



ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TRÊS GENES RELACIONADOS À PRODUÇÃO DE PROLINA EM PLÂNTULAS DE MAMONA (RICINUS COMMUNIS L.), SOB DÉFICIT HÍDRICO INDUZIDO POR PEG 6000.

Marina Erê Almeida Hummel Pimenta **Santos**¹; Daiane Mariele **de Laa**²; Patrícia Favoretto **Moraes**³; Carlos Augusto **Colombo**⁴; Tammy Aparecida Manabe **Kiihl**⁵

Nº 14133

RESUMO - *A mamona preenche satisfatoriamente todos os requisitos-base para participar como matéria-prima na Produção de Biodiesel brasileiro. Além de possuir alto teor de óleo e não competir com o mercado alimentar é uma cultura típica do semi-árido nordestino cultivada por pequenos produtores e portanto exerce um papel social importante. Entre os fatores limitantes que afetam a produção destacam-se as interações com o clima, fundamental no desenvolvimento da mamona, principalmente na semeadura e floração. Portanto, a obtenção de cultivares com tolerância à seca é um grande desafio uma vez que a mamona, assim como a maioria das culturas, também é sensível ao estresse hídrico. Neste contexto, o presente projeto teve como objetivo analisar a expressão de três genes relacionados à produção de Prolina, a qual pode ter relação com os níveis de sobrevivência das plântulas de mamona sob déficit hídrico induzido por PEG 6000. Dois acessos foram selecionados em função das respostas divergentes à exposição ao estresse hídrico induzido por PEG 6000 10 g.L⁻¹: China Careca e PB07. A expressão dos genes Prolina Oxidase, Prolina Sintetase e Prolina Imunopeptidase foi detectada através de PCR em tempo real. Através das análises obtidas usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foi possível constatar que as amostras do acesso China Careca possuíam níveis de expressão para todas as três prolinas contraditórios aos obtidos do PB07, caracterizando que os dois acessos avaliados possuem atuações inversas na produção de prolina.*

1. Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, PUC Campinas-SP; marinaere@uol.com.br

2. Colaboradora: Pesquisadora Pós-doc Centro de Grãos e Fibras, Instituto Agrônomo- IAC, São Paulo- SP, Bolsista PNPd Capes; daianelaat@gmail.com

3. Colaboradora: Mestranda, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agrônomo – IAC, São Paulo – SP

4. Colaborador: Pesquisador, Centro de Recursos Genéticos, Instituto Agrônomo – IAC, São Paulo – SP

5. Orientadora: Pesquisadora, Centro de Grãos e Fibras, Instituto Agrônomo- IAC, São Paulo- SP; tammykiihl@gmail.com.br



Palavras-chaves: *Ricinus communis* L., melhoramento genético, produção de prolina, produtividade, PEG 6000.

ABSTRACT- *Castor satisfactorily fulfill all key requirements to participate as feedstock in Brazilian Biodiesel Production. Besides having high oil content and not compete with the food market is a typical culture of the northeastern semi-arid cultivated by smallholders and therefore plays an important social role. Among the limiting factors affecting the production stand out interactions with the fundamental climate in developing castor oil, especially in sowing and flowering. Therefore, obtaining cultivars with drought tolerance is a major challenge since the castor, like most cultures, is also sensitive to water stress. In this context, this project aims to analyze the expression of three related genes to the production of proline, which may be related to levels of castor seedling survival under water deficit induced by PEG 6000. Two cultivars were selected on the basis of divergent responses to exposure to water stress induced by PEG 6000 10 g L^{-1} : China careca, and PB07. Obtained by analysis using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was established that the samples of the China careca had expression levels for all three prolines genes contradictory to those obtained from PB07, featuring the two cultivars have inverses performances at proline production.*

Key-words: *Ricinus communis* L., breeding, proline production, productivity, PEG 6000.

1 INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis* L) é considerada uma espécie oleaginosa pertencente à família da euforbiácea, conhecida popularmente como Ricino ou Carrapateira. Este espécime tornou-se uma cultura com crescente importância econômica e social em diversos países. Nos últimos anos o cultivo desta oleaginosa tem conquistado novas fronteiras, como o Centro Oeste brasileiro, devido ao alto rendimento energético, relativa rusticidade e tolerância á seca, sendo adaptável a condições adversas. Cultivada por pequenos produtores brasileiros, o óleo extraído de suas sementes presta-se a uma ampla gama de setores da indústria (BANZATO & ROCHA, 1969; WEISS, 1983).

Destaca-se como alternativa para a produção do biodiesel, sendo o seu óleo é estritamente industrial, o que reduz a competição com o mercado alimentar, o que ocorre com outras matérias primas: a cana e a soja (BELTRÃO *et al*, 2005). O desenvolvimento das plântulas da mamona pode ser influenciado por diversos fatores, como temperatura, umidade ou por condições estressantes.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

Durante a germinação, potenciais osmóticos muito baixos influenciam a absorção de água, inviabilizando a sequência dos eventos germinativos (BANSAL *et al*, 1980).

Devido à carência de recursos hídricos nas regiões onde o cultivo de mamona é mais expressivo, estudos sobre a tolerância à seca são necessários a fim de compreender como os efeitos do estresse hídrico podem afetar seu desenvolvimento. O polietilenoglicol (PEG 6000) tem sido utilizado com sucesso em trabalhos para simular os efeitos da restrição hídrica em plantas, por não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular, atuando como um agente osmótico (BRAGA *et al*, 1999; SOUZA & CARDOSO, 2000).

Sob a influência do estresse hídrico, a síntese de algumas proteínas é inibida e a degradação de outras é acelerada, o que leva a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres. Uma característica marcante de um distúrbio no metabolismo das proteínas é a mudança nas proporções dos aminoácidos e, frequentemente, um aumento elevado na concentração de prolina (LARCHER, 2000). O acúmulo de prolina durante o estresse hídrico pode ser um indicador potencial de tolerância à seca em algumas espécies de cultivares (HEERDEN & VILLIERS, 1996) e este acúmulo nas plantas, sob estresse, poderia ser decorrente da regulação osmótica e proteção da integridade celular (STEWART & LEE, 1974; SHEVYAKOVA, 1984). E tem função de proteger as células dos processos de desnaturação sob estresse hídrico e salino (SHEVYAKOVA, 1984), ou ainda participar na constituição de um estoque de Nitrogênio e Carbono que poderia ser utilizado depois do período de estresse (TAYLOR, 1996).

Embora vários trabalhos tenham relacionado à função da prolina na adaptação das células sob déficit hídrico, ainda existem dúvidas se o acúmulo desse composto nos tecidos das plantas proporciona vantagem adaptativa ou simplesmente é uma consequência acidental de outros estresses, induzindo mudanças no metabolismo (HARE & CRESS, 1997). O presente estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer análises entre as condições de deficiência hídrica apresentadas pela planta e seus níveis de expressão de genes especializados na produção de prolina: Prolina Oxidase, Prolina Sintetase e Prolina Imunopeptidase, visando gerar conhecimento ao Programa de Melhoramento de Mamona do IAC.

2 MATERIAL E METODOS

Foram utilizados dois acessos de mamona (*Ricinus communis* L) proveniente da Coleção de Germoplasma de Mamona do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC): PB07 e China Careca. O



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

experimento foi realizado no Centro Experimental Central do Instituto Agrônomo-IAC, Fazenda Santa Elisa em Campinas. As etapas relacionadas à expressão dos genes de prolina foram realizadas no Laboratório de Diversidade Genética Vegetal, também situado na Fazenda Santa Elisa em Campinas.

Os acessos de mamona selecionados foram aqueles que obtiveram melhores resultados de acordo com o projeto anteriormente realizado, e que possuíam maiores diferenças fisiológicas e morfológicas entre eles, de acordo com a maior e menor tolerância ao estresse hídrico. Por volta de 40 sementes de cada acesso foram plantadas diretamente em caixas de vermiculita, durante o período de aproximadamente um mês, até alcançarem 15 cm, em média. Depois foram transferidas para tubos tipo Falcon na sala de climatização, em solução de PEG 6000 a uma concentração de 10 gL^{-1} e em triplicatas biológicas, visando sempre ter as amostras de controle (água destilada). As plântulas foram coletadas nos tempos: 2h, 8h e 24h após o início do experimento. O material vegetal (tecido foliar) foi armazenado em tubos tipo mini-Falcon no ultrafreezer (-80°C) para a conservação. Foi realizado o desenho dos iniciadores para os genes relacionados à produção de prolina (Prolina Oxidase, Prolina Sintetase e Prolina Imunopeptidase), utilizando o programa Primer Express 3.0.

A extração de RNA foi realizada a partir do protocolo utilizando o reagente TRIZOL (Ambion-Life Technologies). Para cada acesso foram utilizadas seis amostras, em três pools com dois indivíduos, em triplicata, de cada tempo (2h, 8h e 24h). Contendo tanto amostras controle (água destilada) como tratamento (PEG 6000 10 gL^{-1}). Após o procedimento, o RNA total foi conservado no ultrafreezer (-80°C). A fim de verificar a integridade do RNA, as amostras foram separadas por eletroforese em um Gel de agarose 1% corado com Gel Red (Biotium, Hayward, CA) e visualizadas com um HP Alphamager (Alpha Innotech Corporation, Santa Clara, CA). Para a síntese dos cDNA foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for q.RT-PCR, da InvitrogenLif.

Para a escolha dos iniciadores a ser usados na reação de RT-PCR, testes de eficiência para cada oligonucleotídeo iniciador foi feita com 500nM de iniciador e concentrações de cDNA seriadas de $10 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ até $0,151 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Os iniciadores com melhores valores de eficiência foram escolhidos para este trabalho. A eficiência de amplificação foi calculada por $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, e os resultados da reação (dados pelo valor de Ct) foram tabelados para o cálculo da equação de regressão e do R-quadrado.

As reações de RT-PCR foram amplificadas no equipamento Applied Biosystem 7500 Fast nas seguintes condições: 8ng de cDNA, 500nM de cada iniciador (Forward e Reverse), 1 X Sybr



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

Green PCR MasterMix (Applied Biosystems LifeTechnologies) LifeSensitive, em um volume final de 20 μ L. O programa utilizado para a reação foi: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C. Foi adicionado o passo para a curva de dissociação (15 seg a 95°C, 1 min a 60°C e 15 seg a 95°C). Em todas as placas, as amostras foram amplificadas em triplicata para todos os oligonucleotídeos iniciadores. Como amostra de referencia foi utilizada a Actina. Dados de expressão gênica foram avaliados utilizando os valores Ct e de eficiência de amplificação usando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os genes relacionados à produção de prolina induzido pelo estresse hídrico escolhidos foram baseados no artigo de Heerden & Villiers (1996). O teste de eficiência de cada primer apresentou valor de aproximadamente um, indicando que os primers são eficientes para as reações de amplificação (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência de primers dos três tipos de prolina e seus Valores de Eficiência

Genes	Sequência (Primer F)	Sequência (Primer R)	Valores de E
Prolina Oxidase	TTAGGCCAGCAGAGACTATTGAGATT	TGCTGTGTGCTCTGCGTCTAC	1,394522
Prolina Sintetase	CCTGCAGGGTGTGTGGAAGT	AGGCCGAAAATCAAGGTT	1,238811
Prolina Iminopectidase	TGATGGATCAGCGAGGAACAG	GAACCCAGCTGCGCCATA	1,235661

De acordo com os conceitos de Heerden & Villiers (1996), o metabolismo da planta consta com mecanismos para suportar diferentes níveis de estresse. Entre estes pode-se destacar a atuação da enzima de prolina que vai estabelecer subsídios pra que a planta obtenha uma forma de defesa contra o déficit hídrico. Em uma planta com os níveis normalizados de prolina a sua produção é de forma crescente na ordem da primeira a atuar até a última, de forma a produzir a Prolina Oxidase primeiro, seguida da Sintetase e pela Imunopectidase.

Os efeitos causados pelo estresse hídrico moderado nas folhas de mamona quando cultivadas em solução de PEG 6000 10 gL⁻¹ foram visíveis já nas primeiras horas após o contato. A técnica da RT-PCR em tempo real detectou a expressão dos genes de prolina em todos os tecidos analisados e foram considerados como diferencialmente expressos aqueles indivíduos que tiveram expressão igual ou maior que duas vezes. Todos os genes de prolina testados foram transcritos



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014

12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

ativamente em condições de estresse hídrico, em pelo menos um indivíduo de um acesso (Tabela 2). A transcrição dos genes de prolina nos dois acessos analisados foram diferentes entre eles. O gene da Prolina Imunopeptidase foi mais expresso no acesso China careca, levando em consideração o seu comportamento precoce se comparado com PB07, já a expressão do gene da Prolina Oxidase foi mais expresso no acesso PB07.

Tabela 2: Valores obtidos de expressão de cada prolina, em relação os acessos China Careca e PB07. E os tempos de avaliação estabelecidos: 2h, 8h e 24h.

		Prolina Oxidase	Prolina Sintetase	Prolina Imunopeptidase	
China careca	T1 (2h)	1,1767	0,3341	2,4582	
		0,1860	1,0803	5,9037	
		4,5026	0,8571	6,7184	
	T2 (8h)	0,4760	0,7346	1,4719	
		0,0593	0,4134	3,8118	
		0,6383	1,2491	2,8551	
		0,0803	0,8255	0,6987	
		T3 (24h)	0,0624	0,8080	1,3696
			0,0557	0,8755	2,8298
	PB07	T1 (2h)	0,6761	2,3016	3,2159
			5,0657	0,8757	1,2669
			4,0863	0,8321	0,8546
T2 (8h)		2,5653	1,3544	1,2106	
		1,1238	0,3196	1,5700	
		3,8514	0,7062	0,9401	
		0,7809	1,6941	2,5159	
		T3 (24h)	0,5210	0,6395	0,4000
			0,4587	0,1173	0,3872

A expressão do gene de Prolina Oxidase foi diferente nos dois acessos. Entretanto, para os tempos se expressou de forma inversa. O acesso China Careca, que apresentou maior resistência fenotípica ao estresse hídrico simulado por PEG 6000, teve níveis menores para a Prolina Oxidase, se comparados ao acesso PB07, o qual apresentou maior sensibilidade ao estresse. Durante os diferentes tempos, no acesso China careca os níveis desta prolina se comportaram de forma decrescente, sendo que no tempo de 2h possui os maiores valores, já os analisados no tempo de 24h apresentaram valores menores. Podendo estabelecer uma relação de até duas vezes maiores.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

Já o acesso PB07, além de apresentar os maiores coeficientes para este gene à produção é maior, com o decorrer do tempo apresentou também um decaimento nos níveis.

Já o gene Prolina Sintetase se comportou de forma semelhante nos dois acessos avaliados, tanto entre os indivíduos quanto entre os tempos, sendo que possui valores baixos (menores que dois). Sua produção é independente as relações fenotípicas expressadas pelas plantas. Entretanto, entre os tempos expressos no acesso PB07 houve uma variação entre o tempo de 2h e 8h, em que a produção possa ter sido maior.

Os níveis de expressão da Prolina Imunopeptidase foram inversos aos da Prolina Oxidase, sendo constante entre as triplicatas e entre os tempos. O acesso China Careca teve os maiores valores de expressão no tempo de 2h com decaimento dos valores nos próximos tempos. Já no acesso PB07 a expressão diferencial da Prolina Imunopeptidase apresentou valores menores quando comparados à China Careca.

4 CONCLUSÃO

Todos os genes de prolina testados foram transcritos ativamente em condições de estresse hídrico, em pelo menos um indivíduo de um acesso. A transcrição dos genes de prolina nos dois acessos analisados foram diferentes entre eles. O gene da Prolina Imunopeptidase foi mais expresso no acesso China Careca, o qual apresentou uma maior resistência fenotípica ao estresse causado pelo contato com o PEG 6000 se comparado com PB07, que entre os avaliados em estudos anteriores, e neste, se apresentou suscetível ao estresse hídrico. Já o comportamento do gene da Prolina Oxidase foi mais expresso no acesso PB07, que seguiu com os padrões de produção de prolina.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida, à Petrobrás pelo auxílio financeiro e ao Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, pela oportunidade de estágio.



VII Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, L. F. and SOUSA, M. P. and BRAGA, J. F., SÁ M. E. (1999). **Efeito da disponibilidade hídrica do substrato na qualidade fisiológica de sementes de mamona.** Revista Brasileira de sementes 21(2): 95–102.

BANSAL, R. P. and BHATI, P. R., SEM, D. N. (1980). **Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone.** Biology Plantarum 22(2):327– 331.

BELTRÃO, N. E. de M., CARTAXO, W. V., PEREIRA, S. R. de P., SOARES, J. J.; SILVA, O. R. R. F. **Ocultivo sustentável da mamona no Semi-árido Brasileiro.** Campina Grande: Embrapa-CNPA (Circular Técnica, 84), 2005.

BENZATO, N.V. e ROCHA, J.L.V. **Florescimento e maturação das cultivares de mamoneira IAC-38 em Campinas.** Bragantia, Campinas v. 24, p.29-31, 1969.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. **Metabolic of stress induced proline accumulation in plants.** Plants growth regulation, Dordrecht, v.21, n.2, p 70-102, 1997 Kavar, T. Et al. Identification of genes involved in the response of leaves of Phaseolus vulgaris to drought stress Mol Breeding (2008) 21:159–172

HEERDEN, P. D. R.; VILLIERS, O. T. **Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance in spring wheat cultivars.** South African Journal of Plant and Soil, Pretoria, v. 13, p. 17-21, 1996.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: RiMa,2000. 531 p.

SOUZA, G. M. & CARDOSO, V. J. M. 2000. **Effects of different environmental stress on seed germination.** Seed Science Technology, 28(3): 621–630.

STONE, L.R.; GOODRUM, D.E.; JAAFAR, M.N.; KHAN, A.K. **Rooting Front and Water Depletion Depths in Grain Sorghum and Sunflower.** Agronomy Journal 93:1105-1110, 2001.

SHEVYAKOVA, N. I. **Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress.** Soviet Plant Physiology, New York, v. 30, p. 597-608, 1984.

STEWART, G. R.; LEE, J. A. **The role of proline accumulation in halophytes.** Planta, Berlin, v. 120, p. 279-289, 1974.

TAYLOR, C. B. **Proline and water deficit: ups, downs, ins, and outs.** Plant Cell, Rockville, v. 8, p. 1221-1224, 1996.

WEISS, E.A. (1983) **Oilseed crops.** London: Longman, 660p.