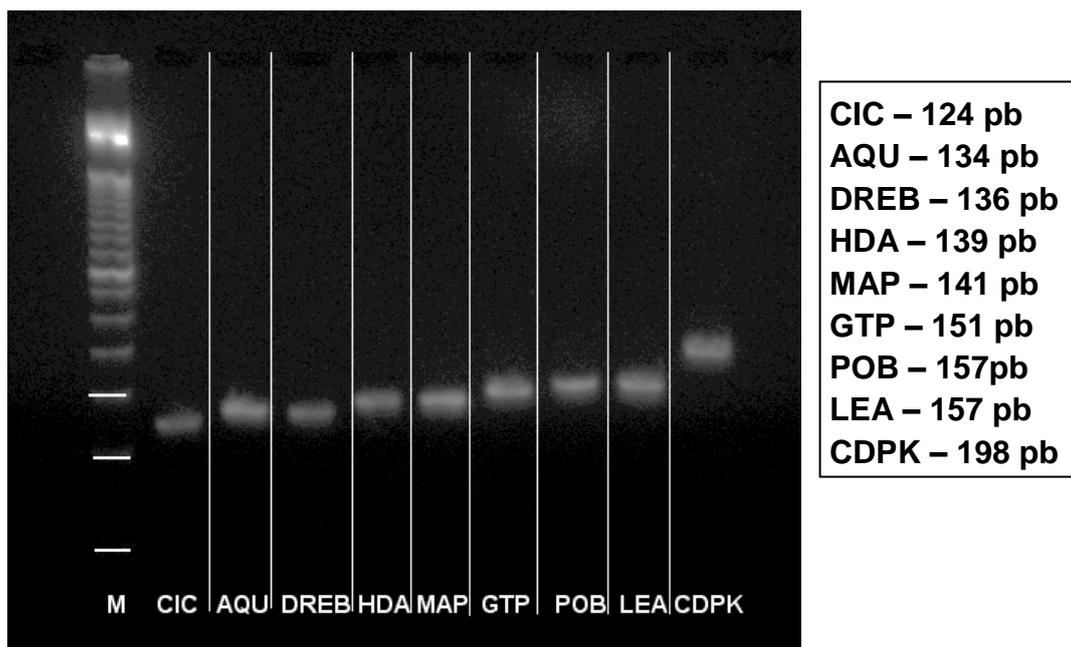
Os primeiros testes realizados com as amostras e os *primers* foram os testes de eficiência, onde foram aceitos os *primers* com valores de eficiência variando de 85 a 115 e os valores de  $R^2$  acima de 95 (tabela 8)

**Tabela 08.** Genes utilizados no presente trabalho, suas respectivas eficiências e valores de  $R^2$ . Os valores de eficiência devem permanecer entre 85-115 e  $R^2$  acima de 95.

<u>GENE</u>	<u>Eficiência</u>	<u><math>R^2</math></u>
HDA	90	99
CDPK-7	85,4	95
AQUAPORINA PIP 1.1	92	99
CICLOFILINA	102	99
POB	103	96
GTP	102	99
LEA	89,1	99
DREB	113	99
MAPK	95	99

Dos genes considerados normalizadores somente o GTP apresentou um bom resultado, com o fator M equivalente a 0,473, o POB obteve um valor de fator M superior a 0,5, sugerindo a sua exclusão. Entretanto, dentre os genes alvo, a LEA14 se mostrou bastante estável e apresentou um valor de fator M.

Previamente aos testes de qPCR, os *primers* foram analisados através da visualização do gel de agarose (Figura 13), onde foi possível confirmar as sua especificidade e identificar todos os genes estudados no presente trabalho.



**Figura 13.** Gel de agarose 3% para verificação da especificidade dos *primers* utilizados.

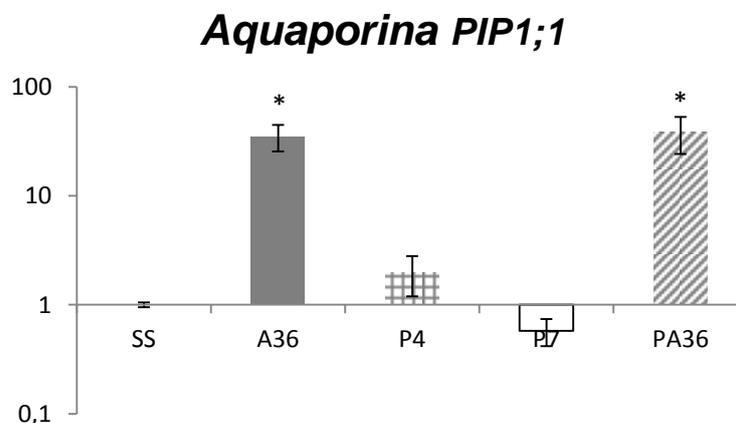
Para todos os *primers* testados foi verificada apenas uma banda no gel. Marcador de peso molecular (M): 50 pb – 10 Kpb.

### Aquaporina PIP1;1

A aquaporina PIP1;1 obteve a maior expressão relativa (Figura 14) nos tratamentos com água: A36 (35,10) e PA36 (38,64), entretanto os tratamentos com PEG P4 (1,99) e P7 (0,58) não apresentaram significância estatística, e houve uma possível supressão no tratamento P7. Assim como no presente estudo, a Aquaporina PIP1;1 é representada na literatura como um gene de altos níveis de expressão principalmente em raízes, podendo variar de 5000-7000 cópias por nanograma de RNA total (JANG et al, 2004; ALEXANDERSSON et al, 2005; MAHDIEH et al, 2008).

Segundo Jang et al (2004) a Aquaporina PIP1;1 aumentou o seu valor de expressão em 2 vezes nas partes aéreas da planta, nas primeiras 12 horas, quando esta foi submetida ao estresse hídrico e nas raízes em 5 vezes quando submetida ao estresse salino. Ainda segundo o autor, tal gene foi suprimido à baixas temperaturas e quando exposto ao estresse hídrico por longos períodos, quando começa a redução da expressão gênica.

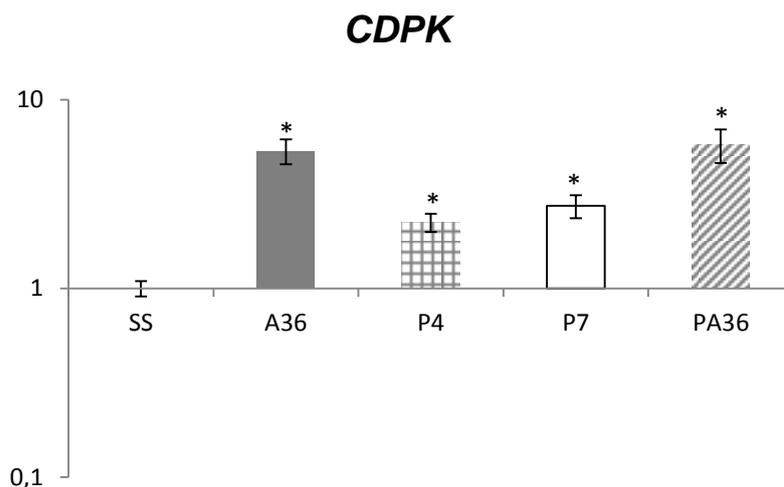
Em plantas de tabaco, os níveis de PIP1;1 foram influenciados pela situação de estresse hídrico, uma vez que os transcritos diminuíram nesta condição e retornaram a elevados valores quando as plantas foram reidratadas (MAHDIEH et al, 2008).



**Figura 14.** Gráfico da expressão da Aquaporina PIP1;1 nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

### *CDPK*

O *CDPK* apresentou aumento na sua expressão (Figura 15) quanto aos tratamentos com embebição em água: A36 (5,36 vezes) e PA36 (5,78). Foi possível notar um aumento significativo em ambos os tratamentos sob estresse: P4 (2,24) e P7 (2,74), o que sugere uma resposta positiva deste gene ao estresse hídrico. Apesar de haver uma diferença entre o A36 e o PA36, não houve diferença estatística entre as amostras, sugerindo que o pré-tratamento com PEG não foi significativo. Os dados apresentados sugerem que: o gene apresenta uma função durante o ciclo celular; e é responsivo ao estresse o qual foi submetido. O gene *CDPK* da *Ricinus communis* usado no presente estudo obteve uma elevada similaridade com o *CDPK7* da *Arabidopsis thaliana* (*Query coverage* – 72%; *E-value* – 0.0; *Max Identity* – 78%) e segundo Wan et al (2007) a *AtCDPK7* é tecido específica, estando presente principalmente em raízes, caules e folhas. O presente estudo demonstrou a expressão da *CDPK* em embriões de mamona sob diferentes condições, e segundo o referido autor anteriormente, a *AtCDPK7* tem a sua expressão vinculada principalmente ao estresse salino, variando pouco quanto ao estresse hídrico ou térmico (frio).

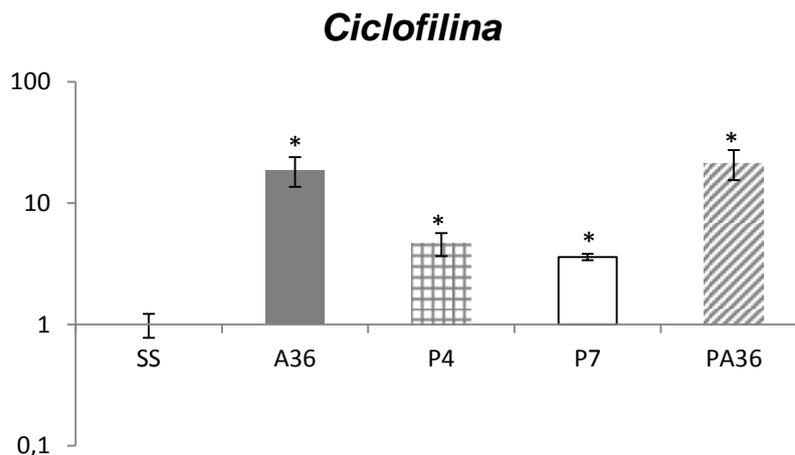


**Figura 15.** Gráfico da expressão do *CDPK* nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

### Ciclofilina

Dentre os genes estudados a Ciclofilina (Figura 16) está entre os genes que apresentaram maior expressão relativa: A36 (18,78); P4 (4,66); P7 (3,60) e PA (21,37), onde as maiores expressões ocorreram quando embebidas em água, com valores menores quando submetidas ao estresse. O presente resultado confirma a importância da Ciclofilina em resposta ao estresse hídrico em sementes de mamona e a sua participação ativa na germinação, fator devido a sua função no fluxo de água no interior da célula.

A expressão da ciclofilina sob estresse já foi detectada em diversas outras espécies como cana de açúcar e espécies de *Pinus* (SATHYAN, 2004; QUE et al, 2011). Nesta última foram registrados elevados valores de expressão como 256 vezes a mais do que o controle em uma das populações estudadas.



**Figura 16.** Gráfico da expressão da Ciclofilina nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

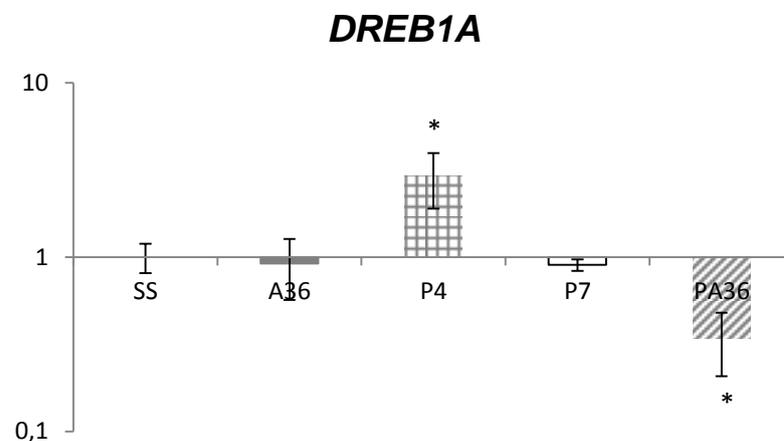
### *DREB1A*

Os dados de expressão para o gene *DREB* (Figura 17) não apresentaram representatividade estatística, talvez devido a sua variação entre as amostras biológicas. Em termos de dados absolutos, houve aumento apenas no tratamento com PEG -1,0 MPa por 4 dias (2,91 vezes em comparação com a semente seca). Os dados sugerem uma atividade condizente com a função do gene, um fator de transcrição que auxilia e amplifica a expressão de genes responsivos a determinados estresse, e ainda infere que a exposição por longos períodos ao estresse podem suprimir a ação deste gene.

Segundo LIU et al (1998), os fatores de transcrição *DREB1A* e *DREB2A* estão envolvidos na expressão do rd29A, dependente de DRE (*Dehydration Responsive Element*). Tais fatores de transcrição se ligariam às DREs e ativariam a região promotora rd29, a qual é responsável por diversas respostas a estresse como hídrico, salino e ao frio. De acordo com os dados do referido autor, quando plantas de *Arabidopsis* foram submetidas ao estresse hídrico, com apenas 2 horas de tratamento já foi possível observar picos de expressão da *DREB2A*, entretanto mesmo com 24 horas sob estresse, a *DREB1A* não apresentou expressão significativa.

A expressão do gene *DREB1* em plantas transgênicas de *Arabidopsis* promoveram uma maior tolerância ao estresse salino e ao frio (ZHANG et al, 2009). Os dados foram condizentes com o presente estudo, não foram observados resultados significativos para o gene em questão.

Em estudos realizados por Liu et al (1998) e Gilmour et al (1998) foi possível observar que a partir da superexpressão dos genes *DREB1B* ou *DREB1A* em plantas transgênicas, estas apresentaram uma maior tolerância à estresses causados por seca, frio e alta salinidade.

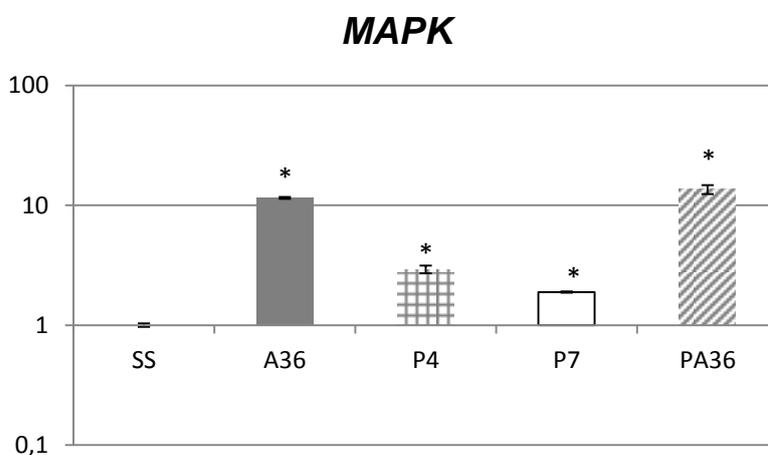


**Figura 17.** Gráfico da expressão do *DREB1A* nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

### *MAPK*

A *MAPK* obteve valores significativos (Figura 18), com altos valores de expressão para ambos tratamentos com embebição em água: A36 (11,53 vezes) e PA36 (13,58), os dados sugerem que o pré-tratamento sob estresse melhorou a expressão do gene quando a semente foi reidratada. Os tratamentos sob estresse obtiveram valores significativos, com valor maior para o P4 (2,93) e uma menor expressão para o P7 (1,89). Com a observação dos dados obtidos é possível inferir que: a expressão do gene decresce com a

persistência da semente sob estresse por longos períodos, uma vez que a expressão reduz quase pela metade entre os tratamentos P4 e P7; e confirmou a sua atividade na germinação e ciclo celular, com a elevada expressão nos tratamentos com água. Este padrão foi verificado por Chen et al (2010) em *Brassica napus*, onde houve um aumento da expressão do gene quando submetido por 3 horas ao estresse hídrico, porém o padrão foi reduzindo com o tempo de 6, 12 e 24 horas. Como sugerido pelo o autor citado, os dados obtidos pelo presente estudo sugerem uma indução da *MAPK* por estresse hídrico, porém ocorre uma possível redução da expressão gênica quando exposto ao estresse hídrico por longos períodos.



**Figura 18.** Gráfico da expressão da *MAPK* nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

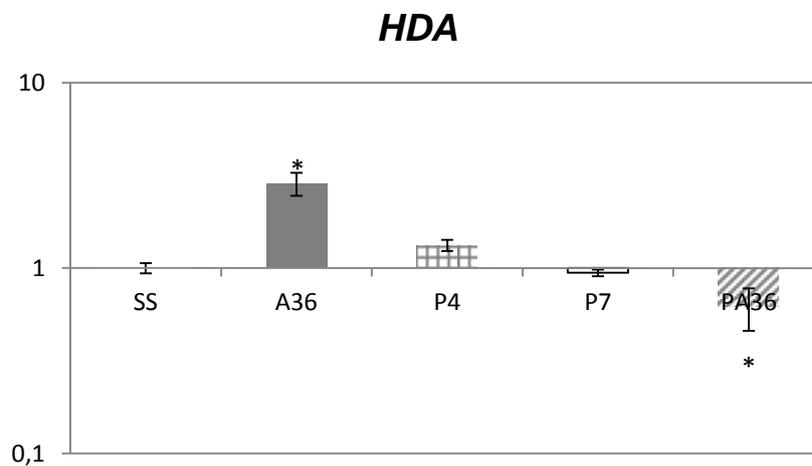
## HDA

A Histona Desacetilase (Figura 19) apresentou um aumento na sua expressão quando a semente foi colocada em água por 36 horas (2,86 vezes), entretanto houve uma supressão para o tratamento de PA36 (0,62 vezes). Os dados relacionados ao estresse hídrico não obtiveram valores estatísticos significativos e foram muito similares ao controle. Os dados apresentados sugerem que: o gene apresenta uma função durante o ciclo celular, demonstrado pela expressão durante a embebição em água; uma leve

resposta ao estresse hídrico, porém não significativa; e obtém uma resposta negativa quando submetido a tal estresse e reidratado em seguida.

Segundo FU et al (2007), as *HDA*s respondem de formas diferenciadas a diversos tipos de estresse: como a *HDA702* tem a sua expressão elevada, valor superior a 1 vez, sob estresse hídrico e as *HDA704*, *HDA706*, *HDA712* tem uma supressão da sua atividade. O mesmo autor demonstrou a resposta de diferentes *HDA*s a estresses salino, hídrico e ABA.

O gene utilizado no presente estudo não obteve ainda uma boa anotação na base de dados do NCBI, o que dificultou uma melhor identificação do gene para predição de sua possível atividade.



**Figura 19.** Gráfico da expressão do *HDA* nos seguintes tratamentos: SS (Semente seca); A36 (água por 36 horas); P4 (PEG por 4 dias); P7 (PEG por 7 dias) PA36 (PEG por 7 dias e embebido em água por 36 horas). Teste estatístico: teste T 5%.

## 6. CONCLUSÃO

As sementes apresentaram uma infestação de fungos nos testes de germinação e o tratamento com Hipoclorito de Sódio (0,5% de cloro ativo) associado ao TWEEN 20 com a retirada da carúncula se mostrou eficiente como modelo de desinfestação das mesmas.

O presente estudo demonstrou que as sementes de mamona, variedade EBDA MPA-11, não são tolerantes ao estresse hídrico quando submetidas ao tratamento com PEG 8000 em papel germitest. Os potenciais hídricos menores, -0,2 e -0,3 MPa, interferiram na germinação das sementes submetidas ao estresse hídrico, mesmo quando reidratadas. Os tratamentos de secagem após o estresse salino não se mostraram eficientes para os potenciais acima do -0,3 MPa. Desta forma não foi observado efeito de *priming* nas sementes da variedade EBDA MPA-11

Em aspectos moleculares, os genes *MAPK*, *Ciclofilina*, *DREB1A* e *CDPK* se mostraram responsivos ao estresse hídrico. Destes, com exceção do *CDPK*, foi observado um padrão de redução nas expressões dos genes quando submetidos a 4 e 7 dias em PEG, respectivamente. O gene *DREB1* se expressou apenas quando submetido sob estresse por 4 dias, não obtendo expressão em ambos os tratamentos com água, possivelmente devido a sua atividade como fator de transcrição em resposta a estresses.

O *HDA* apresentou uma expressão significativa durante o tratamento A36, inferindo um papel durante a germinação, porém houve uma supressão da sua expressão no tratamento PA36, o que sugere que o pré-tratamento com PEG -1,0 MPa por 7 dias interferiu na atividade gênica.

A Aquaporina não apresentou dados que determinassem uma expressão significativa estatisticamente, onde obteve elevadas expressões em ambos os tratamentos com água. Ficou demonstrado uma retomada da atividade quando submetida ao estresse e reidrata posteriormente.

## 7. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, P. K.; AGARWAL, P.; REDDY, M. K.; SOPORY, S. K. **Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants**. Plant Cell Rep. 2006. 25:1263-1274p.
- ALBUQUERQUE, U. P. de; ANDRADE, L. H. C. **Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de pernambuco (nordeste do Brasil)**. Caracas, Venezuela: Interciência. 2002. 27(7):336-347.
- ALEXANDERSSON, E.; FRAYSSE, L.; SJOVALL-LARSEN, S.; GUSTAVSSON, S.; FELLERT, M.; KARLSSON, M.; JOHANSON, U.; KJELLBOM, P. **Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins**. Plant Molecular Biology. 2005. 59:469-484
- ANWAR, A. K.; KAR-LING, T.; KNYPL, J. S.; BORKONSKA, B.; LOY, E. P. **Osmotic conditioning of seed: physiological and biochemical changes**. Acta Horticulturae, 1978. ed 1 (83): 267-278p.
- BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS. **Aspectos de mercado para o óleo de mamona “castor oil”**. Belo Horizonte. 2000. 15 p.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of Development and Germination**. New York, Plenum Press. 1994. 2 ed.
- BIODIESELBR. **A História da Mamona**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/historia-mamona.htm>> Acesso em 20 de janeiro de 2012.
- BORGES, E. E. L.; PEREZ, S. C. J. G.; BORGES, R. C. G.; REZENDE, S. T. & GARCIA, S. R. **Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (Tamboril-da-Mata)**. Revista Árvore, 2002. 26 (5): 603-613p.
- BORGES, E. E. L.; SILVA, L. F.; BORGES, R.C. **Avaliação do osmocondicionamento na germinação de sementes de quaresminha (*Meconia candolleana* Triana)**. Revista Brasileira de Sementes, 1994. 16 (1): 90-94p.
- BOYER, S. J. **Plant productivity and environment**. Science. 1982. 218: 444-448p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS. 2009. 399p.
- BRASIL. Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República. **Cadernos NAE: Biocombustíveis**. Brasília. 2004. Vol 2. 233p.
- BRAY, E. A. **Molecular responses to water deficit**. Plant Physiology, 1993. 103: 1035-1040p.
- CANTANHÊDE, I. S. L. **AVALIAÇÃO DE NOVOS HÍBRIDOS DE MAMONA (*Ricinus communis* L.) EM CONDIÇÕES DE SAFRA E SAFRINHA NO MUNICÍPIO DE BARIRI-SP**. 2009. 64p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP. 2009.

CARNEIRO, J. W. P.; PIRES, J. C. **Influência da temperatura e do substrato na germinação de sementes de mamona.** Revista Brasileira de Sementes, 1983. vol 5, n. 3, p.127-131.

CAVALCANTE, A. M. B. & PEREZ, S. C. J. G. de A. **Efeitos dos estresses hídrico e salino sobre a germinação de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Effects of water and salt stresses on *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit germination).** Brasília: Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1995. v.30, p.281-289

CHAN, A. P.; CRABTREE, J.; ZHAO, Q.; LORENZI, H.; ORVIS, J.; PUIU, D.; MELAKE-BERHAN, A.; JONES, K. M.; REDMAN, J.; CHEN, G.; CAHOON, E. B.; GEDIL, M.; STANKE, M.; HAAS, B. J.; WORTMAN, J. R.; FRASER-LIGGETT, C. M.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P. D. **Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*.** Nature Biotechnology 2010, doi:10.1038/nbt.1674.

CHEN L.; LUO, M.; WANG, Y.; WU, K. **Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response.** Journal of Experimental Botany. 2010. 6(12):3345-3353p.

CHEN, Z.Q.; LIU, Q.; ZHU, Y.S.; LI, Y. X. **Assessment on predicting methods for membrane-protein transmembrane regions.** Acta Biochem. Biophys. 2002. Sin. 34 (3) 285–290.

CONAB. **Mamona.** Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/detalhe.php?c=18592&t=2#this>> , Acesso em 30/10/2010.

COSTA, G. G. L.; CARDOSO, K. C.; DEL BEM, L. E. V. A.; CUNHA, M. A. S.; CAMPOS-LEITE, L.; VICENTINI, R.; PAPES, F. C, MOREIRA, R.; YUNES, J. A.; CAMPOS, A. P. F.; da SILVA, M. J.; **Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L.** BMC Genomics. 2010. 11:462p.

COSTA, T. L. **Características Físicas e Físico-químicas do Óleo de duas Cultivares de Mamona.** 2006, 113p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola) – Centro de Ciências e Tecnologia e Recursos Naturais – Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, 2006.

da SILVA, F. F.; POLO, M.; RODRIGUES, A. C. **Efeitos do estresse hídrico induzido durante a germinação da mamona, *Ricinus communis* (Euphobiaceae).** Bol. Mus. Biol. Mello Leitão. 2009. 25:31-41

de CARVALHO, R. L.; POTENGY, G. F.; KATO, K. **PNPB e Sistemas Produtivos da Agricultura Familiar no Semiárido: Oportunidades e Limites.** Maranhão, VIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO. 2010.

de CASTRO, R. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M. **Embebição e Reativação do Metabolismo.** In: FERREIRA, A. B. e BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado.** Porto Alegre: Artmed. 2004. Cap 9, p. 149-162.

de CASTRO, R. D.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; GROOT, S. P. C.; BINO, R. J.; HILHORST, H. W. M. **Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not.** *Plant Physiology*, 2000. 122, 327–335.

de SANTANA D. G. e RANAL, M. A. **Análise da germinação: Um enfoque estatístico.** Brasília: Editora UnB. 2004.

DEKKERS, B. J. W.; WILLEMS, L.; BASSEL, G. W.; BOLDERENVELDKAMP, R. P. V.; LIGTERINK W.; HILHORST, H. W. M.; BENTSINK, L. **Identification of Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds.** *Plant and Cell Physiology*. 2011

dos SANTOS, D. C.; de CARVALHO, M. L. M.; de OLIVEIRA, L. M.; KATAOKA, V. Y.; NETO, A. L. S. **Teste de germinação em sementes de mamona.** Aracaju. 2º Congresso Brasileiro de Mamona, 2006.

EMBRAPA, **Mamona**, Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/index.html>> Acesso em: 29/10/2010.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Mamona.** Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mamona/SistemaProducaoMamona.htm>> Acesso em: 22 de janeiro de 2012.

FARIA, A. P. de. **AVALIAÇÃO EX VIVO DA TOLERÂNCIA DE CULTIVARES DE MAMONEIRA (*Ricinus communis* L.) AO DÉFICIT HÍDRICO.** 2010. 84 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal) – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2010.

FERREIRA, D.F. **Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0.** In: 45ª reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria. São Carlos. São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FONSECA, N.R.; MYCZKOWSKI, M.L.; PRIOR, M.; SÁ, R.O.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZANOTTO, M.D. **Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de mamona.** Campina Grande. I CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA: Energia e Sustentabilidade. 2004.

FU, W.; WU, K.; DUAN, J. **Sequence and expression analysis of histone deacetylases in rice.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007. V. 356: 843-850

GAO, Y.P.; YOUNG, L.; BONHAM-SMITH, P.; GUSTA L.V. **Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions.** *Plant Mol. Biol.* 1999. 40:635.

GILMOUR, S.J.; ZARKA, D.G.; STOCKINGER, E.J.; SALAZAR, M.P.; HOUGHTON, J.M.; THOMASHOW, M.F. **Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression.** *The Plant Journal*. 1998. 16(4), 433-442.

GODOY, L. J. G.; SANTOS, T. S.; VILLAS BOAS, R. L.; JÚNIOR, J. B. L. **Índice relativo de clorofila e o estado nutricional em nitrogênio durante o ciclo do cafeeiro fertirrigado.** Revista Brasileira de Ciências do Solo. Viçosa. 2008. v. 32, n. 1, p. 217-226.

HALL, T.A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. 41:95-98.

HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K.; BOHNERT, H.J. **Plant cellular and molecular responses to high salinity.** Annu.Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2000, vol 51, 463-499.

HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. **LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2005. 45:131-135.

HU, Y.; QIN, F.; HUANG, L.; SUN, Q.; LI, C.; ZHAO, Y.; ZHOU, D. **Rice histone deacetylase genes display specific expression patterns and developmental functions.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2009. 388:266-271.

HUNDERTMARK, M. & HINCHA, D. K. **LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*.** BMC Genomics, 2008. 9:118

I.B.G.E. **Indicadores sociais municipais 2010: incidência de pobreza é maior nos municípios de porte médio.** Disponível em: < [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2019&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2019&id_pagina=1)> Acesso em 17/01/2012.

ICHIMURA, K.; SHINOZAKIA, K.; TENAB, G.; SHEENB, J.; HENRYC, Y.; CHAMPIONC, A.; KREISC, M.; ZHANGD, S.; HIRTE, H.; WILSONE, C.; HEBERLE-BORSE, E.; ELLISF, B. E.; MORRISG, P. C.; INNESH, R. W.; ECKERI, J. R.; SCHEELJ, D.; KLESSIGK, D. F.; MACHIDAL, Y.; MUNDYJ, J.; OHASHIN, Y.; WALKERO J. C. **Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature.** 2002. Vol 7, Issue 7, 301–308p.

INGRAM, J.; BARTELS, D. **The molecular basis of dehydration tolerance in plants.** Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 1996. v.47, p. 377-403.

JANG, J. Y.; KIM, D. G.; KIM, Y. O.; KIM, J. S.; KANG, H. **An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Molecular Biology. 2004. 54: 713-725.

JAVOT, H.; MAUREL, C. **The role of aquaporins in root water uptake.** Annals of Botany. 2002. v.90, p.301-313.

JOSÉ, A. C.; LIGTERINK, W.; DAVIDE, A. C.; da SILVA, E. A. A.; HILHORST, H. W. M. **Changes in gene expression during drying and imbibition of desiccation sensitive *magnolia ovata* (a. st.-hil.) spreng. Seeds** Revista Brasileira de Sementes, 2008. vol. 31, nº 1, p.270-280.

JOSHI R. K.; KAR, B.; NAYAK, S. **Characterization of mitogen activated protein kinases (MAPKs) in the *Curcuma longa* expressed sequence tag database.** *Bioinformatics*, 2011. 7(4):180-183.

KIMURA, M.; YAMAMOTO, Y. Y.; SEKI, M.; SAKURAI, T.; SATO, M.; ABE, T.; YOSHIDA, S.; MANABE, K.; SHINOZAKI, K.; MATSUI, M. **Identification of Arabidopsis Genes Regulated by High Light–Stress Using cDNA Microarray.** *Photochemistry and Photobiology*. 2003. 77(2): 226-233

KOBORI, N. N. **Tratamento fungicida e qualidade de sementes de mamona.** 2011. 102p. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011

KUMARI, S.; SINGH, P.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. **Heterologous Expression of a Salinity and Developmentally Regulated Rice Cyclophilin Gene (*OsCYP2*) in *E. coli* and *S. cerevisiae* Confers Tolerance Towards Multiple Abiotic Stresses.** *Mol Biotechnol*. 2009. 42: 195-204.

LABOURIAU, L. F. G. **A Germinação de sementes.** Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983. 174p.

LIU, F.; VANTOAI, T.; MOY, L. P.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUSH, J. **Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol*. 2005. 137:1115–29

LIU, Q.; Kasuga, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. **Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*.** *Plant Cell*. 1998. 10:1391–1406

LUDWIG, A. A.; ROMEIS, T.; JONES, J. D. G. **CDPK-mediated signalling pathways : specificity and cross-talk.** *Journal of Experimental Botany*, 2004. vol. 55, n 395.

MAHDIEH, M.; MOSTAJERAN, A.; HORIE, T.; KATSUHARA, M. **Drought Stress Alters Water Relations and Expression of PIP-Type Aquaporin Genes in *Nicotiana tabacum* Plants.** *Plant Cell Physiology*. 2008. 49(5): 801-813

MAUREL, C.; CHRISPPEELS, M.J. **Aquaporins. A molecular entry into plant water relations.** *Plant Physiology*. 2001. Vol 125, p. 135-138.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.; SANTONI, V. **Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions.** *Annu. Rev. Plant Biol*. 2008. (59) 595-624.

MCCARTY, D.R. **Genetic control and integration of maturation and germination pathways in seed development.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1995. 46, 71-93.

MENESES, C. H. S. G; LIMA, L. H. G. M.; LIMA, M. M. A.; VIDAL, M. S. **REVISÃO: ASPECTOS GENÉTICOS E MOLECULARES DE PLANTAS**

**SUBMETIDAS AO DEFICIT HÍDRICO.** Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas, Campina Grande. 2006. Vol. 10, n 1/2, p 1039-1072.

MITRA, J. **Genetics and genetic improvement of drought resistance of crop plants.** Current Science. 2001. vol.80, p. 758-763.

MORAIS, A. T. **Clonagem e estudo funcional do promotor do gene DREB da mamoneira (*Ricinus communis* L.).** 2008. 70 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas - Universidade de Brasília, Brasília, DF. 2008.

MORAIS, G. L. **Caracterização Filogenética das Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs) de mamona (*Ricinus communis* L.) e análise da expressão dos genes *Rcom* RIPs durante o desenvolvimento da Semente.** 2010. 105 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Centro de Biotecnologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

NAKABAYASHI, K.; OKAMOTO, M.; KOSHIBA, T.; KAMIYA, Y.; NAMBARA, E. **Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed.** The Plant Journal, 2005. 41, 697-709

NASCIMENTO, W. M. **Condicionamento osmótico de sementes de hortaliças: potencialidades e implicações.** Horticultura Brasileira, 1998. 16(2): 106-109.

NEPOMUCENO, A.L.; NORMAN, N.; FARIAS, J.R.B.; OYA, T. **Tolerância à Seca em Plantas.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. 2001. n 23.

NEPOMUCENO, A.L.; STEWART, J.M.; OOSTEHUIS, D.M.; TURLEY, R.; NEUMAIER, N.; FARIAS, J.R.B. **Isolation of a cotton NADP(H) oxidase homologue induced by drought stress.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2000. v. 35, n. 7, 1407-1416p.

NONOGAKI, H.; CHEN, F.; BRADFORD, K. J. **Mechanisms and Genes Involved in Germination *Sensu stricto*.** Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell. EUA. 2007. CAP 11, 264-304.

OLSNES, S. **The History of Ricin, Abrin and Related Toxins.** *Toxicon*. 2004. 44 (4): 361-370.

PARK, S.; KIM, Y.; JEONG, J. C.; KIM, C. Y.; LEE, H. ; BANG, J.; KWAK, S. **Sweetpotato late embryogenesis abundant 14 (IbLEA14) gene influences lignification and increases osmotic- and salt stress-tolerance of transgenic calli.** *Planta*. 2011. 233:621-634

PARK, W.; SCHEFFLER, B. E.; BAUER, P. J.; CAMPBELL, B. T. **Identification of the Family of Aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.).** BMC Plant Biology. 2010. 10:142.

PEREIRA, M. D.; LOPES, J. C. **Germinação e desenvolvimento de plântulas de pinhão manso sob condições estresse hídrico simulado.** Londrina. Semina: Ciências Agrárias. 2011. Vol. 32, suplemento 1, p.1837-1842.

PFÄFFL, M. W.; LANGE, I. G.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. D. **Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ER $\alpha$  and ER $\beta$  mRNA with real-time RT-PCR.** APMS. 2001. 109: 345-55.

PIMENTEL, C. **Relações hídricas em dois híbridos de milho sob dois ciclos de deficiência hídrica.** Rio de Janeiro: Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1999. v. 34, n. 11, p. 2021-2027.

PIMENTEL, C.; SARR, B.; DIOUF, O.; ABOUD, A. C. S.; ROY-MACAULEY, H. **Tolerância protoplasmática foliar à seca, em dois genótipos de caupi cultivadas em campo.** Rio de Janeiro: Rev. Univ. Rural, Série Ciências da Vida, 2002. v. 22, n. 1, p. 07-14.

QUE, Y.; LIU, J.; XU, L.; Guo, J.; XU, J.; CHEN, R. **Molecular cloning and characterization of a cytoplasmic cyclophilin gene in sugarcane.** African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10(42), 8213-8222.

ROMANO, P. G. N.; HORTON, P.; GRAY, J. E. **The Arabidopsis Cyclophilin Gene Family.** Plant Physiology. 2004. vol 134, 1268-1282. 2004.

SAIJO, Y.; HATA, S.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K.; IZUI, K. **Overexpression of a single Ca $^{2+}$ -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants.** Plant J. 2000. 23:319-27.

SAIJO, Y.; KINOSHITA, N.; ISHIYAMA, K.; HATA, S.; KYOZUKA, J.; HAYAKAWA, T.; NAKAMURA, T.; SHIMAMOTO, K.; YAMAYA, T.; IZUI, K. **A Ca $^{2+}$ -dependent protein kinase that endows rice plants with cold- and salt-stress tolerance functions in vascular bundles.** Plant Cell Physiol. 2001; 42:1228-33.

SANTIAGO, A. N.; LARANGEIRAS, L. A. P.; DOURADO, V. V.; LEITE, V. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; SILVA, S. A.; PEIXOTO, M. F. S. P.; PEIXOTO, C. P.; GONÇALVES, N. P. **EBDA MPB-01 Nova Variedade de Mamona com Potencial Produtivo para Agricultura Tecnificada.** Salvador, Bahia. 2008a.

SANTIAGO, A. N.; LARANGEIRAS, L. A. P.; DOURADO, V. V.; LEITE, V. M.; OLIVEIRA, E. A. S.; SILVA, S. A.; PEIXOTO, M. F. S. P.; PEIXOTO, C. P.; GONÇALVES, N. P. **EBDA MPA-11 Nova Cultivar de Mamona com Potencial Agronômico para o estado da Bahia e Minas Gerais.** Salvador, Bahia. 2008b.

SANTOS, R.F. dos; KOURI, J.; BARROS, M.A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P. de 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.** Campina Grande: Embrapa Algodão, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p.23-41.

SANTOS, R.F. dos; KOURI, J.; BARROS, M.A.L.; MARQUES, F.M.; FIRMINO, P. de 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.** Campina Grande: Embrapa Algodão, Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p.23-41.

SATHYAN P. **IDENTIFICATION OF DROUGHT RESPONSIVE GENES IN ALEPPO PINE (*Pinus halepensis*) AND LOBLOLLY PINE (*Pinus taeda*L).** 2004. 74p. Thesis (Master of Science) - Graduate Studies of Texas A&M University, Texas. 2004

SAVY FILHO, A. **Mamona Tecnologia Agrícola.** Campinas, SP: EMOPI, 2005. 105p.

SCOTT, A.; KNOTT, M. **Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance.** Biometrics, Washington D.C. 1974. v.30, n.3, p.507-512

SHARMA, A. D. & KAUR, P. **Combined effect of drought stress and heat shock on cyclophilin protein expression in *Triticum aestivum*.** General and Applied Plant Physiology. 2009. vol 35, 88-92.

SHINOZAKI, K. & YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. **Gene networks involved in drought stress response and tolerance.** Journal of Experimental Botany, 2007. Vol. 58, No. 2, pp. 221–227.

SHOU, H.; BORDALLO, P.; FAN, J. B.; YEAKLEY, J. M.; BIBIKOVA, M.; SHEEN, J.; WANG, K. **Expression of an active tobacco mitogen-activated protein kinase kinase kinase enhances freezing tolerance in transgenic maize.** Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:3298-3303.

**Signal Transduction Pathways in Drought- and Low-Temperature-Responsive Gene Expression, Respectively, in Arabidopsis.** The Plant Cell. 1998. v. 10, 1391-1406

SILVA, W. R. **Relações entre disponibilidade de água, tratamento fungicida e germinação de sementes em milho (*Zea mays* L.).** 1989. 113p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1989.

SOKOL, A.; KWIATKOWSKA, A.; JERZMANOWSKI, A. Prymakowska-Bosak M. **Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and Arabidopsis cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications.** Planta, 2007. 227, 245–254

SUDENE. **Área de atuação da Sudene – O Semiárido Nordeste.** Disponível em: <<http://www.sudene.gov.br/site/extra.php?idioma=&cod=130>> Acessado em 17/01/2012

TAJ, G.; AGARWAL, P; GRANT, M.; KUMAR, A. **MAPK machinery in plants: Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways.** Plant Signaling & Behavior. 2010. 5:11, 1370-1378.

THIERY, L.; LEPRINCE, A. S.; LEFEBVRE, D.; GHARS, M. A.; DEBARBIEUX, E.; SAVOURE, A. **Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*.** J Biol Chem, 2004, 279:14812-14818.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. **CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through**

**sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acid Research. 1994

TSUJI, H.; SAIKA, H.; TSUTSUMI, N.; HIRAI, A.; NAKAZONO, M. **Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice.** Plant and Cell Physiology. 2006. 47, 995–1003.

TYERMAN, S.D.; NIEMIETZ, C.M.; BRAMLEY, H. **Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles.** Plant, Cell and Environment. 2002. Vol.25, p. 173-194.

VANDESOMPELE, J.; De PRETER, K.; PATTYN, F., POPPE, B.; VAN ROY, N.; De PAEPE, A.; SPELEMAN, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** Genome Biol. 2002

VERLUES, P. E.; ZHU, J. K. **Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress.** Biochemical Society Focused Meeting. 2004;

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Testes de vigor em sementes.** Jaboticabal: Funep. 1994. 164 p.

VILELA, F.A.; OSMAR P. B. **Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno glicol 8000.** Revista Brasileira de Sementes, 2001. vol. 23, nº 1, p.267-275

WAN, B.; LIN, Y.; MOU, T. **Expression of rice Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses.** FEBS letters. 2007. V 581, 1179-1189

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. **Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance.** Planta. 2003. vol. 218, n.1, p. 1-14.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. **ROLE OF PLANT HEAT-SHOCK PROTEINS AND MOLECULAR CHAPERONES IN THE ABIOTIC STRESS RESPONSE.** Trends in Plant Science. 2004. Vol 9, N 5.

WRZACZEK, M. & HIRT, H. **Plant MAP kinase pathways: how many and what for?.** Biology of the Cell. 2001. 93:81-87.

XU, S.; WANG, X.; CHEN, J. **ZINC Finger protein 1 (ThZF1) from salt cress (*Thellungiella halophila*) is a Cys-2/His-2-type transcription factor involved in drought and salt stress.** Plant Cell Rep. 2007. 26:497-506.

YU, Q. J.; HU, Y. L.; LI, J. F.; WU, Q.; LIN, Z. P. **Sense and antisense expression of plasma membrane aquaporin *BnPIP1* from *Brassica napus* in tobacco and its effects on plant drought tolerance.** *Plant Sci.* 2005. 169:647–56

ZEGZOUTI, H.; JONES, B.; MARTY, C.; LELI'EVRE, J.; LATCH'E, A.; PECH, J.; BOUZAYEN, M. **ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding.** Plant Molecular Biology. 1997. 35:847-854

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. K. **From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops.** *Plant Physiol*, 2004, 135:615-621.

ZHANG, Y.; CHEN, C.; JIN, X.; XIONG, A.; PENG, R.; HONG, Y.; YAO, Q.; CHEN, J. **Expression of a rice DREB1 gene, *OsDREB1D*, enhances cold and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*.** *BMB Reports*. 2009.

ZHAO, L.; HU, Y.; CHONG, K.; WANG, T. **ARAG1, an ABA-responsive DREB gene, plays a role in seed germination and drought tolerance of rice.** *Annals of Botany*. 2010. 105:401-209.

ZOU, J.; WEI, F.; WANG, C.; WU, J.; RATNASEKERA, D.; LIU, W.; WU, W. ***Arabidopsis* Calcium-Dependent Protein kinase CPK10 Functions in Abscisic Acid- and Ca<sup>2+</sup> - Mediated Stomatal Regulation In Response to Drought Stress.** *Plant Physiology*. 2010. vol 154, 1232-1243.