



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEINASES CISTEÍNICAS RELACIONADAS
À MORTE CELULAR PROGRAMADA E À MATURAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
RESERVAS EM SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas L.*)

ANTONIO JOSÉ ROCHA

Fortaleza - CE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEINASES CISTEÍNICAS RELACIONADAS
À MORTE CELULAR PROGRAMADA E À MATURAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
RESERVAS EM SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas L.*)

ANTONIO JOSÉ ROCHA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

Orientador: Prof. Francisco de A. P. Campos

Fortaleza - CE
2012

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEINASES CISTEÍNICAS RELACIONADAS
À MORTE CELULAR PROGRAMADA E À MATURAÇÃO DE PROTEÍNAS DE
RESERVAS EM SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

ANTONIO JOSÉ ROCHA

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Francisco A. P. Campos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
(Orientador)

Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont
Departamento de bioquímica
Instituto de Química da UFRJ-Rio de Janeiro-RJ
(1º Membro da banca de defesa)

Prof. Dr. Osmundo B. de Oliveira Neto
Embrapa – Rec. Genética e Biotecnologia- Brasília-DF
(2º Membro da banca de defesa)

Prof. Dr. José Hélio Costa
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
(3º Membro da banca de defesa)

Com amor, dedico à *minha mãe Raimunda Aquiles Rocha*

“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela benção diária e pelo dom da vida.

Ao Professor Francisco de Assis de Paiva Campos. Agradeço por ser um orientador presente, um cientista admirável e por ter me possibilitado trabalhar em um projeto que me deu bastante satisfação. Professor, obrigado pelas oportunidades.

Ao Professor Dr. José Hélio Costa, a quem admiro não somente por ser um profissional exemplar, mas também por ser uma pessoa carismática. Obrigado pela disponibilidade de contribuição para o trabalho e pela oportunidade de ser seu amigo. Foi uma honra tê-lo como amigo.

Ao Professor Dr. Osmundo Brilhante, a quem tenho profundo respeito e estima, gostaria de agradecer imensamente pelo aceite em fazer parte da minha banca examinadora. Obrigado pelas críticas, sugestões e pela contribuição para a obtenção de um trabalho de melhor qualidade.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont quem tenho profundo respeito e estima e gostaria de agradecer imensamente pelo aceite em fazer parte da minha banca examinadora. Obrigado de coração!

Ao Professor Dr. Rodrigo Maranguape da Silva Cunha a quem admiro muito por sua inteligência e pelo profissional exemplar que ele sempre foi, na qual foi muito importante na minha vida acadêmica. Além disso, agradeço por ter contribuído com seus ensinamentos de PCR em tempo real.

À Dra. Muciana Aracely Cunha Jucá, além da amizade, agradeço pelas inúmeras dúvidas esclarecidas sobre PCR em tempo real, por ter me ensinado a trabalhar com a mesma e por me ajudar em experimentos relacionados. Muito obrigado Mumu!

À M.Sc Gabriela de Almeida Monteiro por ter me ensinado inicialmente em quase todos os experimentos que fiz no laboratório assim que cheguei ao laboratório. Obrigado pela ajuda e pela amizade que você depositou em mim. Obrigado Gabi!!

Ao Dr. Fabiano Moura Teixeira por ter me ajudado ao corrigir a dissertação e pela sua enorme paciência durante as correções da dissertação. Obrigado gordinho!.

À **M.Sc Emanoella Lima Soares**, pela enorme contribuição com seus conhecimentos de anatomia de sementes de pinhão manso e pela ajuda na correção de minha dissertação. Suas sugestões foram decisivas para conclusão de meu trabalho. Obrigado de verdade manu!

*Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas **Camila, Mohib, Magda, Verônica, Washington, Ícaro, Bruno** e por último o **Roberto** que tanto me ajudou, pelos momentos de descontração, desabafos e pelo bom convívio.*

Ao laboratório de Bioenergética por ter disponibilizado alguns equipamentos como o *nanodrop* 2000 e o foto documentador que foram fundamentais para execução do meu trabalho. Agradeço também todas as pessoas desse laboratório que me ajudaram diretamente ou indiretamente e *saber que posso sempre contar com vocês!*

A todos os integrantes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

*Aos meus pais **Raimunda Aquiles Rocha** e **José Eudes Rocha (In memoriam)** pelo apoio, dedicação e amor incondicional, vocês são o meu melhor presente de Deus e os responsáveis por todas as minhas conquistas.*

- *Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:*
 - *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Banco do Nordeste (BNB), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Petróleo Brasileiro (PETROBRAS).*
 - *Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta pesquisa foi realizada.*

RESUMO

O pinhão manso (*Jatropha curcas L*) é uma planta oleaginosa com grande potencial para a produção de biocombustível devido à riqueza de lipídios existente em suas sementes. Portanto, é uma fonte potencial de óleo renovável que tem recebido considerável atenção da comunidade científica. O objetivo deste estudo foi fazer uma análise da expressão gênica de proteinases cisteínicas relacionadas à morte celular programada (MCP) em sementes em desenvolvimento e durante a germinação de pinhão manso, no intuito de conhecer melhor o perfil dos transcritos dos principais genes envolvidos no processo de MCP e na deposição de proteínas de reservas durante a maturação das sementes de pinhão manso. Para quantificar com precisão os níveis de expressão gênica por RT-qPCR foi necessário realizar uma seleção de genes de referência. Os genes escolhidos para esse estudo foram: GAPDH, PUB, TA2, PP2A2, EF1- α e actina, todos eles citados e escolhidos na literatura para estudo de normalização de genes em plantas. Através do programa geNorm foi possível mostrar os genes de referência mais estáveis dentre os seis genes de referência. Nossos resultados apontaram que os genes de referência mais estáveis para as sementes de pinhão manso em desenvolvimento foram: GAPDH, PP2A2 e EF1- α e TA2. Os genes de menor estabilidade foram: a actina e PUB. Na germinação, os genes mais estáveis foram GAPDH, PUB e TA2. Já os genes com menores valores de estabilidade foram a actina, EF1- α e PP2A2. O geNorm também mostrou o número de genes de referência necessários para a normalização dos dados obtidos por RT-qPCR. Nós mostramos que para as sementes em desenvolvimento, obtiveram-se quatro genes mais estáveis GAPDH, PP2A2, EF1- α e TA2 foram necessários para normalização dos dados de RT-qPCR. Em sementes em germinação, mostrou-se a adoção de três genes mais estáveis (GAPDH, PUB e TA2). Contudo, Para validar nossos resultados com genes de referência, foi usado o perfil padrão da expressão do gene da oleosina, na qual mostrou que o padrão de expressão da oleosina está de acordo com os fornecidos pela literatura, revelando que os genes de referência são eficientes para normalizar os dados de RT-qPCR. De posse desses resultados, realizou-se um estudo de expressão de genes supostamente envolvidos na morte celular programada e na maturação de sementes de pinhão manso. Nossos resultados mostraram que os genes com seqüência C-terminal KDEL: JcCB0580861; JcCA0152821; JcCA0047111 e o gene γ -VPE JCCB0060111 mostraram altos níveis de expressão nos estágios mais avançados em integumento de sementes em desenvolvimento. Esses genes expressam proteinases cisteínicas que estão possivelmente envolvidos no processo de MCP. Não obstante, os genes que expressam as seguintes VPEs: JcCB0196871; JcCB0244081; e JcCA0012422 possivelmente estão envolvidas na maturação das proteínas de reservas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. Esses dados forneceram importantes informações a cerca do padrão de expressão de genes que estão envolvidos no processo de MCP. Não obstante, o estudo de normalização e validação de genes de referência nos tecidos de integumento e endosperma do pinhão manso propiciaram um melhor entendimento no que diz respeito à estabilidade desses genes nas condições estudadas.

Palavras-chave: *Jatropha curcas*, proteinases cisteínicas, morte celular programada, RT-qPCR,

ABSTRACT

Jatropha (*Jatropha curcas* L) is an oilseed plant with great potential for biofuel production because of the wealth of existing lipids in their seeds. Therefore, it is a potential source of renewable oil that has received considerable attention from the scientific community. The objective of this study was to analyze the gene expression of cysteine proteinases related to programmed cell death (PCD) in developing seeds and during germination of *Jatropha* in order to better understand the transcriptome of the major genes involved in the MCP and during the deposition of protein reserves during maturation of seeds of *Jatropha*. To accurately quantify the levels of gene expression by RT-qPCR was necessary to make a selection of reference genes. The genes were chosen for this study: GAPDH, PUB, TA2, PP2A2, EF1- α and actin, all cited in the literature and chosen for the study of normalization of genes in plants. Through the program geNorm was possible to show the more stable reference genes among the six genes of reference. Our results indicate that the most stable reference genes for seed of *Jatropha* in development were: GAPDH, PP2A2 and EF1- α and TA2. The genes were less stable, actin and PUB. In germination, the most stable genes were GAPDH, PUB and TA2. Since the genes with lower levels of stability were actin, EF1- α and PP2A2. The geNorm also showed the number of reference genes needed for normalization of data obtained by RT-qPCR. We show that for the developing seeds, the use of four most stable genes were GAPDH, PP2A2, EF1- α and TA2 were needed for normalization of RT-qPCR data. In germinating seeds, was the adoption of three most stable genes (GAPDH, PUB and TA2). However, To validate our findings with reference genes, we used the standard profile of gene expression which expresses oleosina, which showed that the expression pattern of oleosin is provided according to the literature, genes reveals that the reference are efficient to normalize the data by RT-qPCR. With these results, we carried out a study of expression of genes supposedly involved in programmed cell death and maturation of seeds of *Jatropha*. Our results showed that genes with sequence C-terminal KDEL: JcCB0580861; JcCA0152821; JcCA0047111 and γ -VPE gene JCCB0060111 showed high levels of expression in later stages of seed integument development. These genes express cysteine proteinases that are possibly involved in the MCP. Nevertheless, genes that express the following VPEs: JcCB0196871; JcCB0244081; JcCA0012422 and are possibly involved in the maturation of protein reserves in developing seeds of *Jatropha*. These data provided important information about the expression pattern of genes that are involved in the transcriptome involved in MCP. However, the study of normalization and validation of reference genes in tissues of the integument and endosperm *Jatropha* provided a better understanding with regard to the stability of these genes in the studied conditions.

Keywords: *Jatropha curcas*, cysteine proteinases, programmed cell death, RT-qPCR,

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURA

LISTA DE TABELAS

ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1. Morte celular programada.....	19
2.2. Diferenças de morte celular programada em animais e plantas.....	19
2.3. Importância da MCP em resposta ao desenvolvimento das plantas.....	20
2.4. Morte celular programada em sementes de plantas.....	23
2.5. Papel multifuncional das proteinases cisteínicas nas plantas.....	24
2.6. Classificação e caracterização das proteinases cisteínicas.....	24
2.7. Proteinases cisteínicas com sequência C-terminal KDEL.....	25
2.8. Enzimas de processamento vacuolares (VPE).....	26
2.9. Estudos genômicos e transcriptômicos com pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L).	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos gerais.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Análise de expressão gênica por RT-PCR e RT-qPCR.....	30
4.1.1. Material vegetal.....	30
4.1.2. Extração e purificação de RNA total.....	31
4.1.3. Quantificação e análise da integridade de RNA total.....	32

4.1.4. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	32
4.1.5. Síntese de iniciadores para expressão por qRT-PCR.....	32
4.1.6. RT-PCR.....	34
4.1.6. RT-qPCR.....	34
4.1.7. Análise dos dados.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1. Extração e purificação de RNA total de pinhão manso.....	36
5.2. Estabilidade de expressão dos genes constitutivos por RT-qPCR em tecidos de pinhão manso.....	40
5.3. Validação dos genes de referência por RT-qPCR	51
5.3. Análise de expressão semi-quantitativa por RT-PCR.....	53
5.4. Análise de expressão gênica por RT-qPCR de proteinases cisteínicas com C-terminal KDEL de sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso (<i>J. curcas</i>).....	58
5.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR de proteinases cisteínicas do tipo VPE de sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso (<i>J. curcas</i>).....	65
5. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
7. ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mudanças ocorridas no integumento interno (tégmen) em sementes de pinhão manso.....	18
Figura 2. Morte celular programada no endosperma de pinhão manso na região adjacente ao embrião.....	18
Figura-3. Morte celular programada em plantas.....	22
Figura- 4. Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de desenvolvimento.....	30
Figura-5. Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de germinação.....	31
Figura-6. Eletroforese de RNA total de integumento de sementes de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	36
Figura-7. Eletroforese de RNA total de endosperma de sementes de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	37
Figura-8. Eletroforese de RNA total purificados de integumento de sementes de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	38
Figura-9. Eletroforese de RNA total purificados de endosperma de sementes de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	38
Figura-10. Eletroforese de RNA total de endosperma de sementes em germinação de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	39
Figura-11. Eletroforese de RNA total purificados de endosperma de sementes em germinação de <i>J. curcas</i> , em gel de agarose.....	39
Figura-12. Expressão relativa dos genes constitutivos em diferentes estágios do integumento e endosperma.....	41
Figura-13. Estabilidade de expressão média de genes de referência com valores M sugerido pelo geNorm de sementes em desenvolvimento de tecidos de <i>J. curcas</i>	42
Figura-14. Estabilidade de expressão média de genes de referência com valores M sugerido por geNorm de sementes em germinação de tecidos de <i>J. curcas</i>	44
Figura 15. Gráfico do geNorm mostrando a determinação do número de genes de referência mais adequado para a normalização dos genes alvos durante o desenvolvimento da de sementes de pinhão manso.....	46
Figura 16. Gráfico do geNorm mostrando a determinação do número de genes de referência mais adequado para a normalização dos genes alvos de sementes em germinação de pinhão manso.....	47

Figura-16. Validação dos genes constitutivos (genes de referência).....	52
Figura-17. Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos produtos amplificados para as sequencias com C-terminal KDEL.....	55
Figura-18. Eletroforese em gel de agarose a 2% para detecção dos produtos amplificados para as sequencias das VPEs.....	56
Figura 19. Curva de melting (curva de fusão) dos seis genes constitutivos.....	57
Figura-20. Curva de melting (curva de fusão) dos sete genes alvos de interesse.....	57
Figura 21. Expressão relativa dos genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111 em sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso.....	60
Figura-22. Expressão relativa dos genes JcCB0196871; JcCB024408; JcC0060111 e JcCA0012422 em sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela-1. Informação a respeito dos genes de referência (constitutivos). 33

Tabela-2. Genes de proteinases cisteínicas identificados em banco de dados públicos. A 54
tabela mostra o nome do gene de interesse com seus devidos códigos de acesso; produto
gênico, os quais podem ser uma proteinase cisteínica com C-terminal KDEL ou sequencias
VPE; seqüências de primers; amplicons e subfamília de cada gene de proteinases cisteínica.

ABREVIATURAS

1. BLAST – (Basic Local Alingment Search Tool)- Ferramenta de Busca de Alinhamento local
2. cDNA- DNA complementar
3. Ct – Ciclo threshold
4. DAF – Dias após a floração
5. DDBJ -(DNA Data Bank of Japan) – Banco de Dados de DNA do Japão
6. DEPC- Diethylpyrocarbonate (Dimetil pirocarbonato)
7. dNTP – Desoxirribonucleotídeo trifosfato
8. EBI- (European Bioinformatics Institute) Instituto de bioinformática europeu
9. EMBL -(European Molecular Biology Laboratory)- Laboratório de Biologia Molecular Europeu.
10. EST – Expressed Sequence Tags (seqüência alva expressa)
11. g - Aceleração da gravidade
12. HAE – Horas após embebição
13. HKGs- housekeepings genes
14. MCP- Morte celular programada
15. MgCl₂ - Cloreto de magnésio
16. Milli Q - Água destilada deionizada
17. mM – Milimolar
18. NCBI (National Center for Biotechnology Information)- Centro nacional de informação biotecnológica.
19. pb - Pares de bases
20. RT-PCR- (Reverse Transcriptase- Polimerase Chain Reaction) -Transcritase reversa de reação em cadeia da polimerase.
21. RT-qPCR- (Reverse Transcriptase- quantitative Polimerase Chain Reaction) Transcrição reversa e Reação em cadeia da polimerase quantitativa.
22. *Taq - Thermus aquaticus*
23. Tm – Temperatura de desnaturação
24. U - unidade (s)
25. VPE – (Vacuolar processing enzyme)-Enzimas de processamento vacuolar
26. ηg - nanograma (s)

1. INTRODUÇÃO

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta nativa da América do sul. Atualmente é encontrada em países da África e Ásia (Openshaw *et al*, 2000) podendo ser cultivada em áreas com solos pouco férteis e de clima desfavorável à maioria das culturas alimentares tradicionais (Francis, 2005). Esta espécie é considerada uma boa opção agrícola para o nordeste brasileiro uma vez que é exigente em insolação e possui resistência à seca (Arruda *et al* 2004; Benning e Pichersky, 2008).

As sementes de pinhão manso produzem um óleo viscoso que pode servir como fonte de matéria prima para a produção de biodiesel. Possui ainda, diversos tipos de utilização industrial sendo utilizado na produção de sabões, tintas, cosméticos, fármacos e pesticidas (Openshaw *et al*, 2000; Arruda, *et al*. 2004; Pinto *et al*, 2005; Carvalho *et al*, 2008).

Da extração do óleo da semente gera-se como subproduto a torta, a qual é composta de resíduos vegetais e pode ser utilizada como fonte de nutrientes para as plantas, uma vez que é rica em nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio (Kumar e Sharma, 2008). A torta de pinhão manso apresenta um alto teor de proteínas (46-63%, valor variável em função do método de extração do óleo), o que a tornaria uma opção para ser fornecida como suplemento alimentar em dietas de ruminantes e monogástricos (Mendonça e Laviola, 2009). Entretanto, o uso da torta na alimentação de animais ainda não é possível devido à presença de fatores tóxicos, alergênicos e antinutricionais (Kumar e Sharma, 2008). Dentre esses fatores podem-se citar especialmente a curcina e os ésteres de forbol. Sabe-se que estes últimos são irritantes à pele e podem afetar as pessoas durante o processo de extração do óleo (Adolf *et al*, 1984; Makkar, 1997).

O potencial do pinhão manso ainda não pode ser totalmente explorado devido à relativa falta de conhecimentos científicos básicos relacionados aos diferentes aspectos de genética, fisiologia e bioquímica da espécie. Dentre os fatores fisiológicos pouco estudados pode-se destacar a morte celular programada, a qual participa no desenvolvimento da planta sob vários aspectos, dentre eles a formação da semente (Helm *et al*, 2008).

As sementes de pinhão manso inicialmente são constituídas pelo nucelo, o qual é envolto por dois integumentos –interno, que ocupa a maior porção da semente nos estágios iniciais do desenvolvimento, e externo (Soares *et al*., 2011). Posteriormente, com a dupla fertilização, são formados o endosperma, o qual ocupa a maior parte da semente quando madura, e o embrião. Para que o endosperma se desenvolva é necessário que tecidos pré-

existentes sejam “consumidos” tanto para nutri-lo quanto para dar espaço à sua expansão. Em mamona, por exemplo, observou-se que o tecido a desempenhar essa função é o nucelo e que esse processo se dá através de morte celular programada com o envolvimento de proteinases cisteínicas (Greenwood et al., 2004). Proteinases cisteínicas também estão envolvidas na morte celular programada de sementes em germinação de *Ricinus communis* (Schimid et al., 1999).

Mudanças ocorridas no padrão de divisão e diferenciação de células do integumento interno durante o desenvolvimento de sementes de pinhão manso foram observadas (Soares, 2011). Em estágios iniciais do desenvolvimento as células desse tecido são pequenas, possuem citoplasma denso e dividem-se ativamente (Figura 1A). Em estágios avançados as células cessam a divisão, gradativamente tornam-se vacuoladas e uma camada de restos de protoplasma e parede celular forma-se ao redor do endosperma em formação (Figura 1B). Essas observações levaram a hipótese de que há ocorrência de morte celular programada no integumento interno de pinhão manso, assim como ocorre com o nucelo de mamona em sementes em desenvolvimento. Conforme pode ser observado na Figura 1, as mudanças nesse tecido ocorrem de forma gradativa iniciando-se na região mais próxima a formação do endosperma e desenvolvimento do embrião. No endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso também se observa vacuolação e lise de células nas regiões próximas ao embrião em formação dando indícios da ocorrência de morte celular programada nesse tecido (Figura 2).

Análises proteômicas do integumento interno de sementes em desenvolvimento de pinhão manso foram realizadas e identificaram-se proteases das 4 classes mecanísticas: cisteínicas, serínicas, aspárticas e metaloproteases (Ranier e Hoorn, 2008). Conforme descrito, a presença de proteinases cisteínicas é observada em tecidos que estão sofrendo morte celular programada (Greenwood et al., 2004; Schmid et al., 1999).

As mudanças observadas no padrão de divisão e diferenciação das células do integumento e a presença de proteases nesse tecido, especialmente as cisteínicas, serviram de base para os estudos realizados neste trabalho. Objetivou-se analisar o padrão de expressão gênica de proteinases cisteínicas, possivelmente envolvidas com a morte celular programada, no integumento e endosperma de sementes de pinhão manso em desenvolvimento e no endosperma durante a germinação da semente.

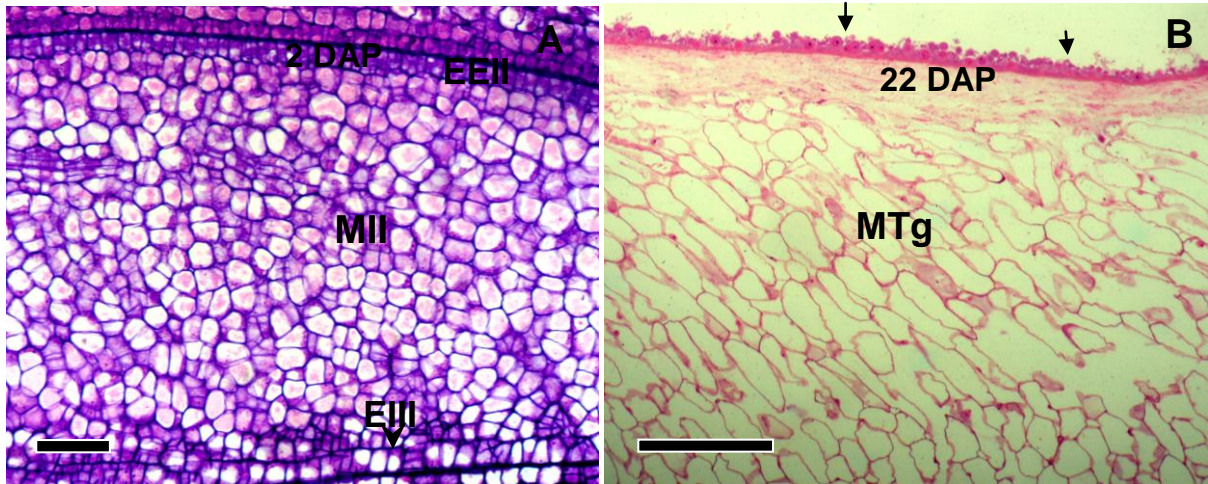


Figura 1. Mudanças ocorridas no integumento interno (ii) em sementes de pinhão manso. **A** (Escala = 30 μ m). Anatomia do integumento interno 2 DAP. **B**. Mesófilo do ii em regiões próximas ao vacúolo central, respectivamente, 22 DAP. Escala = 200 μ m. Setas indicam camada formada pelos remanescentes de parede celular e citoplasma. DAP, dias após a polinização; EEII, epiderme externa do integumento interno; EIII, epiderme interna do integumento interno; MII, mesófilo integumento interno; MTg, mesófilo do tégmen (Soares *et al.*, 2011).

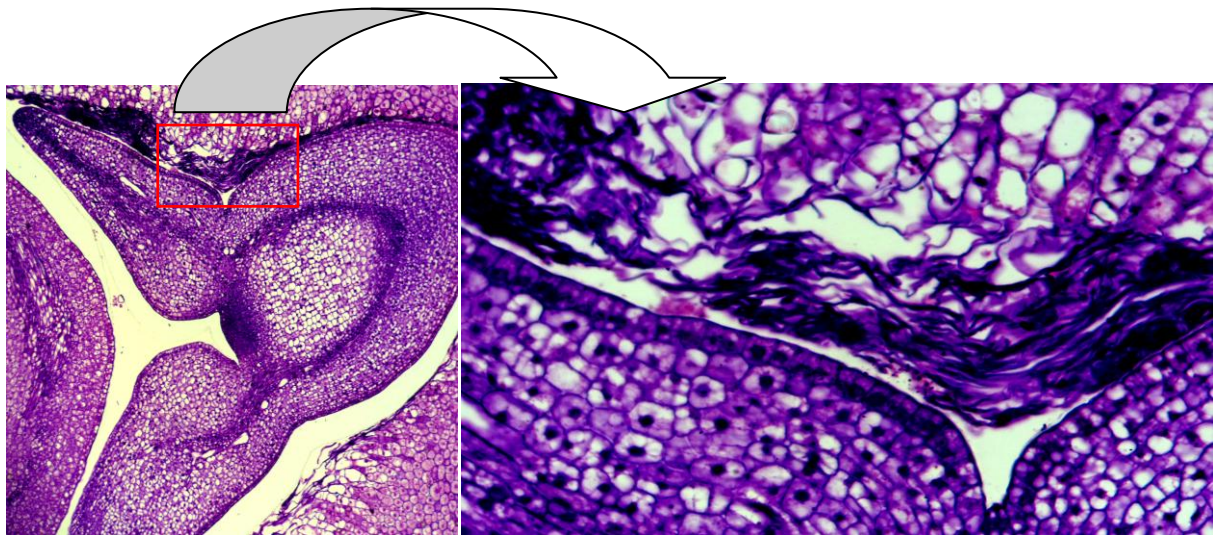


Figura 2. Embrião de *J. curcas* envolto por endosperma **A**. Células vacuoladas e lise de células do endosperma na região adjacente ao embrião. Escala = 200 μ m. **B**. Ampliação da figura A na região do cotilédone e parte do hipocótilo. Escala = 30 μ m.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morte celular programada

A morte celular programada ou MCP tem sido definida como uma seqüência de eventos que levam à destruição controlada das células (Lockshin e Zakeri, 2004). Nas plantas, a MCP ocorre por reação de hipersensibilidade, devido à invasão por patógenos, e durante o desenvolvimento podendo estar envolvida na senescência, reprodução, germinação e desenvolvimento da semente (Helm, *et al*, 2008, Laux e Jurgens, 1997; Williams e Dickman, 2008; Yeng e Meinke, 1993).

Em geral, alterações celulares ocorrem durante o processo de morte celular programada como a vacuolação das células (Collazo *et al*, 2006). Outros eventos ocorrem como a fragmentação do DNA nuclear (*DNA laddering*) por alguns tipos de caspases não genuínas denominadas “metacaspases” (Vercammen *et al* 2007; Bonneau *et al*, 2008); mudanças estruturais como, a vesiculação do citosol, condensação da cromatina, colapso vacuolar, e formação de corpos apoptóticos, muito embora as membranas plasmática e de organelas permaneçam intactas (Dangl *et al*, 2000).

2.2. Diferenças da morte celular programada em animais e plantas

Hoje se sabe que a MCP é um processo fisiológico ocorrido em larga escala no desenvolvimento celular sendo necessária ao crescimento regular de organismos multicelulares. Como um processo de grande complexidade, pode se manifestar de diferentes formas tendo características moleculares e morfológicas bastante variadas em plantas e animais.

Uma das principais diferenças na MCP entre plantas e animais é a existência de macrófagos nos últimos. Os macrófagos são células especializadas que realizam fagocitose e removem as células apoptóticas (Williams e Dickman, 2008). As células vegetais não realizam fagocitose. As plantas, ao contrário dos animais, possuem parede celular a qual não permite absorção e degradação dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas. A presença de vacúolos nas plantas e a autofagia podem representar uma alternativa para compensar o sistema de fagocitose dinâmico em animais (Williams *et al*, 2008). As caspases são enzimas

presentes em animais que estão diretamente envolvidas na MCP (Del pozo et al, 1998; Lam et al, 2000; Collazo *et al*, 2006; Piszczek et al, 2007; Theresa *et al*, 2008 e Williams e Dickman, 2008) Essas enzimas não existem em plantas, porém são substituídas pelas metacaspases as quais exercem função similar a das caspases em animais (Vercammen et al 2007; Bonneau *et al*, 2008).

2.3. Importância da MCP para o desenvolvimento das plantas

A morte celular programada é um processo importante para o desenvolvimento das plantas apresentando importância no crescimento vegetal, na defesa, no desenvolvimento reprodutivo e na senescência. A MCP ocorre em decorrência de uma programação genética. Em plantas, essa resposta tem sido estudada em muitas vias metabólicas de vegetais.

A MCP é essencial para o processo reprodutivo nas plantas. Por exemplo, a maioria das plantas que tem flores unissexuais contém o primórdio de ambos os sexos na fase inicial do desenvolvimento. Nessa fase, as flores do macho ou da fêmea são indistinguíveis. Somente durante a formação das flores, o crescimento do primórdio do macho ou da fêmea cessa e é eliminado através do processo de MCP (Dangl *et al*, 2000).

Morte celular programada também ocorre na coifa das raízes (figura 3) (Laux e Jurgens *et al*,1997). Evidências sugerem que a ruptura das células da coifa é programada e apresenta características de apoptose, como a formação de vesículas semelhantes a corpos apoptóticos, os quais contêm DNA degradado (Williams e Dickman, 2008).

A formação de aerênquima em raízes de milho em resposta à hipoxia é outro exemplo de MCP. Em baixas condições de oxigênio, as células corticais entre a endoderme e hipoderme sofrem “lisigenia”, um processo que leva à desintegração de células quando novas estruturas são diferenciadas (Dangl *et al*, 2000).

Alguns tipos de morte celular programada podem ser únicos em algumas plantas. A formação do endosperma de cereais é um exemplo disso. No início da formação do grão, o endosperma se diferencia em dois tecidos: endosperma amiláceo e camada de aleurona. O endosperma amiláceo acumula amido e proteína de reserva durante a maturação do grão. Quando o grão amadurece as células do endosperma morrem, mas as células da camada de

aleurona permanecem vivas. Um aspecto único de MCP no endosperma amiláceo é que as células mortas retêm todo o conteúdo do citoplasma, incluindo núcleo e organelas (Dangl *et al*, 2000). As células mortas do endosperma amiláceo tornam-se “mumificadas” e não sofrem degradação até que a germinação e crescimento da plântula sejam iniciados, alguns meses ou anos depois, quando então enzimas secretadas da camada de aleurona atacam o endosperma “mumificado” (Dangl *et al*, 2000).

A formação dos elementos traqueais é outro exemplo de morte celular programada. Na maturação funcional, os vasos xilemáticos consistem de uma série de células mortas interconectadas chamadas de elementos traqueais (TEs) os quais transportam água e sais minerais das raízes para as folhas pela perda evaporativa nos poros foliares (Williams e Dickman, 2008).

A MCP também atua na defesa vegetal. Um exemplo acontece quando a planta é atacada por patógenos ocorrendo uma resposta hipersensitiva. A planta reconhece o patógeno e a área da infecção sofre morte celular programada levando à morte do patógeno. Alternativamente, a morte do tecido do hospedeiro pode ser consequência de um mecanismo que a planta usa para matar o patógeno (Greenberg, 1997; Del pozo *et al*, 1998; Dangl *et al*, 2000; Dickman *et al*, 2001; e Hatsugai *et al*, 2004).

A morte celular programada também é importante no desenvolvimento e na germinação de sementes. Tecidos maternos que envolvem e nutrem o embrião como o integumento e o nucelo, sofrem processo de morte celular programada. Esses tecidos maternos são consumidos para assegurar um crescimento adequado do embrião em formação, bem como a nutrição do mesmo (Russel *et al*, 1993).

Em sementes de angiospermas, esse fenômeno é muito importante para a formação da semente e durante sua germinação. Em *Ricinus communis*, por exemplo, o nucelo é o tecido materno que sofre MCP (Greenwood *et al*, 2004). A MCP também ocorre no nucelo de sementes de *Sechium edule* (Lombardi, *et al*, 2007) e *Triticum aestivum* L (Dominguez *et al*, 2001). O integumento interno é outro tecido materno que sofre morte celular programada conforme observado em sementes de *Brassica napus* (Wan *et al*, 2002).

Em sementes em germinação o endosperma sofre morte celular programada para mobilizar proteínas de reservas estocadas e nutrir a plântula em crescimento (Akasofu *et al*, 1989; Schmid *et al*, 1998; Schmid *et al*, 1999).

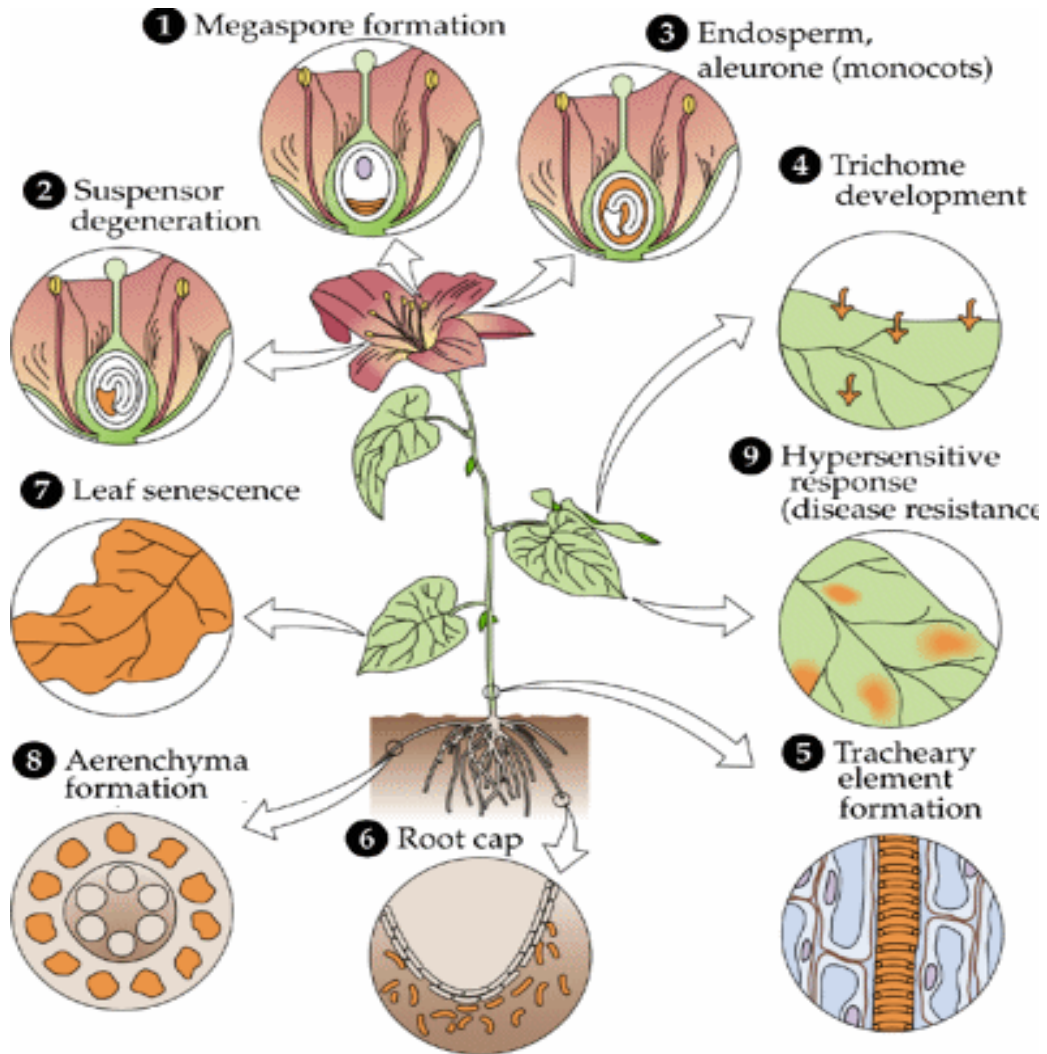


Figura 3. Morte celular programada em plantas. A figura mostra diferentes tipos de morte celular programada nas partes das plantas (Dangl *et al*, 2000).

2.4. Morte celular programada em sementes de plantas

Em angiospermas, a semente é formada pela dupla fertilização, a qual dá origem ao zigoto diplóide e ao endosperma triplóide. Esse processo ocorre no saco embrionário, que por sua vez está embebido nos tecidos maternos – nucelo, tegumento interno e externo (Russell *et al*, 1993; Dominguez *et al*, 2001).

Em sementes, a MCP tem sido descrita no nucelo de mamona (Greenwood, 2007), algodão (Jensen, 1975), cevada (*Hordeum vulgare*) e prímula (*Oenothera biennis*) (Hallac, 1980). Desorganização citoplasmática, condensação nuclear, e desintegração de membrana foram encontradas nas sementes dessas espécies ao passarem por morte celular programada.

Em mamona observou-se a fragmentação do DNA nuclear em células nucleares, além de mudanças estruturais como, a vesiculação do citosol, condensação da cromatina e colapso vacuolar (Greenwood, *et al*, 2005). No mesmo trabalho, observou-se que um grupo de proteinases cisteínicas está envolvido na morte celular programada do nucelo.

Dominguez e colaboradores (2001) observaram a degradação do nucelo durante o estágio inicial de desenvolvimento do grão de trigo (*Triticum aestivum* L). A MCP também ocorre no nucelo de chuchu (*Sechium edule*) associada à atividade de proteases cisteínicas durante o desenvolvimento da semente (Lombardi, *et al*, 2007). O nucelo do chuchu sofre degeneração gradual, dando espaço para o crescimento do endosperma nos espaços deixados pela degradação do mesmo (Lombardi, *et al*, 2007).

Wan e colaboradores (2002), em estudos com sementes de *Brassica napus* L. (canola) identificaram a presença de proteinases cisteínicas associadas à morte celular programada no tegumento interno de sementes em estágios iniciais de desenvolvimento. O tegumento interno sofreu degradação dando espaço para a formação do endosperma.

2.5. Papel multifuncional das proteinases cisteínicas nas plantas

A proteólise em plantas é um processo complexo envolvendo enzimas e vias proteolíticas múltiplas em vários compartimentos celulares. Nesse processo, proteinases cisteínicas desempenham um papel essencial (Grudkowska *et al*, 2004).

As proteinases cisteínicas mostram uma extensa diversidade funcional. Essas proteinases desempenham um importante papel nos processos intracelulares e extracelulares; no desenvolvimento e na maturação de frutos (Brady, 1985); reserva nutricional; maturação de proteínas de reserva no endosperma atuando como enzimas de processamento vacuolar; degradação de proteínas de reserva em sementes em germinação (Kembhavi *et al*, 1993) e na degradação de proteínas defeituosas (Rudenskaya, 1998). Atuam na proteção da planta contra o ataque de patógenos estando presente no látex dos vegetais (Boller, 1986).

As proteinases cisteínicas estão envolvidas na maturação de proteínas de reservas de *Cannavalia ensiformis* (Abe *et al*, 1993), *Ricinus communis* (Hara-Nishimura *et al*, 1991) e *Glycine max* (Scott *et al*, 1992). Algumas proteinases cisteínicas atuam nos lisossomos, local de degradação de proteínas, e os produtos finais, dipeptídeos e aminoácidos, se difundem através da membrana lisossomal e são reutilizados na biossíntese de proteínas (Brocklehurst *et al*, 1987;. Bohley e Seglen, 1992;Kirschke *et al.*, 1995). Além disso, essas proteinases cisteínicas estão envolvidas no processo de morte celular programada em organismos multicelulares (Schimid *et al*, 1999).

2.6. Classificação e caracterização das proteinases cisteínicas

Rawlings e Barrett (1993) descreveram as proteinases de acordo com sua estrutura e evolução agrupando-as em famílias. Dentre as 6 famílias de peptidases, as do tipo cisteínicas são as mais estudadas (Grudkowska e Zagdanska, 2004). A família das peptidases cisteínicas são compostas por 7 clãs (CA, CD, CE, CF, CH, CL e C-) e distribuídas em 61 famílias.

A família de proteinases do tipo C é a família mais investigada devido a sua importância no desenvolvimento e defesa de plantas. As proteinases cisteínicas, estão agrupadas nas famílias: C-1 (papain), C-13 (legumain), C-14 (caspases) e C-2 (calpains)

dependentes de cálcio (Grudkowska *et al*, 2004), além de duas famílias adicionais: C-12 (ubiquitin hidrolases) e C-19 (proteínases específicas de ubiquitina) (Vierstra, 2003). Mais de 50 proteínases de plantas da família C já foram identificadas (Fisher *et al*, 2000) e suas sequências encontram-se depositadas no MEROPS: (<http://merops.sanger.ac.uk>).

As peptidases cisteínicas possuem um modo de ação relativamente simples, pois requerem um ambiente levemente ácido (pH variando entre 3 e 6,5) para sua atividade ótima. São endopeptidases com especificidade pelo substrato determinada pela região S₂ da enzima que é preferencialmente ocupada por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (Menard *et al*, 1993; Storer e Menard, 1994). Para sua detecção são utilizados substratos sintéticos cromogênicos e fluorogênicos contendo Phe-arg (p-NA ou MCA) (Bromme *et al*, 2004). Em algumas famílias desta classe, somente o motivo cisteína-histidina é essencial para catálise. Entretanto, outras proteínases possuem um resíduo de asparagina envolvido na orientação do grupamento imidazol da histidina. Estas enzimas têm um sítio catalítico composto pela tríade cisteína-histidina-asparagina.

2.7. Proteínases cisteínicas com sequência C-terminal KDEL

Nas plantas foi identificado um grupo de proteínases cisteínicas do tipo papaína, caracterizado por possuírem um tetrapeptídeo KDEL na região C-terminal da sequência de aminoácidos. Essa região funciona como um sinal para retenção da proteína no retículo endoplasmático (Helm, *et al*, 2008). Essas proteínases foram identificadas em diferentes tecidos que sofrem MCP, como cotilédones (Becker *et al*, 1997), vagem (Tanaka *et al*, 1991), tegumento externo de sementes (Nadeau, *et al*, 1996) e pétalas senescentes (Vulpuestra, *et al*, 1995).

Em mamona (*Ricinus communis*), uma endopeptidase cisteínica (CysEP) é sintetizada como pré-pro-proteína. Essa enzima é derivada de vesículas chamadas de ricinossomos, nas quais são derivadas do retículo endoplasmático. Essas enzimas são transportadas para o citosol de células que sofrem MCP (Greenwood, *et al*, 2004). Estas vesículas libertam uma CysEP madura nas fases finais da desintegração da organela desencadeada por acidificação do citoplasma, resultando na interrupção do vacúolo (Hierl *et al*, 2012). As CysEP maduras digerem glicoproteínas ricas em hidroxiprolina-(Hyp) que formam a base da parede celular das plantas (Helm *et al*, 2008). As CysEPs do tipo KDEL participam do colapso dos tecidos

na fase final de MCP e em tecidos de re-modelagens, tais como a formação de raízes laterais (Hierl *et al*, 2012). Essas CysEP quando liberadas do ricinossomos interage com resíduos de prolina na posição P1 e P1' do seu substrato (Than *et al*, 2004). Isto conduziu à hipótese de um papel para CysEPs atuando no colapso celular finas quais degradam as glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (HRGPs) que constituem a parede celular (Helm *et al*, 2008).

As seqüências com tetrapeptídeo KDEL em plantas não funcionam apenas como um sinal de retenção da proteína no retículo endoplasmático, mas também na regulação da entrada de proteínas em outros compartimentos. A remoção seqüencial dos pró-peptídeos N- e C-terminal em vacúolos é necessária para a produção da forma madura da proteína (Yamada *et al.*, 2001).

2.8. Proteinases cisteínicas como enzimas de processamento vacuolar (VPEs)

Um grupo de proteinases cisteínicas foi descoberto durante a maturação de sementes de mamona (Hara-Nishi-Mura *et al.*, 1991; Bosch, *et al*, 2010). Estas proteinases foram classificadas como pertencentes a família C-13 e por estarem envolvidas no processo de armazenamento, maturação, processamento e degradação de proteínas *in vivo*, atuando no interior de vacúolos (Rojo *et al*, 2003), receberam o nome de VPE (Enzima de Processamento Vacuolar). O isolamento e sequenciamento de tais proteínas em *Arabidopsis thaliana*, resultaram na identificação de proteínas semelhantes às encontradas em *Ricinus communis*. Estas proteínas vacuolares encontradas em *Arabidopsis thaliana* foram dispostas em duas famílias: a primeira específica para sementes (β VPE) e outra específica para órgãos vegetativos (γ VPE e α VPE) (Kinoshita *et al*, 1995a, 1995b, 1999).

Em 2005, Nakaune e colaboradores utilizando mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes de β VPE, encontrou evidências de que as β VPEs são essenciais no processamento e armazenamento de proteínas de reserva (Shimada *et al.*, 2003). Kinoshita *et al.*, (1999) mostraram o envolvimento de VPEs do tipo α VPE e γ VPE na morte celular programada de folhas de *Arabidopsis thaliana* quando submetidas a estresse com lesões no tecido vegetal e tratamento com etileno, ácido salicílico e metil jasmonato. Estas evidências quando somadas indicam a relação entre a indução de morte celular programada e VPEs do tipo vegetativas (α VPE e γ VPE).

As VPEs são sintetizadas como precursores de proteínas, portanto inicialmente são inativas. A auto-remoção de pró-peptídeos, localizados na extremidade C-terminal, dará origem a proteinases maduras, portanto ativas. Sendo assim, a região contendo estes pró-peptídeos são os inibidores naturais das VPEs (Hara-Nishimura et al., 1993). Como mencionado, embora as VPEs sejam uma das enzimas chaves do processamento vacuolar de proteínas de reserva em sementes, sendo responsável pela maturação e pela ativação de várias proteinases vacuolares, estas proteinases também podem ser identificadas em vacúolos presentes em órgãos vegetativos (Kinoshita et al., 1999).

2.9. Estudos genômicos e transcriptômicos com *Jatropha curcas*, L.

Os estudos genômicos e transcriptômicos com pinhão manso vem tomando grande importância, uma vez que essa planta tem um grande potencial como matéria prima para produção de biodiesel. Além disso, esses estudos fornecem subsídios para uma melhor compreensão no que diz respeito à bioquímica, fisiologia e biologia molecular dessa planta.

Em 2010 os dados do sequenciamento do genoma do pinhão manso foram publicados juntamente com a análise do transcriptoma (Sato, *et al*, 2010; Costa *et al.*, 2010, King, *et al*, 2011). O genoma de *J. curcas* encontra-se disponível em bancos de dados públicos desde o seu sequenciamento, publicado no dia 13 de dezembro de 2010 (Sato, *et al*, 2010).

O resultado do sequenciamento gerou um comprimento total de 285.858.490pb de seqüências não redundantes. Seqüências de contigs e singlets foram geradas quando usados os métodos de Sanger e pirosequenciamento. Os resultados gerados foram de 120.586 contigs obtendo-se um comprimento total de 276.710.623pb, bem como a geração de 29.831singlets, resultando em um comprimento total de 9.147.867pb. Sato e colaboradores, (2010) mostraram que no banco do genoma de *Jatropha curcas* foram encontrados 40.923 genes que codificam proteínas, no entanto 16.447 são genes relacionados à transposons. Além disso, a disponibilidade destas seqüências propiciou detectar grande parte dos genes relacionados à degradação e biossíntese de lipídios, bem como compostos secundários, como os ésteres de forbol e genes que expressam proteínas relacionadas à inativação de ribossomos (RIPs do tipo I) como, por exemplo, a curcina.

A disponibilidade de seqüências disponíveis no banco de *J. curcas* (Jatropha Genoma database) propiciou detectar vários tipos de proteinases cisteínicas, na qual podem ser encontradas 41 seqüências de proteinases cisteínicas pertencentes à sub-família papaína. Além disso, foram encontradas 6 seqüências da sub-família legumaina, bem como 11 seqüências da sub-família caspases e 34 tipos de inibidores de proteinases cisteínicas, sendo 6 do tipo cistatina e 5 do tipo protein Z. Ainda em relação às proteinases foram encontradas 15 seqüências do tipo aspártica e 9 do tipo serínica (Sato, *et al*, 2010).

A informação sobre as seqüências genômicas está disponível no banco de dados do Whole Genome Shotgun (WGS) disponível no GenBank do NCBI (National Center for Biotechnology Information), DDBJ (DNA Data Bank of Japan) e EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Disponível em: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha>.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar a estabilidade de genes de referência em diferentes estágios de desenvolvimento e germinação de sementes de pinhão manso. Em seguida, analisar o perfil transcriptômico de genes que expressam proteínas com seqüências C-terminal KDEL e enzimas de processamento Vacuolar (VPE), relacionados à morte celular programada e envolvidos na maturação de proteínas de reservas de sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso (*Jatropha curcas* L).

3.2. Objetivos específicos

- Identificar transcritos na biblioteca de *J. curcas* de seqüências com C-terminal KDEL e seqüências relacionadas à VPE.
- Avaliar a especificidade e confiabilidade de primers construídos, certificando-se da presença de único produto de PCR, via RT-PCR.
- Analisar a estabilidade da expressão de genes constitutivos em diferentes estágios de desenvolvimento e germinação de sementes de tecidos de *J. curcas* através de RT-qPCR.
- Validar nossos experimentos usando o gene que expressa uma oleosina com expressão padrão.
- Analisar o padrão de expressão de genes KDEL e VPE identificados possivelmente relacionados à MCP e à maturação de proteínas de reservas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Análise de expressão gênica por RT-PCR e RT-qPCR

4.1.1. Material vegetal

Sementes de pinhão manso foram coletadas de matrizes sadias no distrito da Taíba, município de São Gonçalo do Amarante, Ceará, Brasil. O integumento e o endosperma foram isolados de sementes em desenvolvimento. O integumento foi isolado de sementes em seis estágios de desenvolvimento, denominados de estágio I, II, III, IV, V e VI (Figura 4). O endosperma foi isolado de sementes em 4 estágios: IV, V, VI e maduro concomitante com os mesmos estágios do integumento (figura-4) e 2, 4, 6 e 8 dias após a germinação (Figura-5). As amostras de integumento e endosperma foram coletadas e armazenadas em freezer -80°C.

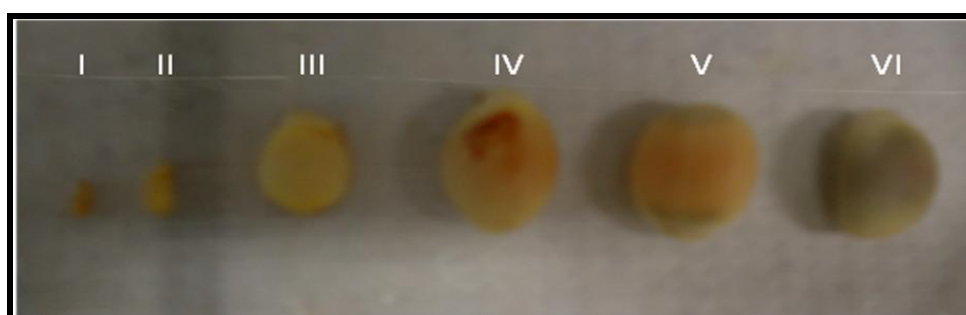


Figura 4. Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de desenvolvimento. Os estágios de desenvolvimento foram divididos em 6 fases e cada uma foi identificada por algarismos de I à VI.

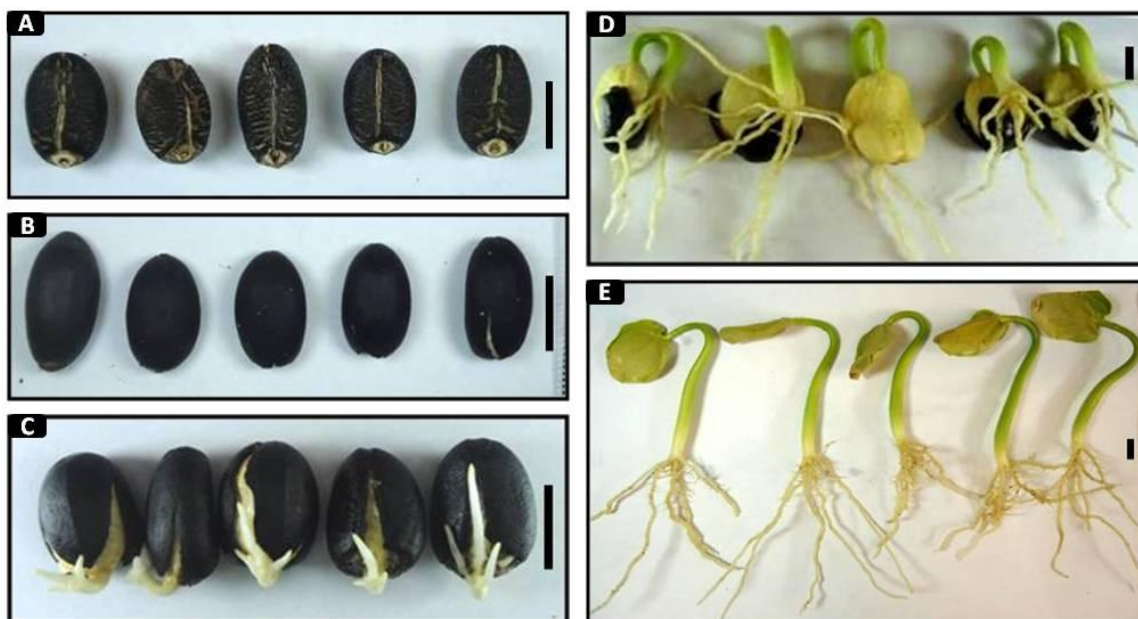


Figura-5. Sementes de pinhão manso em diferentes estágios de germinação. A –As sementes maduras (0 dias); B- 2 dias após a germinação; C-4 Dias; D- 6 dias; E- 8 dias de germinação. Barras equivalentes a 1cm.

4.1.2. Extração e purificação de RNA total

O procedimento de extração de RNA foi realizado em bancada estéril com material livre de ribonucleases. Todas as soluções para extração de RNA foram preparadas com água autoclavada contendo DEPC 0,01%.

Aproximadamente 300 mg de tecido (integumento e endosperma), previamente congelados, foram macerados em nitrogênio líquido e submetidos à extração de RNA com auxílio do kit Plant RNA Purification Reagent (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da extração, o RNA total foi resuspenso em 50µL de água livre de nucleases. A purificação do RNA total extraído foi feita com o kit de purificação RNeasy Plant Mini Kit® (Quiagen), conforme orientações do fabricante. Uma DNase livre de RNase foi adicionada durante a etapa de purificação dos RNAs.

4.1.3. Quantificação e análise da integridade de RNA total

A determinação da concentração e qualidade do RNA ocorreu antes e após o processo de purificação. A concentração e a pureza das amostras de RNA foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) em leituras a 260nm e razões 260/280nm e 260/230nm de absorvância. Para determinação da integridade e qualidade do RNA total, 0,5µg de RNA total foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, previamente corado com brometo de etídio (0,5µg/µL). O RNA total foi visualizado em transluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems).

4.1.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Uma alíquota contendo 2µg de RNA total purificado foi utilizada para síntese do DNA complementar. Para cada reação foram adicionados 1µl de Oligo dT₁₂₋₁₈ (0,5µg/µL) (Invitrogen), 1µl de dNTP 10mM, (Quiagen), 2,4µl de MgCl₂ 25mM (Invitrogen), 4µl de tampão de reação 5X (ImProm-II™ Reaction Buffer, Promega) e água livre de RNases. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 min para desnaturação e rapidamente transferidas para banho em gelo. Logo após, 1µl de transcriptase reversa ImProm-II™ (Promega) foi adicionado em cada amostra, completando o volume da reação para 20µl. A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 42°C por 1h, seguida de 75°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

4.1.5. Síntese de iniciadores para expressão por RT-qPCR

Iniciadores específicos para genes constitutivos utilizados para normalização foram construídos a partir de sequências de nucleotídeos, correspondentes aos genes depositados em biblioteca de cDNA de *Jatropha*, disponíveis em bancos de dados públicos como o WGS do NCBI. Seis genes constitutivos (Tabela 1) que codificam a actina-11 (ACT11), alfa-tubulina 2 (Tα2), fator de alongação 1-alfa (α-EF1), proteína fosfatase 2A-2 (PP2A2), poliubiquitina-3 (PUB3) e gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH), foram selecionados a partir da biblioteca de cDNA de *J. curcas* para análise de expressão gênica. Os iniciadores foram construídos com junções éxon-éxon usando o programa Perl Primer v.1.1.20 (Marshall,

2004), com temperaturas de fusão (T_m) de 58-60 °C. O tamanho dos iniciadores variou de 20 a 24pb e o comprimento dos amplicons de 60-210pb (Tabela 1).

Tabela-1. Lista de genes constitutivos (genes de referência) utilizados na normalização dos dados.

<i>Gene abbreviation</i>	<i>Gene product</i>	<i>Accession nº</i>	<i>Primer sequences</i>	<i>Amplicon (bp)</i>
ACT11	actin 11	GT981647	CTAAAGGCTAATGGGGAAAC/ CAACCACTTGATTAGAAGCC	68
Tα2	tubulin alpha-2	GT973596.1	TTCACTGTCTATCCATCTCC/ ATGAGGAAATCACCTGAGAG	207
EF1-α	elongation factor 1-alpha	GT973112.1	TGCTGTGCTCATTATTGAC/ GCATCCATCTTGTGCAG	137
PP2A2	protein phosphatase 2A-2	GT981067	AATATGGAAATGCCAACGTC/ GTAAGCAGAAGACCTGACTC	92
PUB3	polyubiquitin-3	GT982408.1	GATAGAAGTCCTCAGAAGCA/ CAATAGTGTCTGAGCTTTC	107
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2	GT982081	TGGTTGATCTCACTGTTAGG/ AGACTCCTCTTTGATAGCAG	73

A junção éxon-éxon dos primers foi necessária para diminuir risco de contaminação com DNA genômico nos ensaios de RT-qPCR. Todos os pares de iniciadores foram inicialmente testados via RT-PCR. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2%, conforme já descrito.

Os oligonucleotídeos específicos alvos para expressão gênica foram desenhados partir de sequências de nucleotídeos, correspondentes aos genes, depositados no banco de dados do genoma de *Jatropha curcas*, disponíveis em: <http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>. Esses oligonucleotídeos específicos amplificaram genes cujos produtos são proteinases cisteínicas relacionadas à morte celular programada e à maturação de proteínas de reservas. Sete genes alvos: JcCB0580861; JcCA0047111; JcCA0152821(KDEL) e JcCA0012422 JcC0196871; JcCB0244081 JcCB0060111 (VPEs) foram selecionados a partir do banco do genoma de *Jatropha curcas* para análise da expressão gênica.

Os iniciadores foram desenhados em junções éxon-éxon usando o programa Perl Primer v.1.1.20 (Marshall, 2004), com temperaturas de fusão (T_m) de 58-60°C. O tamanho dos iniciadores variou de 20 a 24pb e o comprimento dos amplicons de 81-150pb. Todos os pares de iniciadores foram inicialmente testados via RT-PCR.

4.1.6. RT-PCR

A RT-PCR foi realizada sob as seguintes condições: para cada reação foram adicionados 1µL de cDNA (~800ng), 1µl de dNTP 5mM, 0,75µl de cada oligonucleotídeo iniciador 20µM (senso e anti-senso), 0,125µl de enzima Go Taq® DNA Polymerase 5U (Promega), 5µl de tampão de reação 5X (Go Taq® 5X Green Buffer, Promega) e água livre de RNases, totalizando um volume final de 25µL por reação. A amplificação foi conduzida em termociclador Biocycler, empregando-se um programa com etapa inicial de pré-desnaturação a 92°C por 5 minutos, seguida de 25 a 28 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 25 seg a 72°C. Após isso, foi realizado um ciclo adicional de extensão final de 5 minutos a 72°C. Uma alíquota de 5µL dos produtos de PCR de cada gene foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 2%, conforme descrito anteriormente.

4.1.7. RT-qPCR.

A RT-qPCR foi realizada utilizando o *Mastercycler® ep realplex* da *Eppendorf*, em uma placa de reação de 96 poços, conforme recomendações contidas no kit *SYBR® Green Rox Plus* (*Applied Biosystems*). Cada reação continha 0,4µL de cada iniciador (400 nmoles), 1ul de cDNA (100 ng), 10µl de Power 1X SYBR® Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*) e 8,2µl de água livre de RNases totalizando um volume final de 20µl por reação. Alíquotas da mesma amostra de cDNA foram utilizadas para todos os conjuntos de iniciadores em cada experimento. As condições de temperatura dos ciclos para PCR foram de 95°C por 15 minutos para ativação da enzima no 1º ciclo; 95°C por 15 segundos para desnaturação da fita; 50-60°C de anelamento por 15 segundos e extensão a 60°C por 25 segundos, no total de 40 ciclos.

4.1.8. Análises dos dados

O perfil da expressão dos genes constitutivos de *J. curcas* foram analisados usando o software geNorm (Vandesompele et al., 2002). O geNorm é uma aplicação básica visual (VBA) para Microsoft Excell que calcula automaticamente uma medida de estabilidade de expressão (valor de M) para cada gene constitutivo em um dado grupo de amostras com variação da média em pares (valores de V) de um gene específico com todos os genes controle. O valor M é definido como uma variação média de certo gene em relação a todos os outros testados. Genes com valores de $M < 1,5$ têm maior estabilidade, quando ocorre o

oposto a instabilidade aumenta (Vandesompele et al., 2002). A exclusão gradual do gene com o maior valor M permite fazer um ranking com os genes testados de acordo com a sua estabilidade de expressão. Além disso, o geNorm indica o número mínimo de genes necessários para uma normalização acurada dos dados e que seus autores sugerem a utilização de dois ou mais genes para normalização ao invés de apenas um (Vandesompele et al., 2002). A quantidade de genes necessários irá depender dos valores V do geNorm. Os valores V são definidos como valores da variação da média em pares de determinados genes. Valores abaixo do limite de corte $V < 0,15$ sugerido pelo geNorm indicam o número ótimo de genes necessários para normalização de determinados dados.

Após ter feito a estabilidade dos genes constitutivos e obtido a expressão relativa tanto dos genes constitutivos e genes alvos usando o *Mastercycler*® ep com auxílio do programa *realplex*, foram feitos estudos de normalização e validação dos dados. A normalização é a comparação do perfil da expressão do gene de referência com os genes alvos em estudo. Já a validação é usar um ou mais genes cujo padrão de expressão é conhecido e normalizar usando os genes constitutivos em estudo. Esse procedimento foi feito manualmente no excel usado o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ de Livak *et al.*, (2001). Além disso, os dados foram confirmados com o auxílio do programa *q-BASE plus* (Biogazelle). O programa *GraphPad Prism*® 5.02 foi utilizado para construção dos gráficos da análise da expressão relativa dos genes alvos usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Extração e purificação de RNA total de pinhão manso

As concentrações das amostras de RNA total de integumento e endosperma de sementes em desenvolvimento e na germinação de *J. curcas* variaram entre 0,32ug/ul a 1,86ug/ul. Na germinação a concentração das amostras de RNA variou de 0,15ug/ul a 0,89ug/ul.

A relação entre as absorbâncias a 260nm e 280nm deve ser acima de 1,8 para que uma amostra de RNA seja considerada de qualidade e livre de proteínas. Contudo, outros pesquisadores defendem que amostras que apresentem relação entre as absorbâncias a 260nm e 280nm acima de 1,6 já possuem qualidade satisfatória para a maioria dos experimentos de biologia molecular (Romano, 1998). A relação entre as absorbâncias a 260nm e 230nm deve ser maior que 2 para termos uma amostra livre de contaminação por carboidratos e polifenóis (Sambrook. *et al.* 1989). As amostras de RNA extraídas satisfizeram esse padrão. Os RNAs totais extraídos apresentaram bandas íntegras indicando que não houve degradação, porém ainda com DNA genômico. (Figuras 6 e 7).

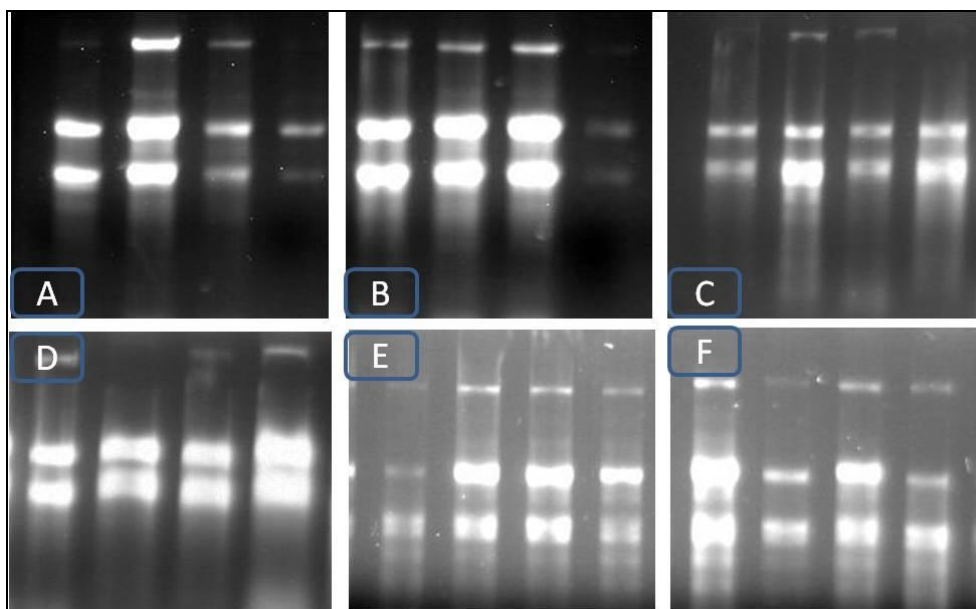


Figura-6. Eletroforese de RNA total de integumento de sementes de *J. curcas*. Os géis de agarose A, B, C, D, E e F referem-se aos estágios de desenvolvimento I, II, III, IV, V e VI respectivamente, nas quais cada estágio por gel aparece em quadruplicata.

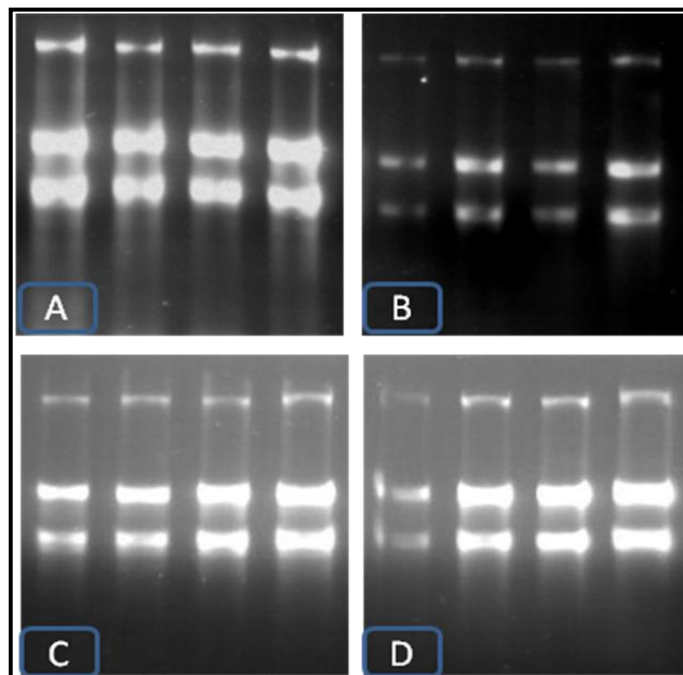


Figura-7. Eletroforese de RNA total de endosperma de sementes de *J. curcas*. Os géis de agarose A, B, C, D, referem-se aos estágios de desenvolvimento IV, V e VI e VII (maduro) respectivamente, nas quais cada estágio por gel aparece em quadruplicata.

Após a extração do RNA total realizou-se a purificação para retirada de carboidratos, proteínas e DNA genômico que ficaram retidos na extração do RNA. Os valores apresentados na quantificação entre as absorvâncias de 260nm e 280nm e a relação entre as absorvâncias de 260nm e 230nm foram acima de 2 (valor resultante da divisão de 260 nm/230nm) indicando que as amostras de RNA total apresentavam-se livres de contaminantes que posteriormente poderiam interferir durante a RT-PCR. A maioria das amostras extraídas satisfaz esse padrão de quantificação, demonstrando que os RNAs extraídos estavam com boa qualidade e livres de proteínas e carboidratos. As amostras de RNA também estavam desprovidas de DNA genômico (Figuras 8 e 9).

Os RNAs obtidos de endosperma nos estágios maduro, 2, 4, 6 e 8 dias após a germinação apresentaram-se íntegros e livres de contaminantes (Figura 10 e 11). Após a purificação do RNA extraído podemos observar que as relações de absorvância 260/280 e 260/230 estão no padrão esperado. Além disso, livres de DNA genômico (Figuras 10 e 11).

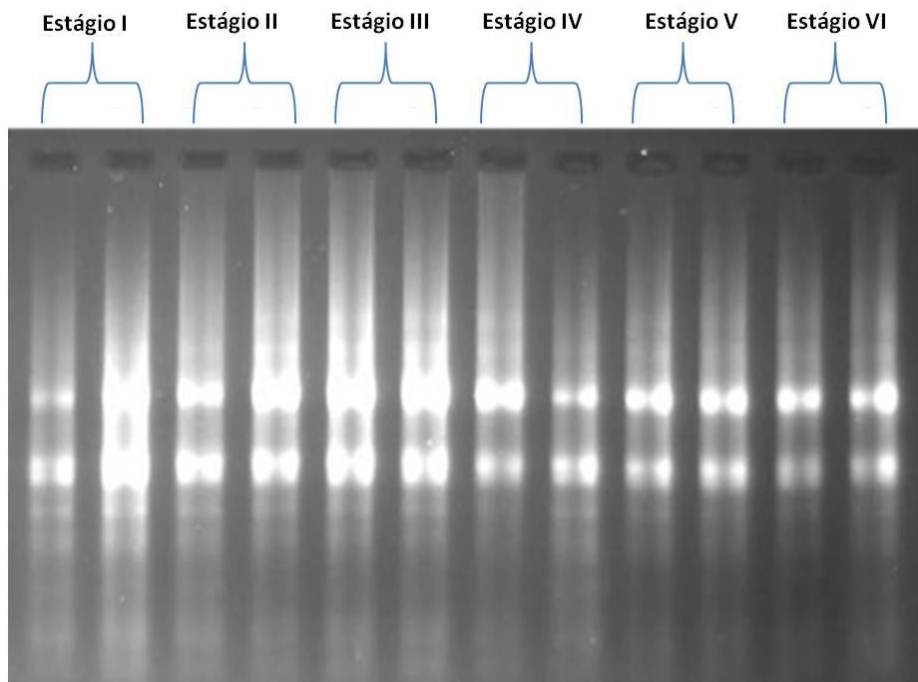


Figura-8. Eletroforese de RNA total purificados de integumento de sementes de *J. curcas* em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose 1,2% refere-se aos estágios de desenvolvimento I, II, III, IV, V e VI os quais aparecem em duplicata.

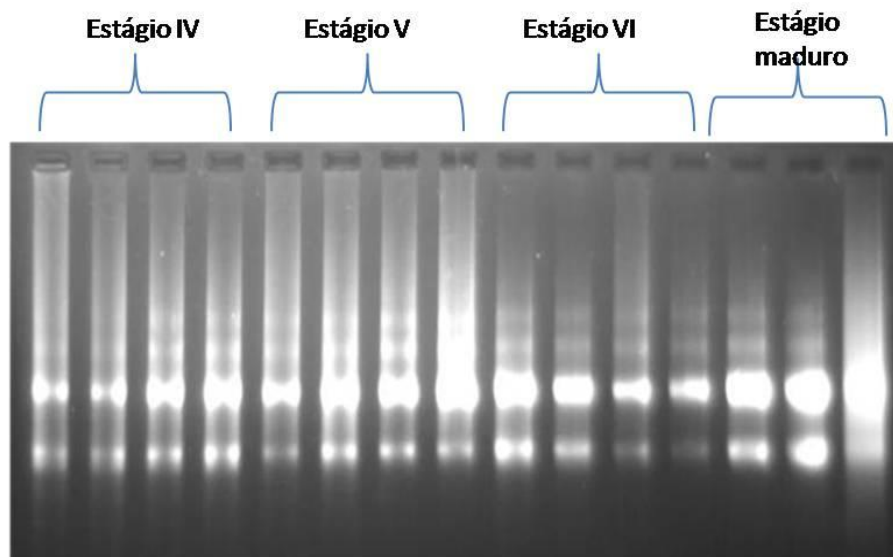


Figura-9. Eletroforese de RNA total purificados de endosperma de sementes de *J. curcas* em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose 1,2% refere-se aos estágios de desenvolvimento IV, V e VI e VII (sementes maduras), os quais aparecem em quadruplicata no gel.

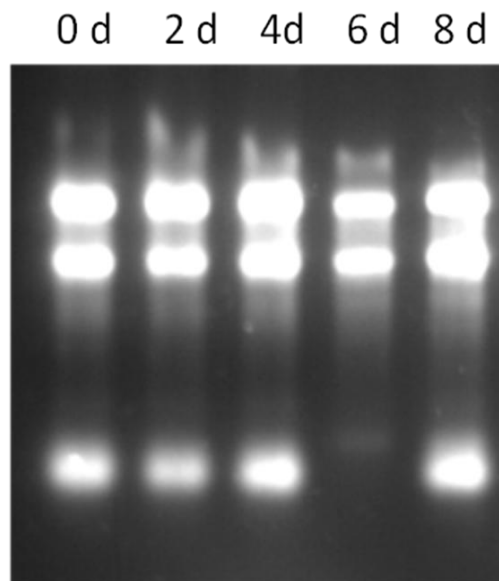


Figura-10. Eletroforese de RNA total de endosperma de sementes em germinação de *J. curcas* em gel de agarose 1,2%. O gel de agarose refere-se aos estágios maduro (0 dias), 2d, 4d, 6d e 8 dias.

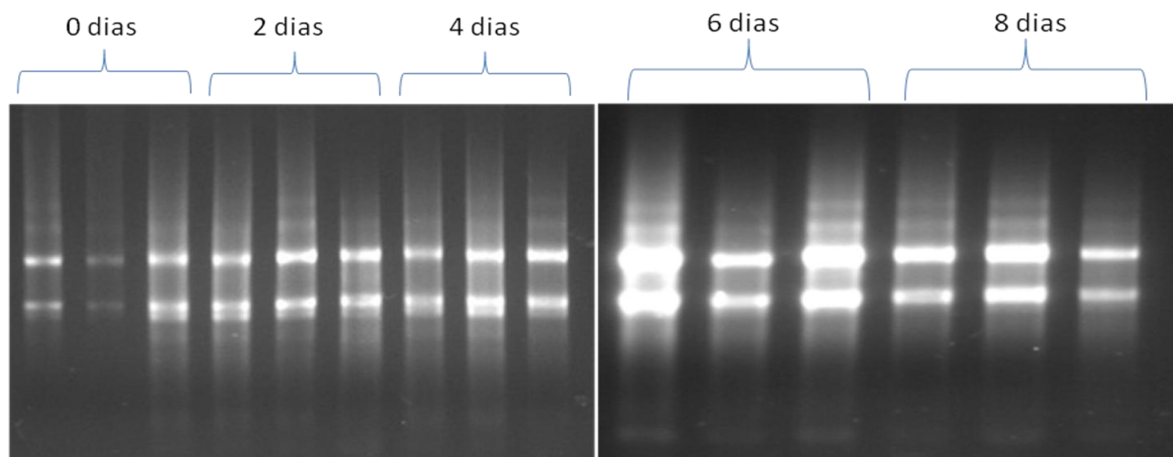


Figura-11. Eletroforese de RNA total purificados de endosperma de sementes em germinação de *J. curcas*, em gel de agarose a 1,2%. O gel de agarose refere-se aos estágios maduro 0d, 2d, 4d, 6d e 8d (d = dias), os quais aparecem em triplicata no gel.

A quantidade e qualidade do RNA extraído são fatores fundamentais para obtenção de êxito em protocolos de biologia molecular, pois problemas na quantificação podem afetar a reprodutibilidade e, portanto, a relevância dos resultados. Amostras de RNA consideradas de alta qualidade são livres de nucleases, proteínas, carboidratos e DNA genômico (Bustin *et al*, 2004; Nolan, 2004; Pfaffl, 2005; Fleige; Pfaffel, 2006). Como os valores de A260/280 e A260/230 são superiores a 2 e livres de DNA genômico, o RNA é considerado de alta qualidade com base na literatura citada.

5.2. Estabilidade de expressão dos genes constitutivos analisada por RT-qPCR em tecidos de *J. curcas*

Para a análise de estabilidade da expressão de genes foram utilizados os genes constitutivos: EF1- α (fator de alongação), PP2A2 (fosfatase2A) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), actina11, poliubiquitina (PUB3) e alfa tubulina (T α 2). Os transcritos com menores valores de CT na RT-qPCR foram o GAPDH, EF1- α e actina11 representando 20,7; 21,6 e 22,9, respectivamente, enquanto os transcritos com maiores valores de CT foram T α 2; PUB3 e P2A2 representando 23, 2; 24,1 e 27,7 respectivamente (figura 12). Os valores de CT são inversamente proporcionais à expressão, ou seja, quanto menor o CT mais expresso é o transcrito, pois precisaram de menos ciclos na RT-qPCR para que o nível de fluorescência atingisse a linha limiar arbitrário (threshold). Logo, o transcrito mais expresso foi o GAPDH enquanto o menos expresso foi o P2A2.

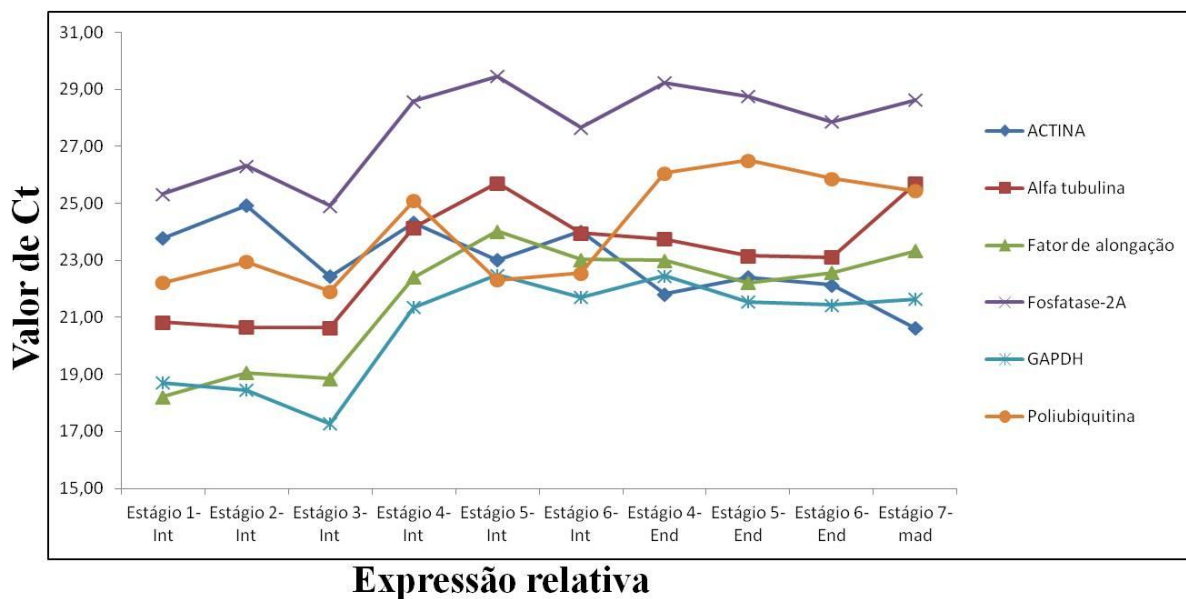


Figura-12. Expressão relativa dos genes constitutivos em diferentes estágios do integumento e endosperma. No gráfico estão os valores de Ct dos transcritos dos genes constitutivos com maior e menor expressão na RT-qPCR e o nível de expressão nos estágios estudados.

A estabilidade da expressão dos genes constitutivos foi feita em duas condições experimentais: a primeira, durante o desenvolvimento da semente utilizando-se 10 condições (6 estágios do integumento e 4 estágios do endosperma) e a segunda durante a germinação da semente, utilizando-se cinco estágios: maduro, 2d, 4d, 6d e 8 dias.

O programa geNorm foi usado para estimar a estabilidade de expressão dos genes constitutivos (valores M) nas condições testadas. Os resultados da estabilidade dos genes constitutivos mostraram que os genes Poliubiquitina (PUB3), alfa tubulina (TA2), EF1- α (fator de alongação), PP2A2 (fosfatase 2A) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) apresentaram valores M abaixo do valor do limite de corte ($M < 1,5$) sugerido pelo geNorm. Os genes mais estáveis, utilizados como referência para as amostras de endosperma e integumento em desenvolvimento foram: GAPDH, PP2A2 e EF1- α e TA2, respectivamente (figura 13) e menos estáveis foram Actina, PUB3 e Ta2. Os valores M de maior estabilidade para os genes GAPDH, PP2A2, EF1- α e TA2 foram de 0,60; 0,65; 0,70 e 0,8 respectivamente. Os valores de menor estabilidade para os genes Actina, PUB3 e Ta2 foram de 1,70; 1,15 0,80 respectivamente (figura13).

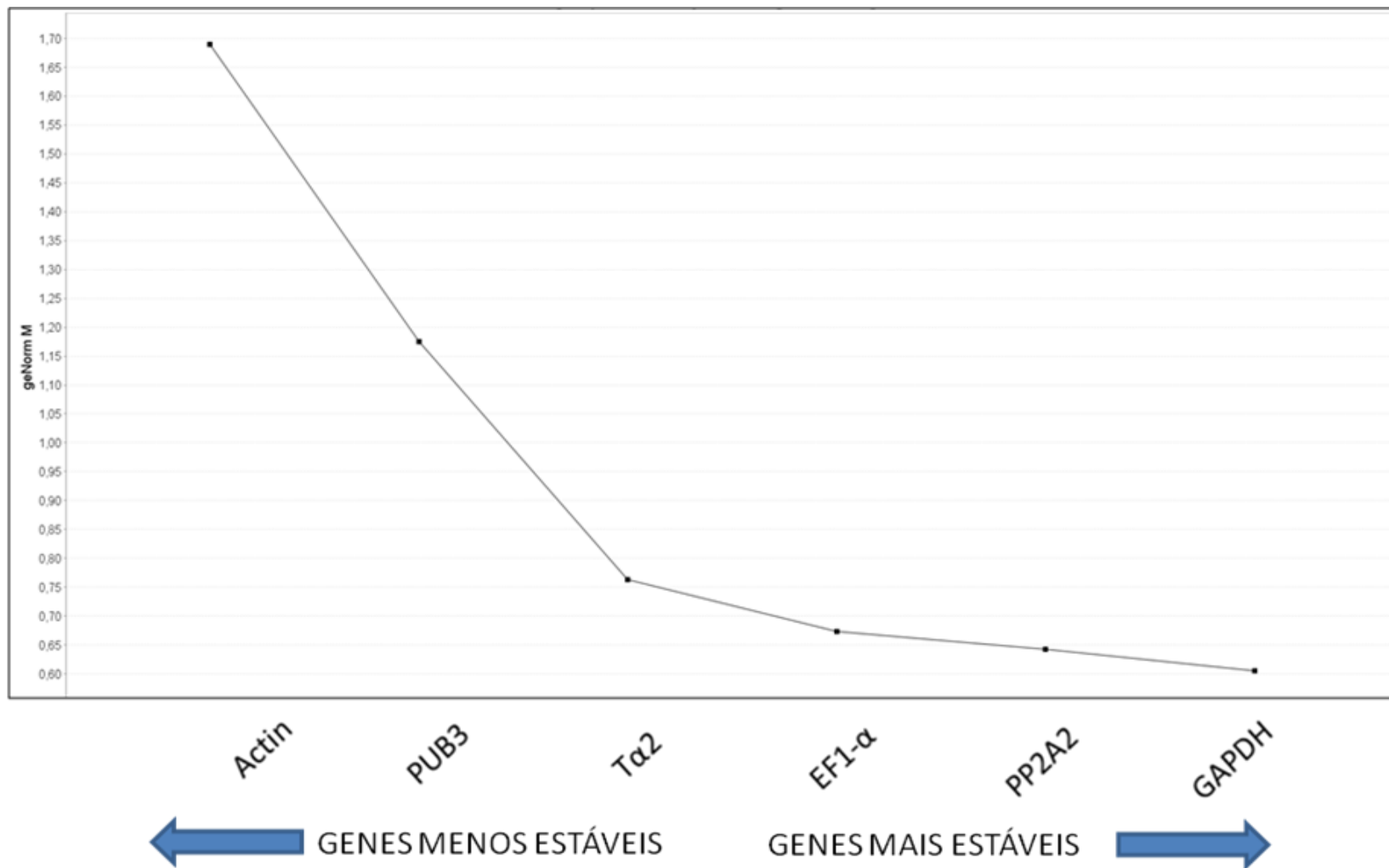


Figura-13. Estabilidade de expressão média de genes de referência com valores M sugerido pelo geNorm no desenvolvimento de tecidos de *Jatropha curcas*. O gráfico mostra os genes mais estáveis em ordem crescente: Actin; PUB3, TA2, EF1- α , PP2A2 e GAPDH.

Amostras do endosperma de sementes em germinação apresentaram resultados semelhantes aos encontrados nas sementes em desenvolvimento conforme pode ser verificado na figura 14. Os genes mais estáveis durante a germinação foram GAPDH, PUB e TA2. Já os genes com menores valores de estabilidade foram a actina, EF1- α e PP2A2 (figura 14). Os valores de maior estabilidade (valores M) na germinação para os genes GAPDH, PUB e TA2 foram de 0,5; 0,56 e 0,575 respectivamente. Já os genes com menores valores de estabilidade foram a actina, EF1- α e PP2A2 com valores de 1,050; 0,71 e 0,65 respectivamente (figura 14). Curiosamente o GAPDH foi identificado entre os genes constitutivos como sendo o mais estável durante a análise e comparação com as amostras de tecido do endosperma e integumento em desenvolvimento, bem como a actina sendo o gene de menor estabilidade durante o desenvolvimento e germinação de sementes.

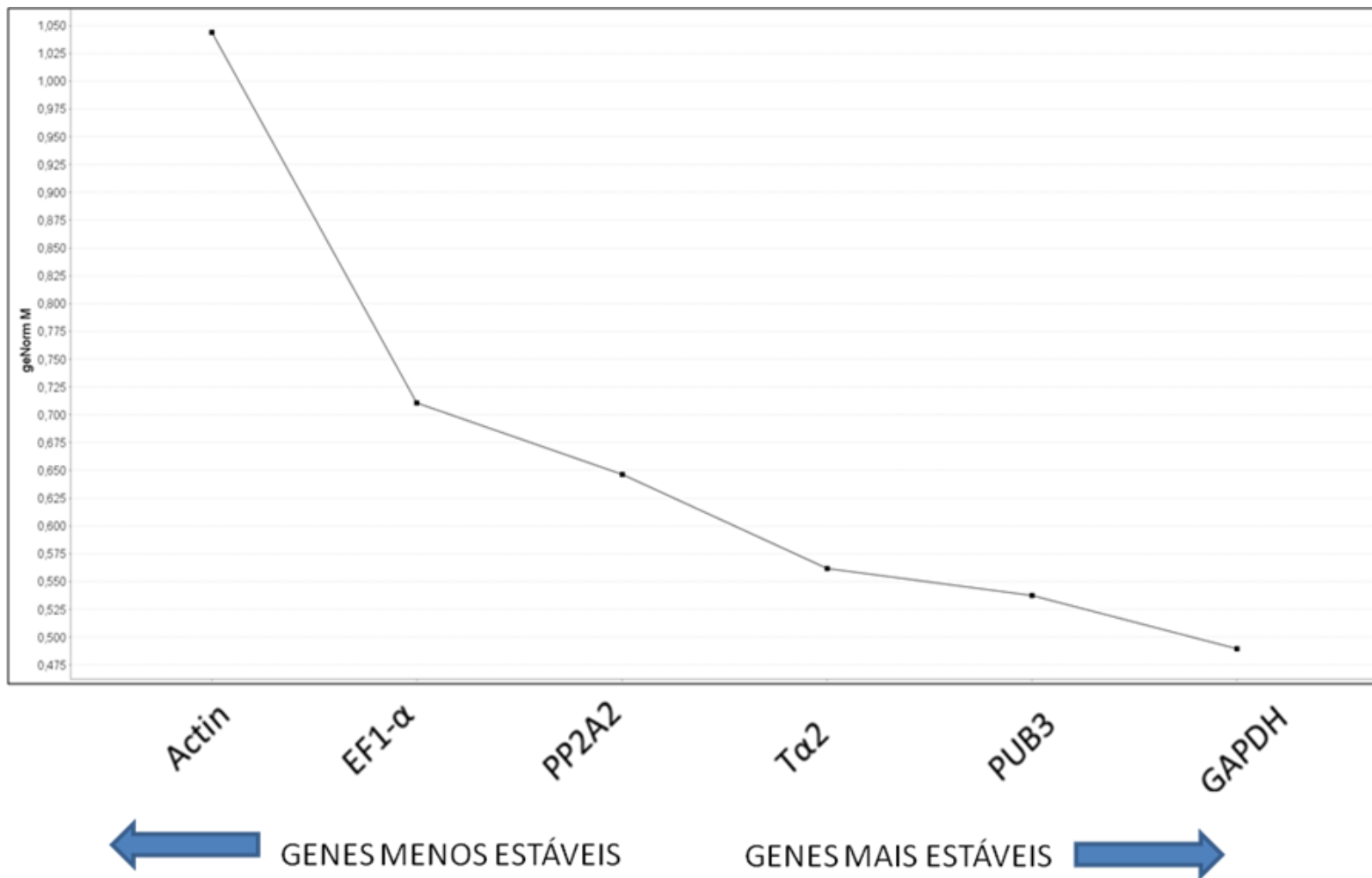


Figura-14. Estabilidade de expressão média de genes de referência de sementes em germinação de tecidos de *Jatropha curcas* com valores M sugeridos pelo geNorm. O gráfico mostra os genes mais estáveis em ordem crescente: Actin, EF1- α , PP2A2, TA2, PUB3 e GAPDH.

O programa geNorm também avalia o número de genes controle requeridos para normalização realizando a análise aos pares verificando assim a variação da expressão dos genes dois a dois e indicando as possíveis combinações gênicas. O geNorm estimou o número de genes necessários para normalização dos dados sendo representado por valores de variação “V”. O resultado desta análise mostrou que para os dados do desenvolvimento normalizado foi necessária a adoção de quatro genes que apresentasse grande estabilidade, devido a estas condições e sugestões indicadas pelo programa geNorm, sendo os genes GAPDH, PP2A2, EF1- α e TA2 foram escolhidos. Estes genes foram utilizados para o estudo e tornou-se a opção mais adequada à análise sugerida pelo geNorm. A variação V foi de 0,14 a qual se encontra abaixo do valor de corte sugerido pela literatura (0,15) indicando que esse número de genes selecionados é a melhor escolha para o estudo de normalização (Vandesompele et al, 2002) (figura-15).

Os resultados da variação aos pares feita pelo geNorm permitiram identificar que, exceto pela utilização de 4 genes, à medida em que se incorporava novos genes à análise ou se retirava genes, os valores V se modificavam levando a valores abaixo ou acima do valor de corte sugerido pelo geNorm (0,15). Com a utilização de 2 genes (V2/3) o valor da variação V resultante foi 0,19, com 3 genes (V3/4), a variação V diminuiu para 0,17. Quando se usou 4 genes (V4/5) a variação V diminuiu para 0,14, abaixo do valor de corte sugerido que é de 0,15. Por fim, quando se utilizaram 5 genes, os valores V aumentaram para 0,28 (figura 15). Pode-se concluir, que a adoção de 4 genes para normalizar os dados de RT-qPCR foi a melhor para todas as condições testadas.

Os dados da expressão relativa de sementes em germinação também foram analisados pelo geNorm. Quando se utilizaram 2 genes (V2/3) para análise o valor da variação V foi 0,25. No entanto, ao adicionar-se 3 genes (V3/4) o valor V diminuiu para 0,18. Entretanto, ao ser usado quatro genes (V4/5) a variação V aumentou consideravelmente para 0,35. Quando cinco genes foram adicionados, os valores V aumentaram para 0,42 (figura 16). Pode-se concluir que a adoção de três genes para normalizar os dados de RT-qPCR foi a melhor dentre todas as condições testadas selecionando-se os genes GAPDH, PUB e TA2. Apesar do valor V obtido nos experimentos (0,18) ter ficado acima do valor de corte sugerido pelo geNorm (0,15), esta combinação foi a melhor (figura 16). Valores de “V” muito acima de 0,15 implicam na não confiabilidade dos dados usados na PCR em tempo real.

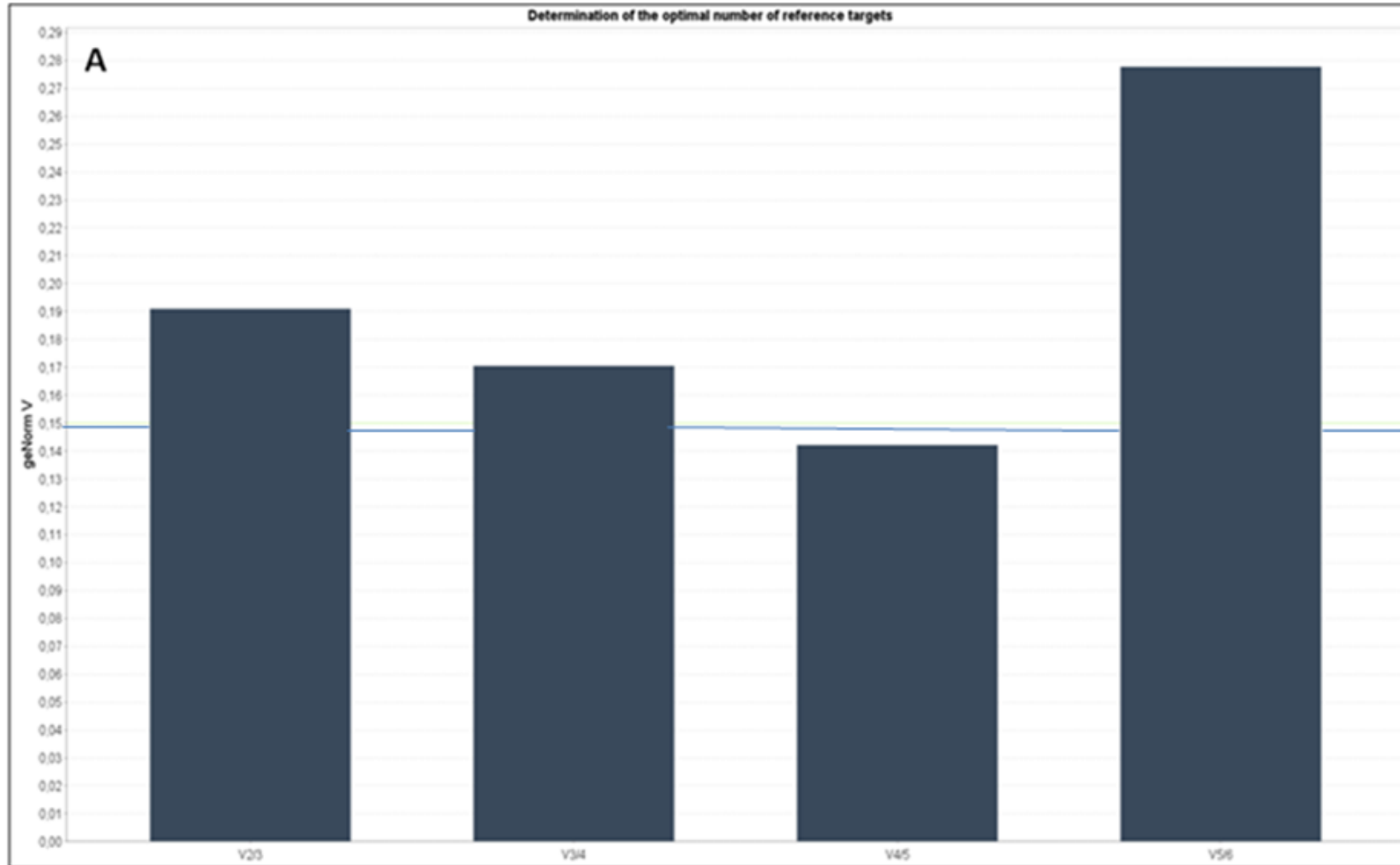


Figura 15. Gráfico do geNorm mostrando a determinação do número de genes de referência mais adequado para a normalização dos genes alvos durante o desenvolvimento da de sementes de pinhão manso. A – Dados dos valores V do geNorm usando uma combinação de 2 genes (V2/3); 3 genes (V3/4) e 4 genes (V4/5) usadas na expressão de genes de referência no desenvolvimento de sementes de pinhão manso.

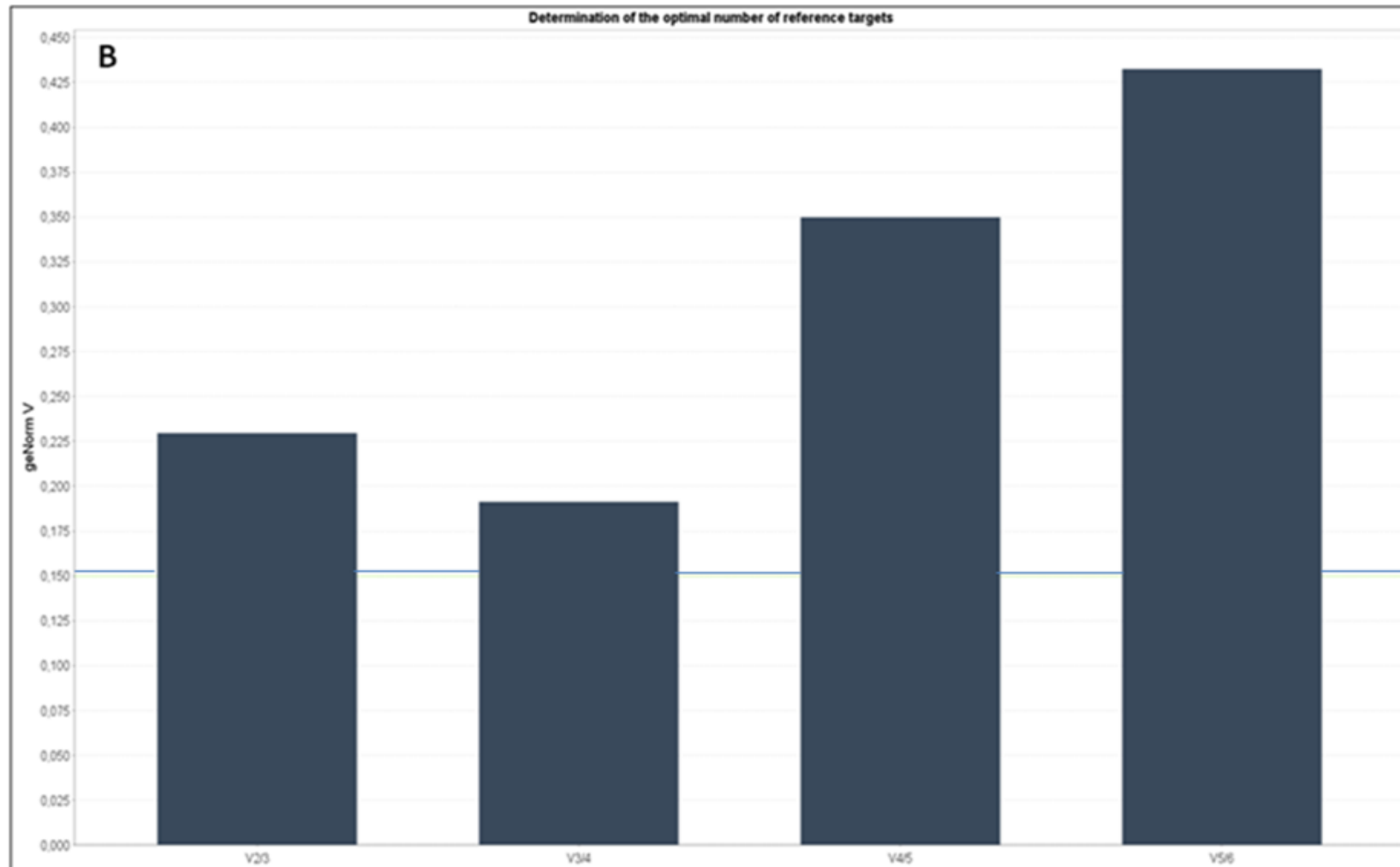


Figura 16. Gráfico do geNorm mostrando a determinação do número de genes de referência mais adequado para a normalização dos genes alvos de sementes em germinação de pinhão manso. Dados da variação V do geNorm na expressão de genes HKGs em sementes em germinação usando as mesmas combinações de genes de referência em sementes de germinação de pinhão manso.

Portanto, para normalizar os genes alvo de sementes em desenvolvimento foram adotados 4 genes de referências: GAPDH, PP2A2 e EF1- α e TA2. Esses genes, além de serem os mais estáveis (valores M) formaram um número ideal para normalizar os genes alvo (valores V). Para normalizar os mesmos genes usando os cDNAs do endosperma em germinação houve uma mudança tanto na quantidade quanto na escolha dos genes. No endosperma em germinação adotaram-se somente 3 genes de referência para normalização dos genes alvos: GAPDH, PUB e TA2.

O resultado dessas análises está de acordo com o trabalho de Cunha (2011) a qual realizou experimentos com os mesmos genes constitutivos (GAPDH, PUB, TA2, actina, PP2A2 e EF1- α), mas com diferentes estágios do endosperma e integumento de sementes em desenvolvimento de *Jatropha curcas*. Além disso, Cunha (2011) avaliou diferentes tecidos como integumento, endosperma, raiz e folha. Cunha (2011) mostrou que os genes constitutivos com maiores valores de Ct foram EF1- α e GAPDH, entretanto os transcritos menos abundantes foram Actina11 e PP2A2 e PUB.

Em relação à estabilidade dos genes constitutivos (valores M) Cunha (2011), mostrou que os genes mais estáveis em tecidos de sementes em desenvolvimento e germinação, folha e raiz foram: PP2A2, PUB e EF1- α . Esses genes apresentaram valores M abaixo do limite de corte $M < 1,5$ como sugerido pelo geNorm. Quando cada grupo experimental foi avaliado separadamente, os genes constitutivos mais estáveis para as amostras de endosperma em desenvolvimento foram PUB, PP2A2 e GAPDH. Nas amostras de germinação os genes mais estáveis foram EF1- α , PP2A2 e PUB. Esta análise está de acordo com os resultados obtidos, exceto na germinação na qual os genes mais estáveis foram: GAPDH, e EF1- α PUB em oposição aos resultados apresentados por Cunha (2011).

Morais (2010) também avaliou a normalização de genes constitutivos usando o geNorm. Dentre os 14 genes constitutivos avaliados com o programa geNorm, consideram os genes Actina 2/7 e EF1- α os mais estáveis com valores M de 0,64, seguido por PUB, TIP (transportador de fosfato) e UBC (proteína de conjugação de ubiquitina rad6), com valores de M de 0,69, 0,76, e 0,83 respectivamente. Os genes menos estáveis foram Tubulina- β e tubulina- α e actina 11, apresentando valores de estabilidade de 1,65, 1,40 e 1,24 respectivamente. Esses resultados diferem dos nossos resultados avaliados pelo geNorm, mostrando que a expressão desses genes constitutivos pode variar consideravelmente entre

tecidos de diferentes genótipos e diversos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de escolher os genes mais adequados para cada experimento, pois um determinado gene de referência poderá ser o melhor para uma espécie, entretanto, pode não apresentar uma expressão estável em outras, bem como sobre diferentes condições ambientais (Brunner et al, 2004; Czechowski *et al*, 2005; Exposito-Rodriguez et al, 2008; Paolacci *et al*, 2008). Genes de referencia ideais devem apresentar níveis de expressão constante em toda planta, e não ter o seu perfil de expressão influenciado por tratamento exógeno (Hu *et al*, 2009).

Em outro trabalho, Pinheiro (2009) estudou a normalização de genes constitutivos em sementes de cacauzeiro (*Theobroma cacao*) usando o geNorm para estimar a estabilidade dos genes necessários para expressão de genes associados à biossíntese de ácidos graxos. Os resultados da análise de expressão dos genes constitutivos nas sementes mostraram que dentre os 10 genes analisados, os genes mais estáveis foram GAPDH e PUB, com valores “M” de estabilidade de 1,45 e 1,4 respectivamente. Já os genes menos estáveis foram tubulina 6 (TUB 6) e EF1- α . Os resultados dos valores M foram de 3,23 e 2,26 respectivamente. Parte desses resultados mostra que alguns dos genes mais estáveis estão compatíveis com nosso trabalho, na qual mostra que um dos genes constitutivos, o GAPDH, se posiciona como o gene de maior estabilidade, no entanto o EF1- α , se mostra como gene menos estável no experimento de Pinheiro (2009), diferente de nossa análise, na qual o EF1- α foi um dos genes mais estáveis em sementes em desenvolvimento de pinhão manso, porém, este gene, se colocou entre os genes menos estáveis na germinação.

Cunha (2011), também analisou o número de genes constitutivos controle requeridos para normalização através da avaliação dos valores V sugerido pelo geNorm. Nesta análise, revelou-se que a adoção de 3 genes seria a melhor escolha sugerida pelo geNorm. No presente estudo os resultados foram: para tecidos de integumento e endosperma em desenvolvimento 4 genes para a melhor escolha e na germinação 3 genes, ambos baseados nos valores de Parwise (valores V) sugeridos pelo geNorm.

Morais (2010) também avaliou a normalização de genes constitutivos usando os valores “V” do geNorm. Entre os 14 genes constitutivos avaliados, a análise do programa geNorm identificou que os cinco genes Actin 2/7, EF β , UBI, Tip e UBC atingiram uma variação inferior a 0,15, mostrando a importância de obter valores abaixo do valor de corte sugerido pelo geNorm.

Estudos com genes de referência utilizando o geNorm foram realizados com *Arabidopsis thaliana* (Czechowski *et al*, 2005, Remans *et al*, 2008), arroz (Jain *et al*, 2006), álamo (Brunner *et al*, 2004), batata (Nicot *et al*, 2005), café (Barsalobres-Cavallari, *et al* 2009), pêssego (Tong *et al*, 2009), soja (Hu *et al*, 2009), tomate (Exposito-Rodriguez *et al*, 2008), trigo (Paolacci *et al*, 2009), poplar (Gutierrez *et al*, 2008) entre outras plantas, indicando que o geNorm é um programa adequado e muito usado para esse tipo de procedimento experimental usando RT-qPCR.

Dados precisos da expressão relativa podem ter uma influência significativa baseada na escolha de um ou vários genes de referência para normalizar os resultados finais. Alguns estudos relataram a expressão instável de genes constitutivos em condições experimentais, incluindo fases de desenvolvimento e tratamento da amostra (Livak *et al*, 2001; Vandesompele *et al*, 2002, Pfaffl *et al*, 2004). Conseqüentemente, a normalização de dados de expressão usando um gene de referência inadequado pode levar a interpretações errôneas (Bustin *et al*, 2009). Isso enfatiza a necessidade de validar a estabilidade de expressão de um gene controle antes da sua utilização na normalização por RT-qPCR (Pfaffl *et al*, 2004; Bustin *et al*, 2004, Livak *et al*, 2001; Morais, 2010).

O emprego de genes constitutivos em RT-qPCR é fundamental para normalização dos níveis de expressão obtidos por esta técnica evitando-se assim erros de interpretação dos dados. Inúmeros trabalhos têm descrito métodos para seleção de genes de referência, na qual se encontram entre os mais citados aqueles baseados na validação de múltiplos genes (Vandesompele *et al*, 2002) e na análise estatística da variância do Ct do gene de referência (Pfaffl *et al*, 2004).

Nesse estudo, a RT-qPCR foi utilizada para avaliar a expressão de seis genes constitutivos sob diferentes estágios de desenvolvimento e tecidos de forma a selecionar os genes mais adequados ao estudo do transcriptoma de genes relacionados à morte celular programada em sementes de pinhão manso.

5. 3. Validação dos genes de referência por RT-qPCR

Para validar nossos resultados, nós estudamos o padrão de expressão do gene oleosina 3 (OLE3). As oleosinas são as proteínas estruturais mais abundantes incorporadas em monocamadas fosfolipídica dos corpos de petróleo e é suposta para evitar a coalescência destas organelas (Graham, 2008). Como esperado, a OLE3 foi altamente expressa no endosperma a partir de sementes em estágio de desenvolvimento e em sementes maduras, enquanto que durante a germinação, a sua expressão diminui gradualmente (Figura 16). A transcrição da oleosina 3 também foram encontradas no integumento de sementes em desenvolvimento, mas em baixos níveis (figura-16). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores sobre a distribuição espacial e temporal de oleosinas de sementes (Costa et al, 2010; Hsieh et al, 2000; Lu et al, 2007; Vandana et al, 2006).

Excepcionalmente, o uso de EF1- α como gene de referência único ao analisar todas as amostras em conjunto, resultou em uma estimativa diferente de expressão relativa da OLE3 na fase intermédia do desenvolvimento da semente, o que realça a importância de tomarmos a média geométrica de múltiplos genes, além do uso de um único gene para a normalização. Não surpreendentemente, o uso de menos HKGs estáveis para normalizar os dados de OLE3 expressão leva a interpretações divergentes e equivocada do experimento. Embora, o gene da actina já havia sido utilizado como gene de referência para a análise da expressão em sementes de *J. curcas* (Xu et al, 2011), este gene não apresentou ter uma estabilidade de expressão no nosso estudo.

Nossos estudos estão de acordo com Cunha, 2011. O referido autor também usou a oleosina para validar seus experimentos. Cunha, 2011 mostrou que o padrão de expressão da oleosina foi bastante semelhante, na qual mostrou um nível alto de expressão nos estágios intermediários e em sementes maduras, bem como na germinação em 12, 24 e 48h. O nível de expressão do gene se mostrou também em raiz e folham, mas pouco expresso. Em nossos estudos, houve um grande nível dos transcritos no endosperma em desenvolvimento, desde estágio IV ao estágio de sementes maduras, decrescendo nos estágios de germinação (Figura-16). Além disso, houve pouca expressão nos estágios de integumento em desenvolvimento.

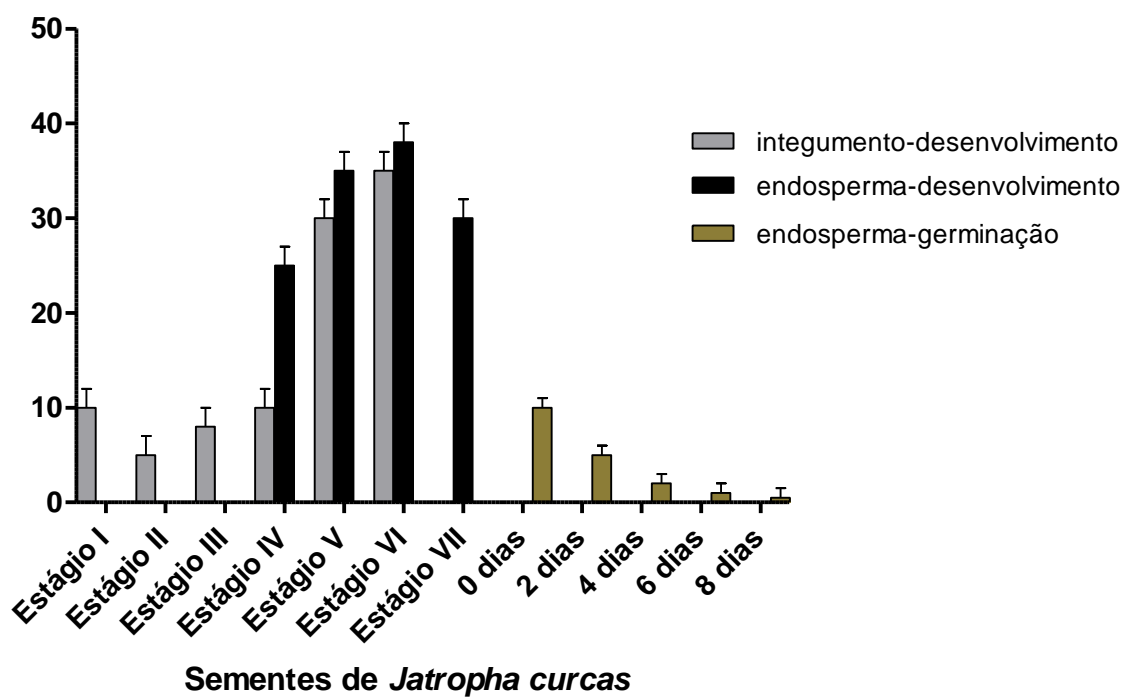


Figura-16- validação dos genes constitutivos (genes de referência). Para validação foi usado o gene oleosina 3 (OLE3) de sementes em desenvolvimento e germinação de *Jatropha curcas*.

5.4. Análise de expressão semi-quantitativa por RT-PCR

As análises de expressão semiquantitativa por RT-PCR de 7 transcritos de genes de interesse (tabela 2) foram classificadas em dois grupos: um grupo de sequências com um tetrapeptídeo KDEL na região C-terminal possivelmente envolvido na morte celular programada e um grupo de sequências de enzimas de processamento Vacuolar (VPE), possivelmente envolvidas na maturação de proteínas de reservas e na MCP de sementes de pinhão manso.

Nesse trabalho, a análise semi-quantitativa por RT-PCR contribuiu inicialmente para identificar se os produtos amplificados por PCR são condizentes ao tamanho esperado dos genes, este é um dos indicativos relacionados à especificidade de amplificação das sequências dos genes de interesse.

Os resultados observados na eletroforese semi-quantitativa mostraram que todos os pares de primers construídos amplificaram um único produto de PCR com tamanhos de amplicons esperados em todos os estágios analisados (Figura 17 e 18). A comparação entre o marcador molecular e as amostras observadas no gel de agarose, permitiu inferir a confiabilidade e fidelidade da especificidade do anelamento dos primers construídos a partir dessas sequências alvos de KDEL e VPEs disponíveis no banco de dados de *Jatropha curcas*.

Além disso, a análise da curva de fusão (*melting curve*) realizada após 40 ciclos de amplificação RT-qPCR mostrou que todos os pares de primers amplificaram apenas um único produto de PCR mostrando um único pico na curva de fusão em cada gene analisado (Figura 19 e 20) e corroboram com os dados observados na amplificação do RT-PCR.

Tabela-2. Genes de proteinases cisteínicas identificados em banco de dados. A tabela mostra o nome do gene de interesse com seus devidos códigos de acesso; produtos gênico, os quais podem ser uma proteinase cisteínica com C-terminal KDEL ou sequência VPE; sequências de primers; amplicons e subfamília de cada gene de proteinases cisteínica.

NOME DO GENE	CÓDIGO DE ACESSO (GENBANK)	PRODUTO GÊNICO	SEQÜÊNCIA DOS PRIMERS	AMPLICON	SUB-FAMÍLIA
JcCB0580861	BABX01091552.1	Proteinase cisteínica tipo KDEL	F TACTCAGAGGGCGTATTTACTG R CTCACAATCCAATATTTGGTTCC	138pb	Papain
JcCA0152821	BABX01005964.1	Proteinase cisteínica tipo RDEL	F AAATTGATGGATACGAAATGGTG R TCTCCAGTGAATATTGCCTC	138pb	Papain
JcCA0047111	BABX01026169.1	Proteinase cisteínica tipo KDEL	F CCAATGTGGATGTTGCTG R CTTAATCTTCTCCACTTGTGTC	130pb	Papain
JcCB0196871	BABX01069065.1	Proteinase cisteínica VPE (β VPE)	F GGTAAGGTAGTAAATAGCACGG R AAATTTGGCATCCCAAGAACC	88pb	Legumain
JcCB0244081	BABX01069065.1	Proteinase cisteínica VPE (β VPE)	F ATATAGGACGGTAAAGGAGAGG R GCTTGAATTTCCATATCCATCAC	81pb	Legumain
JcCA0012422	BABX01002756.1	Proteinase cisteínica VPE (β VPE)	F TTCAATCAGCTTCATTCACC R AACAGAAACACCAACATCAG	100pb	Legumain
JCCB0060111	BABX01093218.1	Proteinase cisteínica VPE (γ -VPE)	F GAATATTTATGCAACCACAGCAG R ATTGTGTACATCGCTGTCCT	150pb	Legumain

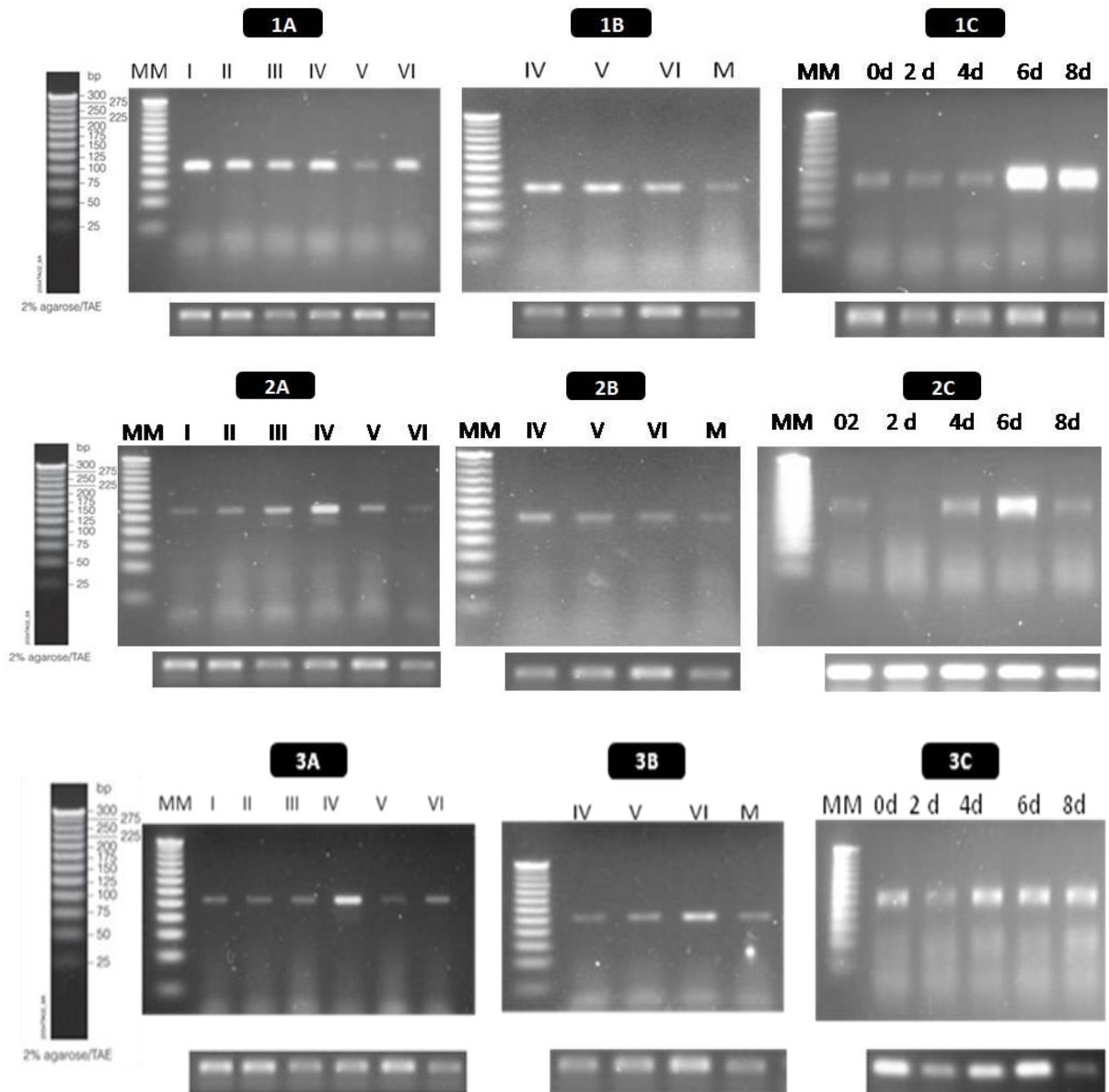


Figura-17. Eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização dos produtos amplificados para as sequencias com C-terminal KDEL. Os géis mostram a expressão dos genes, JcCB0580861 (1A-1C); JcCA0152821 (2A-2C) e JcCA0047111 (3A-3C). A- expressão do gene no integumento. B-expressão do gene no endosperma em desenvolvimento. C-expressão do gene no endosperma de sementes em germinação. Os géis de baixo referencem-se ao padrão de expressão da Actina, usado como controle interno.

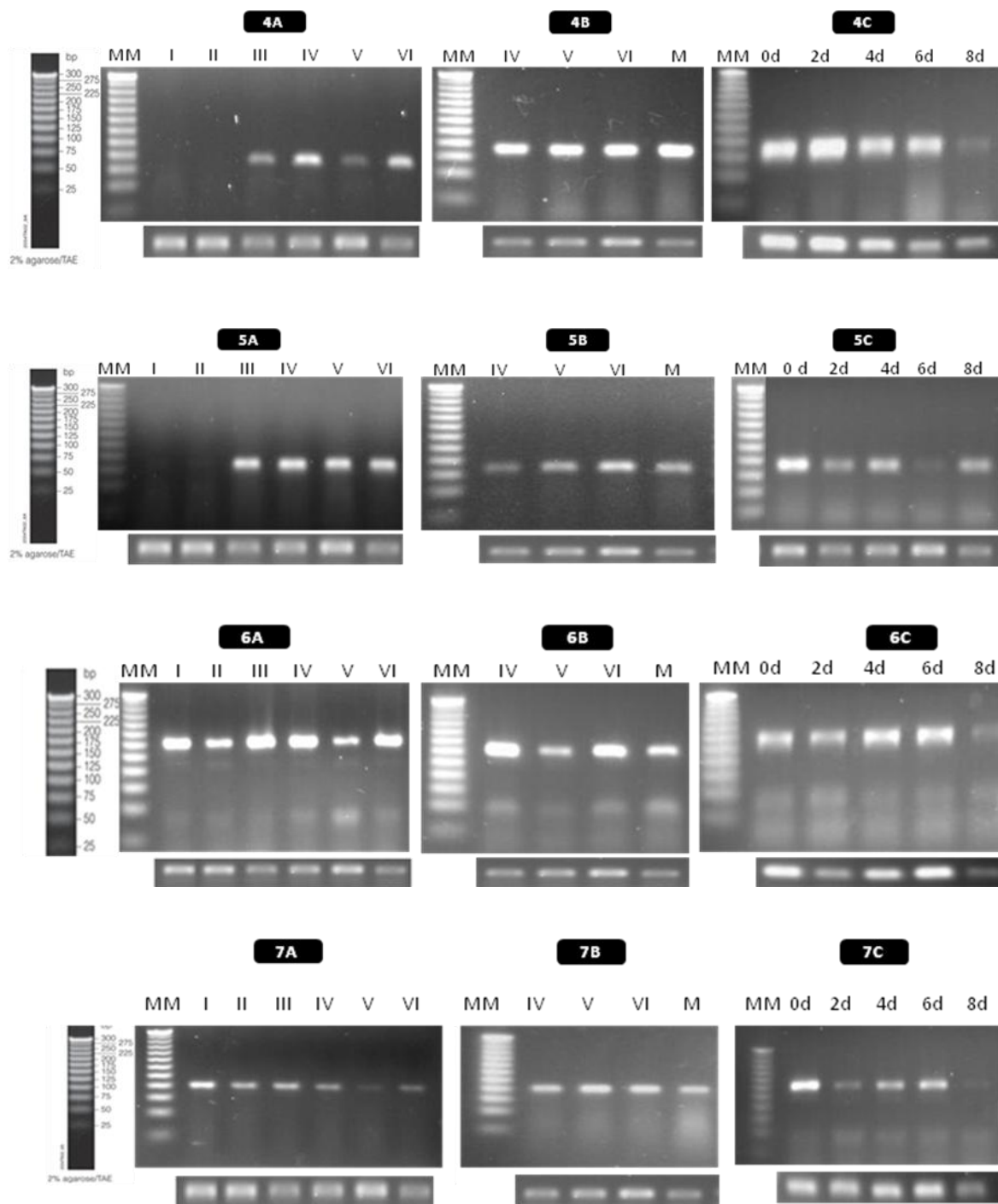


Figura-18. Eletroforese em gel de agarose a 2% para visualização dos produtos amplificados para as sequencias das VPEs. Os geis mostram a expressão dos seguintes genes: JcCB0196871 (5A-5C); JcCB0244081 (6A-6C); JcCB0060111 (7A-7C) e JcCA0012422 (8A-8C). A- expressão do gene no integumento. B-expressão do gene no endosperma em desenvolvimento. C-expressão do gene no endosperma de sementes em germinação. Os geis de baixo referencem-se ao padrão de expressão da Actina, usado como controle interno.

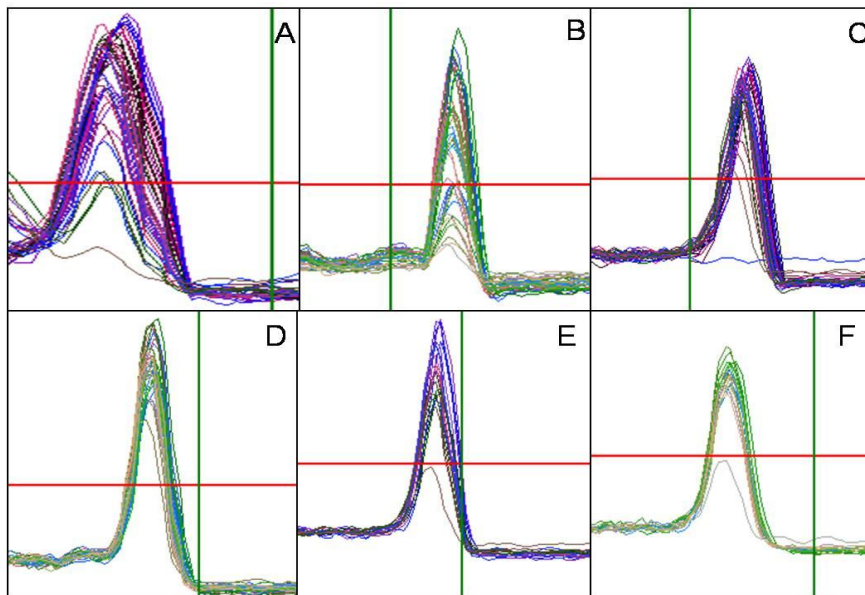


Figura-19. Curva de fusão dos seis genes constitutivos. As curvas de fusão representam os genes: A-actin11; B- TA2;C- EF1- α ;D- PP2A2; E-PUB3-F-GAPDH.

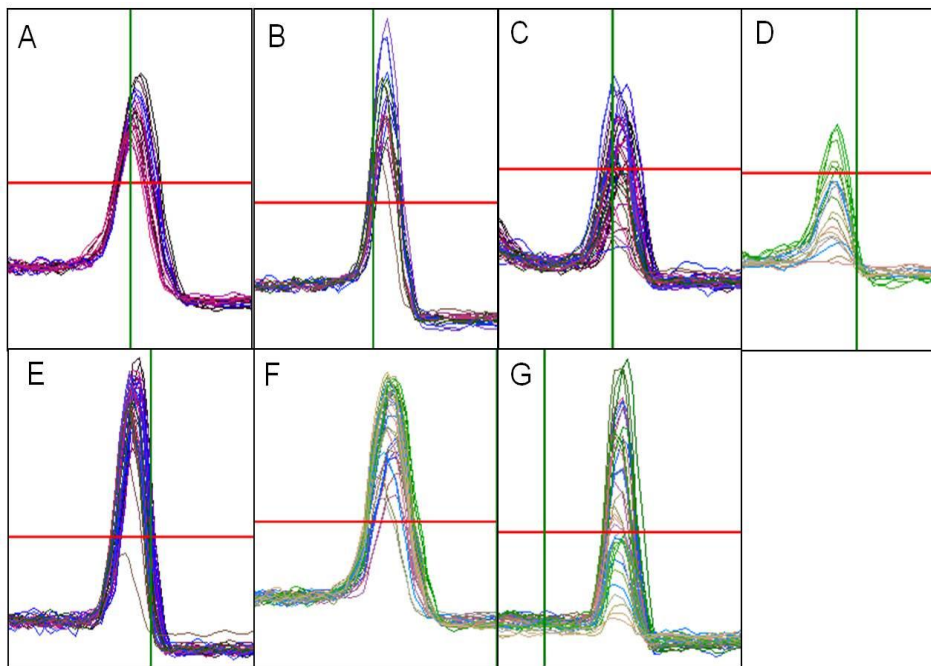


Figura-20. Curva de fusão (melting curve) dos genes de interesse: O gráfico revela as curvas de fusão dos seguintes genes: A- JcCB0196871; B- JcCB0580861; C- JcCA0047111; D- JcCA0152821; E- JcCA0012422; F- JcCB0244081; G- JCCB006011.

5.5. Análise de expressão gênica por RT-qPCR de proteinases cisteínicas com C-terminal KDEL de sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso (*J. curcas*)

Para avaliar o padrão de expressão de proteinases cisteínicas com domínio C-terminal KDEL ou RDEL, foram selecionadas 3 seqüências de genes disponíveis no banco de dados de *Jatropha curcas*. Os genes analisados com seqüências KDEL e RDEL selecionados foram: JcCB0580861 (KDEL) ; JcCA0152821(RDEL) e JCCA0047111(KDEL).

A expressão do gene JcCB0580861 com domínio KDEL, teve sua expressão por RT-qPCR identificada em todos os estágios do integumento de sementes em desenvolvimento. O aumento gradual da expressão foi identificado de acordo com o amadurecimento da semente. O aumento gradual ocorreu entre os estágios I e estágio VI (figura 21A). Os valores encontrados para estes estágios aumentaram em cerca de 8 vezes, entretanto a expressão deste gene não foi identificada no estágio VII. Na figura 20A observa-se que a expressão deste gene foi baixa no endosperma de sementes em desenvolvimento nos estágios IV, V, VI e VII. A análise do mesmo gene em tecidos de endosperma de sementes em germinação mostrou que este gene foi expresso em todos os estágios, entretanto sua expressão ocorreu em diferentes níveis de expressão gênica. A partir do segundo dia de germinação ocorreu um gradual aumento nos níveis de expressão do gene, obtendo um nível maior de expressão em sementes com 8 dias de germinação (Figura 21A).

A expressão do gene JcCA0152821 por RT-qPCR com domínio RDEL foi detectada em todas as condições e estágios analisados. No integumento de sementes em desenvolvimento foi identificado um baixo nível de expressão durante os três primeiros estágios de desenvolvimento, tendo um aumento abrupto no estágio IV, com valores de expressão cerca de 500 vezes maior, quando comparados ao calibrador (estágio I). Na seqüência ocorreu a diminuição gradual de expressão nos estágios seguintes não sendo detectada no estágio VII (figura 21B). No endosperma em desenvolvimento obteve-se um alto nível de expressão no estágio IV com uma expressão cerca de 225 vezes maior em relação ao calibrador tendo uma diminuição gradual nos estágios V, VI e VII (Figura 21B). Com relação aos níveis de expressão no endosperma de sementes em germinação houve aumento gradual nos estágios de 0d, 2d, 4d, 6d e 8 dias de germinação com uma expressão cerca de 90 vezes maior em relação ao calibrador (Figura 21B).

A análise de expressão por RT-qPCR do gene JCCA0047111 com domínio KDEL integumento de sementes em desenvolvimento mostrou a expressão do gene em todos os estágios, exceto no último estágio analisado (estágio VII). O maior nível de expressão identificado para este gene foi durante o estágio IV, cerca de 22 vezes maior que o observado no calibrador. Embora um padrão de expressão relativamente uniforme tenha sido observado nos estágios I, II e III, este padrão é modificado pelo alto nível de expressão no estágio IV, dando continuidade nos demais estágios (Figura 21C). Já no endosperma em desenvolvimento a expressão manteve-se relativamente uniforme. No endosperma de sementes em germinação observou-se um padrão de expressão relativamente uniforme aumentando significativamente em sementes com 8 dias de germinação, a qual foi cerca de 7 vezes mais expresso em relação ao calibrador (Figura 21C).

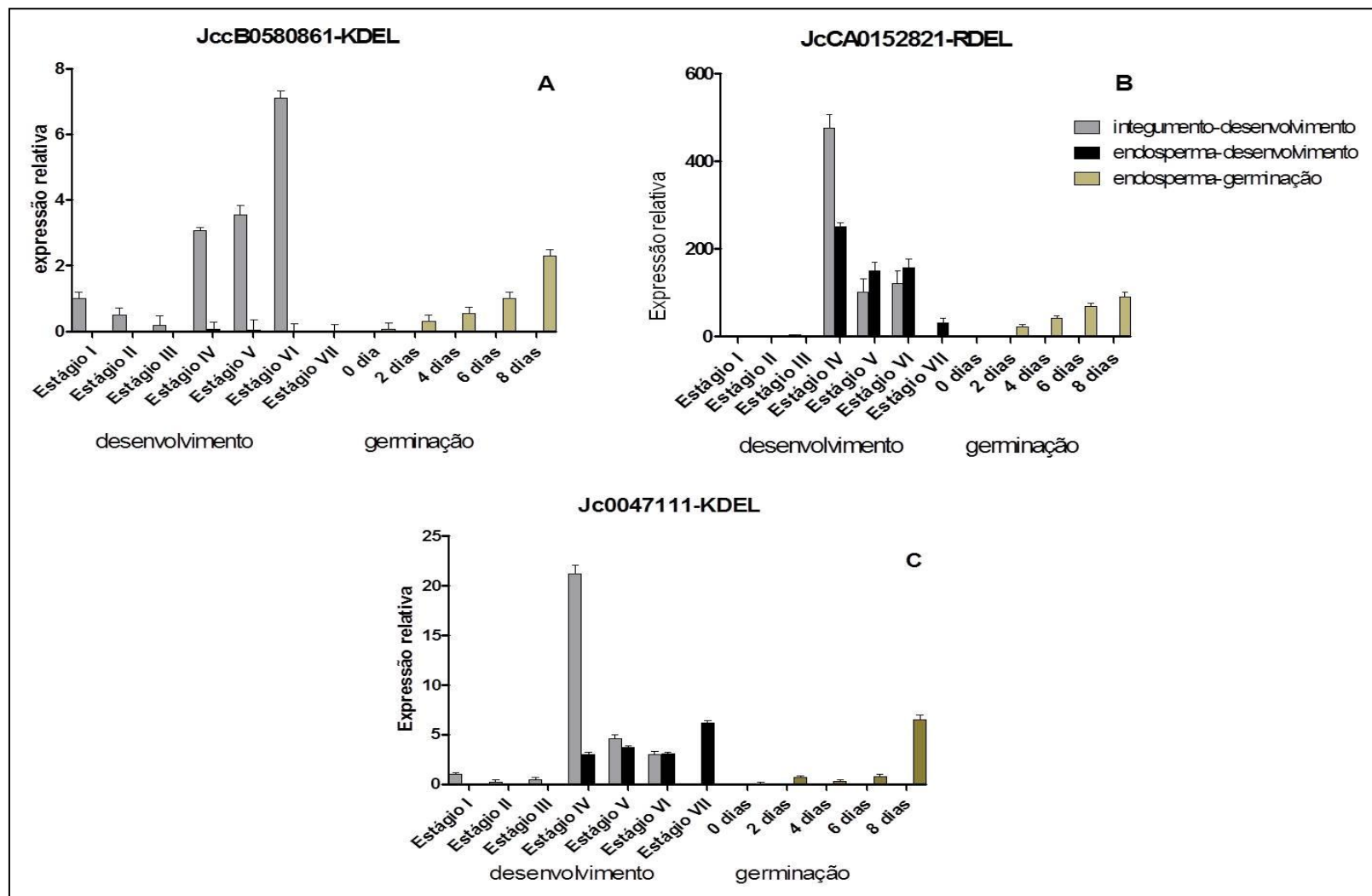


Figura 21- Expressão relativa dos genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111 em sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso. A - expressão relativa do gene JcCB0580861 no desenvolvimento e germinação. B- expressão relativa do gene JcCA0152821. C- expressão relativa do gene JCCA00471.

De acordo com as observações anatômicas de Soares *et al* (2011), ocorrem várias mudanças no integumento interno de sementes em desenvolvimento de pinhão manso. Nos estágios iniciais de sementes em desenvolvimento o integumento é constituído de células pequenas com citoplasma denso que se dividem ativamente, não mostrando indícios de morte celular programada. Entretanto, em estágios mais avançados no desenvolvimento da semente, as células do integumento que estão mais próximas à região em contato com o endosperma vão gradativamente tornado-se vacuoladas, e forma-se, uma camada de remanescentes de células, supostamente originada do processo de morte celular programada. Estas observações estão compatíveis com os baixos níveis de expressão gênica observados nos estágios iniciais de desenvolvimento de sementes dos genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111. A atividade desses genes nos estágios mais avançados foi significativamente mais expressa, principalmente no estágio IV do gene JcCA0152821, com expressão cerca de 500 vezes maior que o calibrador. Podemos sugerir, baseado nas observações de Soares *et al*, (2011) e em comparação com os níveis de expressão gênica, que as proteinases cisteínicas analisadas podem desempenhar um importante papel na morte celular programada do integumento interno de sementes em desenvolvimento de pinhão manso.

Soares *et al*, (2011) também observou características de morte celular programada na região central do endosperma que está em contato com o embrião. A análise de expressão gênica por RT-qPCR dos genes que expressam proteases cisteínicas com KDEL C-terminal mostraram que o gene JcCA0152821 apresentou altos níveis de expressão nesse tecido, entretanto o gene JCCA0047111 apresentou baixos níveis de expressão, bem como nenhuma expressão significativa do gene JcCB0580861 foi detectada no endosperma dessas sementes em desenvolvimento. Em comparação com as observações de Soares *et al* (2010), e levando em consideração os altos níveis de expressão do gene JcCA0152821 tanto no integumento quanto no endosperma de sementes em desenvolvimento, pode-se sugerir que a expressão desse gene poderá ter uma participação efetiva na morte celular programada também no endosperma de sementes em amadurecimento de pinhão manso, entretanto não podemos sugerir o mesmo para os genes JcCB0580861 e JCCA0047111.

Morte celular programada foi observada no integumento interno de sementes de canola (*Brassica napus*) em estágios iniciais e avançados (Wan, *et al*, 2001). Em outros trabalhos também se observou MCP, como na senescência de tépalas de flores de lírio (Guerreiro *et al*, 1998) nos grãos de pólen em desenvolvimento de *Nicotina tabacum* L

(Zhang et al, 2009) no algodão (Jensen, 1975), e em prímula de *Oenothera biennis*, (Hallac, 1980). Além disso, foi observada morte celular programada no nucelo de *Ricinus communis* (Greenwood, et al, 2005); nos grão de trigo de *Triticum aestivum L* (Dominguez et al, 2001) e no nucelo de chuchu (Lombardi, et al, 2007). Em todos esses exemplos citados acima há uma participação efetiva de proteinases cisteínicas com C-terminal KDEL.

Diferentes proteases estão relacionadas à morte celular programada em plantas, dentre elas as proteinases cisteínicas, sobretudo as que apresentam em sua extremidade C-terminal os tetrapeptídeos KDEL, HDEL, DELK, KQEL e RDEL. Vulpuesta, em 1995 utilizando um polipeptídeo quimérico demonstrou que, os tetrapeptídeos conhecidos como KDEL, HDEL e RDEL, promovem retenção da proteína no lúmen do retículo endoplasmático. As proteinases cisteínicas com motivo KDEL estão envolvidas na morte celular programada (Guerreiro et al, 1998; Schmitd et al, 1998; Gietl e 2001; Schmitd, Ling et al, 2003). Essas proteinases cisteínicas contendo C-terminal KDEL foram encontradas em diferentes tecidos de plantas que sofrem MCP, como cotilédones (Becker et al, 1997), vagem (Tanaka et al, 1991), tegumento externo de sementes (Nadeau, et al, 1996) e pétalas senescentes (Vulpuestra, et al, 1995).

As seqüências dos genes JcCB0580861; JcCA0152821e JCCA0047111 os quais expressam proteinases cisteínicas em sementes de *Jatropha curcas* apresentam em sua extremidade C-terminal, os tetrapeptídeos KDEL. Com essa observação torna-se evidente que essas proteinases podem desempenhar um importante papel na morte celular programada nos tecidos de integumento e endosperma de sementes em desenvolvimento.

Ricinus communis possui no nucelo uma endopeptidase cisteínica, CysEP, com motivo KDEL a qual está envolvida na MCP desse tecido (Greenwood, et al, 2005). Em *Arabidopsis thaliana* foram identificadas três endopeptidases cisteínicas com motivo KDEL, designadas de AtCEP1 (At5g50360), AtCEP2 (At3g48340) e AtCEP3 (At3g48350). As AtCEP1 e AtCEP3 têm um papel proeminente na regulação da MCP durante diferentes estágios do desenvolvimento das flores (Helm, et al, 2008).

Em *Vigna mungo* identificou-se uma proteinase cisteínica com C-terminal KDEL denominada de Endopeptidase-Sulfidril (SH-EP), a qual foi localizada nos vacúolos. Este tetrapeptídeo também funciona como um sinal de retenção no retículo endoplasmático. Em

cotilédones em germinação, as Endopeptidase-Sulfidrilas (SH-EP) são bastante expressas e estão envolvidas na degradação de proteínas de reservas acumuladas em vacúolos especializados em estocar essas proteínas (Okamoto *et al*, 1994; Toyooka *et al*, 2000).

Soares *et al* (2011) mostraram em estudos anatômicos que há indícios de MCP no integumento interno de sementes em desenvolvimento de *Jatropha curcas*. Nas análises do padrão de expressão dos genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111 que codificam proteinases cisteínicas com C-terminal KDEL observaram-se altos níveis de expressão desses genes em sementes nos estágios mais avançados de desenvolvimento. Guerreiro *et al*, 1998; Schmitd *et al*, 1998; Gietl e 2001; Schmitd, Ling *et al*, 2003 afirmaram que proteinases cisteínicas com KDEL estão envolvidas na MCP. Pode-se sugerir uma participação desses genes na MCP em tecidos do integumento e endosperma ao longo do desenvolvimento das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas L*).

Nesse mesmo experimento, ainda foram observados o padrão de expressão dos genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111 durante a germinação de sementes de pinhão manso. Em relação aos genes JcCB0580861; JcCA0152821 verificaram-se um aumento gradual nos níveis de expressão nos estágios analisados, diferentemente do padrão de expressão do gene JCCA0047111, na qual os níveis de expressão nos estágios de sementes de 2d, 4d e 6 dias de germinação foram semelhantes e com um aumento em 8 dias de germinação.

Em outras plantas foi observada morte celular programada envolvendo a participação de proteinases cisteínicas em tecido de endosperma de sementes em germinação, como: em células do endosperma em germinação de *Ricinus communis*, *Vicia sativa* e em *P. sativum*, na qual envolve a participação de uma endopeptidase cisteínica (Cys-EP) que possui C-terminal KDEL (Schmid *et al*, 1999). O endosperma é consumido durante a germinação dessas sementes, liberando o material de reservas contido no endosperma possivelmente por processo de morte celular programada (Schmid *et al*, 1998; Schmid *et al*, 1999). Em sementes de germinação de *Vigna mungo* também foram encontrados tecidos senescentes depois da mobilização do material de reservas por processo de Morte celular programada envolvendo uma endopeptidase cisteínica (SH-EP) (Akasofu *et al*, 1989).

O envolvimento de endopeptidases cisteínicas é essencial para o processo de morte celular programada em muitos tecidos senescentes de sementes de plantas como o

endosperma e cotilédones. Somente algumas dessas endopeptidases têm o motivo KDEL C-terminal estando envolvidas tanto na mobilização de proteínas de reservas durante a germinação quanto na morte celular programada (Schmid *et al*, 1999; Akasofu *et al*, 1989; ; Schmid *et al*, 1998; Schmid *et al*, 1999; Greenwood *et al*, 2004).

Os genes JcCB0580861; JcCA0152821 e JCCA0047111 expressam proteinases cisteínicas com C-terminal KDEL, cujos transcritos foram encontrados em sementes de pinhão manso em germinação. Conforme descrito, a presença de proteinases cisteínicas é observada em tecidos que estão sofrendo morte celular programada (Akasofu *et al*, 1989; Schmid *et al*, 1998; Schmid *et al*, 1999; Greenwood *et al*, 2004). Proteinases cisteínicas com motivo KDEL estão envolvidas na morte celular programada (Guerreiro *et al*, 1998; Schmitd *et al*, 1998; Gietl e 2001; Schmitd, Ling *et al*, 2003). Pode-se sugerir que esses genes podem também participar no processo de morte celular programada no endosperma de sementes de pinhão manso durante a germinação. Os níveis de expressão do gene JcCA0152821 foram altos, aumentando de 42 vezes em 2 dias de germinação para 90 vezes em 8 dias de germinação quando comparado ao calibrador. Em contrapartida, os genes JcCB0580861 e JCCA0047111 com motivo KDEL mostraram baixos níveis de expressão quando comparado à expressão do gene JcCA0152821 (figura 21).

5.6. Análise da expressão gênica por RT-qPCR de proteinases cisteínicas do tipo VPE de sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso.

Para avaliar o padrão de expressão de proteinases cisteínicas do tipo VPE (enzima de processamento vacuolar), foram selecionadas 4 seqüências de genes disponíveis no banco de dados de *Jatropha curcas*. Os genes selecionados e analisados foram: JcCB0196871; JcCB024408; JcC0060111 e JcCA0012422.

A análise de expressão por RT-qPCR do gene JcCB0196871 no endosperma mostra um aumento gradual dos níveis de expressão. Conforme observado na figura 22, o nível mais alto da expressão ocorreu durante o estágio VI com um valor 100 vezes maior que o expresso em relação ao estágio I. A análise de expressão no integumento mostrou valores inferiores nos níveis de expressão quando comparados aos valores no endosperma de sementes em desenvolvimento (figura 22). Na análise de sementes em germinação, os níveis expressão gênica nos estágios analisados foram baixos, apresentando níveis de expressão gênica abaixo do calibrador, ou seja, uma expressão pouco significativa nos tecidos do endosperma em germinação (figura 22).

Na análise da expressão do gene JcCB0244081 por RT-qPCR observaram-se diferentes níveis de expressão (figura 22). Nos estágios analisados em integumento de sementes em desenvolvimento, houve uma expressão muito baixa durante os estágios I-III, no integumento de semente em desenvolvimento esse gene referido teve uma expressão constante nos estágios IV e V e um leve aumento no estagio seguinte (estagio VI), e por fim a ausência da expressão no estágio VII. No entanto, no endosperma em desenvolvimento um crescente valor de expressão se deu a partir do estágio subsequente aumentando até o ultimo estágio analisado (estagio VII). Enquanto que os níveis de expressão nos diferentes estágios de sementes em germinação foram abaixo do calibrador, houve decréscimo na expressão do gene durante toda a germinação, exceto no estágio de 8 dias que houve um pequeno aumento na expressão, entretanto com valores abaixo do calibrador (figura 22).

O padrão de expressão do gene JcCA0012422, quando analisado por RT-qPCR, mostrou que esse gene é expresso continuamente em todos os estágios de sementes em desenvolvimento e germinação, exceto no estágio VII, na qual não foi detectado nenhuma expressão. Na avaliação dos níveis de expressão no integumento de sementes em

desenvolvimento, nos estágios I a III observa-se uma diminuição dos mesmos em relação ao calibrador (estágio I) com um posterior aumento nos estágios IV-VI e ausência no estágio VII. Os níveis de expressão no endosperma em desenvolvimento aumentaram cerca de 2,5 vezes no estágio IV em relação ao calibrador, diminuindo no estágio V, aumentando novamente no estágio VI e diminui no estágio VII. Os níveis de expressão no endosperma de sementes em germinação foram pouco significativos com valores abaixo do calibrador (figura 22).

A análise de expressão do gene JcC0060111 por RT-qPCR foi capaz de identificar a sua expressão nas condições analisadas. O aumento gradual da expressão deste gene foi observado no integumento, exceto no estágio VII. O maior nível de expressão foi observado durante o estágio VI, com uma expressão cerca de 5 vezes maior em relação ao estágio I (figura-22). Além disso, foi observada uma expressão muito baixa nos tecidos do endosperma de sementes em desenvolvimento, onde o estágio IV teve a maior expressão, com cerca de 1,27 vezes mais expresso em relação ao calibrador (figura-22). Contudo, ao longo do desenvolvimento mostrou um declínio da sua expressão (figura 22). No endosperma em germinação houve um aumento gradual nos níveis de expressão desse gene.

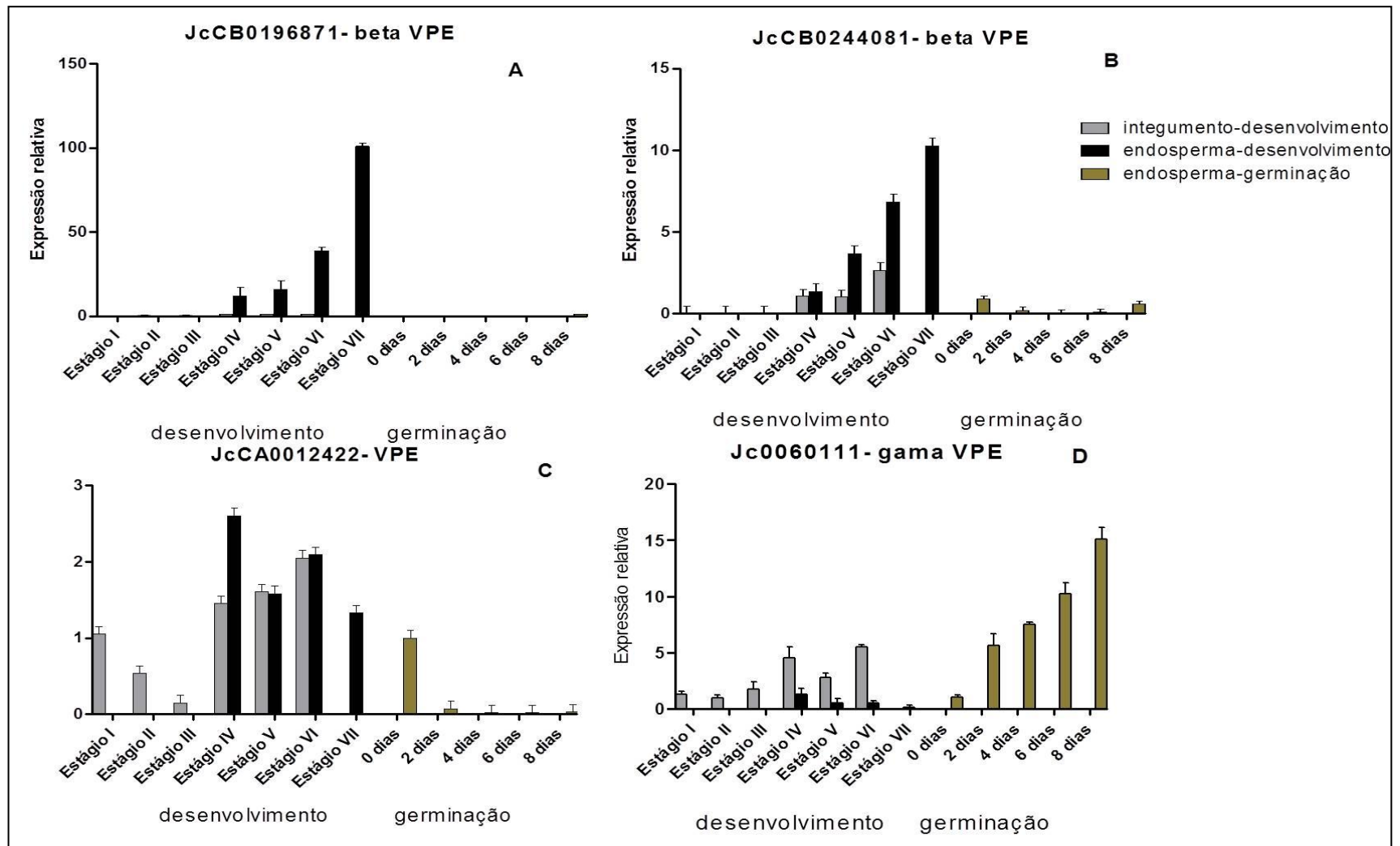


Figura-22 . Expressão relativa dos genes JcCB0196871; JcCB024408; JcC0060111 e JcCA0012422 em sementes em desenvolvimento e germinação de pinhão manso . A - expressão relativa do gene JcCB0196871-βVPE. B- expressão relativa do gene JcCB024408. C- expressão relativa do gene JcC0060111. D- expressão relativa do gene JcCA0012422.

A análise desse experimento mostrou que ocorreu um aumento crescente nos níveis de expressão dos genes JcCB0196871 e JcCB0244081 no endosperma de sementes em desenvolvimento, iniciando no estágio IV e atingindo pico no estágio VII. Esses dados estão de acordo com os obtidos por Pinheiro (2010), que em seu trabalho verificou, a partir de análises histoquímicas de endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso, um aumento crescente da intensidade de coloração específica para proteínas de reservas. Segundo Nakaune *et al* (2005) as proteinases cisteínicas do tipo β estão envolvidas na maturação de proteínas de reserva. Diante disso, os resultados da análise dos níveis de expressão dos referidos genes juntamente com os apresentados por Pinheiro sugerem que os genes JcCB0196871 e JcCB0244081 são proteinases cisteínicas do tipo β , as quais estão envolvidas com a maturação de proteínas de reserva durante o amadurecimento da semente.

O gene JcCA0012422 apresentou baixo nível de expressão. Apesar de estar em baixos níveis, a expressão desse gene foi verificada nos mesmos estágios do desenvolvimento que os outros genes referentes a proteinases cisteínicas do tipo β (JcCB0196871 e JcCB0244081), sugerindo que a sua expressão também é importante para o processo de maturação de proteínas de reserva durante o desenvolvimento da semente de pinhão manso.

Em relação à expressão do gene JcC0060111 foi detectado um aumento gradual de expressão no endosperma de sementes em germinação nos estágios de 0 a 8 dias. Kinoshita *et al* (1999) afirmaram que as VPEs do tipo α -VPE e VPEs do tipo Y-VPE (gama VPE) estão associadas com vários tipos de morte celular programada em sementes de plantas sob diferentes condições de estresse. A atividade do gene JcC0060111 foi mais acentuada na germinação. Podemos sugerir que, por esse gene expressar uma proteinase do tipo YVPE, à medida que há um aumento de expressão desse gene na germinação, há um aumento na morte celular programada das células senescentes do endosperma em germinação. Portanto, a expressão desse gene poderá estar relacionada à morte celular programada nas sementes em germinação de pinhão manso.

Durante o processo de maturação de sementes de *Ricinus communis*, foi isolado um novo grupo de proteinases cisteínicas (C13), que foram denominadas Legumain. Essas proteinases cisteínicas em plantas são frequentemente chamadas de enzima de processamento vacuolar (VPE) (Hara-Nishimura *et al.*, 1991). Essas enzimas pertencem à subclasse específica de asparagina da família de endopeptidases cisteínicas na qual cliva peptídeos

ligados com Asn ou Asp na posição P1 que flanqueia a extremidade C-terminal (Becker et al, 1995).

Em plantas superiores, proteínas de sementes são sintetizadas no retículo endoplasmático como pró-proteínas precursoras e então transportadas para vacúolos onde se encontram as proteínas de reservas. Elas são transportadas via vesículas acumuladoras de precursores (PAC) (Hara-Nishimura et al, 1998a). As pró-proteínas são processadas e as proteínas maduras são formadas nos vacúolos. As proteínas responsáveis pela maturação dessas pró-proteínas durante o processo de maturação da semente são as enzimas de processamento vacuolar (VPE). (Hara-Nishimura et al., 1998a).

Embora algumas destas proteínas relacionadas à maturação estejam fixas a parede celular, sua função não se restringe ao pre-processamento de proteína precursora, mas também na degradação de proteínas da parede celular do vacúolo (Muntz et al., 2002).

6. CONCLUSÃO

- O estudo de normalização e validação de genes de referência nos tecidos de integumento e endosperma do pinhão manso propiciaram um melhor entendimento no que diz respeito à estabilidade desses genes nas condições estudadas.
- Os genes com seqüência C-terminal KDEL: JcCB0580861; JcCA0152821; JcCA0047111 e o gene γ -VPE JCCB0060111 mostraram um altos níveis de expressão nos estágios mais avançados em tecidos do integumento e endosperma em sementes de pinhão manso em desenvolvimento, e com base em nossas análises, esses genes expressam proteinases cisteínicas que estão possivelmente envolvidos no processo de MCP.
- Os genes que expressam as seguintes VPEs: JcCB0196871; JcCB0244081; e JcCA0012422 de acordo com nossos estudos, provavelmente estão envolvidas na maturação das proteínas de reservas de sementes em desenvolvimento de pinhão manso
- Esses dados forneceram importantes informações a cerca do padrão de expressão de genes que estão envolvidos no transcriptoma de sementes em desenvolvimento, mais precisamente envolvidos no processo de MCP. Não obstante, o estudo de normalização e validação de genes de referência nos tecidos de integumento e endosperma do pinhão manso propiciaram um melhor entendimento no que diz respeito à estabilidade desses genes nas condições estudadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe Y, Shirane K, Yokosawa H, Matsushita H, Mitta M, Kato I, Ishii S (1993). Asparaginyl endopeptidase of jackbean seeds. Purification, characterization and high utility in protein sequence analysis. **J. Biol. Chem.** 268: 3525-3529.
- Adolf, W., Opferkuch, H.J., Hecker, E., 1984. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**. 23, 129–132.
- Arruda, F.P.; Beltrão, N.E.M.; Andrade, A.P.; Pereira, W.E.; Severino, L.V. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Rev. bras. ol. Fibras**, vol. 8, p. 789-799, 2004.
- Akasofu, H. Yamauchi, D. Mitsuhashi, W. Minamikawa, T. Nucleotide sequence of cDNA for sulfhydryl-endopeptidase (SH-EP) from cotyledons of germinating *Vigna mungo* seeds. **Nucleic Acids Res.** Vol. 16, p.6733–6733, 1989.
- Barsalobres-Cavallari, C. F; Severino, F.E; Maluf, M.P; Maia, I.G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in coffee Arabica under different experimental conditions. **BMC Mol Biol**, 10 1, 2009.
- Becker , C.; Senyuk , A. D.; Shutov , V. H.; Nong , J.; Fischer , C.; Horstmann , K. Müntz . Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage protein mobilization. **European Journal of Biochemistry**, vol. 248, p. 304 – 312, 1997 .
- Becker, C.; Shutov, AD.; Nong, VH.; Denyuk, VI.; Jung, R.; Horstmann, C.; Fischer, J.; Nielsen, NC.; Muntz, K. Purification cDNA cloning and characterisation of proteinase B, an asparagine-specific endopeptidase from germinating vetch (*Vicia sativa* L.) seeds. **Eur J Biochem**, vol. 228, p. 456–62, 1995.
- Benning, C.; Pichersky, E. Harnessing plant biomass for biofuels and biomaterials. **Plant Journal**, vol. 54, p. 533-535, 2008.
- Beyene, G.; Foyer, CH.; Kunert, KJ. Two new cysteine proteinases with specific expression patterns in mature and senescent tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**. vol 57, p. 1431–1443, 2006.
- Bonneau, L.; Young, G.; Georgia, ED.; Galois, P. What happened to plant caspases? **Journal of Experimental Botany**, Vol. 59, p. 491-499, 2008.
- Boller T (1986). Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In: Dalling MJ (Eds.), **Plant Proteolytic Enzymes**, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, pp. 67-96.
- Bohley P, Seglen PO (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. **Experientia** 48: 151-157.

- Bosch, M.; Poulter, N.S.; Perry, R.M.; Wilkins, K.L.; Franklin-Ton, V.E. Characterization of a legumain/vacuolar processing enzyme and YVADase activity in *Papaver* pollen. **Plant Mol Biol**, vol. 74, p. 381-393, 2010.
- Brady CJ (1985). Fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38:155-178 Brockbank WJ, Lynn KR (1979). Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed) **Biochim. Biophys. Acta** 578: 13-22.
- Brocklehurst K, Willenbrock F, Salih E (1987). In "Hydrolytic enzymes". Neuberger A, Brocklehurst K (Eds.) **Oxford: Elsevier**, Amsterdam, New York, pp. 39-158.
- Brömme, D; Nallaseth, F.S; Turk, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. **Methods**, vol. 32, p. 199-206, 2004.
- Brunner, A.M; Yakovlev, I.A; Strauss, S.H. Validating internal control for quantitative plant gene expression studies. **BMC Plant Biol**, vol. 4, p.14, 2004.
- Bustin, S.A.; Nolan, T. Template handling, preparation and quantification. In: Bustin, S.A. (Ed) *The Real-Time PCR Encyclopaedia A-Z of Quantitative PCR*. Published by international University Line, La Jolla, CA, p. 87-120, 2004.
- Carnielli, FO combustível do futuro. 2003. Disponível em: www.ufmg.br/boletim/bul1413
- Carvalho, C.R., Clarindo, W.R.P., Praça, M.M., Araújo, F.S., Carels, N. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, vol. 174, p. 613-617, 2008.
- Collazo, C. Chácon, O. Borrás, O. Programmed cell death in plants resembles apoptosis of animals. **Biotecnologia aplicada**, Vol. 23, 2006.
- Costa, G.G.L.; Cardoso K.C.; Del Bem, L.; Lima, A.C.; Cunha, M.A.S.; Leite, M.C.; Vicentini, R.; Papers, F.; Moreira, R.C.; Yunes, J.A.; Campos, F.A.P.; Da Silva, M.J. Transcriptome analysis of the oil-rich seed of the bioenergy crop *Jatropha curcas* L. **BMC Genomics**, vol. 11, p. 462, 2010.
- Cunha, M.A.S. *Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídios em sementes de Jatropha curcas L.* 2011. 95f. (Doutorado em Biotecnologia-RENORBIO). Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza, Ceará. 2011.
- Chrispeels, M.J.; Herman EM. Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodelling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. **Plant Physiol**, vol. 123, p. 1227-33, 2000.
- Collazo, C.; Chacón, O.; Borrás, O. Programmed cell death resembles apoptosis of animals. **Biotecnologia Aplicada**, vol. 23, p. 1-10, 2006.

- Czechowski, T; Stitt, M; Altmann, T; Udvardi, M.K; Scheible, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiol.** Vol. 139, p. 5-17, 2005.
- Dangl. JL. Dietrich, R.A. Thomas, H. Senescence and Programmed Cell Death. In: Buchanan, BB. Gruissem, W. Jones, RL. 1^o edição. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants.** USA: JOHN WILEY, 2000. p 1044-1055.
- Del Pozo, O.; Lam, E. Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. **Curr Biol**, vol. 8, p. 1129–32, 1998.
- Dickman, M.B., Park, Y.K., Oltersdorf, T., Li, W., Clemente, T.; French, R. Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. **Proc. Natl Acad. Sci**, vol. 98, p. 6957–6962, 2001.
- Dominguez, F.; Moreno, J.; Cejudo, FJ. The nucellus degenerates by process of programmed cell death during early stages of wheat grain development. **Plant**, vol. 213, p. 352-360, 2001.
- Dubin A. Defense against own arms: staphylococcal cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim Polon**, vol. 50, p. 715–24, 2003.
- Dubin, G.; Krajewski, M.; Popowicz, G.; Stec-Niemczyk, J.; Bochtler, M.; Potempa, J.; Dubin, A.; Holak, TA. A novel class of cysteine protease inhibitors: solution structure of staphostatin A from *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, vol. 42, p. 13449–56, 2003.
- Dunn AD, Crutchfield HE, Dunn JT (1991). Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D and L. **J. Biol. Chem.** 266: 20198-20204.
- Exposito-Rodriguez, M; Borges, A.A; Borges-Perez, A; Perez, J.A. Selection of internal control genes for quantitative real time PCR studies during tomato development process. **BMC Plant Biol**, 8 131, 2008.
- FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potential and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, vol. 29 (1), p. 12, 2005.
- Fernandes, KVS.; Sabelli, PA.; Barratt, DHP.; Richardson, M.; Xavier, F. J.; Shevery, PR. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to level of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Mol Biol**, vol. 23, p. 215–219, 1993.
- Fleige, S.; Pfaffl, MW. Impact of RNA integrity on the quantitative real time RT-PCR performance and relative mRNA quantification models. **Molecular aspects of medicine.** Vol 27, p.126-139, 2006.
- Fischer, J.; Becker, C.; Hillmer, S.; Horstmann, C.; Neubohn, B.; Schlereth, A.; Senyuk, V.; Shutov, A.; Muntz, K. The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intercellular localization and functions in globulin proteolysis. **Plant Mol Biol**, vol. 43, p. 83–101, 2000.

Frigerio, L.; Pastres, A.; Prada, A.; Vitale, A. Influence of KDEL on the fate of trimeric or assembly-defective phaseolin: selective use of an alternative route to vacuoles. **Plant Cell**, vol. 13, p. 1109–26, 2001.

Georg Hierl, Ute Vothknecht and Christine Gietl (2012). Programmed cell death in Ricinus and Arabidopsis: the function of KDEL cysteine peptidases in development. **Physiologia Plantarum**. Vol. 145. p. 103-113.

Gietl, C. Schmid, M. Ricinosomes, an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissue. **Naturwissenschaften**, vol. 88, p. 49–58, 2001.

Greenwood, S.M.; Christine, G. Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during Ricinus seed development. **Plant Biology**, vol. 102, p. 223–224, 2004.

Greenberg, J.T. **Programmed cell death: A way of life for plants**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 93, pp. 12094-12097, October 1996.

Grudkowska, M.; Zagdanska, B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **Acta biochimica polonica**, vol. 51, p. 609-624, 2004.

Grzonka, Z.; Jankowska, E.; Kasprzykowski, F.; Kasprzykowska, R.; Lankiewicz, L.; Wiczak, W.; Wiczerzak, E.; Ciarkowski, J.; Drabik, P.; Janowski, R.; Kozak, E.; Jaskolski, M.; Grubb A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochim Polon**, vol. 48, p. 1–20, 2001.

Gutierry, L; Mauriat, M; Guénin, S; Pelloux, J; Lefebvre, J; louvet, R; Rusterucci, C; Moritz, et T; Guerineau, F, et al. The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. **Plant Biotechnology Journal**. Vol. 6, p.609-618, 2008.

Guerreiro, C.; Mercedes, C. Reid, M.S. vulpuesta, V. Analysis of the expression of two thiolprotease genes from daylily (*Hemerocallis* spp) during flower senescence. **Plant Molecular biology**. 36:565-571, 1998.

Hallac, I.N. Fine structure of nucellar cells during development of the embryo sac in *Oenothera biennis* L. **Annals of botany**, vol. 45, p. 515-521, 1980.

Hara-Nishimura, I.; Inoue, K.; Nishimura, M. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into mature forms. **FEBS Lett**, vol. 294, p. 89–94, 1991.

Hara-Nishimura, I.; Shimada, T.; Hatano, K.; Takeuchi, Y.; Nishimura, M. Transport of proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulation vesicles. **Plant cell**, vol. 10, p. 825-836, 1998.

Hara-Nishimura, I.; Takeuchi, Y.; Nishimura, M. Molecular Characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. **Plant cell**, vol. 5, p. 1651-1659, 1993.

Hara-nishimura, I., Kinishita, T., Hiraiwa, N.; Nishimura, M. Vacuolar processing enzyme in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. **J Plant Physiology**, vol. 668-674, 1998a.

Hara-Nishimura, I., Inoue, K.; Nishimura, M. A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. **FEBS Lett**, vol. 294, p. 89-93, 1991.

Hatsugai, N.; Kuroyanagi, M.; Yamanda, K.; Meshi, Tetsuo.; Tsuda, S.; kondo, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. **Science**, vol. 305, p. 855-858, 2004.

He, R.; Drury, GE.; Rotari, VI.; Gordon, A.; Willer, M.; Tabasum, F.; Woltering, EJ.; Gallois P. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by UV and H₂O₂ in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 283, p. 774–783, 2007.

Helm, M.; Schmid, M.; Hierl, G.; Terneus, K.; Li, Tan.; Lottspeich, F.; Kieliszewsky, M.J.; Gietl, C. KDEL-Tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extension scaffolds. **American Journal of botany**, vol. 95, p. 1049-1068, 2008.

HELLER. J. Physic nut – *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. **Rome Italy: International Plant Genetic Resources Institute**, p. 66, 1996.

Hu, R; Fan, C; Li, H; Zhang, Q; Fu, Y. F. Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real time-RT-PCR. **BMC Mol Biol**, 10 93, 2009.

KAUSHIK, N.; KUMAR, S. *Jatropha curcas* L. Silviculture and Uses. **Agrobios** (India), Jodhpur, 2004.

Kembhavi AA, Buttle DJ, Knight CG, Barrett AJ (1993). The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assay. **Arch. Biochem. Biophys.** 303: 208-213.

Kerr, JFR, Willie AH, Currie, AR. Apoptosis: a basic phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, vol. 26, p.239-257, 1972.

King, AJ.; Yi, Li.; Granhan, IA. Profiling the developing *Jatropha curcas* L. Seed Transcriptome by Pyrosequencing. **Bioenerg. Res**, vol 4, p. 211-221, 2011.

Kinoshita, T.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. Homologues of vacuolar processing enzyme that are expressed in different organs in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Mol Biol**, vol. 29, p. 81–89, 1995a.

- Kinoshita, T.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. The sequence and the expression of the gamma-VPE gene, one member of a family of three genes for vacuolar processing enzymes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, vol. 36, p.1555–1562, 1995b.
- Kinoshita, T.; Yamada, K.; Hiraiwa, N.; Kondo, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. Vacuolar processing enzyme is up-regulated in the lytic vacuoles of vegetative tissues during senescence and under various stress conditions. **Plant J**, vol. 19, p. 43–53, 1999.
- Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND (1995). Proteinases I: Lysosomal cysteine proteinases. In: “Protein Profile”, Vol. 2, Sheterline, P.(Eds.), **Academic Press Ltd.**, London, UK pp. 1587-1643.
- KUMAR, A.; SHARMA, S. Review An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial crops and products**, vol. 28, p. 1–10, 2008.
- Klionsky, D.J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. **J. Cell Sci**, vol.118, p.7–18, 2005.
- Jain, M; Nijhwan, A; Tyagi, A. K; Khurana, J.P. Validation of housekeeping gene as control internal for studying gene expression in Rice by quatitative real-time PCR. **Biochem Biophys Res Commun**, vol. 345 (2), p. 646-651, 2006.
- Lam, E.; del Pozo, O. Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. **Plant Mol Biol**, vol. 44, p. 417–428, 2000.
- Laviola, B. G.; Bhering, L. L.; Albrecht, J. C.; Marques, S. S.; Marana, J. C. Caracterização morfoagronômica do banco de germoplasma de pinhão manso resultados do 1º ano de avaliação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 1., 2009, Brasília, DF. Anais... Brasília, DF: Embrapa Agroenergia; São Paulo: ABPPM, 2009.
- Laux, T.; Jurgens, G. Embryogenesis: a new start in life. **Plant. Cell**, vol. 9, p. 989–1000, 1997.
- Lianglu Wan.; Qun Xia.; Xiau Qiu.; Gopalan Selvaraj. Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of inner integument. **The Plant Journal**, vol. 30 (1), p. 1-10, 2001.
- Ling, J. Kojima, T. Shiraiwa, M. Takahara, H. Cloning of two cysteine proteinases genes: CysP1 and CysP2, from soybean cotyledons by cDNA representational difference analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1627, p. 129–139, 2003.
- Linnestad, C.; Doan, D.N.P.; Brown, R.C.; Lemmon, B.E.; Meyer, D.J.; Jung, R.; Olsen, O.A. Nucellain, a barley homolog of the dicot vacuolar-processing protease, is localized in the nucellar cell walls. **Plant Physiol**, vol. 118, p. 1169–80, 1998.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Method**, vol 25, p. 402-408, 2001.

Lombardi, L.; Casani, Simone.; Ceccarelli, N.; Galleschi, L.; Picciarelli, P.; Lorenzi, R. Programmed cell death of nucellus during *Cecium edule* Sw. seed development is associated with activation of caspase-like proteases. **Journal of Experimental Botany**, Vol 58, No 11, p. 2949-2958, 2007.

Lockshin, R.A.; Zakeri, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, vol. 36, p. 2405–2419, 2004.

Marshall, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics**, vol. 20(15), p. 2471-2472, 2004.

Makkar, H.P.S., Becker, K., Sporer, F., Wink, M., 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **J Agric. Food Chem.** 45,3152–3157.

Ménard, R; Carmona, E; Plouffe, C; Brömme, D; Konishi, Y; Levebvre, J; Storer, A.C. The specificity of S1' subsite of cysteine proteases. **FEBS letter**, vol. 328, p.107-110, 1993.

Mendonça, S.; Laviola, B.G. Uso Potencial e Toxidez da Torta de Pinhão-manso. Comunicado técnico. Brasília, DF, v.1, p.1-8, 2009.

Morais, G.L. Caracterização filogenética das proteínas das potéínas inativadoras de ribossomos (RIPs) de mamona (*Ricinus communis* L) e análise de expressão de genes Rcom RIPs durante o desenvolvimento da semente. 2010. 105f. (Doutorado em Biologia celular e molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2010.

Mizuochi T, Yee ST, Kasai M, Kakiuchi T, Muno D, Kominami E (1994). **Immunol. Lett.** 43: 189-193.

Embrapa Agroenergia, 2009. 8 p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 001).

Mitsuhashi, N.; Hayashi, Y.; Koumoto, Y.; Shimada, T.; Fukasawa-Akada, T.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. A novel membrane protein that is transported to protein storage vacuoles via precursor-accumulating vesicles. **Plant Cell**, vol.13, p. 2361-2372, 2001.

Muntz, K.; Blattner, FR.; Shutov, AD. Legumains — a family of asparagine-specific cysteine endopeptidases involved in propeptide processing and protein breakdown in plants. **J Plant Physiol**, vol. 160, p. 1281–1293, 2002.

Nadeau, J. A.; Zhang, X. S.; Li, J.; O'Neill, S. D. Ovule development: Identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. **Plant Cell**, vol. 8, p. 213 – 239, 1996.

Nakamura, A.; Longhi, I. M.; Scatena, E. L. Desenvolvimento de óvulo, fruto e semente de espécies de Poaceae (Poales). **Revista Brasil. Bot**, vol. 32, n.1, p.165-176, 2009.

- NAKAUNE,S.; YAMADA, K.; KONDO, M.; *et al.* A vacuolar processing enzyme, VPE is involved in seed coat formation at the stage of seed development. **The Plant Cell**. vol 17, p. 876-887, 2005.
- Nicot, N; Hausman, J.F; Hoffman, L; Everds, D. Housekeeping gene selection for real time PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J. Exp. Bot.** vol, 56(421), p. 2907-2914, 2005.
- Nunes, C.F. Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Lavras**, 78. (2007).
- Nunes, C.F.; Pasqual, M.; Santos, D.N.; Custódio, T.N. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-manso. **Pesquis Agropecuária Brasileira**, vol. 43(1), p. 9-14, 2008.
- Okamoto, T.; Nakayama, H.; Seta, K.; Isobe, T.; Minamikawa, T. Posttranslational processing of a carboxy-terminal propeptide containing a KDEL sequence of plant vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP). **FEBS Lett** , vol. 351, p. 31-34, 1994.
- Okamoto, T.; Minamikawa, T. Purification of a processing enzyme (VmPE-1) that is involved in post-translational processing of a plant cysteine proteinase (SH-EP). **Eur J Biochem**, vol. 231, p. 300–305, 1995.
- Okamoto T.; Minamikawa T. Molecular cloning and characterization of Vinga mungo processing enzyme (VmPE-1), and asparaginyl endopeptidase possibly involved in post-translational processing of vacuolar cysteine endopeptidase (SH-EP). **Plant Mol Biol**, vol. 39, p. 63–73, 1999.
- Okamoto, T.; Shimada, T.; Hara-Nishimura, I.; Nishimura, M.; Minamikawa T. C-terminal KDEL sequence of a KDEL- tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. **Plant Physiol**, vol. 132, p. 1892–900, 2003.
- Openshaw, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled Promise. **Biomass and Bioenergy**, vol. 19, 1-15, 2000.
- Paolacci, A. R; Tanzarella, O.A; Porceddu, E; Ciaffi, M. Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. **BMC Mol Biol**, 10 11, 2009.
- Pennel, R.I.; Lamb, C. **Programmed cell death in plant cell**, vol. 9, p.1157-1168, 1997.
- PINHEIRO, C.B. Isolamento de plastídios do endosperma de sementes em desenvolvimento de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). 2010. 104f. (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Ceará-UFC. Fortaleza, Ceará. 2010.

Pinto, A.C.; Guarieiro, L.L.N.; Rezende, J.C.; Ribeiro, N.M.; Torres, E.A.; Lopes, W.A.; Pereira, P.A.; Andrade, J.B. Biodiesel: An Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 16 (6B), p. 1313-1330, 2005.

Piszczek, E. Gutman, W. Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta. Physiol. Plant*, Vol. 29, p. 391-398, 2007.

PFAFFEL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper- Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, vol. 26, p. 509-515, 2004.

PFAFFEL, M.W. Nucleic acids: mRNA identification and quantification in: Worsfold, P.J., Gallagher, P.K. (Eds), *Nucleic Acids, Encyclopedia of Analytical Science*, second ed. Academic Press, ISBN 0-12-764100-9, p.417-426, 2005.

Programmed cell death: A way of life for plants. Jean T. Greenberg* *proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 93, p. 12094-12097, 1996.

Programmed cell death in plant-pathogen interaction. Greenberg, J. T. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* Vol. 48, p. 525-545, 1997.

Remans, T; Smeets, K; Opdenakker, K; Mathijsen, D; Vangronsveld, J; Cuypens, A. Normalization of Real time PCR gene expression measurements in *Arabidopsis thaliana* exposed to increased metal concentration. *Planta*, vol. 227(6), p.1343-1349, 2008.

Renier, A. L. Hoorn, Van der. Plant proteases: From phenotypes to molecular mechanism. *Annual. Rev. Plant Biol*, vol. 59, p. 191-223, 2008.

Rojo, E.; Martins, R.; Carter, C.; Zouhar, J.; Pan, S.; Plotnikova, J. H.; Paneque, M.; Sanchez-Serrano, J.J.; Baker B. VPEY exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Curr Biol*, vol. 14, p.1897-1906, 2004.

Rojo, E.; Zouhar, J.; Carter, C.; Kovaleva, V.; Raikhel, N.V. A unique mechanism for protein and degradation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc natl Acad Sci*, vol. 100, p. 7389-7394, 2003.

Romano, E; Brasileiro, A.C.M. Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In: Brasileiro, A.C.M; Carneiro, VTC. **Manual de transformações Genéticas De Plantas**. Brasília: Editora Embrapa, 1998. p. 40-43.

Russel, S.D. The egg cell: development and role in fertilization and early embryogenesis. *The plant cell*, vol. 5, p. 1349-1359, 1993.

Rudenskaya GN, Bogacheva AM, Preusser A, Kuznetsova AV, Dunaevsky Ya E, Golovkin BN, Stepanov VM (1998). Taraxalin –A serine proteinase from dandelion, *Taraxacum officinale*. **FEBS Lett.** 437: 237-240.

- Rzychon, M.; Sabat, A.; Kosowska, K.; Potempa, J.; Dubin, A. Staphostatins: an expanding new group of inhibitors with a unique specificity for the regulation of staphopains, *Staphylococcus* ssp. Cysteine proteinases. **Mol Microbiol**, vol. 49, p.1051–66, 2003
- Safadi, F.; Mykles, D.I.; Reddy, A.S.N. Partial purification and characterization of a Ca²⁺-dependent proteinase from *Arabidopsis* roots. **Arch Biochem Biophys**, vol. 348, p. 143–1451, 1997.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.
- Sato, S.; Hirakawa, H.; Sachiko, I. *et al.* Sequence analysis of genome of an Oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. **DNA Research**, p.1-12, 2010.
- Soares, E.L.; Shah, M.U.; Rocha, A.J.; Cunha, M.A.S.; Nogueira, F.C.S.; Junqueira, M.; Carvalho, P.C.; Soares, A.A.; Domont, G.B.; Campos, F.A.P. **Biochemical and anatomical analysis of programmed cell death in the inner integument and endosperm of *Jatropha curcas* seeds**. XIII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal-XVI Reunião Latino-americana de Fisiologia Vegetal, Búzios-RJ, , p.xx, 2011.
- Solsoloy, A. D.; Solsoloy, T. S. Pesticidal efficacy of formulated *J. curcas* oil on pests of selected field crops. In: Gubitz, G.M., Mittelbach, M., Trabi, M. (Eds.), *Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas**. **DBV Graz**, p. 216–226, 1997.
- Schmittgen, T.D.; Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. **Nature Protocols**, vol. 3(6), p.1101-1108, 2008.
- Schmid, M. Simpson, D. Kalousek, F. Gietl, C. A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. **Planta**, vol. 206, p. 466-475.
- Schmid, M. Simpson, D. Gietl, C. Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. Vol. 96, p.14159–14164, 1999.
- Stennicke, H.R, Salvesen, G.S. **Caspase assays. Methods in Enzymology**, vol. 322, p. 91–100, 2000.
- Storer, A.C; Menárd, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, vol. 244, p. 486-500.
- Subbaiah, C.C.; Kollipara, K.P.; Sachs, M.M. A Ca²⁺-dependent cysteine protease is associated with anoxia-induced root tip death in maize. **J Exp Bot**, vol. 51, p. 721–30, 2000.
- Tanaka, T.; Yamauchi, D.; Minamikawa, T. Nucleotide sequence for an endopeptidases (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits. **Plant Mol Biol**, vol.16, p. 1083-1084, 1991.

Than ME, Helm M, Simpson DJ, Lottspeich F, Huber R, Gietl (2004). The 2.0-Å crystal structure of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase from germinating endosperm of *Ricinus communis* confirm its function in the final stage of programmed cell death. **J Mol Biol**. Vol. 336, p. 1102-1116.

Theresa, J. R, Elizabeth M. M and Paul F. McCabe .Programmed cell death in plants: distinguishing between differentes modes, **Journal of Experimental Botany**, vol. 59,p. 435-444, 2008.

Tong, Z; Gao, Z; Wang, F; Zhou, J; Zhang, Z. selection realiable reference genes expression studies in peach using real time PCR. **BMC Mol Biol**, vol. 10 (71), p. 12-25, 2009.

Toyooka, K.; Okamoto, T.; Minamikawa, T. Mass transport of proform of a KDEL-tailed cysteine proteinase (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmatic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. **J Cell Biol**, vol. 148, p. 453–63, 2000.

Turk, V.; Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett**, vol. 285, p. 213–219, 1991.

Uren, A.G.; O'Rourke, K.; Aravind, L.A.; Pisabarro, M.T.; Seshagiri, S.; Koonin, E.V.; Dixit, V.M. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. **Mol. Cell**, vol. 6, p. 961–967, 2000.

Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, vol. 3, p. 34.1-34.11, 2002.

Vercammen, D. Declercq, W. Vandenabeele, P.and Frank Van Breusegem. Are metacaspases caspases?. **The Journal of Cell Biology**, vol. 179, p. 375-380, 2007.

Vierstra, R.D. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. **Trends Plant Sci**, vol. 8, p. 135–42, 2003.

VULPESTRA, V.; LANGE, N.E.; GUERREIRO, C.; REID, M. Up-regulation of cysteine protease accompanies the ethilene-insensitive senescence of daylily (*Hemerocallis* flowers). **Plant Molecular Biology**, vol. 28, p. 575-582, 1995.

Wang PH, Do YS, Macaulay L, Shinagawa T, Anderson PW, Baxter JD, Hsueh WA (1991). Identification of renal cathepsin B as a human prorenin-processing enzyme. **J. Biol. Chem**. 266: 12633-12638.

Wang, C.; Barry, J.K.; Min, Z.; Tordsen, G.; Rao, AG.; Olsen, O.A. The calpain domain of the maize DEK1 protein contains the conserved catalytic triad and functions as a cysteine proteinase. **J Biol Chem**, vol. 278, p. 34467–74, 2003.

Watanabe, N.; Lam, E. Two Arabidopsis metacaspases AtMCP1b and AtMCP2b are arginine/lysine-specific cysteine proteases and activate apoptosis-like cell death in yeast. **J. Biol. Chem**, vol. 280, p. 14691–14699, 2005.

Williams, B.; Dickman, M. Plant programmed cell death: can't live with it; can't live without it. **Molecular plant pathology**, vol. 9(4), p. 531-544, 2008.

Woltering, E.J.; van der Bent, A.; Hoeberichts, F.A. Do plant caspases exist? **Plant Physiol.** Vol. 130, p. 1764–1769, 2002.

Yamada, K.; Matsushima, R.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescencing Arabidopsis leaves. **Plant Physiol**, vol. 127, p. 1626–1634, 2001.

Yamada, K.; Shimada, T.; Kondo M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. Multiple functional proteins are produced by cleaving Asn-Gln bond of a single precursor by vacuolar processing enzyme. **J Biol Chem**, vol. 274, p. 2563-2570, 1999.

ZANG, M.; WANG, Y.; ET AL. NtCP56, A new cysteine protease in Nicotiana tabacum L., involved in pollen grain development. **Journal of experimental botany**, vol.60, N.6, p.1569-1577, 2009.

8. ANEXOS