



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**BIODETOXIFICAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*
L.) MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO DA RICINA**

Natália Lima de Sousa

Doctor Scientiae

BRASÍLIA
DISTRITO FEDERAL - BRASIL

2017

NATÁLIA LIMA DE SOUSA

**BIODETOXIFICAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*
L.) MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO DA RICINA**

**Tese apresentada a Universidade de
Brasília como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia e Biodiversidade para
obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

**Brasília
Distrito federal - BRASIL
2017**

NATÁLIA LIMA DE SOUSA

**BIODETOXIFICAÇÃO DE SEMENTES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS*
L.) MEDIANTE SILENCIAMENTO GÊNICO DA RICINA**

Tese apresentada a Universidade de Brasília como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 20 de dezembro de 2017

Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão

Dr. Thales Lima Rocha

Dra. Diva Maria de Alencar Dusi

Dra. Thaís de Moura Cipriano

Dedico este trabalho a meu querido avô, grande apreciador dessa minha jornada, que partiu antes de sua conclusão. Em meus pensamentos viverá para sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família. Aos meus pais Vera Lucia e Ozéias, as duas pessoas mais importantes da minha vida que sempre me apoiaram sem pestanejar. Hoje sou quem sou por causa de vocês e minhas conquistas são suas também. A meus irmãos por me aturarem e ajudarem. A toda minha família por compreenderem minha ausência em alguns eventos.

Ao Tomas Felipe, essa pessoa mais que especial na minha vida. Apoio mútuo nessa caminhada de mãos dadas. Muito obrigada por toda a ajuda e companheirismo durante esses quatro difíceis anos.

Aos meus avós, batalhadores que passaram por muitos perrengues nessa vida. Vó Albertina e avô Felix são raros nossos encontros por causa da distância, mas sempre calorosos. Saudades. Vó Antônia e vô Afonso são meus segundos pais. Vó Antônia é a vizinha mais fofa que ainda arruma tempo para uns puxões de orelha e Vô Afonso sempre carinhoso, partiu em 2014 logo no início deste doutorado e essa perda ainda dói. Nunca esquecerei seus olhos marejados quando lhe contei que havia passado na seleção. Sei que seria seu orgulho formar a primeira Doutora da família, como bem dizia. Nos momentos mais difíceis quando pensei em desistir, foi principalmente pensando em meu querido avô que não o fiz. Saudades imensas.

Ao meu orientador Dr. Francisco Aragão por todos os ensinamentos que vou levar para a vida, por ser esse excelente líder que mesmo de vez em quando nos deixando meio loucos, sempre nos guia e nos ajuda a solucionar os problemas porque o que não podemos é dormir no ponto.

A Glaucinha essa pessoa linda com quem você pode contar e que te ajuda sempre. Naqueles momentos de desespero que você não sabe mais o que fazer ela aparece e fala “amorinho vamos fazer assim, tá” e o desespero dá lugar à esperança de que “tudo vai dar certo”. Aprendi muito com você, você é minha grande inspiração como cientista e como pessoa. Muito obrigada por tudo.

A Elsa por ser essa ótima pessoa e a mais paciente que conheço que está sempre ali nos ajudando. Obrigada pelo auxílio e pelo carinho.

A Mary a pessoa mais maravilhosa que já conheci. Dava um medinho dela em dia de Northern, mas era sempre alegre, bem-humorada e guerreira. Ainda me pego na

saudade e na imaginação vendo você entrando no Laboratório em seu caminhar vagaroso e nos “bons-dias” bancada por bancada. Saudades das trufas de menta e dos esmaltes trocados (ainda guardo o seu favorito) são pequenas coisas que fazem uma falta enorme. Figurinha carimbada das minhas defesas. Aprendi muito com você Mary e levo seus ensinamentos para muito além do laboratório, levo para a **Vida**.

E que amizades mais lindas são essas que a gente faz entre a preparação de um meio de cultura, a irrigação de plantas numa casa de vegetação, um cafezinho num sofá e uma confraternização num barzinho. Quando se trata de assuntos geek e Comic con já vem em mente a Lilian, e se surge o assunto dos memes aí já penso na Lídia, se for pra marcar de sair pra comemorar algo a Tati não pode faltar, quando o assunto é andar de bike o Pedro já aparece com as dicas, e nas trocas de “protocolos” culinários é com a Estela na certa. Quero agradecer pela amizade e companheirismo.

A todos que conheci no laboratório durante esses anos Jéssica (companheira de bancada, desculpe-me pela zona), Thaís, Angélica, Cristiane, Kenny, Renato, Raquel, Giovanni, Abdul, Carol, Emanuel, Cristoban, Eduardo, Cristiana, Nayhanne, Franciele.

A todos que colaboraram de alguma forma com esse projeto. Ao estagiário Renato que ajudou em parte da metodologia. Ao Dr. Ariosvaldo Santiago da EBDA por fornecer as sementes de mamona. A Pabline por realizar os experimentos com animais. Ao Dr. Eduardo Melo por ceder as células IEC e acesso ao laboratório para realizar os experimentos, e as suas estagiárias Nathália e Milena pelo grande auxílio. A Dra. Bianca Damiani e Leticia Cardoso pelo auxílio com o ensaio de hemaglutinação. A Dra. Rose Monnerat por fornecer os nematoides e seus meios de cultura.

A Embrapa por disponibilizar o local de trabalho. A CAPES e FUNDECT pela bolsa de estudos e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Agradeço também aos membros da banca examinadora por disponibilizarem seu precioso tempo para contribuir com a melhora deste trabalho.

Por fim quero agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente participaram deste trabalho e que por distração eu possa ter esquecido de mencionar.

Esse árduo caminho percorrido não foi solitário,

Várias pessoas ao meu lado caminharam.

Fácil não foi, nem de todo alegre,

Mas ao final gratidão é o que descreve.

“I have a bad feeling about this”

– **Han Solo**

RESUMO

SOUSA, Natália Lima de. Doutorado em Biotecnologia e Biodiversidade, Universidade de Brasília, Dezembro de 2017. **Biodetoxificação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) mediante silenciamento gênico da ricina.** Orientador: Dr. Francisco José Lima Aragão.

A mamona é uma oleaginosa pertencente à Família Euphorbiaceae com distribuição mundial, porém mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Tem grande importância na indústria principalmente devido ao seu óleo de grande aplicabilidade em medicamentos, cosméticos e lubrificantes. Seu subproduto de maior importância é a torta empregada na recuperação de solos devido ao alto teor de nitrogênio, e por conter alto teor de proteínas poderia ser empregada na alimentação animal. Porém seu uso como ração é inadequado devido à presença da ricina, uma proteína tóxica e de difícil eliminação. Para gerar plantas de mamona biodetoxificadas por meio da engenharia genética foi utilizada a técnica de RNA interferente para silenciar o gene da ricina nas sementes (com a intenção de silenciar também a RCA₁₂₀, uma aglutinina muito similar a ricina), por *Agrobacterium tumefaciens* ou biobalística. Utilizando transformação via *A. tumefaciens* não foi possível obter plantas transgênicas, provavelmente por causa do baixo número de embriões transformados. Por outro lado, foram obtidos sete explantes transgênicos por meio de biobalística, sendo a maioria do tipo mosaico com apenas a epiderme transgênica. Porém, a linhagem TB14S-5D, apresentou todos os tecidos transgênicos e transferiu os transgenes para a progênie. Essa linhagem apresentou níveis indetectáveis de ricina no ensaio ELISA, em ensaio de hemaglutinação de hemácias não apresentou reação de aglutinação demonstrando que a RCA₁₂₀ também foi silenciada. O ensaio realizado com nematoides não ocorreu como esperado, pois o extrato de proteína da planta não transgênica não causou a morte da cultura como deveria, talvez por um mecanismo de defesa do próprio animal. Em ensaio com células IEC-6 e camundongos os extratos da planta transgênica não apresentaram toxidez. Os resultados mostram que a planta gerada tem potencial para que sua torta seja usada como alimento animal, gerando uma fonte renda maior para o produtor e um manejo mais seguro.

Palavras-chave: Mamona; *Ricinus communis* L.; Biodetoxificação; RNAi; ricina.

ABSTRACT

SOUSA, Natália Lima de. Biotechnology and Biodiversity PhD Program, University of Brasília, December 2017. **Bio-detoxification of castor bean seeds (*Ricinus communis* L.) by silencing the ricin gene.** Adviser: PhD Francisco José Lima Aragão.

Castor bean is an oilseed plant that belongs to Euphorbiaceae family with worldwide distribution, but mainly cultivated in tropical and sub-tropical regions. It has great importance in industry due to its oil content of great applicability in medicines, cosmetics and lubricants. Castor bean cake is the most important sub-product mainly used in soil recovery due to the high nitrogen content. Besides, it contains high protein content that could be used in animal feed. However, its use as animal feed is inadequate due to the presence of ricin, an extremely toxic and difficult to eliminate protein. To generate biot detoxified castor bean plants by genetic engineering, the RNAi technique was used to silence the ricin gene in castor bean seeds (also intending to silence the RCA₁₂₀, that is a strong agglutinin very similar to ricin) by *Agrobacterium tumefaciens* or biolistic. It wasn't possible to generate transgenic plants through genetic transformation by *A. tumefaciens* probably because of the low number of transformed embryos. Still it was possible to generate seven transgenic explants by genetic transformation via biolistic, however most explants were mosaic with only the epidermis being transgenic. The transgenic line TB14S-5D presented all tissue being transgenic and transferred the transgenes to progeny. This line had undetectable levels of ricin by ELISA, in a red blood cell hemagglutination test it did not present agglutination reaction showing that RCA₁₂₀ was also silenced. The nematode assay did not occur as expected because the protein extract from the non-transgenic plant did not cause the death of the culture as it was expected, perhaps by a defense mechanism of the animal itself. Furthermore the transgenic plant extracts showed no toxicity to IEC-6 cells and mice. The results show that the cake of the plant generated can be used as animal feed, generating a higher source income for the producer and safer handling.

Keywords: Castor bean; *Ricinus communis* L.; Biot detoxification; RNAi; ricin.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Características da espécie <i>Ricinus communis</i> L.....	14
2.2. Aspectos agronômicos da cultura	15
2.3. Os principais produtos da cultura e suas aplicações	17
2.4. A toxicidade da mamona	18
2.5. A detoxificação da torta de mamona	23
2.6. RNA interferente.....	24
2.7. Transformação genética de mamoneira	24
3. JUSTIFICATIVA	26
4. OBJETIVOS	29
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. ARTIGO	31
6. DADOS ADICIONAIS	41
6.1. Material e métodos.....	42
6.1.1. Construção de vetores para transformação genética de mamona	42
6.1.2. Preparo do material vegetal para transformação.....	45
6.1.3. Transformação genética via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
6.1.4. Transformação por biobalística	48
6.1.5. Análise das plantas regeneradas	50

6.1.6. Ensaio com nematoides	50
6.2. Resultados	52
6.2.1. Transformação via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	52
6.2.2. Transformação por biobalística	53
6.2.3. Ensaio com nematoides	58
6.3. Discussão	59
6.4. Linha do tempo	62
7. CONCLUSÕES GERAIS	63
8. PERSPECTIVAS	65
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO GERAL

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta tropical de ampla distribuição geográfica e de grande importância econômica e social. Esta espécie foi a primeira da Família Euphorbiaceae a ter o genoma totalmente sequenciado, o qual contém 350.6 Mb (Chan *et al.*, 2010). É bastante tolerante a estresses abióticos e costuma ser cultivada em locais onde os produtores têm poucas opções, principalmente onde o clima apresenta altas temperaturas e pouca água (Severino *et al.*, 2012).

As sementes de mamona são oleaginosas e seu óleo é bastante utilizado na indústria devido às suas características singulares (alta viscosidade, estável a baixas e altas temperaturas e o único na natureza solúvel em álcool). Tem grande aplicação na fabricação de lubrificantes além de ser bastante utilizado na indústria farmacêutica e de cosméticos (Ogunniyi 2006).

Após a retirada do óleo da semente o que sobra é a torta, o subproduto mais importante da cultura da mamona. É bastante empregada na recuperação de solos devido ao alto teor de nitrogênio e por conter grande quantidade de proteínas poderia ser empregada na alimentação animal, mas seu uso para essa finalidade é impedido pela presença de uma proteína muito tóxica e de difícil eliminação conhecida como ricina (Hoffman *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2011).

A ricina é uma proteína altamente tóxica do tipo inativadora de ribossomos que pode levar a morte. Para a utilização da torta como ração animal é necessária sua detoxificação prévia, mas os métodos até então desenvolvidos geralmente são pouco eficientes e/ou economicamente inviáveis em grande escala (Severino *et al.*, 2012).

Sabe-se que existem várias cópias do gene da ricina no genoma da mamona (Chan *et al.*, 2010) e a quantidade de ricina varia conforme a variedade (Baldoni *et al.*, 2011), mas não existe relato da existência de variedades sem ricina. Portanto, uma estratégia para a produção de uma torta de mamona sem ricina é o silenciamento gênico desta proteína por meio da técnica de RNA interferente, pela utilização de um protocolo de transformação eficiente. Como a cadeia A da ricina é muito similar a cadeia A da RCA₁₂₀ (uma forte aglutinina também presente na torta) é possível o seu silenciamento em conjunto com a utilização dessa técnica (Chan *et al.*, 2010). Isto possibilita obtenção de plantas de mamona com sementes detoxificadas que permitirão o emprego da torta como ração animal, gerando um produto de maior valor para o produtor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características da espécie *Ricinus communis* L.

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta que pertence à Família Euphorbiaceae e única espécie do gênero (Perry 1943; Souza and Lorenzi, 2005; APG III 2009). É diploide, $2n=20$ cromossomos, com genoma de 350,6 Mb que foi o primeiro da família Euphorbiaceae a ser sequenciado (Perry 1943; Chan *et al.*, 2010).

Esta espécie apresenta grande variação morfológica, as cores podem variar entre verde, vermelho, rosa ou arroxeadado e possui o caule cilíndrico com nós bem definidos. As folhas são simples e alternas, possuem margens denticuladas, palmatiformes com quantidade de lobos variando entre 7 e 11 e o pecíolo é inserido no centro do limbo (Rodrigues *et al.*, 2002; Milani *et al.*, 2009; Rana *et al.*, 2012) (Figura 1A).

As flores formam uma inflorescência do tipo racemo no ápice dos ramos. As flores femininas possuem estigma bem característico com cor vermelha intensa e se localizam na parte superior da inflorescência e as masculinas na parte inferior (Figura 1B), também podendo ocorrer inflorescências de apenas um gênero. A reprodução é mista, sendo que a autofecundação ocorre a uma taxa de 5 a 65% (Greenwood and Bewley, 1981; Rodrigues *et al.*, 2002; Rana *et al.*, 2012).

Os frutos são globosos e tripartidos, variam de muito papilhosos a lisos (Figura 1C e D) e podem ser deiscentes, semideiscentes ou indeiscentes (Figura 1E). As sementes variam quanto à coloração e tamanho, possuem carúncula e tem formato ovóide (Rodrigues *et al.*, 2002; Milani *et al.*, 2009; Rana *et al.*, 2012) (Figura 2).

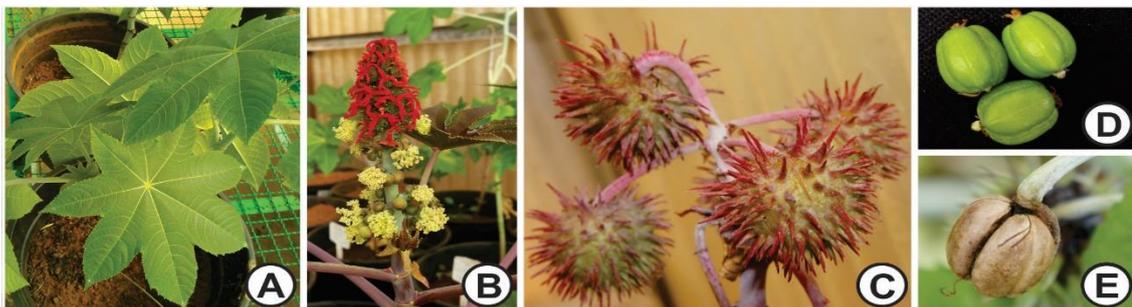


Figura 1. Características morfológicas de mamoneira. A: Folhas palmatiformes com a inserção do pecíolo no centro do limbo. B: Inflorescência com flores femininas no topo e masculinas na base. C: Frutos papilhosos. D: Frutos lisos. E: Fruto seco indeiscente.

A mamoneira é uma planta que apresenta grande variabilidade morfológica. Existe um Banco de Germoplasma (BAG) de mamona no Brasil, localizado na Embrapa

Algodão (Campina Grande), que em 2006 estimava-se que possuía cerca de 400 acessos (Milani *et al.*, 2006). O banco foi criado a fim de caracterizar, estudar e preservar a diversidade de mamona (Milani *et al.*, 2009; Baldoni *et al.*, 2011).

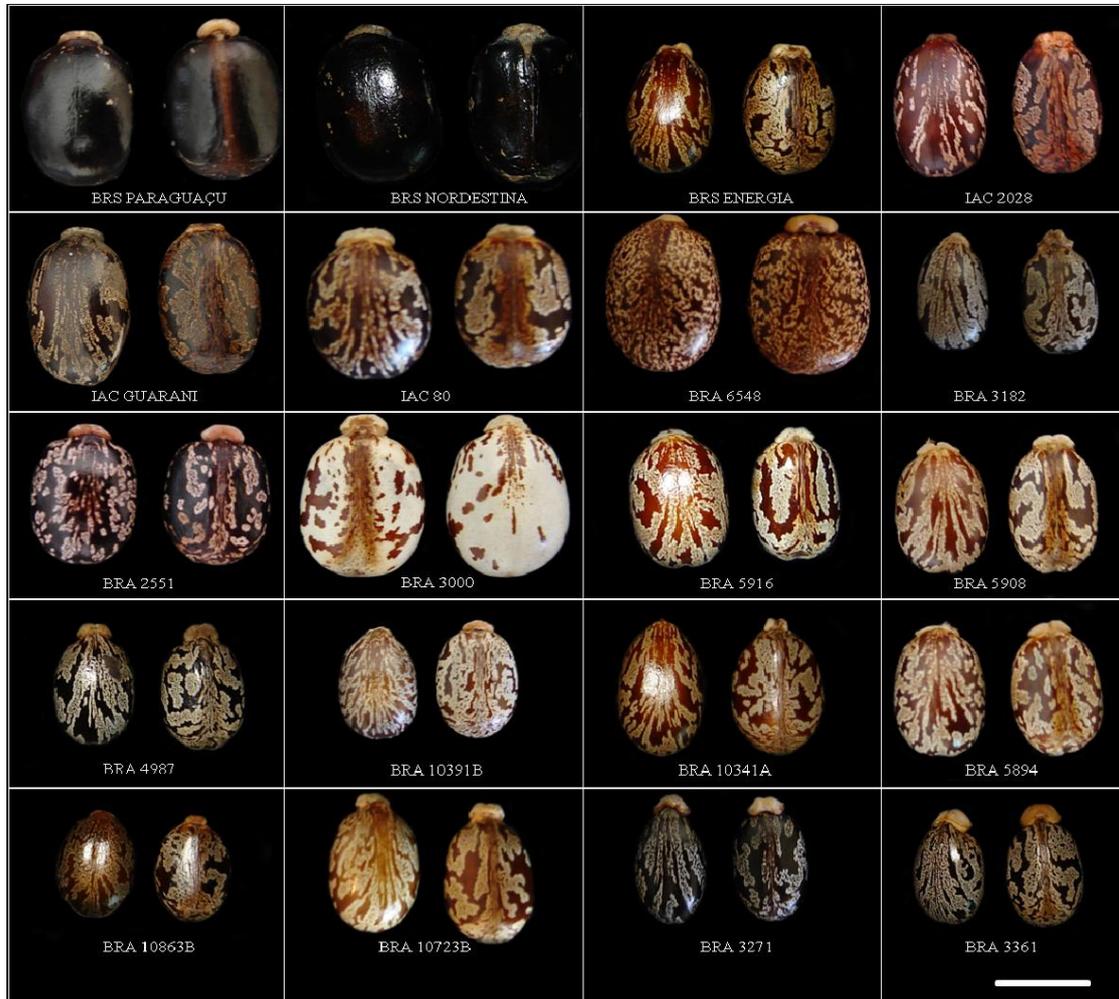


Figura 2. Variabilidade morfológica em sementes de mamona provenientes do Banco de germoplasma da Embrapa Algodão. Barra = 15,9mm. Figura retirada de Baldoni (2010).

2.2. Aspectos agronômicos da cultura

Possivelmente originária da África mais especificamente da Etiópia (Foster *et al.*, 2010). A mamona foi muito utilizada no Antigo Egito e Grécia devido às propriedades do seu óleo (lubrificante e laxante). Acredita-se que foi introduzida pelos escravos no Brasil no século XVI. É considerada uma planta invasora e pode ser encontrada em todo o território brasileiro (Rodrigues *et al.*, 2002; Ogunniyi 2006).

A mamoneira apresenta distribuição mundial, porém é mais cultivada em regiões tropicais e subtropicais. É conhecida por ser uma planta bastante tolerante a estresses abióticos como períodos de seca, temperaturas elevadas e chuvas fortes, no entanto não suporta temperaturas muito baixas e períodos longos de chuva, além de ser uma planta indicada para fitorremediação de solos (Rana *et al.*, 2012; Severino *et al.*, 2012; Bauddh *et al.*, 2015).

De acordo com a FAO Statistics (2017) o maior produtor de mamona é a Índia que no ano de 2014 produziu 1.700.000 toneladas (t) de sementes de mamona, seguida por Moçambique com produção de 68.900 t, China com 40.000 t e Brasil com 37.500 t (Figura 3).

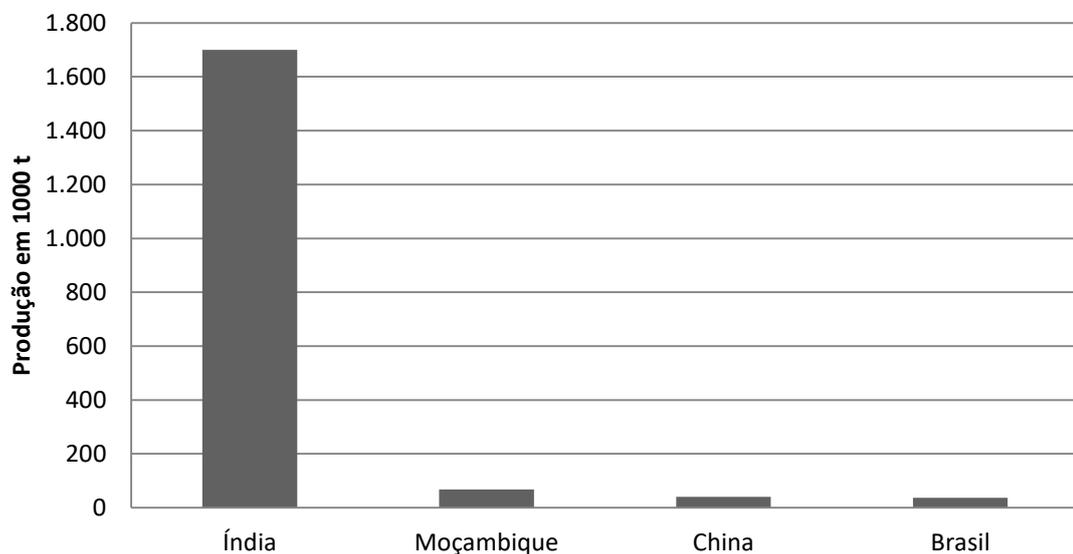


Figura 3. Produção de sementes de mamona em 1000 toneladas no ano de 2014 nos quatro principais países produtores. Dados retirados de FAO Statistics (2017).

A maior parte da produção de mamona no Brasil ocorre no semi-árido, produzida principalmente por pequenos agricultores e na agricultura familiar envolvendo cooperativas (Ogunniyi 2006; Severino *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2017). Essa cultura pode ser uma importante fonte de renda para o produtor por não necessitar de muitos insumos, porém ainda não existe mecanização padronizada e a maior parte dos processos é manual (Ogunniyi 2006; Severino *et al.*, 2012; Campos and Santos, 2015).

2.3. Os principais produtos da cultura e suas aplicações

A cultura da mamona tem como produto de maior importância o óleo de rícino que compõe de 45-55% do peso da semente e é de alto valor para a indústria. Cerca de 90% desse óleo é composto por ácido ricinoléico um ácido graxo, de nome ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico, composto por 18 carbonos com um grupo hidroxila no 12º carbono e uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 (Severino *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2016) (Figura 4).

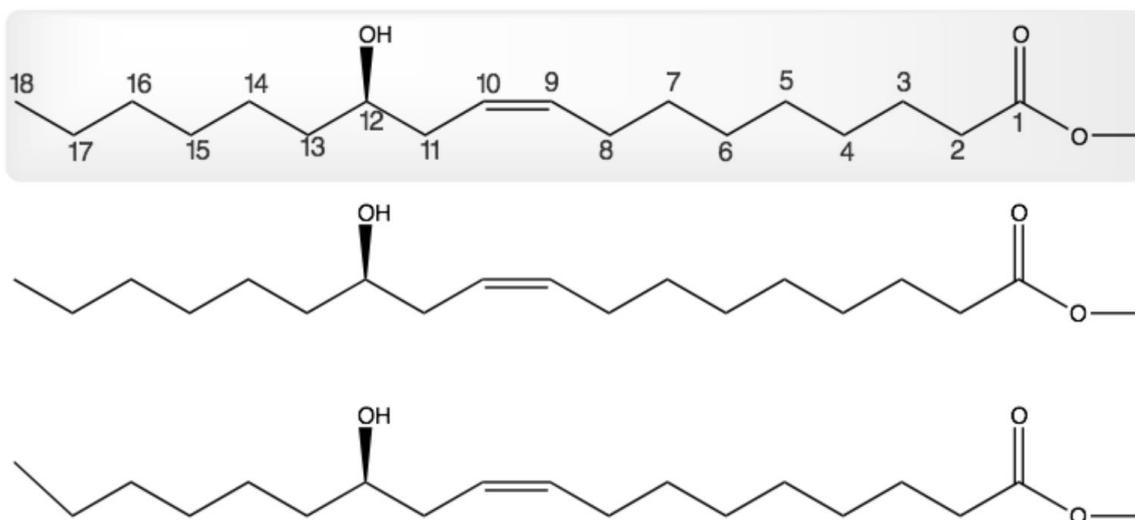


Figura 4. Estrutura do ácido ricinoléico em forma de triglicerídeo. Figura adaptada de Patel *et al.* (2016).

O ácido ricinoléico tem algumas particularidades como sua alta viscosidade, tolerância a extremos de temperatura além de ser único ácido graxo natural solúvel em álcool, características que o torna bastante importante na indústria (Ogunniyi 2006).

A química do óleo de mamona gera diversos tipos de produtos como medicamentos, cosméticos, próteses, biocombustível, lubrificantes e pode estar presente em alguns alimentos mesmo não sendo considerado um alimento (Ogunniyi 2006). O segmento de maior expressividade no uso do óleo de mamona é a indústria de lubrificantes. Devido à sua grande viscosidade e por ser funcional em condições extremas de temperatura é muito utilizado em motores de alto desempenho (Wu *et al.*, 2007; Mandankar *et al.*, 2013; Karmakar *et al.*, 2017).

Após a extração do óleo da semente de mamona resta a torta que é o subproduto de maior importância da cultura. Atualmente, vem sendo muito utilizada como adubo

orgânico de ótima qualidade por conter grande quantidade de nitrogênio (Lima *et al.*, 2011).

A torta possui grande quantidade de amido e tem potencial para ser utilizada na produção de etanol, biogás ou plásticos (Melo *et al.*, 2008; Bateni *et al.*, 2014). Além disso, devido a alta quantidade de proteínas a torta poderia ser empregada na alimentação animal gerando um produto de maior valor ao produtor. Porém, o que dificulta sua utilização como ração é a sua alta toxicidade devido à presença da ricina devendo ser detoxificada previamente (Hoffman *et al.*, 2007; Diniz *et al.*, 2011).

2.4. A toxicidade da mamona

A toxicidade da torta de mamona que inviabiliza seu uso como alimento animal ocorre principalmente devido à presença da ricina (RCA_{60}), uma proteína altamente tóxica, mas com baixo potencial de hemaglutinação. Além disso, estão presentes alguns compostos de baixa toxidez: a ricinina, complexo CB-1A e RCA_{120} (Severino 2005; Barnes *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 2015).

A ricinina é um alcalóide que está presente em todas as partes da planta principalmente em partes jovens, mas representa baixa toxicidez e está presente em baixa concentração na torta (Severino 2005).

O complexo CB-1A é formado por glicoproteínas alergênicas de baixo peso molecular que estão presentes nas sementes em baixa quantidade, apresentam baixa toxicidez, mas podem causar reação alérgica em pessoas previamente sensibilizadas (Spies and Coulson, 1965; Severino 2005).

RCA_{120} é uma aglutinina composta de dois dímeros ricina (duas cadeias A e duas cadeias B) ligados por uma ponte dissulfeto entre as cadeias A. É uma aglutinina forte, mas de baixa toxicidade. As cadeias A da RCA_{120} e da ricina diferem em apenas 18 aminoácidos (Roberts *et al.*, 1985; Harley and Beevers, 1986; Chan *et al.*, 2010). Tanto a RCA_{120} quanto a ricina são codificadas por genes sem íntron, que são traduzidos em proteínas precursoras de cadeia única que sofrem mudanças pós-traducionais para formar a proteína final (Butterworth and Lord, 1983; Lord and Spooner, 2011).

A principal toxina presente na torta de mamona, a ricina, é uma lectina composta de duas subunidades, a cadeia A (RTA) e a cadeia B (RTB) ligadas por ponte dissulfeto

(Barnes *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 2015) (Figura 5). Existem 28 supostos genes que codificam para ricina no genoma, sendo que pelo menos sete destes codificam para proteínas funcionais (Halling *et al.*, 1985; Chan *et al.*, 2010).

A concentração de ricina em sementes maduras de mamona pode variar de acordo com a variedade, em 2011 Baldoni *et al.* quantificaram ricina em diferentes acessos de mamona provenientes do BAG da Embrapa Algodão e foi possível encontrar uma variação na concentração de ricina entre as variedades de 3,5 até 32,1 ng de ricina por µg de proteína total. A ricina é sintetizada durante o desenvolvimento da semente e seu acúmulo se inicia em torno de 28 dias após a polinização (DAP) e por volta de 40 DAP ocorre um aumento significativo de ricina nas sementes (Barnes *et al.*, 2009; Baldoni *et al.*, 2010).

A síntese da ricina ocorre com a tradução do gene em um polipeptídeo (preproricina) de cerca de 64,1 kDa que codifica para as duas cadeias A e B com um peptídeo de ligação entre elas e um sinal N-terminal. A preproricina é direcionada ao retículo endoplasmático (RE) pelo peptídeo sinal, onde este é clivado, ocorre a N-glicosilação em sítios específicos (N) e são formadas as pontes dissulfeto. Após essas alterações a então nomeada de proricina é direcionada para os vacúolos de armazenamento através do complexo de Golgi. Por fim, os glicanos são modificados e ocorre a remoção do resíduo do sinal N-terminal e do peptídeo de ligação entre as cadeias formando a proteína final de 58.8 kDa (Figura 5). O processo de síntese da RCA₁₂₀ é bastante similar, exceto que esta contém uma ponte dissulfeto a mais que liga duas cadeias A formando a proteína tetramérica (Butterworth and Lord, 1983; Lord and Spooner, 2011).

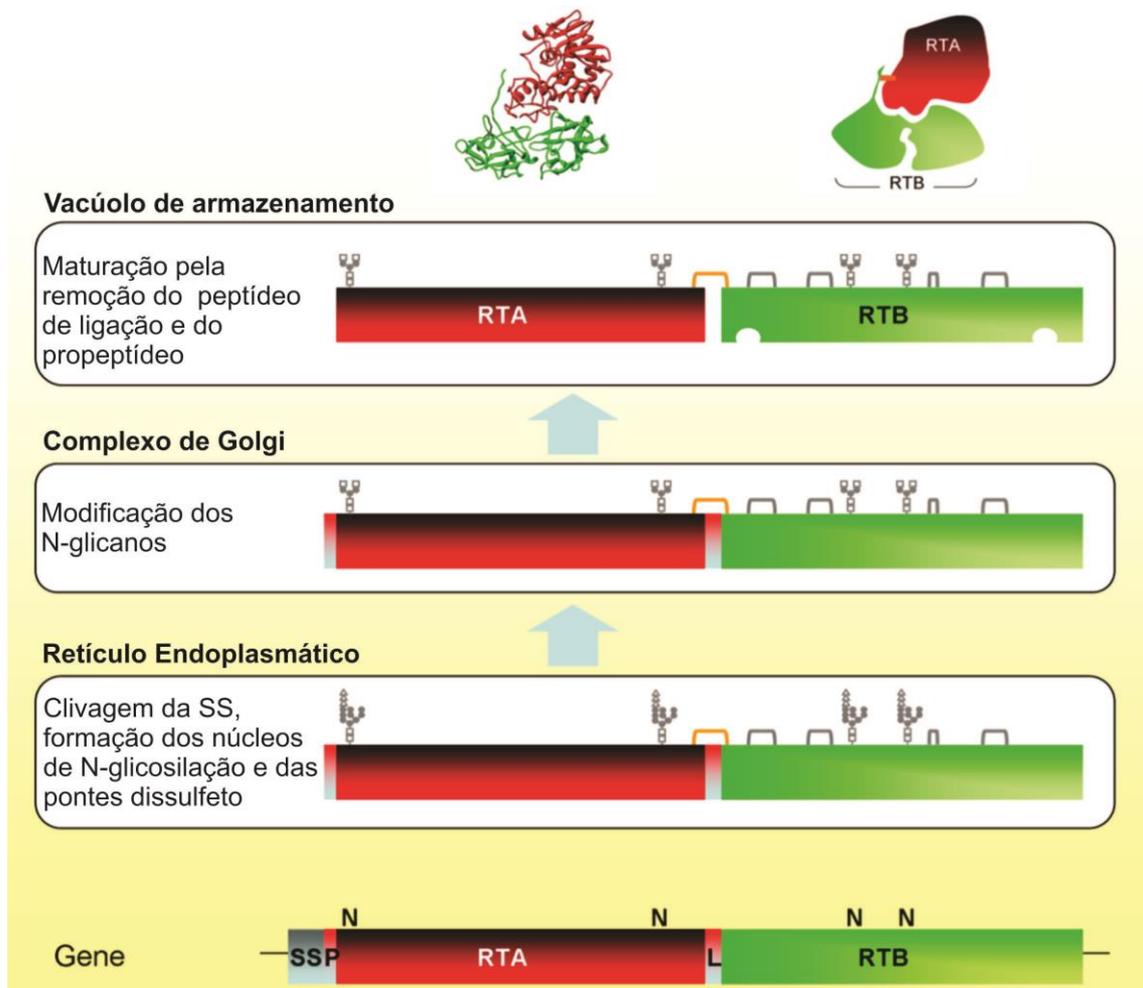


Figura 5. Esquema da biossíntese da ricina e do transporte intracelular a partir do gene (de baixo para cima), mostrando as alterações pós-traducionais ocorridas até a formação da proteína final. SS: Sequência sinal; P: Propeptídeo; L: Peptídeo de ligação; N: Sítio de N-glicosilação; RTA: Cadeia A da ricina; RTB: Cadeia B da ricina. Figura adaptada de Lord and Spooner (2011).

Localizada somente no endosperma da semente, a ricina é uma Proteína Inativadora de Ribossomos do tipo II, que compõe de 6-9% da torta e não se encontra no óleo após o processo de extração (Barnes *et al.*, 2009; Bozza *et al.*, 2015). A ricina causa morte celular inativando ribossomos irreversivelmente. Isso ocorre quando a cadeia B da ricina se liga aos resíduos de galactose de glicoproteínas ou glicolipídios presentes na membrana celular e entra na célula por endocitose. Logo, a ricina segue em vesícula que pode ser excitada, ou direcionada aos lisossomos para degradação, ou seguir a via de toxicidade sendo levadas ao complexo de Golgi. Algumas moléculas seguem até o retículo endoplasmático onde a ponte dissulfeto que liga as cadeias A e B é desfeita. A cadeia A transloca para o citossol, se liga ao RNA ribossomal (rRNA) 28S da subunidade 60S e remove um único resíduo de adenina da sequência GAGA

defesa contra predação (Harley and Beevers, 1986; Park *et al.*, 2004; Lannoo and Van Damme, 2014).

A dose letal (DL50) de ricina em camundongos por quilo de peso corpóreo varia entre 2,4 a 36 µg por injeção intraperitoneal, entre 21 a 30 mg por via oral e entre 2,8 a 12,5 µg por via inalatória. A via oral é a menos tóxica, sendo estimada que por inalação ou injeção seja até 1.000 vezes mais tóxica (He *et al.*, 2010; Worbs *et al.*, 2011).

Em humanos a DL50 é estimada entre 1 a 20 mg de ricina por quilo de peso corpóreo por ingestão oral, mas as vias de toxicidade mais letais são: por inalação com DL50 de 1 a 10 µg/kg e por injeção com DL50 de 5 a 10 µg/kg. Os dados de toxicidade em humanos são estimados em estudos com animais e em estudos de casos analisados de intoxicação (Musshoff and Madea, 2009; Worbs *et al.*, 2011; Nunez *et al.*, 2017).

Os sintomas de intoxicação por ricina variam conforme a rota de intoxicação e a dose, mas geralmente incluem febre, náusea, vômitos, diarreia, anorexia, dor, fraqueza e danos nos órgãos podendo levar à morte (Musshoff and Madea, 2009; Haan *et al.*, 2016; Nunez *et al.*, 2017). Caso a rota de intoxicação seja oral pode ser feita uma descontaminação gastrointestinal, mas depende do tempo após a ingestão. Porém, não existe tratamento definido e em caso de intoxicação por ricina o que pode ser feito é tentar amenizar os sintomas (Aggarwal *et al.*, 2012; Nunez *et al.*, 2017). Há uma demanda para o desenvolvimento de vacinas (Smallshaw *et al.*, 2012) ou antídotos contra a ricina principalmente devido a sua possível utilização como arma biológica (Musshoff and Madea, 2009; Schep *et al.*, 2009; Smallshaw *et al.*, 2012).

Existem diversos meios de detecção e quantificação da ricina, dentre eles o Ensaio imunoenzimático (ELISA) se destaca pela praticidade e alta sensibilidade, o método consiste na identificação da ricina no extrato bruto de proteínas através de ligação de anticorpo específico (Musshoff and Madea, 2009; Baldoni *et al.*, 2011; Bozza *et al.*, 2015). A técnica de ELISA é muito utilizada, porém os anticorpos para a cadeia A da ricina geralmente detectam também a cadeia A da RCA₁₂₀ (Harley and Beevers, 1986; Baldoni *et al.*, 2011) o que leva a detecção das duas proteínas.

Sabe-se que a ricina é uma proteína altamente tóxica e com baixo potencial de hemaglutinação ao contrário da RCA₁₂₀ que tem baixa toxidez e é uma forte hemaglutinina (Sehgal *et al.*, 2015; Worbs *et al.*, 2015). Portanto, pode-se detectar a presença da RCA₁₂₀ em sementes de mamona por meio de ensaio de hemaglutinação (Sehgal *et al.*, 2015). Ensaio de toxidez utilizando células animais (Cheah *et al.*, 2009;

Fernander *et al.*, 2012; Madeira *et al.*, 2011) ou camundongos são comumente utilizados para avaliar a toxidez da ricina (Fodstad *et al.*, 1979; Pincus *et al.*, 2002; He *et al.*, 2010), sendo que a intoxicação por ricina em camundongos pode ser avaliada pela queda da glicose no sangue (Pincus *et al.*, 2002). Além desses métodos, o uso de nematóides é uma boa ferramenta para avaliação de extratos de plantas (Katiki *et al.*, 2011), e como já foi reportado como ferramenta para quantificar ricina (Demant *et al.*, 2012) é uma das técnicas que podem ser empregadas, principalmente por ser uma cultura de fácil manutenção e baixo custo, ser um modelo mais complexo que cultura de células e os dados de toxidez serem similares a ensaios com camundongos (Hunt 2017).

2.5. A detoxificação da torta de mamona

A presença da ricina na torta que impede a sua utilização como ração faz com que seja necessária sua detoxificação para este fim. Neste contexto, foi possível a detoxificação da torta por meio do processo de fermentação com o microrganismo *Paecilomyces variotii* e que se mostrou não tóxica para células RAW 264.7 em uma concentração de 1 µg/mL de extrato protéico após 72 horas de fermentação (Madeira *et al.*, 2011). A fermentação com o microrganismo *Aspergillus niger* também demonstrou a diminuição da toxidez da torta, similar ao o que ocorreu em tratamentos químicos com hidróxido ou óxido de cálcio, em ensaio de citotoxicidade utilizando células VERO em uma concentração de 10 µg/mL de extrato protéico (Fernander *et al.*, 2012). Existem várias propostas de metodologia para a eliminação da ricina na torta de mamona como fervura, autoclavagem, tratamentos com químicos e com agentes biológicos, mas esses procedimentos geralmente tem alto custo e/ou baixa eficiência em escala industrial (Godoy *et al.*, 2009; Madeira *et al.*, 2011; Severino *et al.*, 2012; Dubois *et al.*, 2013).

Assim, como não existe uma variedade de mamona sem ricina e até o momento apenas foi geradas variedades com concentrações baixas de ricina, mas não o suficiente para a utilização da torta como alimento animal (Pinkerton *et al.*, 1999; Auld *et al.*, 2003; Baldoni *et al.*, 2011), possivelmente a melhor alternativa para a detoxificação da torta de mamona, ou seja, a eliminação da ricina das sementes seja o melhoramento por engenharia genética (Hoffman *et al.*, 2007). Devido a existência de várias cópias do gene que codificam para a ricina no genoma (Halling *et al.*, 1985; Chan *et al.*, 2010) uma estratégia seria a utilização da técnica RNA interferente (RNAi).

2.6. RNA interferente

O RNAi é um mecanismo bastante conservado em eucariotos, surgido provavelmente como uma defesa contra vírus. Este é um processo que ocorre naturalmente quando um RNA dupla fita (dsRNA) é reconhecido no citossol pela RNase III Dicer e clivado gerando pequenos RNAs interferentes (siRNAs), estes são reconhecidos e associados ao complexo proteico RISC que separa a dupla-fita de RNA e direciona cada fita simples a fitas complementares para serem clivadas. Assim, cada siRNA serve de molde para a clivagem de novos mRNAs complementares, o que leva ao silenciamento (Carthew 2001; Wesley *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2016).

Do ponto de vista biotecnológico o silenciamento de genes endógenos em células vegetais tem sido obtido de forma mais eficiente com construções do tipo intron-hairpin. Essas construções são feitas com a escolha e clonagem de um fragmento da região transcrita do gene, em sentido senso e antissenso, intercalados por um íntron (Wesley *et al.*, 2001; Nunes *et al.*, 2006; Bonfim *et al.*, 2007; Aragão and Figueireido, 2008; Frizzi and Huang, 2010).

Para que se possa propor a utilização de estratégias baseadas em RNAi para silenciamento do gene da ricina em mamona, é essencial que se tenha um sistema de transformação genética estabelecido.

2.7. Transformação genética de mamoneira

A transformação genética de mamona ainda é um desafio, existem poucos trabalhos publicados, o que se deve principalmente pela dificuldade no cultivo *in vitro* dessa planta (Singh *et al.*, 2011).

Na Índia, em 2005, foi desenvolvido um protocolo de transformação de mamona via *Agrobacterium tumefaciens*. Embriões zigóticos da variedade Jyothi foram utilizados, e um vetor com o gene *hpt* de tolerância a higromicina e o gene *gus* como gene repórter. A multibrotação foi induzida com 0,5 mg/L de Thidiazurom (TDZ) seguida de repicagens em 0,5 mg/L de N6-benziladenina (BA) e a seleção foi feita em concentrações crescentes de higromicina (20, 40 e 60 mg/L). A eficiência do protocolo de transformação foi de 0,08% (Sujatha and Sailaja, 2005).

Em 2006 foram geradas plantas transgênicas de mamona tolerantes ao Lepidoptera *Achaea janata* L., praga da cultura na Índia. Para tanto, foi utilizado o vetor contendo o gene *cryIAb* de tolerância ao inseto, o gene *gus* como gene repórter e o gene *bar* de tolerância ao herbicida glufosinato de amônio, a transformação foi mediada por *A. tumefaciens*. Foram induzidas multibrotações em embriões zigóticos, da variedade Zyoti, com 0,5 mg/L de Benzil-amino-purina (BAP) e a seleção feita com concentrações crescentes de glufosinato de amônio (6 e 8 mg/L). A eficiência de transformação foi de 0,4% (Malathi *et al.*, 2006).

O primeiro protocolo de transformação de mamona via biobalística foi desenvolvido na Índia. Foram utilizados embriões zigóticos da variedade Zyoti, um vetor contendo o gene *gus* como gene repórter e o gene *hpt* de tolerância a higromicina. Assim como no trabalho de transformação via *A. tumefaciens*, as multibrotações foram induzidas com 0,5 mg/L de Thidiazurom (TDZ) seguida de repicagens em 0,5 mg/L N6-benziladenina (BA) e seleção em concentrações crescentes de higromicina (20, 40 e 60 mg/L). Obtiveram uma eficiência de 1,4% (Sailaja *et al.*, 2008).

Em 2014 foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Genética (LEG) um sistema de transformação genética de mamona por biobalística para a cultivar EBDA-MPA-34 (Sousa 2013) baseado em protocolos existentes (Sailaja *et al.*, 2008; Baldoni 2010). Para tanto foi utilizado o vetor pRICRNAi contendo uma construção de RNAi do tipo intron-hairpin com um fragmento do gene da ricina, o gene *gus* como gene repórter e o gene *ahas* (que confere tolerância a imidazolinonas). Com base em avaliação da indução de multibrotação em embriões de mamona por meio de microscopia de varredura, foi possível observar que o TDZ apresentou uma resposta morfogênica mais rápida e com maior formação de brotos que o BAP, então o TDZ foi utilizado para induzir multibrotações nos embriões zigóticos. A concentração de imazapyr (IMZ) ideal para seleção, segundo a curva obtida, foi de 200 nM, porém foi utilizada uma concentração menor de 100 nM no início com aumento nas repicagens seguintes. Foram obtidos brotos expressando o gene *gus* a uma eficiência de transformação de 0,52%, porém todos apresentando apenas a região da epiderme transformada. Em conjunto, foi desenvolvido um protocolo de transformação por *Agrobacterium tumefaciens* baseado nos protocolos existentes (Sujatha and Sailaja, 2005; Malathi *et al.*, 2006), mas com cultura de tecidos similar a de biobalística desenvolvida (Sousa 2013).

3. JUSTIFICATIVA

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma planta de grande importância na indústria principalmente devido ao óleo que compõe cerca de 50 a 55% do peso de suas sementes. Este óleo é bastante utilizado em medicamentos, cosméticos e em lubrificantes para motores que trabalham em temperaturas extremas. Porém o subproduto obtido, após a retirada do óleo das sementes, a torta de mamona, é subutilizado como adubo devido à sua toxicidade que pode causar intoxicações inclusive durante o manejo (Lappi *et al.*, 1978; Hoffman *et al.*, 2007). Mesmo com grande potencial para ser empregado como alimento animal devido à grande quantidade de proteínas (Hoffman *et al.*, 2007; Severino *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2016), seu uso como ração para animais é restrito, pois os métodos para a inativação da ricina geralmente são caros e muitas vezes tem baixa eficiência a nível industrial (Severino *et al.*, 2012).

A procura por uma maneira de eliminar as toxinas da torta de mamona é grande e muitos métodos foram testados como autoclavagem, tratamentos químicos, fermentação e outros. Alguns tiveram sucesso, mas de certa forma, ainda são métodos não utilizados pela indústria seja por ineficiência em grande escala ou por ser inviável economicamente (Severino *et al.*, 2012). Como exemplo, na década de 60 uma torta detoxificada para alimentação animal foi comercializada no Brasil por um breve período, porém o controle da detoxificação não era totalmente eficiente e alguns lotes ainda com toxinas foram liberados o que causou a morte de animais e levou a suspensão das vendas (Hoffman *et al.*, 2007).

Sabe-se que existem várias cópias do gene da ricina distribuídas no genoma da planta (Chan *et al.*, 2010), que a quantidade de ricina nas sementes de mamona varia entre as diferentes variedades (Baldoni *et al.*, 2011) e que não existe relato de variedades de mamona sem ricina. Portanto, possivelmente uma melhor maneira de detoxificar as sementes de mamona seria pelo silenciamento da ricina pela técnica de RNAi. Como a aglutinina (RCA₁₂₀), também presente na torta, tem grande similaridade com a ricina é possível que ela também seja silenciada com a utilização desta técnica.

Com isso, a obtenção de novos genótipos de mamona sem ricina ou com concentrações baixas dessa proteína irá permitir a produção e comercialização de uma torta de mamona biodetoxificada. Isso permitirá o emprego da torta na alimentação

animal, provendo uma fonte de proteína abundante e de baixo custo, além de gerar uma fonte de renda a mais para os produtores de mamona.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi silenciar os genes que codificam a ricina em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) de forma a produzir plantas biodetoxificadas.

4.2. Objetivos específicos

- Produzir plantas de mamona geneticamente modificadas por meio da técnica de biobalística e/ou via *Agrobacterium tumefaciens*;
- Obter plantas transgênicas com sementes biodetoxificadas, apresentando baixo teor ou níveis indetectáveis de ricina;
- Analisar a segregação dos genes exógenos nas linhagens das plantas transgênicas;
- Testar a toxicidade de proteínas isoladas de sementes geneticamente modificadas *in vitro* (para células de mamífero, nematoides e sangue) e *in vivo* (em camundongos).

5. ARTIGO

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds

Natália L. Sousa^{1,2}, Glaucia B. Cabral¹, Pabline M. Vieira³, Aisy B. Baldoni^{1,4} & Francisco J. L. Aragão¹

Ricin is a highly toxic ribosome-inactivating lectin occurring in the seeds of castor bean (*Ricinus communis* L.). Castor bean grows throughout tropical and sub-tropical regions and is a very important crop due to its high seed content of ricinoleic acid, an unusual fatty acid, which has several industrial applications. However, due to the presence of the toxin, castor bean can cause death after the exposure of animals to low doses of ricin through skin contact, injection, inhalation or oral routes. Aiming to generate a detoxified genotype, we explored the RNAi concept in order to silence the ricin coding genes in the endosperm of castor bean seeds. Results indicated that ricin genes were effectively silenced in genetically modified (GM) plants, and ricin proteins were not detected by ELISA. Hemagglutination activity was not observed with proteins isolated from GM seeds. In addition, we demonstrated that seed proteins from GM plants were not toxic to rat intestine epithelial cells or to Swiss Webster mice. After oil extraction, bio-detoxified castor bean cake, which is very rich in valuable proteins, can be used for animal feeding. Gene silencing would make castor bean cultivation safer for farmers, industrial workers and society.

Castor bean (*Ricinus communis* L.) is commercially cultivated due to the high quality and content (mainly ricinoleic acid) of its seed oil. Major producers are India, Mozambique, China and Brazil, responsible for 1.7 million, 68.9, 40.0 and 37.5 thousand tons, respectively (<http://www.fao.org/faostat>). India is the main oil exporter, and the United States, the European Union, and China import about 84% of the castor oil available on the international market^{1,2}. Ricinoleic acid (12-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid) confers higher stability and viscosity on castor bean oil when compared to other vegetable oils and makes it a highly valued material in the composition of lubricants, plastics, cosmetics, paints, varnishes, ethanol and biodiesel^{2,3}. However, castor bean seeds contain ricin, which is a highly toxic storage 7S lectin. Ricin is a dimeric glycoprotein constituted of A- and B-polypeptide chains covalently linked by a disulfide bond⁴. The A-chain is a ribosome-inactivating enzyme that specifically deurinates the first adenosine in the GAGA nucleotide sequence from the conserved loop on the 28 S rRNA subunit^{5,6}. This modification impairs the formation of a critical rRNA stem-loop configuration, to which elongation factor 2 binds during the translocation step of translation. The B-chain binds specifically to cell surface glycoproteins or glycolipids and facilitates the movement of the A-chain into animal cells. One A-chain molecule of ricin is able to irreversibly inactivate one thousand ribosomes per minute, impairing protein synthesis and causing cell death⁷. Castor bean seeds also contain the ricin homologue *R. communis* agglutinin (RCA₁₂₀), which is a tetrameric protein composed of two A-chains (90% similar to the ricin A-chain) and two B-chains (84% similar to the ricin B-chain). RCA₁₂₀ presents a reduced toxicity and a strong hemagglutinin of mammalian red blood cells⁸. Antibodies produced against ricin generally cross-react with RCA₁₂₀⁹.

Seeds accumulate significant amounts of ricin 40 days after pollination¹⁰, ranging from 1.6 mg to 32 mg of ricin per gram of mature seed^{11–13}. Ricin is synthesized as a precursor polypeptide (preproricin) of 64.1 kDa, encoding both A- and B-chains, which is converted into a 61.6 kDa proricin by cleavage of the N-terminal signal peptide, during transference to the lumen of the endoplasmic reticulum. In the vacuoles, propeptides are cleaved, and the ricin accumulates in protein bodies as a 58.8 kDa mature protein¹⁴.

Acute toxicity studies of ricin carried out with mice determined the lethal dose (LD₅₀) values as 2.4 to 36 µg/kg and 21 to 30 mg/kg through intraperitoneal and oral routes, respectively¹⁵. The LD₅₀ for humans is estimated to be between 1 and 20 mg/kg of body weight, and is much more toxic if the exposure is by inhalation (1–10 µg/kg of

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, PqEB W5 Norte, 70770-900, Brasília, DF, Brazil. ²Universidade de Brasília, Departamento de Biologia Celular, Campus Universitário, 70910-900, Brasília, DF, Brazil. ³Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, Laboratório de Biotecnologia, 75790-000, Urutaí, GO, Brazil. ⁴Present address: Embrapa Agrossilvopastoril, Rod. dos Pioneiros MT-222, 78550-970, Sinop, MT, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.J.L.A. (email: francisco.aragao@embrapa.br)

body weight)¹⁵. Symptoms include diarrhea, anorexia, abdominal pain, weakness, low appetite, cramps, and soft dark feces. Ricin could also be harmful to workers exposed to castor bean grains by both inhalation and skin contact during industrial processing. In addition, the US Center for Disease Control and Prevention characterized ricin as a category B priority biothreat agent that might be used for bioterrorism purposes^{16–18}.

Castor cake, which is the remaining industrial sub-product generated after extraction of the oil from castor bean grains, is rich in valuable proteins and fiber and could be used as animal feed. Due to the presence of ricin, it is generally used only as an organic fertilizer. However, a number of domestic animals have presented intoxication and death after ingesting fertilizer containing castor cake¹⁵. Development of several castor cake detoxification methods has been achieved with limited success. It has been demonstrated that fermentation procedures with microorganisms, such as *Paecilomyces variotii* and *Aspergillus niger*, were able to detoxify castor bean residue separated during the process of biodiesel production^{19,20}. In addition, castor cake detoxification has been achieved by chemical treatment with calcium compounds (calcium oxide and calcium hydroxide)²⁰. From the economic point of view, these processes are still not practical and efficient enough to be used on a large scale^{3,20}.

Castor bean genome sequencing revealed several putative genes in the ricin family, including potential pseudogenes or gene fragments, forming clusters in the plant genome²¹. Despite the difficulties in determining whether some shorter genes or pseudogenes are functional, at least seven full-length genes encode proteins with the ribosome-inactivating and lectin domains^{21,22}. This might explain the difficulty in generating detoxified genotypes using classical mutation techniques. Consequently, current castor bean varieties with a lower content of ricin (70–75% less) are still very toxic to mammals^{3,23}. Based on these facts, we explored the RNA interference (RNAi) concept to silence the ricin gene in castor bean seeds in order to generate a non-toxic castor bean genotype. RNAi is a post-transcriptional gene silencing mechanism that regulates the expression of protein-coding genes. Constructs to express self-complementary RNA transcripts form a dsRNA, which is processed into small interfering RNAs (siRNAs). These siRNAs trigger a sequence-specific mRNA degradation, leading to gene silencing²⁴.

Results and Discussion

An intron-hairpin vector was designed, in which a 460 bp fragment of the A-chain ricin gene was directionally cloned in sense and antisense (Δ ricin cassette) to generate dsRNA during transcription (Fig. 1a). In addition, the vector contained the *Arabidopsis thaliana ahas* gene (which confers tolerance to the herbicide imazapyr) and the *gus* gene (used for screening transformants). Of 270 embryonic axes bombarded with the vector pRicRNAi (Fig. 1a), four primary transgenic lines (R₀) were produced, which represents a transformation efficiency of 0.85%.

Transgenic plants were analyzed for the *gus* gene expression and results have shown that all lines were transgenic. However, only one line (named TB14S-5D) transferred the transgenes to the progeny. The presence of the *gus*, *ahas* and Δ ricin transgenes was confirmed by PCR (Fig. 1b). The chi-square test revealed a Mendelian segregation ratio of 3:1 in the T₁ generation (26 positive: 12 negative; $X^2 = 0.87$; $P = 0.35$; $df = 1$). The line TB14S-5D presented a strong GUS histochemical activity and became visibly blue in 20–30 minutes in leaves, endosperms and embryonic axes (Fig. 1c). It will be useful to determine, even under field conditions, whether a specific variety is genetically modified. This is important for the safer use of the event TB14S-5D.

Southern blot analysis of transgenic castor bean plants revealed the presence of the Δ ricin interfering cassette (Fig. 1d). Since the pRicRNAi vector has a unique NcoI restriction site (Fig. 1a), Southern analysis allowed us to estimate the presence of two integrated copies of the Δ ricin cassette in the genome of the transgenic plants. DNA isolated from non-transformed plants did not hybridize with the probe (Fig. 1d).

It has been shown that intron-spliced constructs under control of the 35S CaMV promoter can induce silencing of endogenous genes in seed tissues with 90 to 100% efficiency^{25,26}. Our Northern blot analyses revealed that ricin transcripts were detected only in the endosperm of non-transgenic and negative-segregating seeds (Fig. 1e). mRNAs of several sizes were observed in non-transgenic seeds, probably due to the fact that 19 members of ricin/RCA₁₂₀ genes and pseudogenes containing the A-chain sequence were found in the castor bean genome. These fragments could vary from 0.8 to 1.7 kb²¹. In contrast, it was difficult to detect transcripts corresponding to ricin genes in the endosperm of transgenic seeds. Accordingly, siRNA molecules corresponding to ricin sequences were only observed in transgenic seeds (Fig. 1e). These results indicate that ricin members as well as RCA coding genes were effectively silenced.

ELISA was used to detect and quantify ricin in segregating seeds of the transgenic line TB14S-5D. The results showed that seeds from the cv. EBDA-MPA-34 (wild type) presented 20 ng ricin/ μ g of total protein. Segregating seed, which does not contain the transgenes, presented statistically similar quantities of ricin when compared to the control (non-transgenic plants). In contrast, ricin was not detectable in transgenic seeds (Fig. 2). Considering that the antibody raised against the ricin A-chain cross-reacts with its homologue RCA₁₂₀, our results suggested that both ricin and RCA₁₂₀ were silenced. This is expected because the ricin fragment used for the Δ ricin interfering cassette construction has 94% identity with the RCA₁₂₀ coding gene.

The hemagglutination assay was performed with total proteins isolated from the endosperm of transgenic and non-transgenic castor bean seeds. A strong hemagglutination was visible with proteins isolated from non-transgenic plants at the concentration of 2.5 μ g/ μ L of total protein and was evident until the concentration of 19 ng/ μ L of total protein (Fig. 3). In contrast, no visible hemagglutination activity was observed with proteins isolated from transgenic seeds, even at a higher protein concentration (approximately 131 times more concentrated). In addition, agglutination activity was not observed in cow blood cells incubated with PBS (blank). Purified RCA₁₂₀ presented strong hemagglutination activity until the lowest concentration of 0.39 ng/ μ L (Fig. 3). Ricin has been described as a weak hemagglutinin, whereas RCA₁₂₀ presents a strong hemagglutination activity²⁷. However, a characteristic hemagglutination activity (with a titer of 16) has been observed for one ricin isoform (ricin III)²⁸.

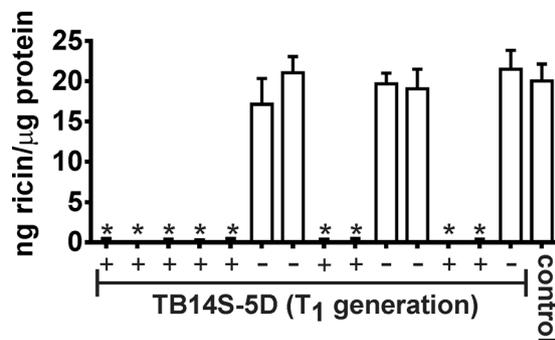


Figure 2. Detection of ricin in bio-detoxified event TB14S-5D. ELISA was used to detect and quantify ricin in the endosperm of castor bean seeds. Ricin was detected in non-transgenic seeds (control, wild type plants) and in the negative segregating seeds of the T₁ generation [marked with (-)]. However, ricin could not be detected in positive transgenic seeds [marked with (+)]. Asterisks represent significant differences compared to control ($P < 0.01$, $n = 9$).

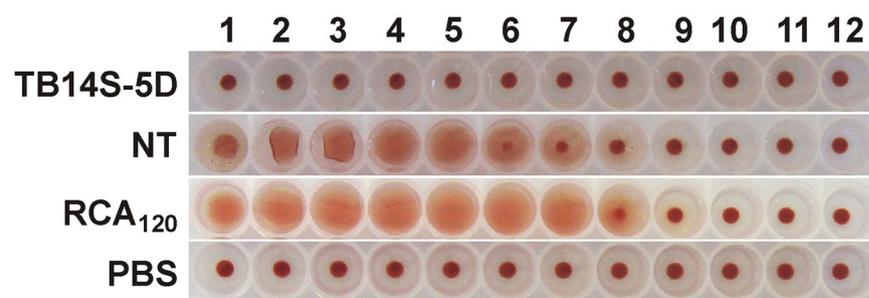


Figure 3. Proteins from transgenic event TB14S-5D do not agglutinate red blood cells. Proteins from transgenic (TB14S-5D) and non-transgenic (NT) seeds were tested for their capacity to hemagglutinate red blood cells (RBC, 2% suspension). Protein concentration was serially diluted by a ratio of 0.5 from wells 1 to 12, starting with 2.5 μg/μL. RCA₁₂₀ (starting with 0.1 μg/μL) was used as a positive control and PBS was a negative control. Agglutinated RBC formed a diffuse mat, whereas non-agglutinated RBC sediment formed a dot at the bottom of the well.

Nevertheless, the fact that no hemagglutination activity was observed with proteins from the transgenic line TB14S-5D confirms that both RCA₁₂₀ and ricin were efficiently silenced.

IEC-6 (rat intestine epithelial cells) were incubated for 24 h with total proteins isolated from seed endosperm of transgenic and non-transgenic plants. The viability of cells exposed to proteins isolated from non-transgenic plants, containing 1 and 10 ng ricin/mL, was reduced to 53% and 16%, respectively (Fig. 4a). However, cells exposed to the equivalent amount of proteins from the transgenic seeds maintained their viability at 97% (at 0.5 μg protein/mL) and 78% at the higher concentration of protein, at 50 μg protein/mL (Fig. 4a and Supplementary Fig. 1). There were no statistical differences between the viability values of 97% and 78%. These results were corroborated by the fact that protein synthesis was 40% and 90% inhibited by cells cultivated for 5 h with proteins from non-transgenic seeds containing 0.1 and 1 ng ricin/mL, respectively (Fig. 4b). However, no inhibition was observed in cells cultivated in the presence of the equivalent amount of proteins isolated from transgenic seeds, even at the highest total protein concentration (Fig. 4b).

Swiss Webster mice were treated with an intraperitoneal administration of ricin in order to measure ricin toxicosis (lethal challenge assay)²⁹. We performed ricin challenge by injecting mice with total proteins isolated from the event TB14S-5D and non-transgenic seeds. As expected, all animals that were submitted to intraperitoneal injection of 20 μg protein/g body weight from wild type seeds (552 μg ricin/kg body weight) died within the first period of 24 h (Fig. 5a). However, animals injected with the equivalent amounts of total proteins isolated from seeds of event TB14S-5D survived with no visible ricin toxicosis symptoms (diarrhea, weakness, low appetite, soft dark feces and weight loss). It has been suggested that the mechanism of death in mice, after systemic administration of ricin, could be marked by hypoglycemia²⁹. Indeed, a remarkable decrease was observed in blood glucose concentration in animals injected with proteins from non-transgenic seeds. However, there was no significant alteration in blood glucose of animals for a period of 60 h after injection with proteins from transgenic seeds (Fig. 5b). Animals were monitored for an additional period of seven days and no death was registered for those injected with proteins from event TB14S-5D.

Considering that the LD₅₀ values in the literature range from 2.4 to 36 μg/kg, the ricin dose administrated in the *in vivo* toxicity assay was from 15 to 230 times the LD₅₀ values for Swiss mice. Taking into consideration that the lethal dose for oral ingestion is approximately 1000-fold higher than by intraperitoneal injection, it is possible to predict that these animals would be able to consume up to 52% their body weight with TB14S-5D-derived

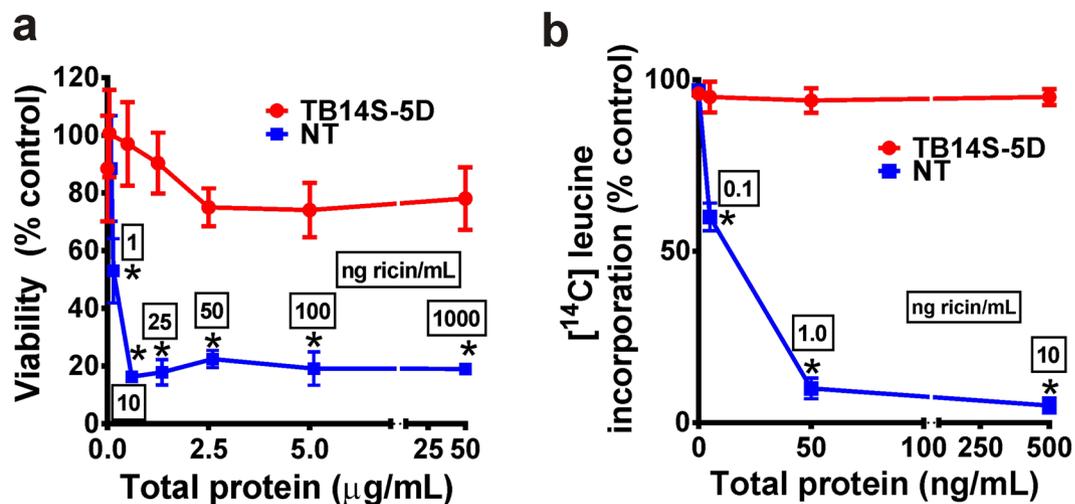


Figure 4. Toxicity performance of transgenic event TB14S-5D. (a) Rat small intestine epithelial cells (IEC-6) were incubated with proteins isolated from transgenic (TB14S-5D) and non-transgenic seeds (NT). In proteins from the non-transgenic seeds, 0 to 50.0 µg total protein/mL contained 0 to 1000 ng ricin/mL (numbers in boxes). There was no statistical difference between the values observed in the TB14S-5D viability curve. Values are expressed as number of viable cells as a percentage of control cells (cultivated only in the DMEM medium). $n = 9$. Asterisks represent significant statistical differences compared to control ($P < 0.01$). (b) Inhibition of protein synthesis was quantified in IEC-6 cells incubated with total proteins isolated from non-transgenic (NT) and transgenic TB14S-5D seeds. In proteins from the non-transgenic seeds, 0 to 500 ng total protein/mL, contained 0 to 10 ng ricin/mL (numbers in boxes). Data were expressed as the percentage of incorporated L-[^{14}C (U)]leucine into proteins of the IEC-6 cells relative to the control (cells incubated with DMEM medium). $n = 9$. Asterisks represent significant statistical differences compared to control ($P < 0.01$).

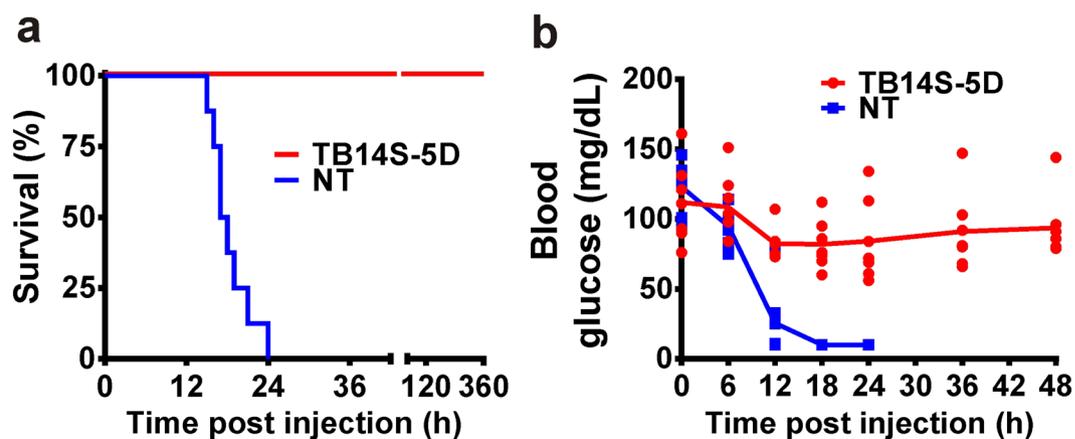


Figure 5. Ricin toxicosis (lethal challenge assay) evaluation in Swiss Webster mice. (a) Swiss albino mice were injected intraperitoneally with 100 µL of a solution of total protein extracted from non-transgenic (NT) seeds (20 µg protein/g body weight; 552 µg ricin/kg body weight) and the equivalent amount of protein (20 µg protein/g body weight) isolated from transgenic TB14S-5D seeds. Comparison of survival curves with log rank test yielded statistical significance of $P = 0.0145$, $n = 7$. (b) Effect of intraperitoneal administration of proteins from transgenic (TB14S-5D) and non-transgenic (NT) seeds on blood glucose concentration was evaluated for a period of 48 h. $n = 7$.

castor bean cake, without acute intoxication. Usually, cows, sheep and goats consume only 1 to 2% of their body weight per day with protein sources, such as soybean ingredients. Thus, castor bean cake would be an excellent source of protein in animal feedstuffs^{3,15}. Without toxic ricin and RCA₁₂₀, castor meal might be widely used as an alternative to corn and soybean meal, which are typically the main ingredients of cattle, poultry and swine diets. Indeed, long-term studies have evaluated the use of physically or chemically detoxified castor bean cake for feeding cows, chickens and sheep, and no adverse effects have been observed^{3,30–33}. Further studies should be carried out in order to determine the performance of the bio-detoxified castor bean cake in animal feeding.

A number of pieces of evidence support the idea that ricin plays a role in plant defense against pathogens and insects³⁴. Moreover, the differential expression patterns observed for the ricin type I and type II members during

seed development raised the hypothesis that ricin could have biological functions other than defense against predators³⁵. The bio-detoxified event TB14S-5D could be used to study the ecological role of ricin and RCA₁₂₀. Further studies should be carried out in order to determine the impact of ricin bio-detoxification of seeds on the cultivation of event TB14S-5D under field conditions.

Collectively, our results demonstrated that silencing ricin genes in castor bean seeds was effective and generated a bio-detoxified genotype. Castor bean can be cultivated under unfavorable environments (dry areas and impoverished soils), where farmers do not have many options, especially in a scenario of rising temperatures and reduced water sources. After oil extraction, the remaining processed material could be used as animal feed, due to its high nutritional value^{3,33,36}. The bio-detoxified line TB14S-5D will make castor bean cultivation, harvest and post-harvest processing much safer. In addition, it will reduce the probability that commercial cultivation might be used to produce bioweapons. This biotechnology will have a major impact on the cultivation of castor bean, a plant already adapted to suboptimal environments, with a consequent positive effect on manufacturing ricinoleic acid-based goods and livestock production.

Methods

RNAi construct. A fragment of 460 bp from *R. communis* ricin A chain gene (position 129 to 589; GenBank accession number DQ661048) was amplified by PCR using the primer pair RcRinR [5'-GAAGCTTGGTACCTAATTCTCGTGCGCAT-3; including the sites for HindIII and KpnI (underlined)] and RcRinf [5'-GTCTAGACTCGAGACATGAAATACCAGTGTTC-3; including the sites for XbaI and XhoI (underlined)]. PCR was carried out according to Bonfim *et al.*³⁷. The amplified fragment was cloned into the pGEMT-Easy vector and sequenced. The ricin A-chain gene fragment was excised from pGEMT-Easy with XhoI/KpnI and HindIII/XbaI and inserted into the pKannibal vector²⁶ interfering cassette (de novo synthesized by Epoch Life Science Inc., USA) in sense and antisense orientations, generating the ricin-interfering cassette (Δ ricin) (Fig. 1). The Δ ricin was transferred to the vector pAG1³⁸, generating the pRi cRNAi which was used to transform castor bean. pAG1 contained the *gus* gene under the control of the *act2* promoter and the mutated *ahas* gene that confers tolerance to imazapyr³⁸.

Castor bean transformation. For transformation, mature seeds (elite cv. EBDA-MPA-34) were surface sterilized in 2.5% sodium hypochlorite and 0.05% Tween 20 for 30 min, and then rinsed three times in sterile distilled water. Then, seeds were soaked in distilled water for 16 h. The embryonic axes were excised from the seed surface and sterilized with 0.5% sodium hypochlorite for 10 minutes. Embryos were transferred to shoot induction medium [SIM; MS medium containing 300 mg/L casein, 100 mg/L thiamine, 0.5 mg/L thidiazuron (TDZ), 0.05 mg/L indoleacetic acid (IAA), 3% sucrose and 1.4% agar (Sigma), pH 4.0]. After 48 h, the apical meristems were exposed by removing the primary leaves. Embryonic axes were cultivated for an additional 16 h in SIM, and apical meristems were bombarded with tungsten particle carrying the vector pRi cRNAi according to Rech *et al.*³⁹. After bombardment, embryonic axes were maintained in SIM for one day in the dark and 28 °C. Then, explants were transferred to SIM supplement with 100 mg/L *myo*-inositol and 150 nM imazapyr. After one week the explants were transferred to MS medium supplemented with 1 mg/L zeatin, 0.1 mg/L IAA, 300 mg/L casein, 100 mg/L thiamine, 100 mg/L *myo*-inositol, 150 nM imazapyr, 3% sucrose and 1.4% agar, pH 4.0. After 10 days, embryos were transferred to elongation medium (MS medium containing 1 mg/L IAA, 1 mg/L gibberellic acid (GA₃), 300 mg/L casein, 100 mg/L thiamine, 100 mg/L *myo*-inositol, 200 nM imazapyr, 3% sucrose and 1.4% agar, pH 4.0). As soon as the elongating shoots reached 2–3 cm in length, they were transferred to the rooting medium (MS medium supplemented with 1 mg/L indolebutyric acid (IBA), 5 μ M AgNO₃, 300 mg/L casein, 100 mg/L thiamine, 100 mg/L *myo*-inositol and 50 nM imazapyr, 3% sucrose and 1.4% agar, pH 4.0). Plantlets that reached 3–4 cm in length were acclimatized according to Rech *et al.*³⁹. Except when specified, explants were cultured at 26 °C with 16-h photoperiod (140 μ mol/m²/s).

Screening of transgenic plants by the GUS histochemical assay. The GUS histochemical assay was carried out using tissues from regenerating shoots, acclimated plants and their progenies (leaves, endosperms and embryonic axes), according to Jefferson *et al.*⁴⁰.

Progeny analysis. The analysis of the T₁ generation transformants was conducted by amplifying the introduced foreign genes (Δ ricin, *gus* and *ahas*) by PCR and by GUS histochemical assay analysis of leaves of plants pollinated by non-transgenic plants. PCR was carried out according to Bonfim *et al.*³⁷ using the primer pair AHASP124 (ACTAGAGATTCCAGCGTCAC)/AHAS500C (GTGGCTATACAGATACCTGG) to amplify 685 bp within the *ahas* gene, the primer pair GUS671C (ATCACGCAGTTCAACGCTGAC)/GUS251 (TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT) to amplify 421 bp within the *gus* gene, and the primer pair PSIUINTF (GAACCCAATTTCCCAACTG)/PSIUIINTR (AGGTACCCCAATTGGTAAAGGA) to amplify 798 bp within the Δ ricin cassette. Chi-square (χ^2) analyses were performed to determine whether the observed segregation ratio was consistent with a Mendelian ratio in the T₁ generation.

Southern blot analysis. Genomic DNA isolation and hybridization were carried out as previously described⁴¹. The hybridization was carried out using a PCR-generated probe (probe a; Fig. 1a), labeled with [α -³²P] dCTP (110 TBq/mol) using the DecaLabel DNA labeling kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. PCR was carried out according to Bonfim *et al.*³⁷ with the primer pair PSIUINTF/PSIUIINTR to amplify a 798 bp fragment corresponding to the *pdk* intron from the ricin-interfering cassette (Δ ricin).

RNA analysis. Total RNA (30 μ g) was isolated from endosperm of immature (50 days after pollination) seeds. RNA analyses were carried out according to Aragão *et al.*⁴². RNA was hybridized with a DNA probe corresponding to the 148 bp fragment PCR amplified using the primer pair Ric149RNAiF (GTAGCCGACCACATATGCATTG)/

RcRinf: (GAGACATGAAATACCAGTGTTC), within the A-chain ricin gene. Probes were labeled with ^{32}P dCTP using the DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Hybridization and post hybridization washes were conducted as described⁴³.

Quantification of ricin content. Quantification of ricin content in mature seeds was carried out using ELISA according to Baldoni *et al.*¹⁰. For protein extraction, 200 mg of tissue (endosperm) was ground in liquid nitrogen and vortexed in 600 μL of sample buffer (PBS) for 30 min at 4 °C. The mixture was centrifuged at 20,800 g for 60 min at 4 °C and the aqueous phase collected. Total protein was quantified using the Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). For ricin detection, goat antiserum (Santa Cruz Biotechnology) was used, raised against a peptide located at the N-terminus of the ricin precursor. A standard curve was produced using purified ricin A (Sigma, L9514). The limit of detection was determined as 80 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ total protein in the 50 μL -well. Absorbance was measured in a microplate reader (Bio-Rad) at 405 nm.

Hemagglutination assay. Hemagglutination assay was carried out in 96-well microtiter plates. Total proteins from endosperm of transgenic and non-transgenic seeds were isolated as previously described. Each well contained 50 μL phosphate-buffered saline (PBS) and 50 μL of RCA₁₂₀ were added (initial concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 50 μL total proteins isolated from transgenic and non-transgenic castor bean endosperm serially diluted (initial concentration of 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) and 50 μL PBS (blank). Fifty microliters of a 2% suspension (diluted in 0.15 M NaCl) of cow (*Bos indicus*) red blood cells were added to each well and gently mixed. Plates were incubated at room temperature for 2 h and results were recorded. The titer was expressed as the reciprocal of dilution factor of the last well showing hemagglutination activity. Samples were observed using an inverted microscope.

Cytotoxicity assay. IEC-6 (rat small intestine epithelial cells) were maintained at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Minimum Essential Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 4.5 g/L glucose, 5 mg/L insulin, 100 UI/L penicillin and 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ streptomycin. The cells were grown in 75 cm² vented tissue culture flasks. Culture medium was changed every three days. Cells were seeded on 24-well tissue culture plates, grown to confluence. Total protein isolated from endosperm of transgenic and non-transgenic seeds was added to the well to make the final concentration of ricin of 0, 1, 10, 25, 50 100 and 1,000 ng ricin/mL. Equivalent amounts of total proteins were used for the transgenic event TB14S-5D (0, 0.05, 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 and 50.0 μg total protein/mL). Cells were incubated for 24 h, and the number of viable cells was determined according to Cheah *et al.*⁴⁴. Data were expressed as number of viable cells as a percentage of control cells.

Protein synthesis inhibition assay. IEC-6 cells (2×10^4 cells/mL) in 100 μL Eagle's MEM medium were added to the wells of 96-well microtiter plates and incubated at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere. To each well was added total protein isolated from endosperm of non-transgenic (NT) seeds containing 0, 0.1, 1 and 10ng/mL ricin. Equivalent amounts of protein were used for transgenic event TB14S-5D (5, 50 and 500 ng total protein/mL). Plates were incubated for 5 h and pulsed for 2 h after addition of 50 μL of medium containing L-[¹⁴C(U)] leucine (0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, specific activity >300 mCi/mMole). After washing the cells in PBS followed by 5% TCA they were lysed in 0.5 M NaOH and the precipitate was collected. Paper filters were counted using a scintillation counter. Data were expressed as the percentage of incorporated L-[¹⁴C(U)]leucine relative to the control (cells cultivated in DMEM medium).

Acute toxicity assay. Healthy young adult outbred Swiss Webster mice (8 weeks old and weighing 30-45 g) obtained from the Laboratório de Pesquisas Biológicas (Instituto Federal Goiano, Brazil) were randomly allocated to treatment groups. All animals were housed in plastic cages (40 cm \times 30 cm \times 16 cm), in air-conditioned rooms at 22 \pm 2 °C and 50 \pm 10% of relative humidity, with a 12-hour light-dark natural cycle. Food (appropriate commercial rodent diet Nuvelab CR-1) and water were given *ad libitum*. Groups of seven animals were treated by intraperitoneal injection of 100 μL of total protein solution extracted from transgenic and non-transgenic castor bean seeds as previously described (20 μg protein/g body weight; 552 μg ricin/kg body weight). Doses were estimated based on previous studies performed to determine the maximum tolerated dose. For transgenic castor bean seeds the concentration of 20 μg protein/g body weight was considered. Mice were monitored for an additional period of seven days for signs of intoxication or death. Procedures were carried out following the international ethical principles for use of animals in testing and authorized by the Animal Experimentation Ethics Committee (CEUA-Instituto Federal Goiano; approval No. 2812220617). Blood glucose concentration was measured using a glucometer (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions.

Statistics. Data were expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. Differences were considered statistically significant with *P* values of <0.01 using two-way ANOVA and Tukey's multiple range test. Survival analyses of the Acute toxicity assay were performed using the log-rank (Mantel-Cox) test and Gehan-Breslow-Wilcoxon test (*P* value = 0.014). The GraphPad Prism Software (version 6.02) was used.

References

- Mutlu, H. & Meier, M. A. R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 10–30, <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900138> (2010).
- Patel, V. R., Dumancas, G. G., Viswanath, L. C. K., Maples, R. & Subong, B. J. J. Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid Insights* **9**, 1–12, <https://doi.org/10.4137/LPI.S40233> (2016).
- Severino, L. S. *et al.* A review on the challenges for increased production of castor. *Agron. J.* **104**, 853–880, <https://doi.org/10.2134/agronj2011.0210> (2012).
- Lappi, D. A., Kapmeyer, W., Beglau, J. M. & Kaplan, N. O. The disulfide bond connecting the chains of ricin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1096–1100 (1978).

5. Endo, Y. & Tsurugi, K. RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J. Biol. Chem.* **262**, 8128–8130 (1987).
6. Parikh, B. A., Tortora, A., Li, X. & Tumer, N. E. Ricin inhibits activation of the unfolded protein response by preventing splicing of the *HAC1 mRNA*. *J. Biol. Chem.* **283**, 6145–6153, <https://doi.org/10.1074/jbc.M707981200> (2008).
7. Olsnes, S., Fernandez-Puentes, C., Carrasco, L. & Vazquez, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. *Eur. J. Biochem.* **60**, 281–288 (1975).
8. Roberts, L. M., Lamb, F. I., Pappin, D. J. C. & Lord, J. M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. *J. Biol. Chem.* **260**, 15682–15686 (1985).
9. Harley, S. M. & Beevers, H. Lectins in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* **80**, 1–6 (1986).
10. Baldoni, A. B., Araújo, A. C. G., Carvalho, M. H., Gomes, A. C. M. M. & Aragão, F. J. L. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. *Int. J. Plant Biol.* **1:e12**, 61–65; <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e12> (2010).
11. Pinkerton, S. D., Rolfe, R., Auld, D. L., Ghetie, V. & Lauterbach, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. *Crop Sci.* **39**, 353–357 (1999).
12. Auld, D. L. *et al.* Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. *Crop Sci.* **43**, 746–747, <https://doi.org/10.2135/cropsci2003.746a> (2003).
13. Baldoni, A. B. *et al.* Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. *Pesq. Agropec. Bras.* **46**, 776–779, <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000700015> (2011).
14. Butterworth, A. G. & Lord, J. M. Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur. J. Biochem.* **137**, 57–65 (1983).
15. Worbs, S. *et al.* *Ricinus communis* intoxications in human and veterinary medicine – A summary of real cases. *Toxins* **3**, 1332–1372, <https://doi.org/10.3390/toxins3101332> (2011).
16. Bozza, W. P., Tolleson, W. H., Rosado, L. A. R. & Zhang, B. Ricin detection: tracking active toxin. *Biotechnol. Adv.* **33**, 117–123, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.11.012> (2015).
17. He, X., McMahon, S., Henderson, T. D. II, Griffey, S. M. & Cheng, L. W. Ricin toxicokinetics and its sensitive detection in mouse sera or feces using immuno-PCR. *PLoS One* **5**, e12858, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012858> (2010).
18. Musshoff, F. & Madea, B. Ricin poisoning and forensic toxicology. *Drug Test. Anal.* **1**, 184–191, <https://doi.org/10.1002/dta.27> (2009).
19. Madeira, J. V. Jr., Macedo, J. A. & Macedo, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresour. Technol.* **102**, 7343–7348, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.099> (2011).
20. Fernandes, K. V. *et al.* Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. *Bras. J. Med. Biol. Res.* **45**, 1002–1010, <https://doi.org/10.1590/S0100-879X201200750013> (2012).
21. Chan, A. P. *et al.* Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nat. Biotechnol.* **28**, 951–956, <https://doi.org/10.1038/nbt.1674> (2010).
22. Leshin, J. *et al.* Characterization of ricin toxin family members from *Ricinus communis*. *Toxicon* **55**, 658–661, <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.09.002> (2010).
23. Singh, A. S. *et al.* Role of conventional and biotechnological approaches in genetic improvement of castor (*Ricinus communis* L.). *Ind. Crops Prod.* **3**, 787–801, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.001> (2011).
24. Guo, Q., Liu, Q., Smith, N. A., Liang, G. & Wang, M. RNA Silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr. Genomics* **17**, 476–489, <https://doi.org/10.2174/1389202917666160520103117> (2016).
25. Nunes, A. C. S. *et al.* RNAi-mediated silencing of the myo-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPS1*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* **224**, 125–132, <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0201-0> (2006).
26. Wesley, S. V. *et al.* Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.* **27**, 581–590, <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01105.x> (2001).
27. Worbs, S. *et al.* Characterization of ricin and *R. communis* agglutinin reference materials. *Toxins* **7**, 4906–4934, <https://doi.org/10.3390/toxins7124856> (2015).
28. Sehgal, P., Khan, M., Kumar, O. & Vijayaraghavan, R. Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 3171–3176, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.015> (2010).
29. Pincus, S. H., Eng, L., Cooke, C. L. & Maddaloni, M. Identification of hypoglycemia in mice as a surrogate marker of ricin toxicosis. *Comp. Med.* **52**, 530–533 (2002).
30. Diniz, L. L. *et al.* Castor bean meal for cattle finishing: 1—Nutritional parameters. *Livest. Sci.* **135**, 153–167, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.07.001> (2011).
31. Vilhjalmsdottir, L. & Fisher, H. Castor bean meal as a protein source for chickens: Detoxification and determination of limiting amino acids. *J. Nutr.* **101**, 1185–1192 (1971).
32. Gionbelli, T. R. S. *et al.* Utilization of castor bean meal treated with calcium hydroxide, fed wet or dry, by lambs. *Livest. Sci.* **168**, 76–83, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.08.012> (2014).
33. Akande, T. O., Odunsi, A. A. & Akinfala, E. O. A review of nutritional and toxicological implications of castor bean (*Ricinus communis* L.) meal in animal feeding systems. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **100**, 201–210, <https://doi.org/10.1111/jpn.12360> (2016).
34. Lannoo, N. & Van Damme, E. J. M. Lectin domains at the frontier of plants. *Front. Plant Sci.* **5**, 397, <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00397> (2014).
35. Loss-Morais, G. *et al.* Analysis of castor bean ribosome-inactivating proteins and their gene expression during seed development. *Genet. Mol. Biol.* **36**, 74–86, <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000005> (2013).
36. Godoy, M. G. *et al.* Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. *Enzyme Microb. Technol.* **44**, 317–322, <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.01.002> (2009).
37. Bonfim, K., Faria, J. C., Nogueira, E. O. P. L., Mendes, E. A. & Aragão, F. J. L. RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol. Plant Microbe Interact.* **20**, 717–726, <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0717> (2007).
38. Aragão, F. J. L., Sarokin, L., Vianna, G. R. & Rech, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merril] plants at a high frequency. *Theor. Appl. Genet.* **101**, 1–6 (2000).
39. Rech, E. L., Vianna, G. R. & Aragão, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. *Nat. Protoc.* **3**, 410–418, <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.9> (2008).
40. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**, 3901–3907 (1987).
41. Lacorte, C., Vianna, G., Aragão, F. J. L. & Rech, E. L. Molecular Characterization of Genetically Manipulated Plants in *Plant Cell Culture: Essential Methods* (ed. Davey, M. R. & Anthony, P.) 261–279 (John Wiley & Sons, 2010).
42. Aragão, F. J. L., Nogueira, E. O. P. L., Tinoco, M. L. P. & Faria, J. C. Molecular characterization of the first commercial transgenic common bean immune to the *Bean golden mosaic virus*. *J. Biotechnol.* **166**, 42–50, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.04.009> (2013).

43. Yoo, B. C. *et al.* A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979–2000, <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023614> (2004).
44. Cheah, K. Y. *et al.* Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 382–390, <https://doi.org/10.4161/cbt.8.4.7453> (2009).

Acknowledgements

We thank Dr. Ariosvaldo N. Santiago (EBDA, Bahia, Brazil) for supplying castor bean seeds, Dr. Eduardo de O. Melo (Embrapa, Brazil) for help with the IEC-6 cells assay, Dr. Bianca Damiani for help with the hemagglutination assay, Laboratório de Pesquisas Biológicas (Instituto Federal Goiano) and Leticia da Silva Cardoso for support with animals. This work was supported by CNPq, Brazil (grant numbers 479848/2007-6 and 454692/2014-5). N. Sousa was supported by a fellowship from CAPES (Brazil).

Author Contributions

N.L.S. generated the transgenic lines and carried out the molecular and cellular studies, analyzed the data and drafted the manuscript. G.B.C. performed tissue culture experiments and molecular analyses. P.M.V. performed experiments with mice. A.B.B. generated constructions and collected preliminary data. F.J.L.A. conceived the study, performed research, analyzed the data and finalized the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15636-7>.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

6. DADOS ADICIONAIS

Os dados adicionais são referentes as transformações genéticas de mamona realizadas a fim de obter plantas transgênicas, uma das quais resultou na obtenção da linhagem transgênica (TB14S-5D), da qual o artigo “Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds” trata, além de ensaio de expressão do *gus* e toxicidade da linhagem com nematóides. São dados que não foram incluídos no artigo, mas considerados importantes para a Tese como um todo.

6.1. Material e métodos

Os experimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Engenharia Genética (LEG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

Todos os procedimentos de cultura de tecidos e transformação genética foram realizados em capela de fluxo laminar limpa e utilizando material estéril. As cultivares de mamona utilizadas nos experimentos foram a EBDA-MPA-11 e EBDA-MPA-34 fornecidas pela Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA). Os explantes, quando sob luz, foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas à temperatura de 25 °C (± 2 °C).

6.1.1. Construção de vetores para transformação genética de mamona

Os vetores utilizados para transformação genética de mamona foram baseados em vetores do tipo intro-hairpin desenvolvidos no LEG. As sequências intro-hairpin foram formadas com um fragmento do gene que codifica para a ricina (*ric*) em sentido senso e antissenso intercalado por um íntron, foi utilizada uma região de alta similaridade com a RCA₁₂₀, sob o controle do promotor do RNA 35S do *Cauliflower mosaic virus* duplicado seguido de uma sequência enhancer do *Alfalfa mosaic virus* (35SCaMV) e com um terminador do gene da octopina sintase (OCS) formando o cassete de transformação (Baldoni 2010) (Figura 7).

O cassete de transformação foi clonado para o sítio *NotI* no vetor pAGI que contém o gene repórter *gus* e o gene de seleção *ahas* de tolerância ao Imazapyr gerando

o vetor pRicRNAi durante trabalho desenvolvido anteriormente (Sousa 2013) (Figura 7). Para transformação via *Agrobacterium tumefaciens* o vetor foi sintetizado pela empresa Epoch Inc. (USA), chamado de pC3301-pRNAiRic, possui o cassete de transformação, o gene *gus* e o gene de seleção *bar* que confere tolerância ao glufosinato de amônio (Figura 7).

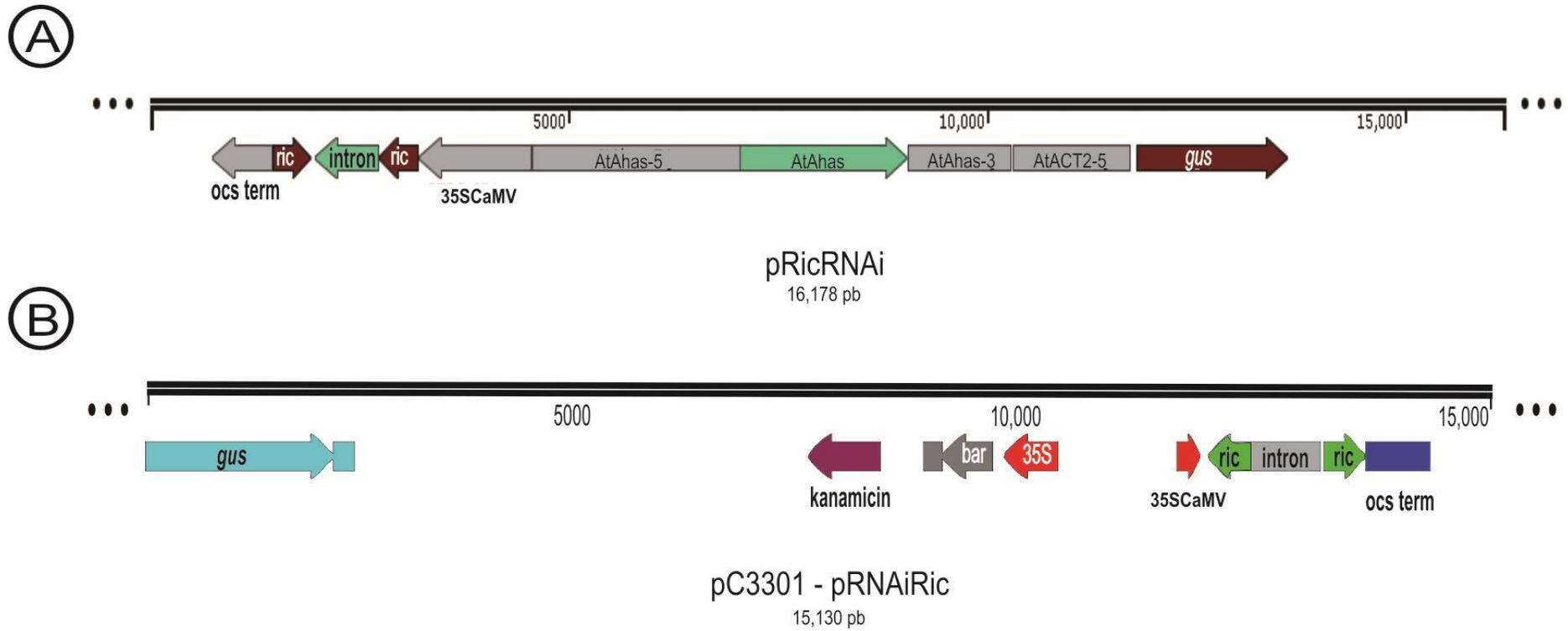


Figura 7. Construções utilizadas para transformação mamona. A: Vetor para biobalística pRicRNAi composto pelo cassette de transformação, um fragmento do gene da ricina (ric) em sentido senso e antisseno intercalado por um íntron, sob o controle do promotor 35SCaMV e terminador OCS, o gene *ahas* (*AtAhas*) e o gene *gus* sob domínio do promotor AtACT2. B: Vetor para transformação por *A. tumefaciens* composto pelo cassette de transformação igual o do vetor para biobalística, o gene *bar* sob domínio do promotor 35S, e o gene *gus*.

6.1.2. Preparo do material vegetal para transformação

O preparo do material vegetal para transformação genética e cultura de tecidos de mamona descrito a seguir foi estabelecido no LEG anteriormente (Sousa 2013) baseado em protocolos descritos (Rech *et al.*, 1998; Malathi *et al.*, 2006) e contém pequenas alterações.

Sementes de mamona saudáveis foram selecionadas e desinfestadas com uma lavagem em álcool 70% por 1 minuto, seguida de uma lavagem em hipoclorito de sódio 2% acrescido de Tween 20 (uma gota para cada 100 mL de solução) por 20 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas 4 vezes com água destilada e deixadas de molho por 24 horas.

Após o período, um alicate foi utilizado para quebra do tegumento das sementes e os embriões zigóticos foram retirados com auxílio de pinça e deixados em água para não desidratar. Os embriões foram lavados três vezes com água destilada, desinfestados em Hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos e lavados cinco vezes com água destilada. O excesso de água foi retirado e os embriões foram colocados em meio MII (Meio de Indução Inicial) (Tabela 1), no qual permaneceram por 48 horas em estufa a 28°C no escuro.

6.1.3. Transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens*

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* utilizada seguiu protocolo desenvolvido anteriormente no LEG (Sousa 2013) que baseou-se em protocolos existentes (Sujatha and Sailaja, 2005; Malathi *et al.*, 2006). Primeiramente a agrobactéria da linhagem EHA105 contendo o vetor pC3301-pRNAiRic foi inoculada em meio AB com os antibióticos necessários (rifampicina e canamicina) e cultivada por 3 dias no escuro a 28 °C.

As agrobactérias foram coletadas com uma espátula e colocadas em 15 mL de meio de cocultura líquido (CCL-agro) (Tabela 1) em um tubo falcon de 50 mL. A suspensão foi agitada fortemente em agitador do tipo vortex até apresentar aspecto homogêneo. A leitura da Densidade Ótica (DO) da suspensão bacteriana foi realizada

em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 600 nm e a DO foi ajustada para 0,5 utilizando o meio CCL-agro para diluição.

Os embriões zigóticos de mamona, retirados das sementes previamente, ficaram por 48 horas em meio MII antes da transformação. Logo, tiveram o meristema exposto cortando os cotilédones e os primórdios foliares, a ponta da radícula foi excisada e foram feitos danos na região meristemática com agulhas de acupuntura. Os embriões foram mantidos no meio de cocultura líquido (CCL-agro) até o término do preparo de todos. Em seguida, foram colocados na suspensão bacteriana e submetidos à sonicação por 5 minutos e vácuo por 30 minutos, foram secos e colocados sobre papel filtro no meio de cocultura sólido (CCS-agro) (Tabela 1) e foram mantidos no escuro por cinco dias a 20 °C.

Após a cocultura sólida os explantes foram transferidos para meio de manutenção de multibrotação (MMM-agro) (Tabela 1) por 15 dias. Então, os brotos foram separados das multibrotações formadas e transferidos para meio de alongamento de brotos (MAB-agro) (Tabela 1).

Para definir a concentração de herbicida que foi utilizada no meio foi realizada previamente uma curva de seleção para o Glufosinato de amônio (GA). Foram utilizados cinquenta embriões por concentração de herbicida que foram submetidos ao protocolo de transformação via *A. tumefaciens*, mas não foram inoculados com agrobactéria. Estes foram então colocados no meio MMM-agro com diferentes concentrações de GA (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 mg/L) e observados. A dosagem de GA foi escolhida com base na observação da resposta dos embriões.

Tabela 1: Composição dos meios utilizados na transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

	Meio de Indução Inicial-agro (MII- agro)	Meio de Cocultura Líquida (CCL-agro)	Meio de Cocultura Sólida (CCS-agro)	Meio de Manutenção de Multibrotação (MMM-agro)	Meio de Alongamento de Brotos (MAB-agro)
Meio MS (Murashige and Skoog basal medium – Sigma M5519)	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L
Sacarose	3%	3%	3%	3%	3%
Inositol	-	-	-	100 mg/L	100 mg/L
Caseína	300 mg/L	-	-	300 mg/L	300 mg/L
Tiamina	100 mg/L	-	-	100 mg/L	100 mg/L
Ágar	1,4%	-	1,4%	1,4%	1,4%
Fitigel	-	-	-	-	-
pH	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Ácido giberélico	-	-	-	-	1 mg/L
Acetoseríngona	-	200 µM	200 µM	-	-
Ácido indol-butírico	0,05 mg/L	-	-	0,1 mg/L	1 mg/L
Nitrato de prata	-	-	-	-	5 mg/L
Glufosinato de amônio	-	-	-	5/8 mg/L	5 ou 8 mg/L
Thidiazuron	0,5 mg/L	0,5 mg/L	0,5 mg/L	-	-
Zeatina	-	-	-	1 mg/L	-
Período no meio	2 dias	Até 30 minutos	5 dias	15 dias	Até a formação de brotos alongados

6.1.4. Transformação por biobalística

O protocolo de transformação por biobalística utilizado, descrito a seguir, foi desenvolvido anteriormente (Sousa 2013) e contém pequenas alterações.

Os embriões zigóticos de mamona retirados das sementes foram cultivados em meio MII por 48 horas, e tiveram o meristema exposto ao se retirar os cotilédones e os primórdios foliares com auxílio de um bisturi para serem submetidos à transformação por biobalística. Alguns permaneceram em meio MII por um período adicional de 24 horas após a exposição do meristema, antes de serem submetidos à transformação.

Os embriões com meristema exposto foram posicionados em meio de bombardeamento (MB) (Tabela 2) de forma que o meristema se encontrasse posicionado para cima, e bombardeados (Rech *et al.*, 1998).

Em seguida a transformação, os embriões foram colocados em meio MII (Tabela 2) e após 24 horas foram transferidos para meio de indução e seleção (MIS) (Tabela 2) onde permaneceram por sete dias. Após esse período passaram para meio de manutenção de multibrotação (MMM) (Tabela 2) e permaneceram por 15 dias. Logo, os brotos foram separados das multibrotações geradas e transferidos para meio de alongamento de brotos (MAB) (Tabela 2) e mantidos até o aparecimento de explantes bem estruturados e alongados com cerca de 2-3 cm. Estes foram transferidos para meio de enraizamento (ME) (Tabela 2) e analisados por teste histoquímico do *gus* (Lacorte 1998). Logo que enraizaram, e com cerca de 3-4 cm as plântulas foram aclimatadas em casa de vegetação.

As plantas geradas produziram sementes que foram colhidas e guardadas em geladeira. Sementes da linhagem TB14S-5D e planta não transgênica (NT) tiveram o tegumento retirado, o endosperma foi utilizado para ensaio com nematóides e os embriões foram desinfestados com uma lavagem em hipoclorito 0,5% por 10 minutos e três lavagens em água destilada, cultivados em meio Gamborg's (Sigma G5893) com sacarose 3%, ágar 0,7% e pH 5,8. Após o desenvolvimento e enraizamento as plântulas foram aclimatadas para produção de sementes.

Tabela 2. Composição dos meios utilizados na transformação por biobalística.

	Meio de Indução Inicial (MII)	Meio de Bombardeamento (MB)	Meio de Indução e Seleção (MIS)	Meio de Manutenção de Multibrotações (MMM)	Meio de Alonamento de Brotos (MAB)	Meio de Enraizamento (ME)
Meio MS (Murashige and Skoog basal medium – Sigma M5519)	4,4 g/L	2,2 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	4,4 g/L	-
Sais de MS (Murashige and Skoog basal salt mixture – Sigma M5524)	-	-	-	-	-	0,5x
Vitaminas MS (Murashige and Skoog vitamin powder – Sigma M7150)	-	-	-	-	-	1x
Sacarose	3%	3%	3%	3%	3%	2%
Inositol	-	-	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Caseína	300 mg/L	-	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L	300 mg/L
Tiamina	100 mg/L	-	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L	100 mg/L
Ágar	1,4%	-	1,4%	1,4%	1,4%	1,4%
Fitagel	-	0,8%	-	-	-	-
pH	4,0	5,8	4,0	4,0	4,0	4,0
Ácido giberélico	-	-	-	-	1 mg/L	0,5 mg/L
Ácido indol-butirico	0,05 mg/L	-	0,05 mg/L	0,1 mg/L	1 mg/L	2 mg/L
Nitrato de prata	-	-	-	-	5 mg/L	5 µM
Imazapyr	-	-	100 ou 150 nM	150 ou 200 nM	200 a 250nM	-
Thidiazuron	0,5 mg/L	-	0,5 mg/L	-	-	-
Zeatina	-	-	-	1 mg/L	-	-
Período no meio	3 a 4 dias	Até 8 horas	7 dias	15 dias	-	-

6.1.5. Análise das plantas regeneradas

As plantas regeneradas foram analisadas pelo ensaio histoquímico do *gus* para observação da expressão do gene. Amostras dos tecidos foram retiradas e colocadas em solução de X-gluc (X-Gluc 500 mg.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0.05 M e Triton X-100 30%) a 37 °C por 12 horas. Após o período de incubação as amostras foram colocadas em álcool 70% para preservação e verificou-se a presença ou ausência de coloração azul indicativa da presença do transgenes (Lacorte 1998).

6.1.6. Ensaio com nematoides

Para avaliar a toxicidade das sementes da linhagem transgênica TB14S-5D em nematoides foi realizado ensaio com cultura de *Caenorhabditis elegans*, pois é um modelo bem estabelecido e muito utilizado para ensaios de toxidez (Katiki *et al.*, 2011; Hunt 2017). A estirpe utilizada (N2) e o meio de cultivo foram cedidos pela Dra. Rose Monnerat. Os nematoides foram cultivados em placa estéril de 24 poços contendo meio nutritivo (MN) (3% de levedura, 3% de peptona de soja, 1% de glucose, 12,5 mg/L de colesterol e 500 mg/L de hemoglobina) a 21 °C sob fotoperíodo de 12 horas (Katiki *et al.*, 2011). Os nematoides foram repicados em nova placa semanalmente adicionando 100 µL da cultura em 500 µL de meio MN novo.

Para a realização dos ensaios com extrato de proteína, o estágio dos nematoides foi padronizado (adultos e jovens adultos) seguindo protocolo descrito (Katiki *et al.*, 2011) com pequenas alterações. Após 5 dias da repicagem dos nematoides, 5 mL da cultura foram colocados em tubo falcon de 50 mL e o volume ajustado com água destilada. O tubo foi mantido imóvel por 5 minutos para que os indivíduos maiores descessem para o fundo enquanto grande parte dos menores permaneceram na parte de cima do tubo que foi descartada deixando um volume de cerca de 2 mL. Foram adicionados 10 mL de água e a suspensão de nematoides foi passada por duas peneiras para selecionar os estágios desejados. Primeiramente por uma peneira de 38 µm para reter os indivíduos maiores, foram feitas 3 lavagens com água para que todos os indivíduos menores fossem retirados. Em sequência os indivíduos retidos foram recuperados e passaram por uma peneira de 53 µm que permitiu a passagem dos indivíduos adultos e jovens adultos e reteve os indivíduos mortos. Os indivíduos jovens

adultos e adultos foram recuperados novamente em uma peneira de 38 μm , ressuspensos em 10 mL de meio MN e aliqotados, 250 μL por poço, em placa de 24 poços.

Para o ensaio de toxidez, o extrato proteico de sementes transgênicas da linhagem TB14S-5D e de sementes não transgênicas foi obtido e quantificado de acordo com Baldoni *et al.* (2011). A concentração de proteína total utilizada no ensaio foi de 8 mg/mL que equivale na planta controle a uma concentração de 160 $\mu\text{g/mL}$ de ricina. O ensaio foi realizado na placa de 24 poços contendo os nematoides selecionados onde foram adicionadas as amostras [proteínas totais da planta transgênica (TB14S-5D); proteínas totais da planta não transgênica; controle com tampão de extração das proteínas (PBS); e controle com apenas meio MN]. Foram realizadas três repetições de cada amostra e os nematoides vivos e mortos foram contados por um período de 7 dias.

6.2. Resultados

6.2.1. Transformação via *Agrobacterium tumefaciens*

A curva de seleção para o herbicida Glufosinato de amônio foi realizada utilizando 50 embriões por concentração do herbicida (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 mg/L) passando pelo mesmo processo de cultura de tecidos exceto pela inoculação da agrobactéria. Após 15 dias de cultivo todos os explantes morreram dos meios com concentração igual ou superior a 5 mg/L, enquanto no meio sem herbicida nenhum morreu e na concentração de 2,5 mg/L morreram 27. Então, as concentrações de glufosinato de amônio iniciais escolhidas foram de 5 ou 8 mg/L.

A transformação genética via *Agrobacterium tumefaciens* não ocorreu como esperado. Dois tratamentos foram realizados com concentrações diferentes do agente seletivo, sendo que nas concentrações de 5 ou de 8 mg/L todos os explantes morreram após a segunda repicagem em meio MAB-agro (Tabela 3).

Vários brotos começaram a alongar, mas logo amarelaram e morreram. Em cada tratamento, 10 multibrotações foram retiradas na segunda repicagem no meio MAB-agro e analisadas por ensaio histoquímico do gene *gus*, mas mostraram baixa expressão do gene (Tabela 3 e Figura 8).

Tabela 3. Diferenças nos tratamentos de cultura de tecidos do protocolo de transformação por *Agrobacterium tumefaciens*.

	Tratamento agro-1	Tratamento agro-2
Concentração de GA (MMM-agro)	5 mg/L	8 mg/L
Concentração de GA(MAB-agro)	5 mg/L	8 mg/L
Nº de embriões submetidos à transformação	115	152
Nº de explantes transgênicos obtidos	0	0

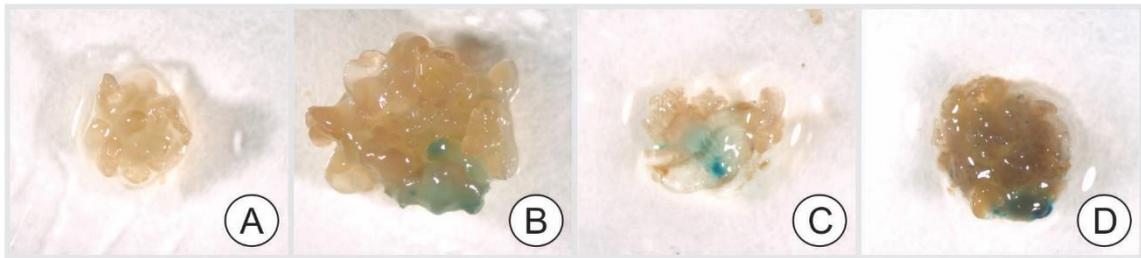


Figura 8. Expressão do gene *gus* em explantes, submetidos à transformação por *Agrobacterium tumefaciens*, da segunda repicagem no meio de elongação mostrando a baixa expressão do *gus*. A: Controle (explante não submetido à transformação); B: Explante transgênico do Tratamento agro 1; C e D: Explantes transgênicos do Tratamento agro 2.

6.2.2. Transformação por biobalística

Cinco tratamentos diferentes de cultura de tecidos foram realizados para obtenção de plantas geneticamente modificadas via biobalística com o vetor pRicRNAi, porém apenas dois resultaram em multibrotações positivas para o *gus*, o Tratamento D e E (Tabela 4). Os tratamentos variaram quanto ao tempo de pré-indução das multibrotações com TDZ, o dia de exposição do meristema e as concentrações de imazapyr nos meios como pode ser observado na Tabela 4.

Quatro multibrotações foram obtidas expressando o gene *gus* no Tratamento D e 3 no Tratamento E (Tabela 4). Em algumas destas multibrotações foi possível analisar a base do explante e observar o padrão de expressão do gene (Figura 9). Todas as multibrotações iniciais apresentaram um padrão de mosaico (partes transgênicas e partes não transgênicas). A maioria apresentou apenas a epiderme transgênica como pode ser observado nas multibrotações TB14S-4 e TB15-1 (Figura 9 C e D respectivamente). E duas multibrotações TB14S-2 e TB14S-5 apresentaram, além da epiderme, uma região do córtex transgênica (Figura 9 A e C respectivamente).

As multibrotações obtidas foram separadas em brotos, e colocadas em meio ME, gerando um total de 29 brotos, 18 brotos do Tratamento D e 11 do Tratamento E, sendo que destes brotos apenas 7 e 4 respectivamente eram transgênicos (Tabela 5 e Figura 10). A maioria destes brotos apresentou padrão de mosaico com apenas a epiderme transgênica. Somente dois brotos o TB14S-5D e o TB14S-5K (Figuras 10 F e G respectivamente) apresentaram todos os tecidos transgênicos (Figura 9B), ambos provenientes da mesma multibrotação TB14S-5 (Figura 9B). Dos explantes

transgênicos obtidos, somente EBDA-3 [obtido por Sousa (2013)], TB14S-5A, TB14S-5D, TB14S-2A, TB14S-4A e TB15- 2A enraizaram e foram aclimatados. Contudo, as plantas com padrão de transgenia apenas da epiderme, como a planta EBDA-3 (Figura 11A), não passaram os transgenes para a progênie, sendo que apenas a planta totalmente transgênica, TB14S-5D (Figura 11B), transferiu os transgenes para a geração T₁.

Tabela 4. Diferentes tratamentos realizados durante a cultura de tecidos das transformações via biobalística.

	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C	Tratamento D	Tratamento E
Cultivar	EBDA-MPA-11	EBDA-MPA-34	EBDA-MPA-34	EBDA-MPA-34	EBDA-MPA-34
Indução (MII) antes da transformação	2 dias	3 dias	3 dias	3 dias	2 dias
Exposição do meristema	No dia da transformação	1 dia antes da transformação	1 dia antes da transformação	1 dia antes da transformação	No dia da transformação
Indução (MII) após a transformação	6 dias	6 dias	1 dia	1 dia	1 dia
Concentração de IMZ (MIS)	100 nM*	100 nM*	100 nM	150 nM	100 nM
Concentração de IMZ (MMM)	200 nM*	250 nM*	150 nM	150 nM	200 nM
Concentração de IMZ (MAB)	250 nM	250 nM	200 nM	200 nM	200 nM
Nº de embriões submetidos a transformação	400	1100	900	270	880
Nº de explantes transgênicos positivos para <i>gus</i>	0	0	0	4	3
Eficiência	-	-	-	1,48%	0,34%

* meios sem TDZ/zeatina e com BAP 0,5 mg/L.

Tabela 5. Número de brotos produzidos em cada multibrotação transgênica obtida por biobalística em cada tratamento.

	Multibrotação transgênicas	Número de brotos	Total de brotos	Número de brotos transgênicos
Tratamento D	TB14S-2	3	18	2
	TB14S-4	1		1
	TB14S-5	12		3
	TB14S-6	2		1
Tratamento E	TB15-1	3	11	2
	TB15-2	3		1
	TB15-3	5		1

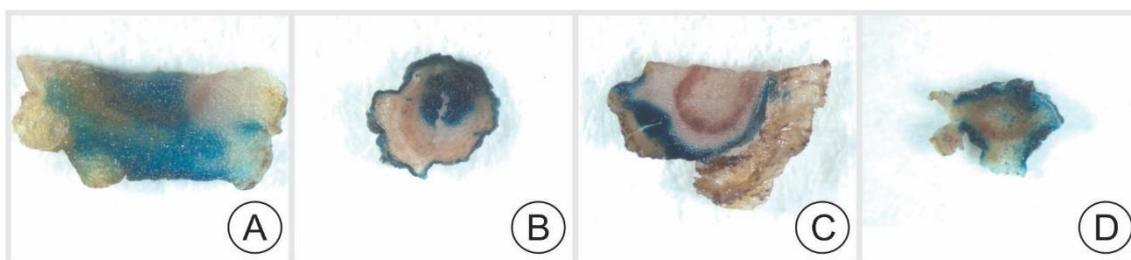


Figura 9. Ensaio histoquímico do *gus* em corte transversal da base de multibrotações transgênicas de mamona mostrando o padrão mosaico com partes transgênicas em azul. A: Multibrotação TB14S-2; B: Multibrotação TB14S-5; C: Multibrotação TB14S-4; D: Multibrotação TB15-1.

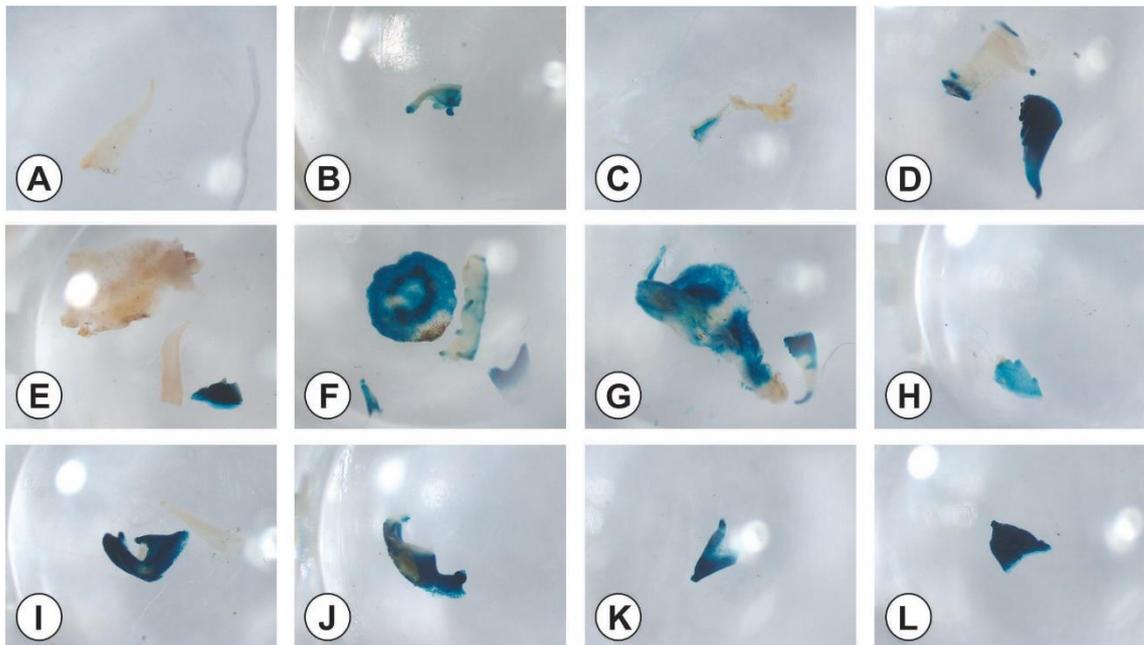


Figura 10. Teste histoquímico do *gus* em folhas ou na base de explantes provenientes das multibrotações transgênicas, que evidencia os tecidos transgênicos em azul. A: Pedaco de folha de explante não transgênico; B: Pedaco de folha do explante TB14S- 2A; C: Pedaco de folha do explante TB14S- 2B; D: Pedaco de folha do explante TB14S- 4A; E: Pedaco de folha do explante TB14S- 5A; F: Pedaco de folha e corte transversal da base do explante TB14S- 5D; G: Pedaco de folha e corte transversal da base do explante TB14S- 5K; H: Pedaco de folha do explante TB14S- 6A; I: Pedaco de folha do explante TB15- 1B; J: Pedaco de folha do explante TB15- 1C; K: Pedaco de folha do explante TB15- 2A; L: Pedaco de folha do explante TB15- 3A.

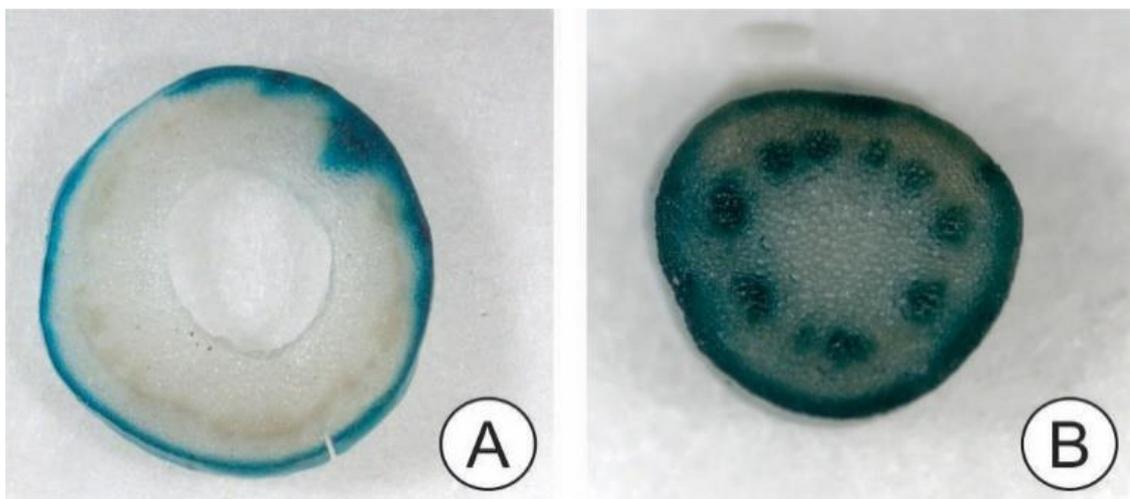


Figura 11. Teste histoquímico do *gus* em corte transversal de pecíolo de plantas transgênicas obtidas, que evidencia os tecidos transgênicos em azul. A: Planta EBDA-3 que apresenta padrão de mosaico, com apenas a epiderme transgênica; B: Planta TB14S-5D com todos os tecidos transgênicos.

6.2.3. Ensaio com nematoides

O ensaio para testar a toxicidade de proteínas isoladas de sementes da planta transgênica TB14S-5D em nematoides não apresentou resultados satisfatórios. Não houve morte de nematóides em nenhum dos tratamentos realizados, inclusive no tratamento utilizando extrato protéico proveniente de planta não transgênica (contendo ricina) onde era esperado que houvesse morte dos indivíduos. Os resultados sugerem que *C. elegans* não é sensível à ricina quando presente em meio nutritivo.

6.3. Discussão

A transformação genética de mamona é uma área em desenvolvimento que ainda apresenta poucos trabalhos publicados e ausência de protocolos estabelecidos. A maioria dos trabalhos existentes até o momento foi realizada na Índia e utilizando uma mesma cultivar, a Jyoti (Sujatha and Sailaja, 2005; Malathi *et al.*, 2006; Sailaja *et al.*, 2008).

Na transformação via *A. tumefaciens* vários brotos alongaram, mas nenhum sobreviveu à seleção de 5 ou 8 mg/L. Malathi *et al.* (2006) em seu protocolo de transformação também utilizou glufosinato de amônio como agente seletivo nas concentrações de 6 e 8 mg/L, para induzir multibrotação utilizou BAP e cinetina e obteve plantas transgênicas com eficiência de 0,42%. No presente trabalho foi utilizado o TDZ para induzir multibrotação, pois em estudo prévio (Sousa 2013) foi observado que este foi melhor para formação de multibrotações na cultivar EBDA-MPA-34 e a concentração de agente seletivo foi determinada de acordo com o resultado de um ensaio de curva de seleção. Visto que a eficiência de transformação é baixa, devem ser realizadas mais transformações com um maior número de explantes, pois no presente trabalho apenas 267 embriões foram submetidos à transformação enquanto Malathi *et al.* (2006) transformaram 5000 embriões e obtiveram 21 plantas transgênicas.

O protocolo de transformação por biobalística estabelecido pelo LEG (Sousa 2013) e modificado neste trabalho mostrou uma boa eficiência (1,4%) (Tabela 5) sendo igual ao obtido por Sailaja *et al.* (2008). Porém, este protocolo ainda deve ser repetido devido ao baixo número de indivíduos submetidos à transformação (270) (Tabela 5) para maior confiabilidade dos resultados. Além disso, quase todas as linhagens geradas apresentaram padrão de mosaico, exceto a linhagem TB14S-5D.

O mosaicismo é uma ocorrência comum na transformação por biobalística devido à transformação de apenas algumas células que podem ser selecionadas e regenerar em plantas, bem como pode ocorrer de células não transformadas se desenvolverem em conjunto gerando o padrão de mosaico (Szymkowiak 1996). Este fenômeno tem sido relatado em soja e algodão (McCabe *et al.*, 1988; Christou *et al.*, 1989; Christou and McCabe, 1992; Aragão *et al.*, 2005; Aragão *et al.*, 2000), e ocorre com mais frequência em sistemas de transformação de meristema apical, que é uma região de células embrionárias que dará origem a novos tecidos. Pois, essa região

contém camadas diferentes que originarão partes diferentes durante a diferenciação dos tecidos, as camadas L1 (que gera tecido epitelial), L2 e L3 (que geram os tecidos mais internos) (Steeves and Sussex, 1989). Desta maneira, quando a transformação genética ocorre apenas na camada L1 são geradas plantas com padrão de mosaicismo, onde apenas a epiderme é transgênica e quando a transformação atinge as camadas mais internas do meristema, L2 e L3, toda a planta é transgênica. Sendo assim, plantas mosaico com apenas a epiderme transgênica não passam os transgenes para a progênie e isso ocorre porque os gametófitos não são produzidos pela camada L1 (Geiser 2012; Aida *et al.*, 2016). A partir disso, é possível sugerir que no presente trabalho ocorreu apenas a transformação da camada L1 em plantas com apenas a epiderme transgênica (Figura 11A), e na linhagem TB14S-5D (Figura 11B) com todos os tecidos transgênicos ocorreu a transformação de todas as camadas (L1, L2 e L3). Isso corrobora o fato das plantas mosaico (Figura 11A) não terem passado os transgenes para a progênie enquanto a TB14S-5D (Figura 11B) foi única linhagem que transferiu os transgenes para a geração T₁.

Para avaliar a toxicidade das sementes transgênicas da linhagem TB14S-5D foi realizado o ensaio com o nematoide *C. elegans*. Os resultados obtidos não corroboraram com aqueles obtidos em células IEC e em camundongos. De fato, era esperado que a administração do extrato de proteína da planta não transgênica resultasse na morte dos nematoides, devido à presença de ricina, o que não ocorreu. Em 2003 Borgonie *et al.* relataram a possivelmente a resistência à administração oral da ricina em *C. elegans* e isso pode estar relacionado com o fato da proteína ser encontrada somente nos lisossomos e não ser localizada no RE dos nematoides após administração oral da proteína. Além disso, o dano nos nematoides apenas foi observado ao injetar ricina nas gônadas, tornando-os inférteis. Isso elucidada a provável causa do insucesso do ensaio de toxidez realizado com *C. elegans*.

A linhagem de mamona biodetoxificada obtida viabilizará a utilização e o aproveitamento de todos os produtos da planta do modo mais sustentável possível. A redução da toxicidade possibilitará o cultivo desta espécie em condições de biossegurança satisfatórias, incluindo na região Nordeste. Por ser muito tolerante à seca pode ser cultivada no semiárido para venda do óleo e seus subprodutos poderão ser aproveitados como ração animal em um contexto de utilização de terras marginais e de limitação de água e energia gasta nos processos de irrigação e drenagem. O setor

agroindustrial terá à disposição um produto de melhor qualidade que pode ser processado em larga escala, com baixos impactos para o meio ambiente e para a saúde humana e animal. Esta linhagem será a base para o desenvolvimento de tecnologias de cultivo de mamona de forma mais racional e segura.

6.4. Linha do tempo

2007 – Aprovação de projeto no Programa de Ciência e Tecnologia Para o Agronegócio (CT Agronegócio – CNPq).

2007 – Construções do tipo intron-hairpin para transformação genética de mamona.

2010 – Publicação do artigo “Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development” (International Journal of Plant Biology).

2010 – Estabelecimento de um sistema de regeneração e transformação de mamona.

2010 – Defesa da tese e doutorado “Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas” - Aisy Botega Baldoni (Biologia Molecular, UnB).

2011 – Publicação do artigo “Variability of ricin content in mature seeds of castor bean” (Pesquisa Agropecuária Brasileira).

2013 – Defesa da dissertação de mestrado “Desenvolvimento de Sistemas Para Transformação Genética de Mamona (*Ricinus communis* L.) – As Bases Para O Silenciamento da Ricina” - Natália Lima de Sousa (Botânica, UnB).

2015 – Obtenção do evento TB14S-5D. Planta estabelecida *in vitro*.

2016 – Enraizamento *in vitro* e aclimação em casa de vegetação do evento TB14S-5D

2017 – Obtenção da progênie do evento TB14S-5D. Caracterização molecular e biológica do evento TB14S-5D.

2017 – Publicação do artigo “Bio-detoxification of ricin in castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds” (Scientific Reports).

2017 – Defesa da tese de doutorado “Biodetoxificação de Sementes de Mamona (*Ricinus communis* L.) Mediante Silenciamento Gênico da Ricina” Natália Lima de Sousa (Biotecnologia e Biodiversidade, UnB).

7. CONCLUSÕES GERAIS

- A transformação via *Agrobacterium tumefaciens* não foi eficiente e não gerou linhagens transgênicas. Porém, isso pode ter ocorrido devido ao baixo número de explantes transformados;
- A metodologia de biobalística adaptada utilizada permitiu a obtenção de plantas transgênicas de mamona a uma eficiência de 1,4%;
- Plantas com apenas a epiderme transformada não transferiram os transgenes para a progênie;
- A planta biodetoxificada gerada TB14S-5D não apresentou níveis detectáveis de ricina ou RCA₁₂₀ por ELISA, e não aglutinou hemácias no ensaio de hemaglutinação;
- Teste de toxicidade de mamona em *C. elegans* utilizando extrato proteico por administração oral não foi bem-sucedida devido a sua possível resistência á administração de ricina via oral;
- Em ensaio com células IEC-6 e camundongos a TB14S-5D não se mostrou tóxica. Em camundongos, os ensaios de toxicidade mostraram segurança para o consumo de grãos da linhagem TB14S-5D, estimando-se que os animais poderiam ingerir cerca de 50% do seu peso sem que efeitos adversos ocorressem;
- Os resultados obtidos demonstraram que houve o silenciamento da ricina e RCA₁₂₀ nas sementes demonstrando a segurança na sua utilização na alimentação animal.

8. PERSPECTIVAS

A mamona é uma planta bastante tolerante a estresses abióticos e costuma ser cultivada em locais onde os produtores têm poucas opções, principalmente onde o clima tem altas temperaturas e pouca água. A mamona biodetoxificada permitirá o seu manuseio seguro durante a colheita e processamento. Após a extração do óleo, a torta poderá ser utilizada na alimentação animal gerando uma renda extra ao produtor. Porém, para que a mamona transgênica possa chegar ao mercado, ainda faltam muitos passos tais como a continuação das análises moleculares e de biossegurança. São necessários ensaios moleculares mais robustos e análise das próximas gerações da linhagem transgênica.

É importante que ensaios sejam realizados com animais de médio porte (como cabras e ovelhas) para se determinar o potencial dessa tecnologia na produção animal (ganho de peso, lactação, comportamento, reprodução etc.).

Também poderá ser realizada a imunolocalização da ricina durante o desenvolvimento da semente como em trabalho publicado pelo grupo anteriormente (Baldoni *et al.*, 2010) a fim de observar e comparar a linhagem transgênica silenciada com a planta convencional. Em paralelo, planeja-se construir um vetor com a estratégia CRISPR para editar os genes que codificam para a ricina.

Como ocorre em outras lectinas, acredita-se que a ricina desempenhe um papel de defesa contra predação (Barnes *et al.*, 2009; Lannoo and Van Damme, 2014). Portanto será possível realizar ensaios e comparar a predação e suscetibilidade a patógenos entre a planta biodetoxificada e plantas não transgênicas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal R, Aggarwal H, Chugh PK (2017) Medical management of ricin poisoning. *J Med Allied Sci* 7:82-86.
- Aida R, Katsutomo S, Norihiro O (2016) Production of chrysanthemum periclinal chimeras through shoot regeneration from leaf explants. *Plant Biotechnol* 33:45-49.
- APG III (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc* 161:105-121.
- Aragão FJL, Figueiredo AS (2008) RNA interference as a tool for plant biochemical and physiological studies. *In: Rivera-Domínguez M, Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernandez ME (eds). A Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology. Research Signpost, Kerala, IND, 17-50.*
- Aragão FJL, Sarokin L, Vianna GR, Rech EL (2000) Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. *Theor Appl Genet* 101:1-6.
- Aragão FJL, Vianna GR, Carvalheira SBRC, Rech EL (2005) Germ line genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by selection of transgenic meristematic cells with a herbicide molecule. *Plant Sci* 168:1227-1233.
- Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J (2005) Ricin poisoning: A comprehensive review. *JAMA* 294:2342-2351.
- Auld DL, Pinkerton SD, Boroda E, Lombard KA, Murphy CK, Lowery CC, Kenworthy KE, Becker WD, Rolfe RD, Ghetie V (2003) Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA₁₂₀. *Crop Sci* 43:746-747.
- Baldoni A, Carvalho MH, Sousa NL, Nóbrega MBM, Milani M, Aragão FJL (2011) Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. *Pesq Agropec Bras* 47:776-779.
- Baldoni AB (2010) Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas. Brasília, Brasil, 71p. (Ph.D. Thesis. Instituto de Ciências Biológicas. UnB)

- Baldoni AB, Araújo ACG, Carvalho MH, Gomes ACMM, Aragão FJL (2010) Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. *Int J Plant Biol* 1:61-65.
- Barnes DJ, Baldwin BS, Braasch DA (2009) Ricin accumulation and degradation during castor seed development and late germination. *Ind Crops Prod* 30:254-258.
- Batani H, Karimi K, Zamani A, Benakashani F (2014) Castor plant for biodiesel, biogas, and ethanol production with a biorefinery processing perspective. *Appl Energy* 14:22.
- Bauddh K, Singhb K, Singha B, Singhc RP (2015) *Ricinus communis*: A robust plant for bio-energy and phytoremediation of toxic metals from contaminated soil. *Ecol Eng* 84:640-652.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EO, Mendes EA, Aragão FJL (2007) RNAi-mediated resistance to *Bean golden mosaic virus* in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 20:717-726.
- Borgonie G, Link CD, Claeys M, Coomans A (2003) Lysosomal and pseudocoelom routing protects *Caenorhabditis elegans* from ricin toxicity. *Nematology* 5:339-350.
- Bozza WP, Tolleson WH, Rosado LAR, Zhanga B (2015) Ricin detection: Tracking active toxin. *Biotechnol Adv* 33:117-123.
- Butterworth AG, Lord JM (1983) Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single-size polypeptide precursor. *Eur J Biochem* 137:57-65.
- Campos ESC, Santos VML (2015) Estudo do processo de extração de óleo de mamona em cooperativas do pólo São Francisco. *Engevista* 4:477-490.
- Carthew RW (2001) Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Cell Biol* 13:244-248.
- Chan AP, Crabtree J, Zhao Q, Lorenzi H, Orvis J, Puiu D, Melake-Berhan A, Jones KM, Redman J, Chen G, Cahoon EB, Gedil M, Stanke M, Haas BJ, Wortman JR, Fraser-Liggett CM, Ravel J, Rabinowicz PD (2010) Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nat Biotechnol* 28:951-956.

- Cheah KY, Howarth GS, Yazbeck R, Wright TH, Whitford EJ, Payne C, Butler RN, Bastian SE (2009) Grape seed extract protects IEC-6 cells from chemotherapy-induced cytotoxicity and improves parameters of small intestinal mucositis in rats with experimentally-induced mucositis. *Cancer Biol Ther* 8:382-390.
- Christou P, McCabe DE (1992) Prediction of germ-line transformation events in chimeric Ro transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. *Plant J* 2:283-290.
- Christou P, Swain WF, Yang N, McCabe DE (1989) Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7500-7504.
- Demant CAR, Auld D, Demant ARM (2012) Development of a bioassay to quantify the ricin toxin content of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. *Maringá* 34:397-402.
- Diniz LL, Valadares Filho SC, Oliveira AS, Pina LD, Benedeti PB, Baião GF, Campos JMS, Valadares RFD (2011) Castor bean meal for cattle finishing: 1— Nutritional parameters. *Livest Sci* 135:153-167.
- Dubois J, Piccirilli A, Magne J, He X (2013) Detoxification of castor meal through reactive seed crushing. *Ind CropsProd* 43:194-199.
- FAO Statistics. 2017. Production - Castor beans. Available: at <http://faostat3.fao.org/home/E>. Accessed 24 october 2017.
- Fernandes KV, Deus-de-Oliveira N, Godoy MG, Guimarães ZAS, Nascimento VV, de Melo EJT, Freire DMG, Dansa-Petretski M, Machado OLT (2012) Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. *Bras J Med Biol Res* 45:1002-1010.
- Fodstad O, Johannessen JV, Schjerven L, Pihl A (1979) Toxicity of abrin and ricin in mice and dogs. *J Toxicol Environ Health* 5:1073-1084.
- Foster JT, Allan GJ, Chan AP, Rabinowicz PD, Ravel J, Jackson PJ, Keim P (2010) Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). *BMC Plant Biol* 10:13.

- Frizzi A, Huang S. Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnol J* 2010;8:655-77.
- Geier T (2012) Chimeras: Properties and dissociation in vegetatively propagated plants. *In: Shu Q, Forster BP, Nakagawa H (eds). Plant Mutation Breeding and Biotechnology. CABI, Wallingford, UK, 191-201.*
- Godoy MG, Gutarra M, Maciel FM, Felix SP, Bevilaqua JV, Machado OLT, Freire DMG (2011) Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. *Enzym Microb Technol* 44:317-322.
- Greenwood JS, Bewley JD (1981) Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). I. Descriptive morphology. *Can J Bot* 60:1751-1760.
- Guo Q, Liu Q, Smith NA, Liang G, Wang M (2016) RNA Silencing in plants: Mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr Genomics* 17:476-489.
- Haan P, Reidinga-Saenen LM, Korporaal-Heijman JA (2016) Intoxication by ingestion of castor beans. *Neth J Crit Care* 24:20-22.
- Halling KC, Halling AC, Murray EE, Ladin BF, Houston LL, Weaver RF (1985) Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Res* 13:8019-8033.
- Harley SM, Beevers H (1986) Lectins in castor bean seedlings. *Plant Physiol* 80:1-6.
- He X, McMahon S, Henderson II TD, Griffey SM, Cheng LW (2010) Ricin toxicokinetics and its sensitive detection in mouse sera or feces using immuno-PCR. *PLoS One* 5:e12858.
- Hoffman LV, Dantas ACA, Medeiros EP, Soares LS (2007) Ricina: um impasse para a utilização da torta de mamona e suas aplicações. Documentos 174. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.
- Hunt PR (2017) The *C. elegans* model in toxicity testing. *J Appl Toxicol* 37:50-59.
- Karmakar G, Ghosh P, Sharma BK (2017) Chemically modifying vegetable oils to prepare green lubricants. *Lubricants* 5:44.
- Katiki LM, Ferreira JFS, Zajac AM, Masler C, Lindsay DS, Chagas AC, Amarante AF (2011) *Caenorhabditis elegans* as a model to screen plant extracts and

- compounds as natural anthelmintics for veterinary use. *Vet Parasitol* 182:264-268.
- Lacorte C (1998) B-Glucuronidade (GUS). *In*: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, BR, 127-141.
- Lannoo N, Van Damme EJM (2014) Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 5:397.
- Lappi DA, Kapmeyer W, Beglau JM, Kaplan NO (1978) The disulfide bond connecting the chains of ricin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1096-1100.
- Lima RLS, Severino LS, Sampaio LR, Sofiatti V, Gomes JA, Beltrão NEM (2011) Blends of castor meal and castor husks for optimized use as organic fertilizer. *Ind Crops Prod* 33:364-368.
- Lord JM, Spooner RA (2011) Ricin Trafficking in Plant and Mammalian Cells. *Toxins* 3:787-801.
- Madankar CS, Pradhan S, Naik SN (2013) Parametric study of reactive extraction of castor seed (*Ricinus communis* L.) for methyl ester production and its potential use as bio lubricant. *Ind Crops Prod* 43:283-290.
- Madeira Junior JV, Macedo JA, Macedo GA (2011) Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresour Technol* 102:7343-7348.
- Malathi B, Ramesh S, Rao KV, Reddy VD (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). *Euphytica* 147:441-449.
- McCabe DE, Swain WF, Martinell BJ, Christoul P (1988) Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Nat Biotechnol* 6:923-926.
- Melo WC, Silva DB, Pereira N (2008) Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação de letalidade da torta hidrolisada para camundongos. *Quím Nova* 31:1104-1106.
- Milani M, Miguel Júnior SR, Oliveira ÉCS, Nóbrega MBM, Costa MN (2006). Caracterização Taxonômica de Acessos de Mamona (*Ricinus communis* L.) do

- Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 67. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.
- Milani M, Miguel Junior SR, Sousa RL (2009) Sub-espécies de mamona. Documentos 230. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.
- Musshoff F, Madea B (2009) Ricin poisoning and forensic toxicology. *Drug Test Anal* 1:184-191.
- Nunes AC, Vianna GR, Cuneo F, Amaya-Farfán J, de Capdeville G, Rech EL, Aragão FJL (2006) RNAi-mediated silencing of the *myo*-inositol-1-phosphate synthase gene (*GmMIPSI*) in transgenic soybean inhibited seed development and reduced phytate content. *Planta* 224:125-132.
- Nunez OFL, Pizon AF, Tamama K (2017) Ricin poisoning after oral ingestion of castor beans: A case report and review of the literature and laboratory testing. *J Emerg Med* 53:e67-e71.
- Ogunniyi DS (2006) Castor oil: a vital industrial raw material. *Bioresource Technol* 97:1086-1091.
- Park S-W, Vepachedu R, Sharma N, Vivanco JM (2004) Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta* 219:1093-1096.
- Patel VR, Dumancas GG, Viswanath LCK, Maples R, Subong BJJ (2016) Castor oil: Properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid Insights* 9:1-12.
- Perry BA (1943) Chromosome number and phylogenetic relationships in the Euphorbiaceae. *Am J Bot* 30:527-543.
- Pincus SH, Eng L, Cooke CL, Maddaloni M (2002) Identification of hypoglycemia in mice as a surrogate marker of ricin toxicosis. *Comp Med* 52,530-533.
- Pinkerton SD, Rolfe R, Auld DL, Ghetie V, Lauterbach BF (1999) Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. *Crop Sci* 39,353-357.
- Rana M, Dhamija H, Prashar B, Sharma S (2012) *Ricinus communis* L. – A Review. *Int J Pharmtech Res* 4:1706-1711.

- Rech EL, Aragão FJL (1998) Biobalística. *In*: Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds). Manual de transformação genética de plantas. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília, BR, 51-64.
- Roberts LM, Lamb FI, Pappin DJC, Lord JM (1985) The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. *J Biol Chem* 260:15682-15686.
- Rodrigues RFO, Oliveira F, Fonseca AM (2002) As folhas de Palma Christi – *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu: Revisão de conhecimentos. *Revista Lecta* 20:183-194.
- Sailaja M, Tarakeswari M, Sujatha M (2008) Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell Rep* 27:1509-1519.
- Sánchez AS, Almeida MB, Torres EA, Kalid RA, Cohim E, Gasparatos A (2017) Alternative biodiesel feedstock systems in the Semi-arid region of Brazil: Implications for ecosystem services. *Renew Sust Energ Ver* 81:2744-2758.
- Schep LJ, Temple WA, Butt GA, Beasley MD (2009) Ricin as a weapon of mass terror — Separating fact from fiction. *Environ Int* 35:1267-1271.
- Sehgal P, Khan M, Kumar O, Vijayaraghavan R (2010) Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans. *Food Chem Toxicol* 48,3171-3176.
- Severino LS (2005) O que sabemos sobre a torta de mamona. Documentos, 134. Embrapa Algodão, Campina Grande, PB.
- Severino LS, Auld DL, Baldanzi M, Cândido MJD, Chen G, Crosby W, Tan D, He X, Lakshamma P, Lavanya C, Machado OLT, Mielke T, Milani M, Miller TD, Morris JB, Morse SA, Navas AA, Soares DJ, Sofiatti V, Wang ML, Zanotto MD, Zieler H (2012) A review on the challenges for increased production of castor. *Agron J* 104:853-880.
- Singh AS, Kumari S, Modi AR, Gajera BB, Narayanan S, Kumar N (2011) Role of conventional and biotechnological approaches in genetic improvement of castor (*Ricinus communis* L.). *Ind Crops Prod* 3:787-801.

- Smallshaw JE, Vitetta ES (2012) Ricin Vaccine Development. *Curr Top Microbiol Immunol* 357:259-72.
- Sousa NL (2013) Desenvolvimento de sistemas para transformação genética de mamona (*Ricinus communis* L.)—as bases para o silenciamento da ricina. Brasília, BR, 64p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biológicas. UnB).
- Souza VC, Lorenzi H (2005) Euphorbiaceae. *In*: Souza VC, Lorenzi H (eds). *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, São Paulo, BR, 364-374.
- Spies JR, Coulson EJ (1965) Antigenic specificity relationships of castor bean meal, pollen, and allergenic fraction, CB-1A, of *Ricinus communis*. *J Allergy* 36:423-432.
- Spooner RA, Lord JM (2015) Ricin Trafficking in Cells. *Toxins* 7:49-65.
- Steeves TA, Sussex IM (1989) *Patterns in Plant Development*. Cambridge University Press, New York, NY.
- Sujatha M, Sailaja M (2005) Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. *Plant Cell Rep* 23:803-810.
- Szymkowiak EJ (1996) What chimeras can tell us about plant development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:351-376.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* 27:581-590.
- Worbs S, Köhler K, Pauly D, Avondet M-A, Schaer M, Dorner MB, Dorner BG (2011) *Ricinus communis* intoxications in human and veterinary medicine – A summary of real cases. *Toxins* 3:1332-1372.
- Worbs S, Skiba M, Söderström M, Rapinoja ML, Zeleny R, Russmann H, Schimmel H, Vanninen P, Fredriksson SÅ, Dorner BG (2015) Characterization of ricin and *R. communis* agglutinin reference materials. *Toxins* 7,4906-4934.

Wu X, Zhao G, Wang X, Liu W (2017) Preparation of high-temperature lubricants by blending castor oil with lithium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. Tribol Lett 65:51.